UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Oborová rada: Neurovědy

MUDr. Petra Laššuthová

Analýza genů SH3TC2 a LMNA a klinická studie u českých pacientů a rodin s autozomálně recesívními typy dědičné neuropatie – Charcot-Marie-Tooth typ 1 a 2

Doktorská disertační práce

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

Praha 2011

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Analýza genů *SH3TC2* a *LMNA* a klinická studie u českých pacientů a rodin s autozomálně recesívními typy dědičné neuropatie – Charcot-Marie-Tooth typ 1 a 2

Analysis of the *LMNA* gene and the *SH3TC2* gene among Czech patients with hereditary neuropathy Charcot-Marie-Tooth type 1 and 2

Doktorská disertační práce, Praha 2011

MUDr. Petra Laššuthová

Školitel:	*Doc. MUDr. Pavel Seeman, Ph.D*
Pracoviště:	*Klinika dětské neurologie, DNA laboratoř,* *2.LF UK a FNM* *V Úvalu 84, Praha 5, 150 06*
Oborová rada:	*Neurovědy*

PODĚKOVÁNÍ:

Touto cestou chci poděkovat především Doc. MUDr. Pavlu Seemanovi, Ph.D. za odborné vedení v průběhu mé práce, cenné rady a podnětné připomínky při psaní rukopisu, rovněž i za ochotu a laskavý přístup. Vážim si jeho odborných zkušeností, zásadový přístup a nadšení pro obor.

Poděkování patří i všem spolupracovníkům z DNA Laboratoře Kliniky dětské neurologie 2.LF UK a FNM, kteří přispěli k této práci, jmenovitě Mgr. Janě Sabové, RNDr. Janě Lisoňové a MUDr. Daně Brožkové.

Svému manželovi a rodičům děkuji za podporu, porozumění a toleranci nejen při psaní této práce, ale také v průběhu celého studia.

autorka

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, 25.02.2011

Jméno – Příjmení (hůlkovým písmem)

Podpis

*__Nehodící se škrtněte__

Obsah

SOUHRN 5
SUMMARY 8

DĚDIČNÉ NEUROPATIE CHARCOT-MARIE-TOOTH 11

I. ÚVOD 11
1. Klinické projevy onemocnění Charcot-Marie-Tooth 11
2. Průběh onemocnění Charcot-Marie-Tooth 14
3. Klasifikace Charcot-Marie-Tooth 14
4. Léčba onemocnění Charcot-Marie-Tooth 28

II. CÍLE STUDIE 29
A. Vyšetření *LMNA* genu 29
1. Cíle 29
B. Vyšetření *SH3TC2* genu 30
1. Cíle 30

III. PACIENTI A METODY 32
A. Pacienti 32
1. Gen LMNA 32
2. Gen SH3TC2 33
B. Metody 34
1. Metody použité pro analýzu všech cílových genů 34
2. Další metody použité v projektu vyšetření genu LMNA 39
3. Další metody použité v projektu vyšetření genu SH3TC2 41

IV. VÝSLEDKY 46
A. Výsledky vyšetření genu *LMNA* 46
B. Výsledky vyšetření genu *SH3TC2* 48
1. Molekulárně-genetické výsledky 48
2. Klinické výsledky 52
3. Výsledky analýzy nových mutací 69

V. DISKUSE 76
A. Gen *LMNA* 76
B. Gen *SH3TC2* 76

VI. ZÁVĚR 82
A. Gen *LMNA* 82
B. Gen *SH3TC2* 83

SVALOVÁ ONEMOCNĚNÍ 84

I. ÚVOD 84
A. Emery-Dreifuss Muskulární Dystrofie (EDMD) 84
1. X-vázaná forma 84
2. AD forma (AD-EDMD) 84
B. Kongenitální myutubulární myopatie X-vázaná 85

II. CÍLE STUDIE 86
A. Vyšetření *LMNA* genu 86

B. VYŠETŘENÍ *MTM-1* GENU 86
III. PACIENTI A METODY 87
A. PACIENTI 87
1. Gen LMNA 87
2. Gen MTM-1 87
B. METODY 88
1. Pre-PCR zpracování vzorků 88
2. Post-PCR zpracovávání vzorků 89
IV. VÝSLEDKY 91
A. GEN *LMNA* 91
1. Mutace p. Arg386Met 91
2. Mutace c.568-570dupCGG 93
B. GEN *MTM-1* 94
V. DISKUSE 96
A. GEN *LMNA* 96
1. Mutace p.Arg386Met 96
B. GEN *MTM-1* 97
VI. ZÁVĚR 98
A. GEN *LMNA* 98
B. GEN *MTM-1* 99
Použitá literatura 100
On-line zdroje 109
Seznam disertačních prací autorky 110
Prezentace na kongresech 111
Životopis 112
Seznam příloh 113

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - Složení amplifikační směsi 34
Tabulka 2 - Primery pro amplifikaci genu LMNA 35
Tabulka 3 - Primery použité pro amplifikaci genu SH3TC2 36
Tabulka 4 - Vybrané restrikční enzymy pro genotypování 42
Tabulka 5 - Sekvence primerů a značených sond pro alelickou diskriminaci 44
Tabulka 6 - Varianty nalezené sekvenováním genu SH3TC2 49
Tabulka 7 - Nalezené mutace u pacientů s CMT4C 52
Tabulka 8– Pacienti s novými mutacemi nebo jenom s jednou mutací v genu SH3TC2 69
Tabulka 9 - Frekvence nových variant v nepostižené populaci 71
Tabulka 10 - Výsledek z programu PolyPhen 73
Tabulka 11 – Souhrn analýzy nových mutací 78
Tabulka 12 - Primery použité pro amplifikaci genu MTM1 89

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Progresivní distální svalové atrofie u pacienta s chorobou CMT 12
Obrázek 2 - Deformity chodidel typu pes cavus u pacienta s chorobou CMT 13
Obrázek 3 - Postižení rukou – atrofie svalů u pacienta s CMTX1 13
Obrázek 4 - Struktura genu LMNA (podle (Brown, et al. 2001)) 24
Obrázek 5 - Princip metody MLPA 39
Obrázek 6 - Výsledný elektroforeogram pro MLPA 40
Obrázek 7 - Elektroforeogram s delecí exonu 13 40
Obrázek 8 - Mutace c.1869 C>T (p. Arg623Cys) v genu LMNA 46
Obrázek 9 - Normální nález v genu LMNA pomocí metody MLPA 47
Obrázek 10 - Mutace c.2860C>T (p.Arg954Stop) v genu SH3TC2 v homozygotním stavu 48
Obrázek 11 - Relativní frekvence mutovaných alel v genu SH3TC2 v české populaci 49
Obrázek 12 - Výsledek alelické diskriminace 51
Obrázek 13 - Rodokmeny rodin pacientů s mutacemi v genu SH3TC2 53
Obrázek 14 - Pacient z rodiny A 54
Obrázek 15 - Pacient z rodiny B 55
Obrázek 16 - Pacienti (jednovaječná dvojčata) z rodiny D 57
Obrázek 17 – Pacienti z rodiny E 58
Obrázek 18 - Pacient z rodiny F 59
Obrázek 19 - Pacientka z rodiny H 61
Obrázek 20 - Pacientka z rodiny I 62
Obrázek 21 - Pacient z rodiny J 63
Obrázek 22 - Pacient z rodiny L 65
Obrázek 23 - Pacientka z rodiny N 67
Obrázek 24 - Vyšetření metodou SnapShot na přítomnost mutací p.Gln46Pro a p.Thr27Ala. 72
Obrázek 25 - Výsledky z programu Panther 73
Obrázek 26 - Výsledky analýzy z programu ClustalX 75
Obrázek 27 - Svalová biopsie s průkazem přítomnosti emerinu 91
Obrázek 28 - Nález mutace v genu pro LMNA u pacienta s AD EDMD 92
Obrázek 29 - Konzervace DNA v oblasti mutace Arg386Met 93
Obrázek 30 - Mutace c.568-570dup CGG v heterozygotním stavu u pacientky 93
Obrázek 31 - Rodokmen rodiny s X-MTM 94
Obrázek 32 - Chromatogram části genu MTM-1 u matky pacientů 95
Obrázek 33 - Předpokládaný mechanizmus působení mutace p.Arg396Met na protein 96

Použité zkratky

A
AD EDMD - autozomálně dominantě dědičná muskulární dystrofie typu Emery-Dreifuss
AR – autozomálně recesivní dědičnost
AR-CMT2 - axonální typ CMT s autozomálně recesivní dědičností
ASD - alternative splicing diabase

C
CHN - kongenitální hypomyelinizační neuropatie
CMAP - compound muscle action potential
CMD1A - dilatační kardiomyopatie typu 1A
CMT – Charcot-Marie-Tooth
CMT2B1 – axonální autozomálně recesivně dědičná forma CMT, mutace v genu LMNA
CMT4 - demyelinizační typy CMT s autozomálně recesivním typem dědičnosti
CMT4C - demyelinizační autozomálně recesivně dědičná forma CMT, mutace v genu SH3TC2
CNV - copy number variations

D
DSS - Dejerine-Sotass syndrom

E
EDMD- Emery Dreifuss muscular dystrophy
EMD – Emerin

F
FPLD - familiární parciální lipodystrofie

G
GDAP-1 - Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1

H
HMN - dědičná motorická neuropatie (hereditary motor neuropathy)
HMSN – dědičná motoricko-senzitivní neuropatie (hereditary motor and sensory neuropathy)
HMSN I - demylinizační forma HMSN
HMSN II - axonální forma HMSN
HNPP – Tomakulózní neuropatie (Hereditary neuropathy with lability to pressure palsies)
HSN/HSAN - dědičná senzitivní neuropatie (hereditary sensory neuropathy)

L
LGMD 1B - pletencová muskulární dystrofie typu 1B

M
MLPA – multiplex ligation-dependent probe amplification
MPZ – myelin protein zero
MTM 1 - myotubularin 1

N
NCV - nerve conduction velocity

P
PCR - polymerázová řetězová reakce

R
RFLP - restriction fragment lenght polymorphism

S
SH3 - Src homology domain
St. p. – status post

T
TPR - tetratricopeptide repeat

X
X-MTM - kongenitální myotubulární myopatie X-vázaná, myotubular myopathy X-linked (centronucelar myopathy)

SOUHRN

Vyšetřili jsme gen *LMNA* sekvenováním všech kodujících exonů ve skupině 98 pacientů s axonálním typem dědičné periferní motoricko-senzitivní neuropatie Charcot-Marie-Tooth (CMT2). V tomto genu jsme nenalezli u žádného pacienta s CMT2 bialelické mutace. Následně jsem metodou MLPA a kitem pro vyšetření *LMNA* genu vyšetřila 48 vybraných pacientů, u kterých sekvenováním nebyly nalezeny mutace. MLPA je kitem sestaveným na detekci delecí a duplikací v genech (např. *LMNA*), které nejsou zachytitelné pomocí sekvenování. U žádného ze 48 vyšetřených pacientů nebyla ani metodou MLPA prokázána žádná odchylka v počtu kopií jednotlivých exonů *LMNA* genu.

Mutace v genu *LMNA* tedy nejsou častou příčinou onemocnění Charcot-Marie-Tooth v ČR a možná se u českých CMT2 pacientů ani nevyskytují. *LMNA* gen nebude zařazen do běžného diagnostického testování pacientů s dědičnou neuropatií v ČR. Výsledky této studie byly publikovány v časopise Journal of Human Genetics.

Dále jsem vyšetřila 8 pacientů s klinickým podezřením na autozomálně dominantní formu svalové dystrofie Emery-Dreifuss (AD EDMD). Kauzální mutace v genu *LMNA* byly nalezeny u dvou rodin (3 pacientů). Proto u pacientů s muskulární dystrofií typu Emery-Dreifuss doporučujeme vyšetření genu *LMNA*, když splňují přesná diagnostická kritéria a nejsou nositeli mutace v genu pro emerin. Toto vyšetření je v naší laboratoři i nadále dostupné. Výsledky této studie byly publikovány v časopise Pediatric Neurology.

Nejvýznamnější částí disertace bylo vyšetření *SH3TC2* genu u českých pacientů s HMSN I. Vyšetřila jsem gen *SH3TC2* u 60 českých pacientů s demyelinizačním typem dědičné periferní motoricko-senzitivní neuropatie. Mutace v tomto genu se ukázaly být častou příčinou onemocnění Charcot-Marie-Tooth v české populaci. Alespoň jedna mutace

byla nalezena u 13 rodin. Bialelické kauzální mutace byly nalezeny u 7 rodin. Prokázala jsem, že prevalentní mutace v tomto genu v ČR je p.Arg954Stop.

Z tohoto důvodu jsem zavedla vyšetření genotypováním pomocí vysokokapacitní a nenákladné metody TaqMan SNP genotyping Assay na tuto nejčastější mutaci. Tímto způsobem bylo vyšetřeno 412 vzorků od pacientů s různým fenotypem, kteří byli dříve zasláni k DNA vyšetření pro podezření na chorobu CMT. Mutace p. Arg954Stop byla touto metodou nalezena u 8 z nich.

Pomocí sekvenování všech 17 kodujících exonů *SH3TC2* genu jsem detekovala i nové, dosud nepopsané mutace v tomto genu. Tyto mutace jsem dále analyzovala. Pro každou z nově popsaných mutací byl vyšetřen vzorek nepostižené české populace pro vyloučení možnosti častého polymorfismu (vždy minimálně 200 kontrolních DNA). Toto bylo provedeno s použitím následujících technik: SnapShot analýza, restrikční enzymy, TaqMan SNP Genotyping Assays. Dále jsem provedla počítačovou analýzu nově nalezených mutací pro potvrzení, resp. vyvrácení jejich patogenního charakteru.

Všichni pacienti, u kterých byly nalezeny kauzální bialelické mutace v genu pro *SH3TC2* byli pozváni k neurogenetické konzultaci a vyšetřeni. Dostavilo se 12 pacientů, u nichž byla shromážděna klinická data. Byl upřesněn fenotyp pacientů s CMT4C.

Vyšetření genu pro *SH3TC2* bylo zavedeno do rutinní praxe naší laboratoře a bude součástí běžného diagnostického postupu u českých pacientů s demyelinizačním typem dědičné periferní neuropatie. Díky výsledkům a zkušenostem získaných v této mé studii je nyní možné zefektivnit a zjednodušit i zlevnit vyšetřování *SH3TC2* genu. U pacientů s HMSN I, u kterých byl již vyloučen nejčastější typ CMT1A doporučujeme na základě výsledků naší studie nejdřív použít genotypizační assay na přítomnost prevalentní mutace p.Arg954Stop, a teprve v případě negativního výsledku sekvenovat celý kódující úsek genu *SH3TC2*. Zjistili jsme, že pomocí genotypizační assaye a sekvenováním pouze těch

pacientů, u kterých byla prokázána nejčastější mutace p.Arg954Stop v heterozygotním stavu zachytíme až 92 % všech pacientů s CMT4C, tedy těch s bialelickými mutacemi v genu *SH3TC2* v české populaci, což je diagnosticky velice výhodné. Výsledky této studie byly přijaty do časopisu Clinical Genetics a článek je t.č. v tisku.

V naší laboratoři jsem také zavedla vyšetření genu *MTM1*, jehož mutace jsou příčinou X-vázané myotubulární myopatie. DNA vyšetření této závažné nemoci ani tohoto genu nebylo dosud v ČR dostupné. Byli vyšetřeni dva pacienti, dvojčata, u kterých byla nalezena mutace v tomto genu a tím se prokázala diagnóza myotubulární myopatie.

SUMMARY

The *LMNA* gene was sequenced in 98 Czech patients with axonal Charcot-Marie-Tooth(CMT 2) disease consistent with both autosomal recessive inheritance and sporadic cases. Biallelic pathogenic mutations were not found in any patients in this group. To exclude larger deletions/duplications in the *LMNA* gene not detectable by sequencing 48 patients from this group were also analyzed with multiplex ligation-dependent probe amplification method (MLPA). No rearrangements in the *LMNA* gene were detected.

Mutations in the *LMNA* gene are either absent or are very rare among Czech patients with axonal CMT. Therefore, we cannot recommend *LMNA* analysis for diagnostic testing of Czech patients with axonal CMT. These results were published in Journal of Human Genetics.

Furthermore, eight patients with clinical signs of Emery Dreifuss muscular dystrophy and pedigrees compatible with autosomal dominant inheritance were tested for mutations in the *LMNA* gene. Three patients (from two unrelated families) were shown to carry causal mutations in the *LMNA* gene. Therefore, the *LMNA* gene testing is due to be recommended for patients with clinical suspicion of Emery Dreifuss muscular dystrophy who have normal emerin. This genetic testing is now available in our laboratory. Results were published in Pediatric Neurology.

My PhD thesis put emphasis on the *SH3TC2* gene testing among Czech patients with HMSN I, mainly. Most of the results obtained are related to this project. The *SH3TC2* gene was sequenced in 60 Czech patients with demyelinating Charcot-Marie-Tooth. Mutations in this gene were shown to be a surprisingly frequent cause of CMT among Czech patients. At least one mutation was found in 13 unrelated families. Biallelic causal

mutations were found in 7 families. Mutation p.Arg954Stop was shown to be a prevalent mutation among Czech patients with CMT4C.

Based on this knowledge, a TaqMan real-time PCR assay for detection of p.Arg954Stop mutation was developed. This assay has a high-throughput and was used to test DNA samples from 412 patients who were previously sent to our laboratory for CMT DNA diagnostics and were negative for CMT1A/HNPP. Mutation p.Arg954Stop was found in 8 of them, six were homozygous, two were heterozygous.

During the sequencing of the *SH3TC2* gene several novel, not yet having been described, mutations were found. These mutations were further tested, either experimentally, either in silico.

Firstly, in order to exclude the possibility of a frequent polymorphism, DNA samples from healthy Czech population were tested for the presence of these mutations. For each and every one of the novel mutations at least 200 DNA samples were tested. Several methods and approaches were used: SnapShot method, restriction analysis (RFLP) and TaqMan SNP Genotyping Assays. Secondly, computer analysis of novel mutations was performed using different databases and online tools.

All patients with biallelic causal mutations in the *SH3TC2* gene were invited to a neurogenetic consultation. From 14 CMT4C patients, twelve came and were clinically reexamined. The phenotype of CMT4C patients was inspected, documented and described in detail.

The *SH3TC2* gene testing is now used in our laboratory on a daily basis and is highly recommended for patients with demyelinating hereditary peripheral neuropathy CMT, who were tested for CMT1A/HNPP and were negative. Thanks to this study it is now possible to make the diagnostic testing for CMT4C simpler, cheaper and more efficient. Genotyping assay for p.Arg954Stop is being used for patients with HMSN I who

were negative for CMT1A/HNPP. If a patient is negative for p.Arg954Stop, sequencing of the whole coding region of *SH3TC2* gene might follow.

According to our pilot study, we proved, that by using genotyping assay followed by sequencing of the entire coding region only in those patiens, who were heterozygous for p.Arg954Stop, we are able to detect 92 % of all CMT4C patients in Czech population. Only 8 % of CMT4C patients have biallelic pathogenic mutation other than p.Arg954Stop, it means 92 % of CMT4C patients are either homozygous or heterozygous for p.Arg954Stop. This makes the diagnostic testing for the presence of p.Arg954Stop mutation with genotyping assay a superior screening test. Results of the study were accepted for publication in Clinical Genetics.

Last but not least, sequencing analysis of the *MTM-1* gene was performed in two brothers with suspected severe myotubular myopathy . This genetic testing was not available in Czech republic until now. Two patients, gemini, with clinical suspicion on myotubular myopathy X-linked, which is caused by mutations in the *MTM-1* gene, were tested. A causal mutation was found in both of them and later also in their mother and the diagnosis was proved. Therefore, we recommend testing of *MTM-1* in patients with clinical signs of myotubular myopathy. This testing is now available in our laboratory.

DĚDIČNÉ NEUROPATIE CHARCOT-MARIE-TOOTH

I. Úvod

Choroba Charcot-Marie-Tooth (CMT), nazývaná též hereditární motoricko-senzitivní neuropatie (HMSN) je heterogenní skupinou dědičných neuropatií, kdy neuropatie je základem obtíží (*Reilly, Hanna 2002*). Je to nejčastější dědičné neuromuskulární onemocnění, s prevalencí v populaci přibližně 1:2500 (*Skre 1974; Pareyson, Marchesi 2009*). Patří k nejčastějším monogenně dědičným chorobám vůbec.

Onemocnění popsali francouzští neurologové Jean-Martin Charcot a Pierre Marie (*Charcot, Marie 1886*) a Angličan Howard Henry Tooth (*Tooth 1886*) souběžně a nezávisle na sobě v roce 1886.

1. *Klinické projevy onemocnění Charcot-Marie-Tooth*

Mezi klasické příznaky onemocnění patří kombinace symptomů vyplývajících z postižení buď primárně myelinového obalu periferního nervu anebo primárně axonu. Postižení axonů periferních nervů je u dědičné neuropatie typicky závislé na jejich délce a svalová slabost u pacientů nejlépe koreluje se stupněm axonální degenerace (*Verhamme, et al. 2004*).

Typickými příznaky dědičné neuropatie jsou distální a pomalu progresivní svalová slabost, atrofie (Obrázek 1), hypestezie a hypo až areflexie. Symptomy se začínají projevovat s maximem na akrech, dříve na dolních končetinách s progresí onemocnění postupují více proximálně. Typické je postižení chodidel, protože chronické postižení

nervu vede k deformitě nohou, většinou typu pes cavus, kladívkovým prstům a vysokému nártu (Obrázek 2). Dále se rozvíjejí typické distální atrofie svalstva dolních končetin. Později se většinou postupně přidává i postižení horních končetin (Obrázek 3), distální slabost rukou a neschopnost provést tzv. špetku. Extensory jsou většinou dříve a více postiženy slabostí než flexory (*Kuhlenbäumer, et al. 2002; Reilly, Hanna 2002; Haberlova, et al. 2006; Smetana, et al. 2008*).

Senzitivní postižení se projevuje ve stejném směru, s maximem postižení na chodidlech a rukou. Je snížená citlivost pro teplo, bolest, ale i vibrační čití. Někdy můžeme u pacientů pozorovat senzitivní ataxii. Typická je hypo až areflexie šlachosvalových reflexů na dolních i horních končetinách (*Thomas, et al. 1997; Kuhlenbäumer, et al. 2002*). Bývá i skolióza, zejména u typu CMT4C (*Horáček, et al. 2005; Azzedine, et al. 2006*)

Obrázky 1 až 3 - fotografie jsou z archivu DNA Laboratoře KDN, 2.LF UK a FN Motol.

Obrázek 1 - Progresivní distální svalové atrofie u pacienta s chorobou CMT

Obrázek 2 - Deformity chodidel typu pes cavus u pacienta s chorobou CMT

Obrázek 3 - Postižení rukou – atrofie svalů u pacienta s CMTX1

2. *Průběh onemocnění Charcot-Marie-Tooth*

Nemoc typicky začíná v první nebo druhé životní dekádě. Manifestuje se poruchami chůze, neschopností běhu, později často i deformitami nohou *(Haberlová, Seeman 2010).* Dále se rozvíjejí atrofie svalstva. Pacienti mají často i poruchy čití, které ale většinou příliš nevnímají. S postupem nemoci se rozvíjí i nešikovnost rukou. Onemocnění má zpravidla pomalu progredientní charakter (*Harding, Thomas 1980a+b; Vance 1991*). Z výše popsaného však existují četné výjimky.

3. *Klasifikace Charcot-Marie-Tooth*

Klasifikace typů dědičné neuropatie prošla postupným vývojem a i přes velký rozvoj poznatků o molekulárních příčinách dědičné neuropatie zůstává původní dělení podle klinických nálezů použitelné a platné – rozdělení na HMSN (dědičná motoricko-senzitivní neuropatie, 90 % pacientů), HMN (dědičná motorická neuropatie, 10 % pacientů) a HSN/HSAN (dědičná senzitivní neuropatie, 1% pacientů) (*Dyck, Lambert 1968b; Harding, Thomas 1980a*).

Ve druhé polovině 20. století s narůstajícím množstvím poznatků vzniká moderní klasifikace nemoci dědičných motoricko-senzitivních neuropatií a to zejména na elektrofyziologickém základě. Na tomto principu byly vyčleněny dva základní typy a to demyelinizační (HMSN I) a axonální typ (HMSN II). Jako kritérium byla zvolena rychlost vedení vzruchu periferním nervem na n.medianus na předloktí (*Dyck, Lambert 1968a; Harding, Thomas 1980a*). Pro demyelinizační typ platí, že onemocnění primárně postihuje

myelinovou pochvu, sekundárně také strukturu axonu. Tento typ je charakterizovaný sníženými rychlostmi vedení periferním nervem (rychlost vedení na n. medianus < 38 m/s). Axonální typ postihuje primárně samotný axon, až druhotně způsobuje také poškození myelinové pochvy. Pro tuto formu je tedy typické, že rychlosti vedení periferním nervem jsou normální nebo subnormální, ale v rozmezí > 38m/s (*Reilly 2000*). Dále je charakteristické snížení tzv. CMAP (compound muscle action potential, sumační svalový akční potenciál) (*Berger, et al. 2002*). Toto dělení je zásadní a používané dodnes. Později se ještě vyčlenila jednotka tzv. intermediárního typu, s rychlostmi vedení na pomezí demyelinizačního a axonálního typu (25-45 m/s) (*Verhoeven, et al. 2001*).

S rozvojem molekulárně-genetických analýz bylo možné najít kauzální příčinu onemocnění u části nemocných na genové úrovni, potvrdilo se, že se jedná o heterogenní skupinu onemocnění, způsobenou mutacemi v různých genech (databáze www.molgen.ua.be[1], www.neuromuscular.wustl.edu[2]). Klasifikace na základě elektrofyziologie byla spojena s molekulárně genetickými poznatky, které jsou v současné době k dispozici. Jsou různá kritéria pro klasifikaci dědičné neuropatie, např. podle typu dědičnosti, podle typu neuropatie. Tradičně je základní dělení na demyelinizační (typ 1), axonální (typ 2) a intermediární typ (podle elektrofyziologického nálezu). Dále pak je vhodné každou tuto podskupinu rozdělit podle typu dědičnosti na dominantní, recesivní a X-vázané formy dědičnosti (*Reilly, Hanna 2002*).

a) Demyelinizační typ CMT (HMSN I)

(1) Autozomálně dominantní dědičnost: CMT1

Jako CMT1 dnes označujeme demyelinizační typ (HMSN I) s autozomálně dominantní dědičností. Je nejčastější formou CMT (*Harding, Thomas 1980a*). K typu CMT1 vedou např. mutace v genech: *PMP22, MPZ, EGR2* a jiné (*Kuhlenbäumer, et al. 2002; Pareyson 2004*).

(a) <u>CMT1A</u>

Je nejčastější formou CMT vůbec (cca 70 % všech pacientů s CMT) (*Nelis, et al. 1996*). Je způsobená poruchami genu pro *PMP22*, a to nejčastěji duplikací 1,5Mb regionu chromosomu 17p, nebo vzácněji také bodovými mutacemi genu pro *PMP22* (*Lupski, et al. 1991; Shy, et al. 2002*). Nemocní s CMT1A mají často tzv. „klasický“ CMT fenotyp, i když existuje relativně velká variabilita (*Thomas, et al. 1997*). Postižení je často mírnější v porovnání s jinými skupinami CMT.

(b) <u>CMT1B:</u>

Jedná se o méně častou formu, způsobenou mutacemi v genu pro *MPZ*. Mutace v tomto genu však mohou také způsobovat axonální typ neuropatie (*Seeman, et al. 2004b*). Je známo více než 100 různých mutací v tomto genu (*Barisic, et al. 2008*) a je možné udělat určité genotypovo-fenotypové korelace (*Shy, et al. 2004b; Shy 2006*).

(c) <u>CMT1C</u>

Mutace v genu *LITAF/SIMLPE* (*Street, et al. 2003*) jsou příčinou CMT1C. Fenotyp může být podobný typu CMT1A (*Shy 2004a*).

(d) <u>CMT1D</u>

Příčinou CMT1D jsou mutace v genu *EGR2 (Warner, et al. 1998; Mikešová, et al. 2005).* Mutace v tomto genu mohou způsobovat i jiné klinické formy CMT / Dejerine-Sotass syndrom (DSS) a kongenitální hypomyelinizační neuropatie (CHN) (*Reilly, Hanna 2002*).

(e) <u>CMT1F</u>

Příčinou CMT1F jsou mutace v genu *NEFL (Jordanova, et al. 2003a).* Je to vzácně se vyskytující forma onemocnění s časným začátkem obtíží, někdy je přítomen i tremor a ataxie. Mutace v tomto genu mohou způsobovat i axonální formu onemocnění (CMT2E) (*Pareyson 2004*).

(f) <u>HNPP</u>

(Hereditary neuropathy with lability to pressure palsies, český název dědičná neuropatie s tendencí k tlakovým obrnám nebo také tzv. tomakulózní neuropatie) je onemocnění, které je taktéž způsobeno poruchami genu pro *PMP22*, a to konkrétně delecí 1,5Mb úseku na chromosomu 17p (*Chance, et al. 1993*). Jedná se o mírnější formu neuropatie. Fenotyp je charakterizován rekurentními atakami nervové dysfunkce (motorické i senzitivní) – obrnami v místech komprese. Opakující se ataky mají za následek neschopnost návratu plné funkce, tj. zanechávají funkční deficit. Ve vyšším věku

proto může být postižení pacientů s HNPP velice podobné CMT1A (*Szigeti, Lupski 2009*). Reflexy jsou sníženy. V nervové biopsii jsou typickým znakem tzv. tomakula (*Li, et al. 2002*), jde o buřtovitá ztluštění myelinového obalu.

(g) Dejerine-Sotass syndrom

Těžší forma onemocnění s časným začátkem v předškolním či dokonce batolecím věku – **Dejerine-Sotass syndrom** (DSS) (*Dyck. Lambert 1968a*) je označován také jako HMSN III. Pro tuto formu CMT je typické výrazné snížení rychlosti vedení periferním nervem < 10 m/s. Je opožděný časný motorický vývoj, opožděný nástup samostatné chůze, dále hypotonie a areflexie (*Saifi, et al. 2003*). Poruchy v několika různých genech mohou vést k fenotypu DSS resp. HMSN III (*Seeman, et al. 2004a*; *Mikešová, et al. 2005*; *Barisic, et al. 2008*).

(h) CHN

Ostatní typy CMT1: Další závažnou formou je **kongenitální hypomyelinizační neuropatie (CHN)**, kde klinické příznaky jsou patrné již po narození, je výrazná hypotonie, areflexie a svalová slabost a velmi výrazně snížené rychlosti vedení periferním nervem, někdy i neměřitelné (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/605253[3]). CHN je někdy považována za nejtěžší formu HMSN III (*Seeman, et al. 2002*).

(2) Autozomálně recesivní dědičnost: CMT4

Jako CMT4 označujeme demyelinizační typy CMT s autozomálně recesivním typem dědičnosti (http://www.ncbi.nlh.nih.gov/omim/214400[4])(*Pareyson 2004*). Do této skupiny řadíme 8 podtypů a je známých 9 asociovaných genů:

(a) CMT4A- *GDAP1*

(b) CMT4B1- *MTMR2*

(c) CMT4B2- *SBF2*

(d) CMT4C- *SH3TC2*

(e) CMT4D- *NDRG1*

(f) CMT4E- *EGR2*

(g) CMT4F- *PRX*

(h) CMT4H-*FGD4*

(i) CMT4J- *FTG4*

(d) CMT4C- *SH3TC2*

Ve své práci jsem vyšetřovala gen *SH3TC2*, a tedy typ CMT onemocnění označovaný jako CMT4C. Je to demyelinizační forma CMT s autozomálně recesivním typem dědičnosti v důsledku mutací v genu *SH3TC2* (*Senderek, et al. 2003; Azzedine, et al. 2006*).

Gen odpovědný za CMT4C byl dlouho neznámý. Teprve nedávno se podařilo zmapovat gen do úseku 5q23-q33 (*LeGuern, et al. 1996; Gabreëls-Festen, et al. 1999; Azzedine, et al. 2006*). Starší, původní název genu, pro který byl protein původně neznámý je *KIAA1985* (*Nagase, et al. 2001*). Gen *SH3TC2* má 17 kódujících exonů, které kódují 1288 aminokyselin. Protein SH3TC2 má několik důležitých domén, zj. SH3 doménu (Src homology domain) a TPR repetice (tetratricopeptide repeat) (www.uniprot.org/uniprot/Q8TF17[5]). Kódovaný protein je přítomen zejména v nervové tkáni (*Senderek, et al. 2003*). Bylo provedeno několik studií, které zkoumali funkci SH3TC2 proteinu (*Arnaud, et al. 2009; Lupo, et al. 2009*).

Následně byly nalezeny kauzální mutace v tomto genu u pacientů s onemocněním CMT4C, a to ve Francii, Alžíru, Španělsku, Německu, Řecku, Itálii a jinde (*Senderek, et al. 2003; Dubourg, et al. 2006*). Domnívali jsme se proto, že mutace v tomto genu mohou být příčinou onemocnění CMT4 i v české populaci. Frekvenci onemocnění CMT 4C v České republice nebylo dosud možné ani odhadovat, protože v ČR až do roku 2007 nebyl nikdo na poruchu tohoto genu vyšetřen.

Nemoc CMT je příčinou závažné morbidity i v romské populaci (*Seeman, Šišková 2006*). V této skupině lze předpokládat vyšší procento autozomálně recesivních onemocnění, vzhledem k míře endogamie a někdy i konsaguinity a uzavřenosti etnika (*Vallat, et al. 2005*). Tato hypotéza se potvrdila i ve Španělsku, kde se prokázalo, že v populaci španělských Romů AR formy CMT tvoří velkou část všech CMT onemocnění (*Kalaydjieva, et al. 2005*), a že častou příčinou jsou také mutace v genu *SH3TC2* (*Claramunt, et al. 2007*).

U pacientů s CMT4C jsou rychlosti vedení periferním nervem sníženy (< 38 m/s), průměrně v rozmezí 20-38 m/s (*Gabreëls-Festen, et al. 1999; Senderek, et al. 2003; Colomer, et al. 2006*). V období před naší studií byl tento typ považován za poměrně

vzácný. Klinicky jsou pro CMT4C typické příznaky jako u jiných forem periferní neuropatie, tedy distální svalová slabost a atrofie, poruchy čití, deformity chodidel. Výrazným znakem tohoto typu je časně nastupující závažná skolióza (*Azzedine, et al. 2006*). Upřesnit fenotyp pacientů s CMT4C bylo také součástí práce na tomto projektu. Výsledky jsou uvedeny v kapitole IV. Naše studie ukázala, že mutace v tomto genu jsou relativně častou příčinou onemocnění CMT v České republice, a současně jsme prokázali, že frekvence této formy CMT je porovnatelná s frekvencí CMT v důsledku mutací v genu *MPZ.*

<u>Ostatní typy CMT4</u>

Ostatní typy CMT4 jsou relativně méně časté. Z nich nejvíce jsou v této skupině zastoupeni pacienti s mutacemi v genu *GDAP1.* Gen kóduje protein Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 (*GDAP1*). Mutace v tomto genu byly popsány jak u pacientů s demyelinizačním typem CMT autozomálně recesivně dědičné (CMT4A), tak převážně u pacientů s axonální formou CMT, u některých pacientů byla popsána i s paréza hlasivek (*Nelis, et al. 2002; Sevilla, et al. 2008*). Mutace v genu *GDAP1* způsobují závažné formy CMT, s časným nástupem obtíží (*Baxter, et al. 2002; Báránková, et al. 2007*). V naší laboratoři je vyšetření tohoto genu běžně dostupné. V genu *GDAP1* byly v české populaci detekovány 2 prevalentní mutace (*Báránková, et al. 2007*).

(3) X-vázané formy CMT1

Mutace v genu *GJB1* pro protein Connexin 32 způsobují onemocnění CMT-X1 (*Lee, et al. 2002*). Je to druhá nejčastější forma CMT, představuje asi 10 % všech CMT (*Seeman, et al. 2003*). Postižení muži mají typický CMT1 fenotyp, ale elektrofyziologicky je často lze zařadit do intermediálního typu, s rychlostmi vedení v rozmezí 25 - 45 m/s (*Vondráček, et al. 2005*). Ženy, nosičky, mají často na EMG axonální typ postižení a jsou většinou postiženy mírně (*Seeman, et al. 2001; Mandich, et al. 2008*).

b) Axonální typ CMT (HMSN II)

Axonální typ (HMSN II) se dále dělí na autozomálně dominantní typ, který označujeme jako CMT2 (AD-CMT2) a autozomálně recesivní typ (označujeme jako AR-CMT2) (*De Sandre-Giovannoli, et al. 2002*). Axonální typ je méně častý než typ HMSN I (*Harding, Thomas 1980a; Gemignani, Marbini 2001*). Na EMG je jen lehké snížení či normální rychlosti vedení, ale jsou výrazně snížené amplitudy (*Lupski 1998*).

(1) Dominantní dědičnost

Vyskytují se při poruchách genů *MFN2* (*Boaretto, et al. 2010*), *KIF1B* (*Saito, et al. 1997*), *RAB7* (*Verhoeven, et al. 2003*), *GARS* (*Hamaguchi, et al. 2010*), *HSP27* (*Solla, et al. 2010*), *MPZ* (*Shy, et al. 2004b*).

(2) Recesivní dědičnost (AR-CMT2)

Vyskytují se při poruchách genů: *GDAP1, LMNA* a *MED25* (*http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1285*[6]). Axonální typ CMT s autozomálně recesivní dědičností je relativně častější v některých populacích, zejména. v oblastech s vyšší mírou konsanguinních sňatků, a to např. v Severní Africe a na blízkém východě (*Tazir, et al. 2004*).

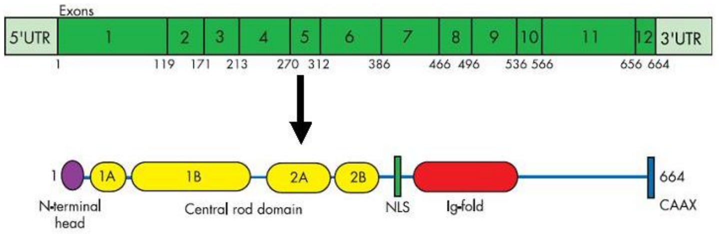
(a) AR-CMT2B1 (způsobené mutacemi v genu *LMNA*)

Kauzální mutace v genu *LMNA*, který kóduje Laminy A/C, byly popsány u pacientů s nejméně pěti různými genetickými onemocněními (*Goizet, et al. 2004*): *autozomálně dominantně dědičná muskulární dystrofie typu Emery-Dreifuss* (AD-EDMD), *pletencová muskulární dystrofie typu 1B* (LGMD 1B), *dilatační kardiomyopatie typu 1A* (CMD1A), *familiární parciální lipodystrofie* (FPLD), *autozomálně recesivně dědičná, axonální periferní neuropatie Charcot-Marie-Tooth* (AR-CMT2B1).

Laminy A/C jsou proteiny jaderné membrány a jsou členy rodiny intermediálních filament (*Vytopil, et al. 2003*). Gen je lokalizován na chromozomu 1q11-q23. Alternativním sestřihem vznikají 4 různé mRNA: A, Adel10, C a C2 (*Goldman, et al. 2002*). Struktura genu je znázorněna na obrázku 4.

Obrázek 4 - Struktura genu *LMNA* (upraveno dle (*Brown, et al. 2001*)

Legenda: Horní část obrázku odpovídá mRNA, ukazuje jednotlivé exony (1-12).
Dolní část obrázku odpovídá proteinu, ukazuje jednotlivé proteinové domény- a to N-koncovou hlavu, alfa-helikální centrální tyčovitou doménu a CAAX box.



Mutace v genu *LMNA*, které jsou spojeny se skeletálními laminopatiemi jsou rozprostřeny podél celého genu, naopak mutace způsobující FPLD jsou zejména jen v C-karboxylové doméně (*Mounkes, et al. 2003*).

V genu *LMNA* byla nalezena homozygotní mutace p.Arg298Cys v několika alžírských rodinách s nemocí Charcot-Marie-Tooth (*Bouhouche, et al. 1999; De Sandre-Giovannoli, et al. 2002; Tazir, et al. 2004*). U těchto pacientů byla pozorována relativně velká variabilita postižení, se začátkem obtíží ve věku 6 až 27 let. Elektrofyziologicky spadali pacienti převážně do kategorie HMSN II, tedy axonálního typu.

V naší studii jsme se podrobněji věnovali testování genu *LMNA* u českých pacientů s autozomálně recesivně dědičnou (častěji sporadický výskyt) periferní neuropatií axonálního typu.

c) Intermediární typ (*Reilly, Shy 2009*)

Tento typ periferní neuropatie je charakterizován rychlostmi vedení periferním nervem na pomezí demyelinizačního a axonálního typu (rychlost vedení n. medianus 25 - 45 m/s) (*Davis, et al. 1978; Jani-Acsadi, et al. 2008*). Řadíme sem několik podtypů:

- Dominant intermediate DI-CMTA - lokus 10q24.1-25.1 (*Villanova, et al. 1998*)
- Dominant intermediate DI-CMTB - mutace v genu *DNM2* (*Kennerson, et al. 2001*)
- Dominant intermediate DI-CMTC - mutace v genu *YARS* (*Jordanova, et al. 2003b*)

d) HMSN V a HMSN IV

U dalších dvou typů je periferní neuropatie v kombinaci s poškozením centrálního motoneuronu. Jedná se o **HMSN typ V** (CMT with pyramidal features (*Harding, Thomas 1984*), a **HMSN typ VI**, (periferní neuropatie s atrofií optiku) (*Voo, et al. 2003; Vucic, et al. 2003*).

Jak je ale patrné z tohoto celkového přehledu typů CMT a jejich příčin v genových mutacích, situace je komplikována tím, že poruchy jednoho genu mohou vést k různým klinickým fenotypům resp. manifestacím. A podobné klinické manifestace mohou být způsobeny poruchami různých genů. Učebnicovým příkladem je gen *MPZ (Brožková, et al. 2010)* nebo právě *PMP22*. Podle typu poruchy genu *PMP22* vzniká i typ postižení (*Lupski 1998*). Duplikace způsobují již zmíněnou formu CMT1A. Delece způsobují mírnější nesymetrické postižení, formu HNPP. Bodové mutace podle lokalizace a efektu na cílový protein mohou způsobovat jednak CMT1A, jednak HMSN III (*Roa, et al. 1993*).

e) Vzácnější typy dědičné neuropatie

(1) Hereditární motorická neuropatie

Zvaná též distal hereditary motor neuronopathy (dHMN), někdy také lépe označovaná jako dSMA (distální spinální muskulární atrofie). Skupina distálních dědičných motorických neuropatií je heterogenní skupinou onemocnění, která je klinicky charakterizovaná motorickou slabostí a atrofií distálního svalstva bez senzitivního deficitu (*Irobi, et al. 2004*). Řadíme sem sedm typů, které dělíme podle klinického obrazu, typu dědičnosti a kauzální genové poruchy (*Irobi, et al. 2006*).

(2) Hereditární senzitivní neuropatie (HSN)

Zvaná též hereditary sensory neuropathy (HSN, HSAN). Skupina dědičných neuropatií, kdy senzitivní deficit výrazně převyšuje motorický deficit, který je ale obvykle také přítomen. Nemoc vede k chronickým ulceracím akrálně, časté jsou také závažné komplikace (infekce měkkých tkání, osteomyelitis, apod.) (*Auer-Grumbach 2008*). Je to heterogenní skupina onemocnění, kterou lze rozdělit podle typu dědičnosti (autozomálně dominantně vs. autozomálně recesivně) a dále také podle příslušné genové poruchy (*Auer-Grumbach 2004*).

a) Autozomálně dominantně dědičné formy HSN

Jsou známé mutace ve dvou genech: *SPTLC1* a *RAB7*. Nejčastější příčinou jsou mutace v genu *SPTLC1*, které způsobují formu HSN *IA (Houlden, et al. 2006).*

b) Autozomálně recesivně dědičné formy HSN

Je známých několik genů, které mohou způsobovat AR HSN (*WNK1/HSN2, NTRK1, NGFB, CCT5* and *IKBAP*) (*Rotthier, et al. 2009*).

4. *Léčba onemocnění Charcot-Marie-Tooth*

V současnosti bohužel není dostupná kauzální léčba pro dědičné periferní neuropatie, i když existují některé publikované terapeutické studie na zvířatech (*Pareyson, Marchesi 2009*). U lidí je dosud k dispozici pouze symptomatická léčba. Využívají se pomocné přístupy a prevence.

Určitý význam má prevence zkracování nepostižených nebo méně postižených svalů protahováním. Celosvětově nyní narůstá pozornost věnovaná této problematice, dosud však nejsou ověřena ani sjednocena doporučení, jak mají pacienti s diagnózou dědičné periferní neuropatie cvičit (*Young, et al. 2008*). Australská skupina prosazuje progresivní svalové cvičení (*Burns, et al. 2009*). Toto však odporuje všeobecně přijímaným úvahám o mechanizmu neurogenní svalové slabosti v důsledku poškození periferního nervu, že neurogenní slabost svalu nelze posilováním odstranit, jak je to běžné u zdravého a normálně inervovaného svalu (*Vinci, et al. 2009*). Jiné skupiny proto preferují mírnější postupy, ale tato data jsou zatím většinou nepublikována.

Ortopedická péče: Má nezastupitelnou roli v péči o pacienty s dědičnými periferními neuropatiemi. A to jednak preventivní péče, používání různých korekčních pomůcek, ale i korekčních operací (*Smetana, et al. 2008*).

Medikamentózní léčba: Zatím nebyly zaznamenány slibné výsledky. I naši pacienti s CMT1A se účastnili studie s Vitaminem C, který se ve zvířecí studii příznivě ovlivnil oslabení, ale bohužel výsledky klinické studie u pacientů nebyly takové, jak bychom si pro pacienty přáli (*Micallef, et al. 2009*). Je otázkou, zda bude studie pokračovat, v jiném dávkování, nebo jiném schématu.

II. Cíle studie

CMT je jak klinicky, tak hlavně geneticky, velice heterogenní skupinou chorob. Pacienti s podobnými klinickými příznaky mohou mít mutace v různých genech a naopak, různé mutace ve stejném genu mohou vést k rozdílným fenotypům *(Wise, et al. 1993).* Ve své práci jsem se zaměřila na dvě podskupiny CMT, a to skupinu způsobenou mutacemi v genu pro *LMNA* a skupinu způsobenou mutacemi v genu pro *SH3TC2*.

A. Vyšetření *LMNA* genu

Mutace v genu *LMNA*, který kóduje laminy A a C, způsobují různá onemocnění souhrnně označená pojmem laminopatie. Laminy jsou součásti cytoskeletonu buňky (*Broers, et al. 2004*). Předpokládá se, že interakce laminů A/C se liší v jednotlivých typech buněk, a že tyto interakce jsou modifikovány více mutacemi v *LMNA* genu (*Goldman, et al. 2002*). Z toho se odvozuje široké spektrum klinických manifestací. Nově se zjistilo, že i nemoc CMT (typ 2B1) může být způsobená mutacemi v *LMNA* genu (*De Sandre-Giovannoli, et al. 2002*).

1. Cíle

- Zjistit frekvence výskytu mutací v genu *LMNA* u pacientů s axonálním typem CMT v České republice. Zjistit případné prevalentní mutace v tomto genu v české populaci.

- Ze souboru pacientů již vyšetřených pomocí sekvenování vybrat cca 50 nejvhodnějších pacientů k vyšetření větších delecí nebo duplikací v *LMNA* genu, které nemusí být zachytitelné pomocí sekvenování. Vyšetření těchto odchylek v počtu kopií (CNV) pomocí nové metody MLPA, kde je k dispozici i kit k vyšetření *LMNA* genu.

B. Vyšetření *SH3TC2* genu

Mutace v genu *SH3TC2* jsou zodpovědné za onemocnění CMT typu 4C (*Azzedine, et al. 2006*). Je to závažná demyelinizační motoricko-senzitivní neuropatie. Jejím obvyklým klinickým projevem je časně nastupující skolióza (*Houlden, et al. 2009*). V době, kdy jsem začínala své postgraduální studium, v ČR nikdo na poruchu tohoto genu vyšetřen nebyl a spektrum a frekvence mutací v tomto genu v české populaci byly zcela neznámé.

1. Cíle

- Zjistit frekvenci a spektrum mutací v genu *SH3TC2* u české populace – u českých pacientů s HMSN I.
- Vyšetřit gen *SH3TC2* a vyhodnotit výsledky u reprezentativního souboru 100 - 200 pacientů s Charcot-Marie-Tooth chorobou a tím objasnit příčinu dědičné neuropatie u další části pacientů s dědičnými neuropatiemi.
- Zjistit, které mutace v *SH3TC2* genu jsou prevalentní v české populaci pacientů s Charcot-Marie-Tooth a jak jsou relativně časté.
- Zjistit jaká je heterozygotní frekvence nejčastější *SH3TC2* mutace v normální české populaci.

- Zjistit, které mutace v *SH3TC2* genu je vhodné u nemocných s Charcot-Marie-Tooth vyšetřovat a jaký racionální a optimální postup zvolit pro diagnostiku českých pacientů s CMT 4C - navrhnout optimální postup pro efektivní detekci v naší populaci prevalentních mutací pro rutinní diagnostická DNA vyšetření pacientů s CMT 4C.
- Upřesnit neurologický a elektrofyziologický fenotyp a diagnostická kritéria pro CMT4C.
- Zjistit, zda existují korelace *SH3TC2* genotypu a závažnosti postižení u vyšetřených pacientů.
- Navrhnout optimální postup pro budoucí diagnostické DNA vyšetřování pacientů s CMT na základě zjištěných údajů o frekvenci a spektru mutací v těchto genech, spolu s analýzou dosud známých poznatků.

III. Pacienti a metody

A. Pacienti

DNA laboratoř Kliniky dětské neurologie UK 2. LF a FN Motol shromáždila v posledních 13 letech soubor s více než 3500 pacienty s podezřením na onemocnění CMT. Z tohoto rozsáhlého souboru zůstává příčina CMT i po vyšetření několika nejčastějších příčin neobjasněna asi u 40 – 50 % případů.

DNA všech pacientů byla izolována z periferní krve nebo slin (*Miller, et al. 1988*). Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas s genetickým vyšetřením na chorobu CMT. Studie byly schváleny etickou komisí FN Motol.

1. Gen *LMNA*

Z databáze byli pro vyšetření LMNA genu vybráni pacienti s axonálním typem CMT, u kterých lze předpokládat AR formu dědičnosti. U 98 takto vybraných pacientů byl vyšetřen celý kódující úsek *LMNA* genu. Z této skupiny byli dále vybráni pacienti pro vyšetření zaměřené na detekci delecí a duplikací exonů *LMNA* genu pomocí metody MLPA.

2. Gen *SH3TC2*

Pro vyšetření genu SH3TC2 byli ze souboru vybráni naopak pacienti a rodiny s demyelinizační formou CMT, kde lze předpokládat AR typ přenosu. U 60 vybraných pacientů byla provedena sekvenační analýza celého kódujícího úseku *SH3TC2* genu.

Kritéria pro výběr pacientů k vyšetření genu *SH3TC2*:

1. motoricko-senzitivní neuropatie se začátkem v první nebo druhé životní dekádě;

2. nepřítomnost klinických známek postižení u rodičů;

3. konsaguinita v rodině nebo alespoň jeden další postižený sourozenec;

4. EMG vyšetření s nálezem NCV < 38 m/s;

Cíleně jsme vybírali pacienty s údajem o skolióze v anamnéze, ale do studie byli zařazeni i pacienti bez údajů o skolióze v anamnéze.

U dalších 412 pacientů s neupřesněným fenotypem byla provedena detekce nejčastější mutace p.Arg954Stop metodou real-time PCR.

B. Metody

1. *Metody použité pro analýzu všech cílových genů*

a) Sekvenační analýza cílových genů

(1) PCR amplifikace cílových genů

Postup přípravy reakční směsi pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR): pro všechny cílové geny bylo použito obdobné složení reakční směsi (Tabulka 1 - Složení amplifikační směsi).

Tabulka 1 - Složení amplifikační směsi

Komponenty master-mixu	Objem na 1 vzorek
genomová DNA (100ng)	0,5-5,0 µL
Primer – forward (10 µM)	0,65µL
Primer – reverse (10 µM)	0,65 µL
2x PPP mix (Top-bio)	6,5 µL
$H_2 0$	doplnit objem do 3 µL
Celkový objem	13 µL

Primery byly používány v pracovní koncentraci 10 µM.
2xPlain PP mix (PPP mix) je standardně dodávaný premix pro přípravu PCR reakcí (Top Bio s.r.o., ČR).

(a) Gen *LMNA*

Celý kódující úsek genu *LMNA* včetně přilehlých intronových oblastí byl amplifikován ve 12 PCR reakcích. Byly použity primery navržené softwarem ExonLocator. Primery jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2 - Primery pro amplifikaci genu *LMNA*

		Sekvence primerů (5′→3′)		
PCR Fragment	Pokrývá exony	Forward	Reverse	Velikost produktu (bp)
1_1	1	GGG ACT GCC CCT TTA AGA GT	CAC CTC TTC AGA CTC GGT GA	497
1_2	1	AGG ACC TGC AGG AGC TCA AT	CCC TCT CAC TCC CTT CCT G	313
2	2	TGC AAA CCA ACC TAA TGC AA	AGG ACA GGT GAA TGG CTC TG	433
3	3	CTC CTT CCC TGG ACC TGT TT	TAA CCT GGG AGC TGA GTG CT	373
4	4	TTG GCC TCC CAG GAA CTA AT	CTG ATC CCC AGA AGG CAT AG	289
5	5	TAG CAG TGA TGC CCA ACT CA	GCC ATC TGA CTC CAC ATC CT	375
6	6	CTC TGG GGA AGC TCT GAT TG	CCA AGT GGG GGT CTA GTC AA	424
7	7	GGC AAC TGG CCT TGA CTA GA	CTC TGA GGG CAA GGA TGT TC	371
8_9	8, 9	TGG GCC TTT GAG CAA GAT AC	TCT AGA AAG GGG CCC TGA AT	465
10	10	TCA CTG GGG TAG ACA TGC TG	TTC CCA CTC CCT TCC TTA CC	353
11	11	GCA CAG AAC CAC ACC TTC CT	CCT ACC CCT CGA TGA CCA G	452
12	12	GGG AGA TGC TAC CTC CCT TC	GGG CAG AAA AGC AGA AGC TA	485

(b) Gen *SH3TC2*

Celý kódující úsek genu *SH3TC2* včetně přilehlých intronových oblastí byl amplifikován v 19 PCR reakcích. Byly použity primery již dříve publikované (*Senderek, et al. 2003*). Sekvence PCR primerů jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3 - Primery použité pro amplifikaci genu *SH3TC2*
(Podle: *Senderek, et al.200*3)

		Sekvence primerů (5′→3′)		
PCR fragment	Pokrývá exony	Forward	Reverse	Velikost produktu (bp)
1	1	GCTGTAGCCGGGATATCAAA	AGCACAATCATCTCCCCATC	337
2	2	CCATGCCACTAATCCTGGAA	TCATCAAGAGGGAAAGAGGG	318
3	3	CACCAGTTGAGGGTTCAGGT	GGACCTACTTTGTTCCAGATGC	338
4	4	TGACGTAAAAATCAATGCCA	TAATTACCAGAGCCAGGCCA	320
5	5	GGTCTGGGAATCAAGCTCAG	ACAGGTGGGTTCATTTGTGA	376
6	6	CCAGGAAGAAAAGTACTCCAGC	TCCACACTATGGATGCCCA	413
7	7	TTCTCAATAAACTTTTGCCATCA	TGGCTTCCCTAAATCCAGTT	348
8	8	AGTCTGGGAACCCCTCATTT	GTGCTTTTCTGGCTCCATGT	416
9	9	ATTTGCGGGAAGTTGGTTT	CATGGCCACCCAAATTCAT	378
10	10, 11	TGAATGCCAAGGCTCCTAAG	TCCAGGTAGGCCACAAACTC	629
11A	11	ACTGGTCAGGAGGAGGAGG	GGAGGGTGTCCAGAGAGGA	629
11B	11	AAGCATGAACTCGACGTGGT	TAAGAGATAGGCCCATGCCA	597
11C	11	GCCCTGTGTCTCATCCTTTC	GATGCCTTAAGCCAAACAGC	569
11D	11, 12	CCTGCAGGCTGTACGACTCT	CTTCCTTTGGCTGATGAGGA	692
13	13	GCTGTTCCTGCTCAGAGCTT	TCCACAGGCTTAGGGTGAAC	367
14	14	GGGGGACTTTAGCAGAGGAT	AGGAGAAGAGGGACTCAGGC	331
15	15	TTTTAGTCCACTGCCGTTCC	CACACAGTCTGACTCCAGGG	364
16	16	CAGCACAGTCCCTGACATCT	CTGGTTTTCTCAGCTCCACC	415
17	17	ATGTTGGGCAAACAAACAAA	AGGTAAGGACTCGGACCCTC	416

(2) Post-pcr zpracovávání vzorků

Po PCR amplifikaci byly vzorky vždy zpracovávány s použitím stejných technik, bez ohledu na cílový vyšetřovaný gen. Amplifikace byla kontrolována vizualizací na agarózovém gelu (1,5procentní). Jako interkalační činidlo byl používán Ethidium Bromid, později barvivo GelRed (Biotium, CA, USA).

Následně byly vzorky – PCR reakce - přečištěny, a to jednak buď pomocí Exo I / SAP štěpení (NEB Molecular Biology, Cleveland, Ohio, USA) nebo pomocí paramagnetických partikulí - kitem Ampure (Agencourt Ampure, Beckman Coulter, CA, USA).

Následovaly sekvenační reakce s použitím BigDye Terminator v3.1 sekvenačního kitu (Applied Biosystems, Foster City, CA) a sekvenačních primerů, které byly shodné s amplifikačními primery tak, jak je uvedeno v tabulkách 2 - 3. Sekvenovalo se vždy, pokud to bylo možné, s použitím primeru forward (ve směru čtení, všechny fragmenty kromě dále uvedených). U několika fragmentů bylo sekvenováno s použitím primeru reverse (proti směru čtení, byly to tyto fragmenty: pro gen *SH3TC2* - exon 4 a exon 15) a několik dlouhých a obtížně sekvenovatelných fragmentů bylo potřebné sekvenovat z obou stran ve dvou sekvenačních reakcích s použitím jak forward tak reverse primeru (gen *SH3TC2* - všechny fragmenty exonu 11 /5 fragmentů). Po sekvenační reakci bylo provedeno odstranění nadbytečných terminátorů kitem Agencourt CleanSeq System (Beckman Coulter, CA, USA) nebo precipitací kyselým etanolem, byly vzorky analyzovány na přístrojích ABI 3100Avant a ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Získané sekvence byly vyhodnocovány a zpracovány s použítím Sequencing Analysis software (Applied Biosystems, Foster City, CA). Porovnávání s referenční

sekvencí a zdravou kontrolou probíhalo jednak vizuálně a jednak s použitím softwaru Mutation Surveyor Software (SoftGenetics, LLC., State College, PA) anebo také programem SeqMan (DNASTAR Inc., USA). Pro jednotlivé geny byly používány tyto referenční sekvence (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez[7]):

Gen *SH3TC2* : NM_024577.3

Gen *LMNA*: NM_170707

Při sekvenování bylo dbáno obecných doporučení podle http://www.cmgs.org/BPGs/pdfscurrentbpgs/Sequencingv2.pdf[8] (*Ellard, et al. 2009*), která jsou považována za zlatý standard.

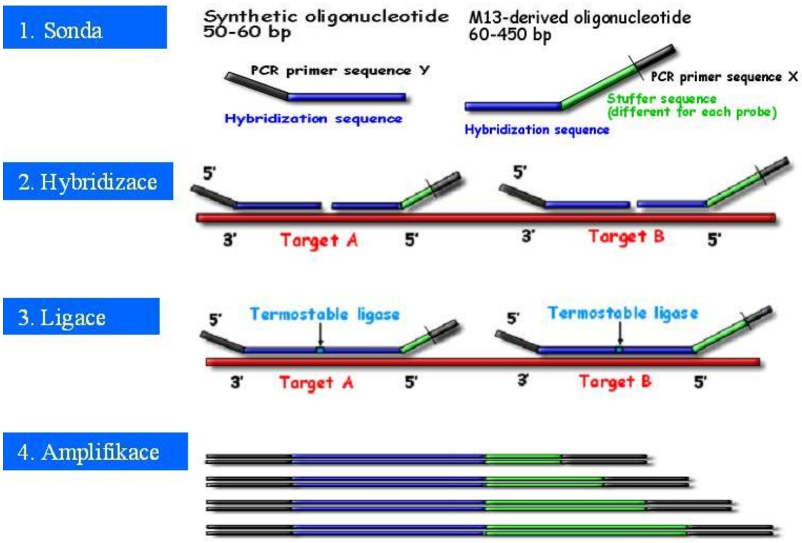
Pro objasnění významu nalezených mutací a eventuelního patogenního efektu mutací, které dosud nebyly popsány (gen *SH3TC2)*, ale také pro účely podrobnějšího zkoumání těchto genů (hledání záměn, které nejsou zachytitelné pomocí sekvenování, gen *LMNA*), byly použity i další metody, které jsou popsány níže podle jejich specifického využití u jednotlivých genů.

2. *Další metody použité v projektu vyšetření genu LMNA*

a) MLPA

Metoda MLPA (Mutliplex ligation-dependent probe amplification) je určená k detekci tzv. copy number variations (CNV), čili takových odchylek v genomové DNA od referenčního vzorku, kdy je přítomna nějaká (různě dlouhá) oblast v nadbytku (duplikace) nebo jenom v jedné, resp. žádné kopii (delece). Některé z těchto variabilit jsou nezachytitelné pomocí sekvenování (např. duplikace nebo delece celého exonu), v takovém případě lze s výhodou použít tuto metodu.

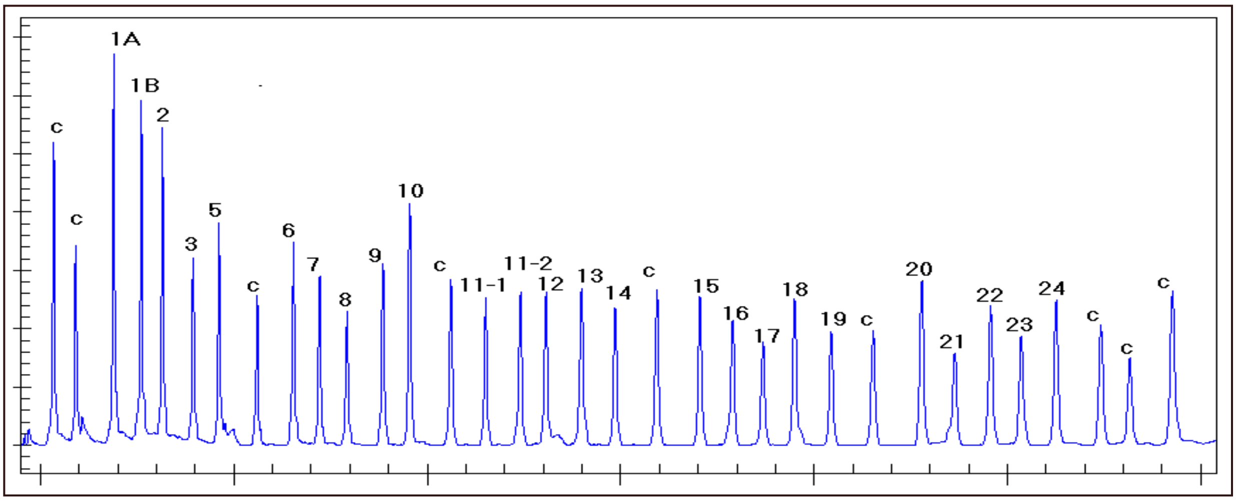
Princip spočívá v amplifikaci MLPA hybridizačních prób, které se vážou k cílové sekvenci. Není to tedy cílová sekvence, která se amplifikuje, což má tu výhodu, že lze použít jenom jeden pár primerů. Získaný produkt má délku v rozmezí 130 - 450 párových bází a lze ho analyzovat fragmentační analýzou s použitím kapilární elektroforézy na běžně dostupných genetických analyzátorech (Obrázek 5).



Obrázek 5 - Princip metody MLPA
(podle http://www.mlpa.com/[9])

Výsledným výstupem je elektroforeogram s jednotlivými píky, kde každý pík odpovídá produktu, vzniklému amplifikací dané próby (Obrázek 6).

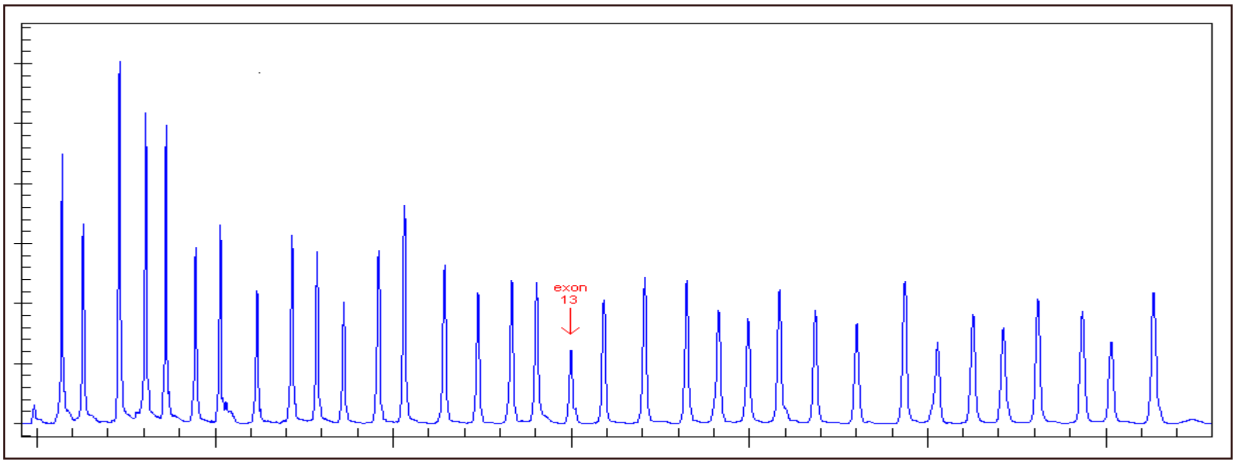
.



Obrázek 6 - Výsledný elektroforeogram pro MLPA

(převzato z http://www.mlpa.com/)

Porovnáním jednotlivých píků vůči kontrole tak lze najít právě hledané copy number variations. Rozdíl v relativní výšce nebo ploše oproti kontrolnímu vzorku = změna počtu kopií (Obrázek 7).



Obrázek 7 - Elektroforeogram s delecí exonu 13

(převzato z http://www.mlpa.com/)

Porovnání píků vůči kontrole lze jednak pouze vizuálně, vhodné je pak použít kvantifikaci podle ploch nebo výšky píků, a to s použitím různých statistických metod. Pro detekci duplikací a delecí v genu *LMNA* jsem použila vyhodnocení pomocí MLPA Excel Sheets, které pro nás připravil Andrew Wallace, MRC, London UK.

3. Další metody použité v projektu vyšetření genu SH3TC2

a) Genotypizace

(1) Genotypování pacientů na přítomnost prevalentní mutace p.Arg954Stop v SH3TC2 genu

Vybrali jsme 412 vzorků DNA od pacientů dříve zaslaných k DNA vyšetření pro podezření na chorobu CMT s dosud neobjasněnou příčinou dědičné motoricko-senzitivní neuropatie, u kterých nebyl zaznamenán autozomálně dominantní přenos onemocnění. Vybráni byli pacienti nezávisle na typu CMT neuropatie. Pacienti byli vyšetřeni metodou TaqMan® SNP Genotyping Assays.

(2) Vyšetření vzorků DNA od zdravých kontrol na přítomnost nově nalezených mutací

Pro každou nově nalezenou mutaci (v *SH3TC2* genu) bylo potřebné vyšetřit frekvenci dané mutace v zdravé české populaci, abychom vyloučili, že daná záměna je jenom častým nepatogenním polymorfizmem. Jednotlivé mutace byly v různých fázích projektu vyšetřovány různými metodami. Jednotlivé postupy jsou popsány níže.

(a) Restrikční mutační analýza

Genotypování pro mutace p.Arg954Stop, p.Val1158Ile, p.Ser433Leu a p.Lys93Lys bylo provedeno s využitím metody polymorfizmů délky restrikčních fragmentů (RFLP) při restrikčním štěpení enzymy, které jsou uvedeny v tabulce 4 (NEB, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA).

Tabulka 4 - Vybrané restrikční enzymy pro genotypování

Mutace	Použitý restrikční enzym
R954X	Taq a I, cat. No. R0149S
K93K	DraI, cat. No. R0129S
S433L	MscI, cat. No. R0534S
V1158I	HpyCH4III, cat. No. R0168S

(b) Genotypování metodou SnapShot

ABI PRISM® SNaPshot™ Multiplex Kit je určený k vyšetření až 10 známých bodových polymorfizmů v jedné zkumavce (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA). Princip metody je založen na extenzi primerů o pouze jedinou bazi cílovým komplementárním ddNTP (značeným terminátorem). SnapShot metodu jsem použila k vyšetření zdravých kontrol na přítomnost mutací p.Thr27Ala a p.Gln46Pro. Obě mutace jsou ve druhém exonu *SH3TC2* genu. Proto stačilo amplifikovat standardními podmínkami exon 2 a následně přečistit kitem Ampure. Dalším krokem je SnapShot reakce, s použitím námi navržených primerů v programu Primer Express Software v2.0 (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA) pro mutaci - p.Thr27Ala:

TGAGGCTATACACTCACTCGATACAG a pro mutaci - p.Gln46Pro: TCTTTGGCATTTGGATACCTGGATTAATGTTC. Produkty SnapShot reakce byly znovu přečištěny, tzn. zbaveny nadbytečných ddNTP – kitem Clean Seq. Dalším krokem byla kapilární elektroforéza s fragmentační analýzou v přístroji ABI 310 Prism Genetic Analyzer (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA).

(c) Genotypování metodou TaqMan® SNP Genotyping Assays

Tuto metodu genotypování jsem použila k vyšetření zdravých kontrol na přítomnost mutací p.Arg227Gln, p.Thr199Ile a p.Asp1229Val. Tato metoda byla také použita k vyšetření 412 pacientů s různým fenotypem a neobjasněnou příčinou obtíží z naší databáze na přítomnost nejčastější mutace p.Arg954Stop v *SH3TC2* genu (1. podkapitola). Pro tuto analýzu byly navrženy sekvence primerů a sond (vše AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA). Sekvence jsou uvedeny v tabulce 5. Amplifikace i post-amplifikační analýza probíhaly na přístroji ABI 7000 (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA).

Tabulka 5 - Sekvence primerů a značených sond pro alelickou diskriminaci

Název		**sekvence (3`-5`)**
R227Q_F		TTGGAAGGCGTGTCTTTGGT
R227Q_R		CTCCAAGGCTGACACCAGTAC
R227Q_V	VIC	CAGGCCCCGCTGAC
R227Q_M	FAM	CAGGCCCTGCTGAC
T199I_F		CCACCAGCCGAGAAGGAA
T199I_R		GCTTCTGCCATCTTCACTGAGA
T199I_V	VIC	CTTGCAAAGTGTCAAGC
T199I_M	FAM	CTTGCAAAGTATCAAGC
D1229V_F		TCTTCTTTGCCCCCATACCA
D1229V_R		TGCCAGGGCCAGAAGGA
D1229V_V	VIC	ATGCCCATGATGCCA
D1229V_M	FAM	TGCCCATGTTGCCA
R954X _F		ACCCATGGCCTTCTTTGTTATGAAA
R954X _R		CCAGCAGCATGGGACATACTTAC
R954X _V	VIC	TCTTTAGATGTCGATGCCTT
R954X_M	FAM	CTTTAGATGTCAATGCCTT

Legenda: F-forward primer; R-reverse primer; V- alela bez mutace; M- alela s mutací; VIC-sonda značená barvou VIC; FAM- sonda značená barvou FAM;

(d) In Silico analýza nových mutací

Pro analýzu nových mutací, resp. jejich patogenního charakteru bylo použito několik programů a databází:

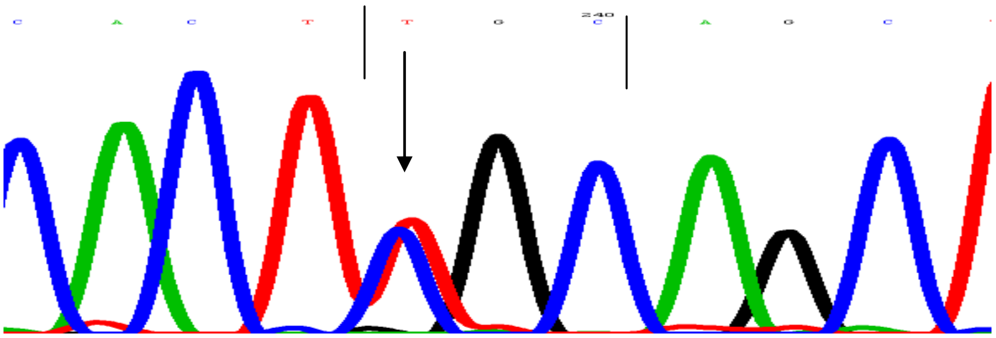
- ClustalX, program, který porovnává homologii několika sekvencí najednou (http://www.clustal.org/download/current/[10]) (*Larkin, et al. 2007*) ;
- SIFT, aplikace, která predikuje efekt záměny aminokyseliny na výslednou funkci proteinu a to na principu fyzikálních vlastností jednotlivých aminokyselin (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_aligned_seqs_submit.html[11]) (*Ng, Henikoff 2003*) ;
- PolyPhen, online nástroj, který předpovídá pravděpodobný efekt aminokyselinové záměny na funkci proteinu na základě fyzikálních, ale také strukturních porovnání (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/ [12]) (*Ramensky, et al. 2002*);
- Panther, vypočítává pravděpodobnost, že aminokyselinová záměna bude mít patogenní efekt na základě evolučních homologií (*Brunham, et al. 2005*) (http://www.pantherdb.org/tools/csnpScoreForm.jsp [13]) (*Thomas, et al. 2003a; Thomas, et al. 2003b; Thomas, Kejariwal 2004; Thomas, et al. 2006*)
- Databáze Alternative Splicing database. Tato je určená pro studium alternativního sestřihu, tzn zda daná nukleotidová záměna může ovlivnit vznik, resp. zánik akceptorového místa pro molekuly, které jsou odpovědné za správný sestřih RNA (http://www.ebi.ac.uk/asd/ [14]) (*Clark, Thanaraj 2002; Thanaraj, et al. 2004; Stamm, et al. 2006*).

IV. Výsledky

A. Výsledky vyšetření genu *LMNA*

Gen *LMNA* jsme vyšetřili sekvenováním všech 12 exonů genu *LMNA* a následně u vybraných pacientů navíc metodou Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification Method (MLPA). Tato metoda může detekovat větší delece nebo duplikace, které nejsou zachytitelné sekvenováním.

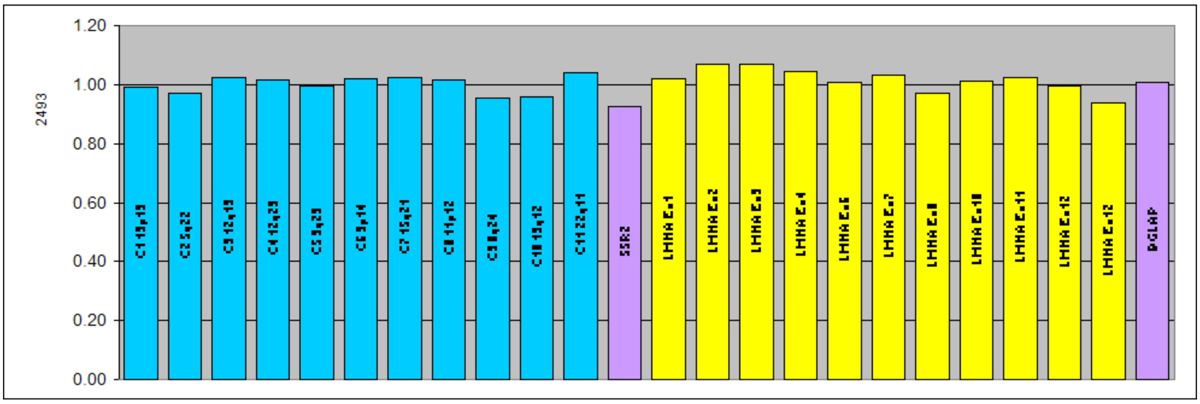
Ve skupině dědičných periferních neuropatií (AR CMT2) jsme vyšetřili pomocí sekvenování celkem 98 vybraných pacientů. Patogenní bialelické mutace nebyly prokázány u žádného z pacientů. U jednoho pacienta s těžkou formou CMT jsme prokázali jednu dosud nepopsanou mutaci v exonu 11: c.1869 C>T (p.Arg623Cys) v heterozygotním stavu (Obrázek 8), druhou kauzální mutaci se však u tohoto pacienta prokázat nepodařilo, je tedy pravděpodobné, že jde o náhodný nález bez souvislosti s CMT. Tuto mutaci jsme následně prokázali i u zdravých příbuzných pacienta, což vylučuje možnost, že by mohlo jít o dominantní mutaci.



Obrázek 8- Mutace c. 1869 C>T (p. Arg623Cys) v genu *LMNA*

Mutace je vyznačena šipkou. Dochází k zámeně tripletu CGC na TGC.

Ze skupiny pacientů s AR CMT2, u kterých jsme neprokázali mutace v *LMNA* genu sekvenováním jsme dále vybrali 48 pacientů, kterých jsme vyšetřili metodou MLPA. Žádné přestavby v genu *LMNA* jsme u nikoho z vyšetřených nepotvrdili (Obrázek 9).



Obrázek 9 - Normální nález v genu *LMNA* pomocí metody MLPA

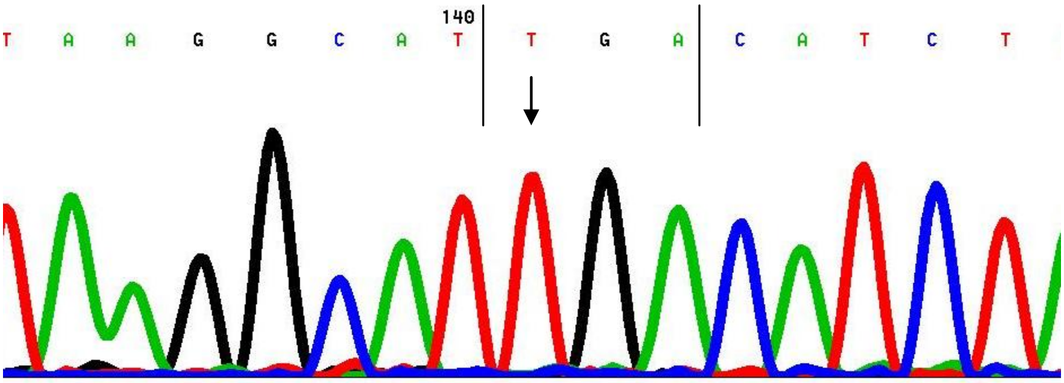
Legenda: Každý sloupec zobrazuje jednu cílovou sekvenci. Na obrázku jsou všechny cílové sekvence přítomny ve dvou kopiích.

B. Výsledky vyšetření genu *SH3TC2*

1. *Molekulárně-genetické výsledky*

a) Výsledky sekvenování

Všech 17 kódujících exonů genu *SH3TC2* bylo vyšetřeno u 60 nepříbuzných českých pacientů. Ze 60 pacientů byly mutace v genu *SH3TC2* nalezeny u 13 (21 %) pacientů, z toho u 7 pacientů (11 %) byly patogenní mutace na obou alelách genu. U zbylých 6 pacientů (10 %) byla nalezena jedna patogenní mutace, nebo nové dosud nepopsané mutace, jejichž význam bylo třeba ověřit. Prevalentní mutací v tomto genu v ČR je již popsaná p.Arg954Stop (63 % mutovaných alel, obrázek 10). Nalezené varianty jsou uvedeny v tabulce 6.

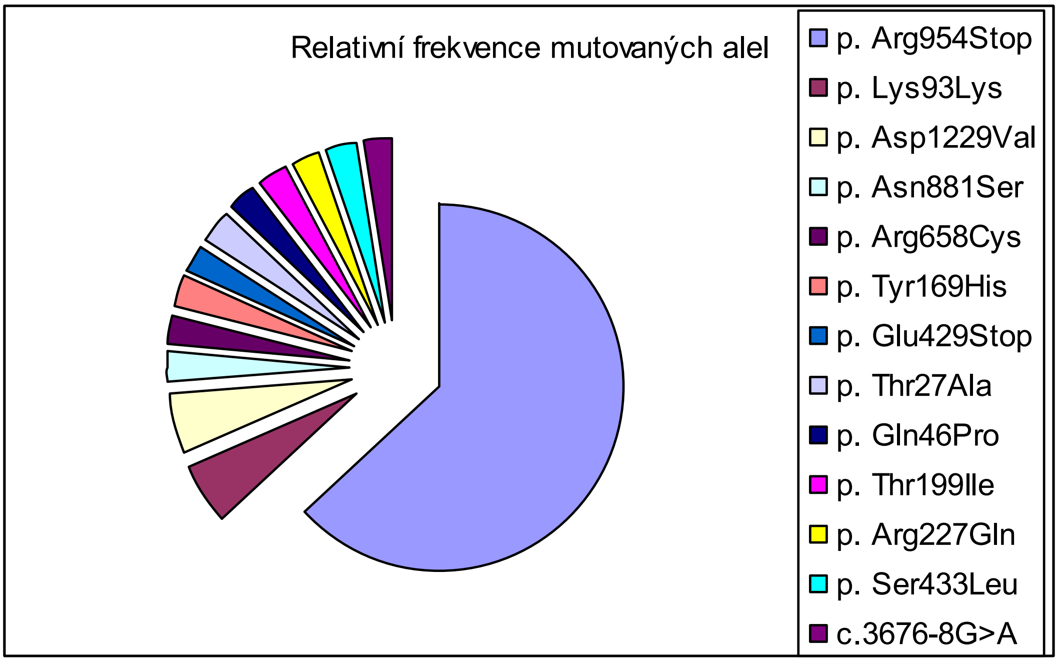


Obrázek 10 - Mutace c. 2860C>T (p.Arg954Stop) v genu *SH3TC2* v homozygotním stavu

Tabulka 6 - Varianty nalezené sekvenováním genu *SH3TC2*

Mutace	Nukleotidová pozice	Počet patogenních alel s mutací
p. Arg954Stop	c. 2860C>T	24
p. Lys93Lys	c. 279G> A	2
p. Asp1229Val	c. 3686A > T	2
p. Asn881Ser	c. 2642 A>G	1
p. Arg658Cys	c. 1972C> T	1
p. Tyr169His	c. 505T> C	1
p. Glu429Stop	c. 1285G> T	1
p. Thr27Ala	c. 231A >G	1
p. Gln46Pro	c.137A > T	1
p. Thr199Ile	c. 596C > T	1
p. Arg227Gln	c. 680G > A	1
p. Ser433Leu	c. 1450C >T	1
	c.3676-8G>A	1

Prokázali jsme, že prevalentní mutací v ČR je nonsense mutace p.Arg954Stop (63 % mutovaných alel) (Obrázek 10 a 11).

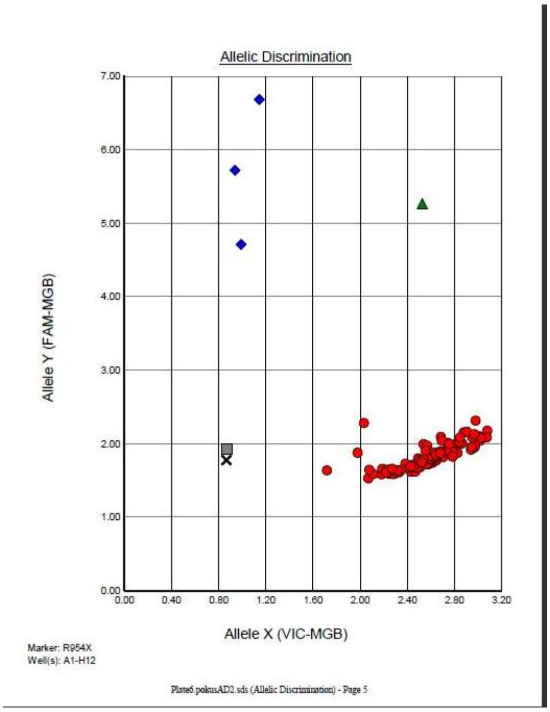


Obrázek 11 - Relativní frekvence mutovaných alel v genu *SH3TC2* v české populaci

V této studii byly nalezeny u českých CMT pacientů mutace již v literatuře popsané a považované za patogenní: stop mutace - p.Arg954Stop (*Senderek, et al. 2003*), missense mutace - p.Arg658Cys (*Senderek, et al. 2003*), p.Asn881Ser (*Azzedine, et al. 2006*), p.Tyr169His (*Lupski, et al. 2010*). Jedna mutace zatím v literatuře nebyla popsána, ale vzhledem k charakteru mutace (stop mutace) ji považujeme za patogenní: p.Glu429Stop. Ostatní missense mutace zatím nebyly v literatuře popsány a jejich charakter bylo žádoucí objasnit. Jsou to tyto mutace: p.Asp1229Val, p.Thr27Ala, p.Gln46Pro, p.Thr199Ile, p.Arg227Gln, p.Ser433Leu. Další dvě dosud nepopsané mutace nezpůsobují záměnu aminokyseliny, ale předpokládáme, že ovlivňují správný sestřih RNA, a tím vedou ke vzniku defektního proteinu: p.Lys93Lys a c.3676-8G>A. Byla také prokázána záměna p.Val1158Ile. Na základě provedených testů se ukázalo, že se jedná o nepatogenní častý polymorfizmus.

b) Výsledky cíleného testování na přítomnost mutace p.Arg954Stop u pacientů s neuropatií

Na základě předešlých výsledků jsme se rozhodli sestavit genotypizační real-time PCR assay na principu alelické diskriminace, která by detekovala mutaci c.2860C>T (p.Arg954Stop). Tímto rychlým a levným vyšetřením jsme vyšetřili 412 pacientů, kteří byli v minulosti odesláni do naší laboratoře k molekulárně-genetickému testování pro podezření na nemoc CMT. Ze 412 vzorků od pacientů byla mutace p.Arg954Stop nalezena u 8 z nich, z toho u 6 v homozygotním stavu. U dalších dvou byla mutace p.Arg954Stop nalezena pouze na jedné alele. U jednoho z nich jsme druhou mutaci našli sekvenováním, u druhého nikoliv. Všechny pozitivní výsledky nálezů mutace p. Arg954Stop byly potvrzeny následně také sekvenováním. Tato metoda bude nadále v naší laboratoři rutinně používána jako screeningový test na CMT4C (obrázek 12).



Obrázek 12 - Výsledek alelické diskriminace pro mutaci p.Arg954Stop

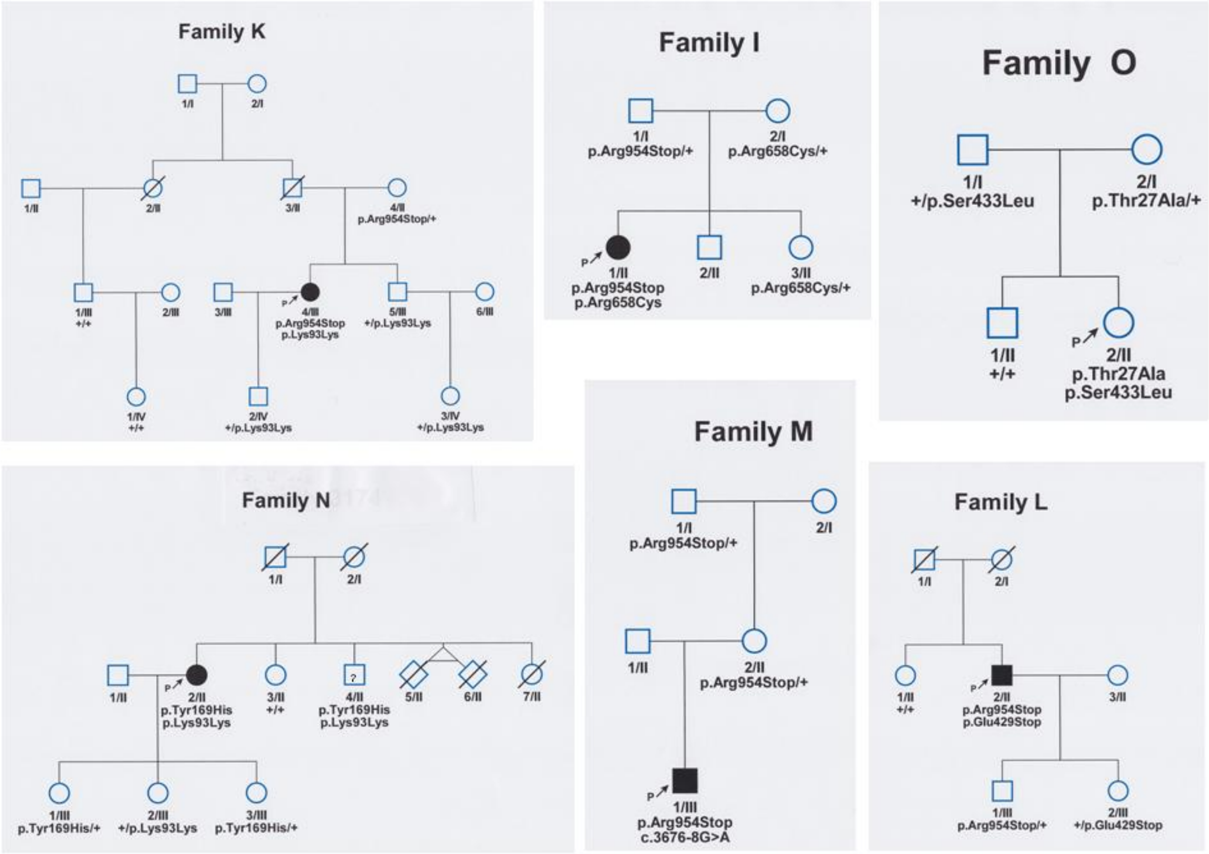
Legenda: X-ntc (H_2O, NK1), - homozygoti pro wild type alelu, - homozygoti pro mutantní alelu, - heterozygoti (ukázka výsledků).

2. *Klinické výsledky*

Bialelické patogenní mutace byly nalezeny u 14 rodin, jejich genotypy jsou uvedeny níže (Tabulka 7). Níže jsou podrobněji popsány případy jednotlivých rodin, u kterých byly nalezeny bialelické patogenní mutace. Rodokmeny jednotlivých rodin jsou na obrázku 13. Znázorněny jsou zejména rodiny, u kterých byly nalezeny i jiné mutace než prevalentní p.Arg954Stop.

Tabulka 7 - Nalezené mutace u pacientů s CMT4C

Rodina/pacient	Mutace
A/1	[p.Arg954Stop]+[p.Arg954Stop]
B/1	[p.Arg954Stop]+[p.Arg954Stop]
C/1	[p.Arg954Stop]+[p.Arg954Stop]
D/1	[p.Arg954Stop]+[p.Arg954Stop]
D/2	[p.Arg954Stop]+[p.Arg954Stop]
E/1	[p.Arg954Stop]+[p.Arg954Stop]
E/2	[p.Arg954Stop]+[p.Arg954Stop]
F/1	[p.Arg954Stop]+[p.Arg954Stop]
G/1	[p.Arg954Stop]+[p.Arg954Stop]
H/1	[p.Arg954Stop]+[p.Arg954Stop]
I/1	[p.Arg954Stop]+[p.Arg658Cys]
J/1	[p.Arg954Stop]+[p.Asn881Ser]
K/1	[p.Arg954Stop]+[p.Lys93Lys]
L/1	[p.Arg954Stop]+[p.Glu429Stop]
M/1	[p.Arg954Stop]+[c.3676-8G>A]
N/1	[p.Tyr169His]+[p.Lys93Lys]



Obrázek 13- Rodokmeny rodin pacientů s mutacemi v genu *SH3TC2*

Na obrázku jsou rodokmeny rodin, u kterých byly nalezeny i jiné bialelické mutace v genu *SH3TC2* než p.Arg954Stop. Rodina O je zmíněna v další kapitole.

Legenda: čtverec - muž, kruh - žena, kosočtverec - neznámé pohlaví, plný znak - postižený, prázdný znak - nepostižený, škrtnutý znak - zemřelý, P - proband.

a) Rodina A

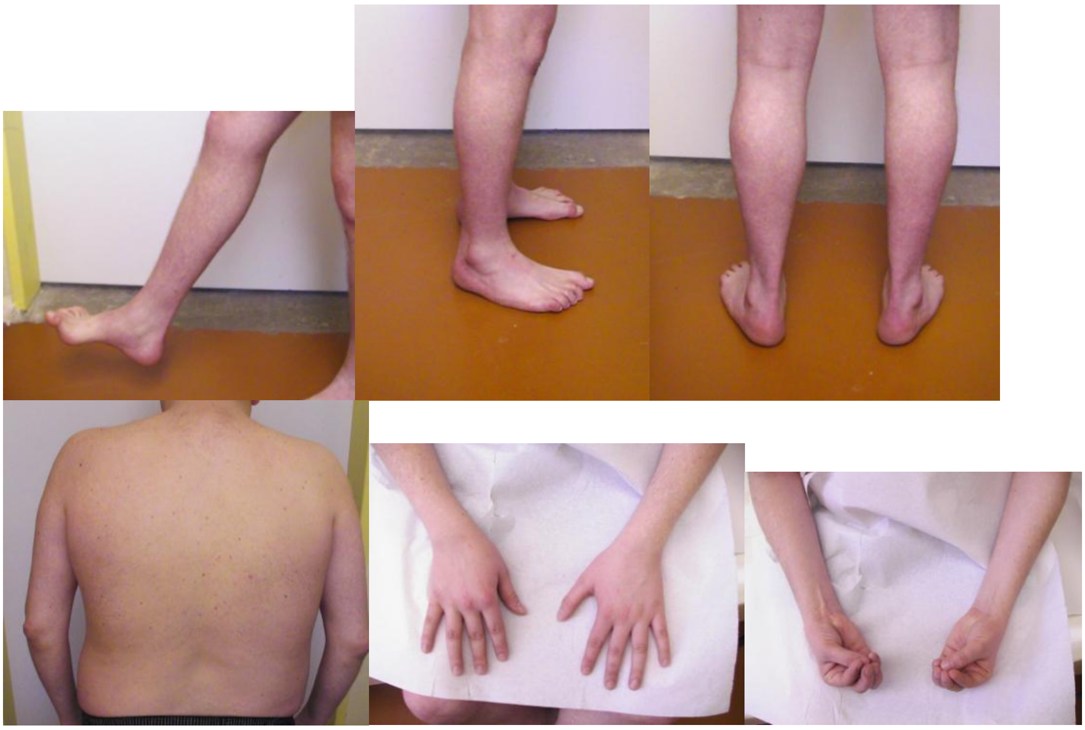
Jedná se o sporadický případ CMT v rodině. Pacient byl sledován od útlého dětství pro poruchu chůze (chodil po špičkách). V 7 letech prodělal první ortopedickou korekční operaci (prodloužení Achillovy šlachy), další korekční operaci prodělal v 18 letech věku. U pacienta byla nalezena mutace p.Arg954Stop v homozygotním stavu. Pacient byl naposledy vyšetřen ve věku 30 let (Obrázek 14).

Obrázek 14 - Pacient z rodiny A

Na dolních končetinách jsou výrazné deformity nohou, je zkrácení Achillových šlach. Na chodidlech má výrazné otlaky. Atrofie lýtek bilaterálně. Atrofie na horních končetinách nemá, ani slabost nepociťuje. Páteř má mírnou kyfoskoliózu v Th části. Chůze je samostatná, ale nejistá.

b) Rodina B

Pacient z rodiny B je jediný postižený v rodině. Nemoc se začala projevovat velice brzy, již v batolecím věku, opožděným motorickým vývojem. V 9 letech byl hospitalizován na dětské neurologii, kde na EMG byly zaznamenány výrazně snížené rychlosti vedení periferním nervem. Prodělal dvě korekční operace dolních končetin (ve věku 15 a 17 let). U pacienta jsme prokázali mutaci p.Arg954Stop v homozygotním stavu. V době posledního vyšetření bylo pacientovi 24 let (Obrázek 15).



Obrázek 15 - Pacient z rodiny B
Na panelu fotografií jsou patrné deformity obou nohou, lehké atrofie distální třetiny lýtek oboustranně. Kyfoskolióza páteře. Na horních končetinách je jen minimální subklinické postižení. Chůze je samostatná.

c) Rodina C

Pacientka je sporadickým případem CMT v rodině. První příznaky onemocnění se u ní objevily v předškolním věku, „nešikovnost“ a zakopávání. V současnosti má pacientka výrazné atrofie distálních lýtek, deformity nohou, atrofie svalů i na rukou, subjektivně pociťuje slabost.

d) Rodina D

Jedná se o jednovaječná dvojčata, u obou jsme prokázali mutaci p.Arg954Stop v homozygotním stavu. Nikdo další v rodině nemá, ani neměl, podobné potíže. Chlapcům bylo v době posledního vyšetření 11 let.

Pacient D/1 subjektivně nepociťuje obtíže, hraje fotbal, jezdí na kole. Hůře běhá. Objektivně má deformity obou nohou typu pes cavus se zkrácením Achillových šlach, rekurvace kolen bilaterálně, výraznější atrofie nemá. Na horních končetinách nejsou atrofie, slabost nepociťuje. Páteř je v ose, rozvíjí se ve všech segmentech fyziologicky (na rozdíl od bratra).

Pacient D/2 subjektivně se necítí být omezen ve svých aktivitách. Poprvé byl vyšetřen ve věku 4 let pro rozvoj skoliózy. Při vyšetření je patrné, že na dolních končetinách jsou deformity obou nohou typu pes cavus a zkrácení Achillových šlach. Na horních končetinách atrofie nejsou patrné, slabost ani neobratnost nepociťuje (Obrázek 16).

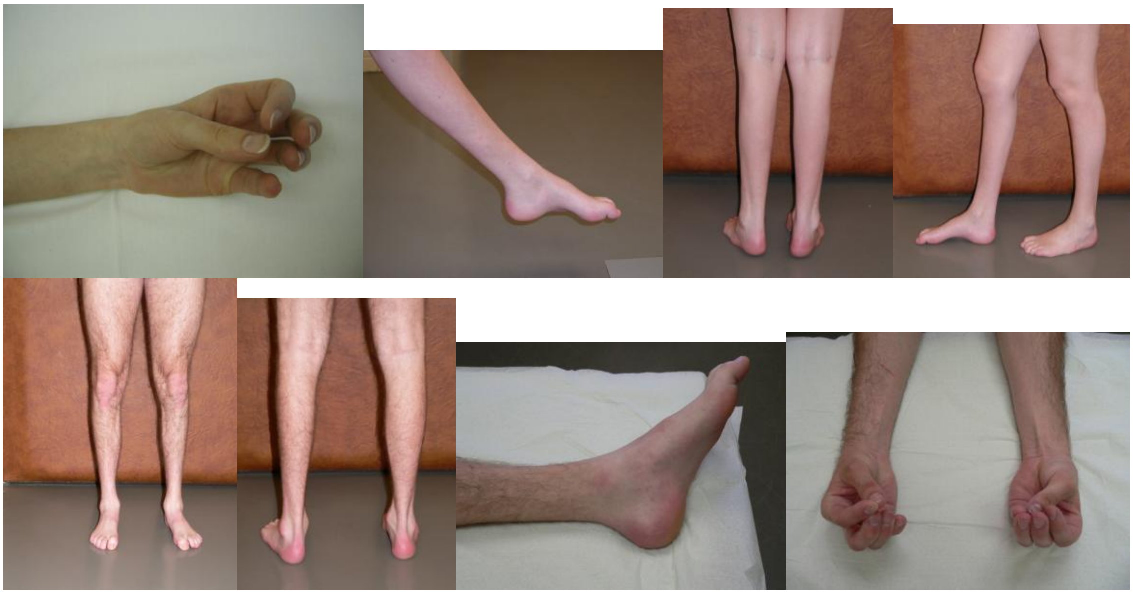
Obrázek 16 - Pacienti (jednovaječná dvojčata) z rodiny D

e) Rodina E

V rodině jsou postiženi oba sourozenci, u obou jsme prokázali mutaci p.Arg954Stop v homozygotním stavu.

U pacientky E/1 se první příznaky onemocnění začaly projevovat od 10. roku věku, zejména horší stabilita chůze a skolióza. Na obou nohou se rozvíjela deformita typu pes cavus, zkrácení Achillových šlach a atrofie peroneálních a lýtkových svalů. Od cca 20 let věku je i výraznější slabost obou rukou.

U pacienta E/2 byla prvním příznakem skolióza, a to již na ZŠ. Pro deformity dolních končetin prodělal korekční operaci nohou. Od 19 let pozoruje poruchu chůze, nyní chodí sám bez holí. V době posledního vyšetření, ve věku 35 let, je patrná výrazná skolióza a výrazné atrofie lýtek. Svaly rukou jsou zatím bez atrofie, schopnost udělat špetku je jemně omezena.



Obrázek 17 – Pacienti z rodiny E

1.řádek obrázku - pacientka E/1

2.řádek obrázku - pacient E/2

Foto: As.MUDr.R.Mazanec, Ph.D

f) Rodina F

První projevy nemoci CMT se u pacienta F/1 objevily v dospívání. Pacient si všiml, že má vyšší nárt a měl ortopedické potíže. V rodině nikdo podobné obtíže neměl, ani nemá. Pacient byl vyšetřen naposledy ve věku 67 let (Obrázek 18).

Obrázek 18 - Pacient z rodiny F

Na dolních končetinách jsou výrazné atrofie lýtek, deformita nohou. Páteř je pohledově bez výraznějšího vyosení. Na horních končetinách jsou atrofie pouze diskrétní. Chůze je samostatná, bez pomůcek, ale nejistá.

g) Rodina G

Sporadický výskyt v rodině, první příznaky CMT byly patrné již v předškolním věku – deformity nohou. Prodělal dvě korekční ortopedické operace nohou. Pacient nepřišel na konzultaci, proto nemáme aktuální údaje.

h) Rodina H

Pacientka měla od útlého dětství problémy s chůzí, již ve věku 10 let byla ortopedicky operována pro deformity nohou. Pacientka byla správně neurologicky vyšetřena až ve věku 43 let. U pacientky byla nalezena mutace p.Arg954Stop v homozygotním stavu. V době posledního vyšetření bylo pacientce 45 let (Obrázek 19).

Obrázek 19 - Pacientka z rodiny H

Závažné postižení dolních končetin, st. p. korekčních operacích. Je patrná skolióza páteře. Chodí o francouzských holích.

i) Rodina I

U pacientky z rodiny I, která je jediná postižená v této rodině, se první příznaky nemoci CMT objevily již kolem 4. roku věku, a to vysoký nárt. V průběhu celého dětství byla prý „nešikovná“, špatně běhala, měla problémy při skoku a doskoku. Prodělala korekční operaci kolen. Neurologicky byla vyšetřena až ve věku 22 let, kdy po porodu pozorovala výraznou nestabilitu a zhoršenou chůzi. V době posledního vyšetření (viz panel fotografií, Obrázek 20) bylo pacientce 35 let. U pacientky jsme prokázali dvě mutace v genu *SH3TC2*, a to mutaci p.Arg954Stop a p.Arg658Cys. Každá z mutací je na jedné alele genu *SH3TC2*. Obě mutace jsou v literatuře již popsány a jsou považovány za patogenní pro CMT4C (*Senderek, et al. 2003*).

Obrázek 20 - Pacientka z rodiny I

Jsou patrné deformity typu pes cavus na obou nohou, atrofie lýtek. Na horních končetinách je jen subklinické postižení. Páteř je pohledově bez výraznějšího vyosení do stran. Chůze je samostatná, ale velmi nejistá.

j) Rodina J

Pacient je složený heterozygot pro mutace p.Arg954Stop a p.Asn881Ser (*Azzedine, et al. 2006*). Jde o sporadický případ CMT v rodině. Nemoc se u něj projevila v předškolním věku. V době posledního vyšetření mu bylo 47 let (Obrázek 21).

Obrázek 21 - Pacient z rodiny J

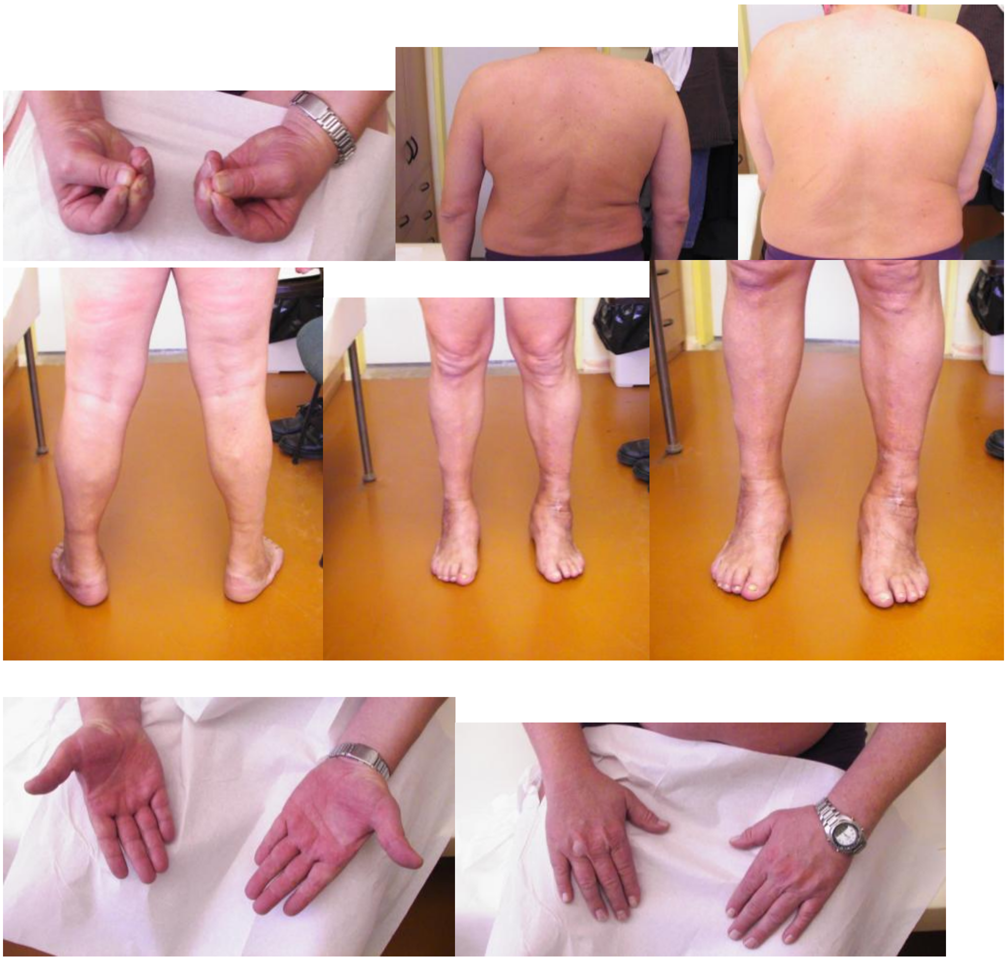
Na dolních končetinách je výrazná deformita typu pes cavus, distální atrofie. Skolióza páteře.

k) Rodina K

Pacientka je sporadickým případem CMT v rodině. První potíže se objevily v 11 letech a byly to zejména horší běh, chůze a neobratnost. Dále se rozvíjely atrofie lýtek a deformity nohou. Prodělala opakované korekční ortopedické operace. V době posledního vyšetření 52letá pacientka má výrazně rozvinuté deformity typu pes cavus, zkrácení Achillových šlach, atrofie lýtek. Na horních končetinách je jen lehká hypotrofie bilaterálně. Páteř je pohledově v ose. Pacientka je složený heterozygot pro mutace p.Arg954Stop a p.Lys93Lys.

l) Rodina L

Pacient z rodiny L je sporadickým případem CMT v rodině. Obtíže se objevily již v útlém věku - od 3 let byl sledován pro rozvoj deformit nohou. Prodělal několik korekčních operací, které vyústily v bilaterální artrodesy kotníků. Pacient je složený heterozygot pro mutace p.Arg954Stop a p.Glu429Stop. Obě mutace způsobují vznik předčasného stop kodonu.



Obrázek 22 - Pacient z rodiny L

Nyní 51letý pacient. Bilaterálně stav po opakovaných korekčních operacích nohou. Na horních končetinách atrofie nejsou patrné. Má skoliózu páteře.

m) Rodina M

Pacient se 2 mutacemi v genu pro *SH3TC2*. Mutace p.Arg954Stop je nepochybně patogenní. Druhá mutace c.3676-8G>A zatím nebyla v literatuře popsána, ale považujeme ji rovněž za patogenní na základě molekulárně-genetické studie. Mutace pravděpodobně ovlivňuje správný sestřih RNA *SH3TC2*. Pacient je nyní mimo území ČR, proto jsme neměli možnost pozvat ho ke klinické konzultaci. Z lékařské zprávy víme, že ve věku 16 let, v době posledního vyšetření, měl výrazné deformity nohou typu pes cavus a skoliózu.

n) Rodina N

Pacientka z rodiny N trpí slabostí dolních končetin asi od 12 let. Prodělala opakované korekční ortopedické operace pro deformity nohou. U pacientky jsme prokázali dvě mutace v genu *SH3TC2*. Jedna z nich byla již v literatuře popsána a je považována za patogenní - p.Tyr169His (*Lupski, et al. 2010*). Druhá mutace je nová, zatím nepopsaná - p.Lys93Lys. Stejnou mutaci jsme prokázali i u pacientky z rodiny K (Obrázek 23).

Obrázek 23 - Pacientka z rodiny N

Nyní 63letá pacientka. Na dolních končetinách jsou výrazné atrofie lýtek bilaterálně, st. p. operacích nohou. Na horních končetinách jsou patrné mírné atrofie thenaru. Páteř je v ose, pohledově skoliózu nemá.

Závěr klinických vyšetření

Klinický obraz CMT4C (způsobené mutacemi v *SH3TC2*) byl u všech našich pacientů podobný:

- U všech se první obtíže objevily do 10 let věku a byly většinou spojené s výraznými deformitami chodidel a závažnou skoliózou. Postižení je spíše mírnější a samostatná chůze byla u všech pacientů zachována.
- V neurologickém nálezu je výraznější slabost na dolních končetinách a jen minimální postižení rukou.
- Nápadná je i výrazná porucha čití, zejména vibračního na dolních končetinách.

3. *Výsledky analýzy nových mutací*

a) Pacienti s dosud nepopsanými mutacemi nebo pouze s jednou mutací v genu *SH3TC2*

V průběhu sekvenování celé kódující části *SH3TC2* genu byly nalezeny i nové, dosud nepopsané, mutace v šesti rodinách (rodiny O, R, S, T, U a V - tabulka 8). U pacienta z rodiny P byla nalezena mutace p.Arg954Stop pomocí genotypizační assaye. U tohoto pacienta jsme nenalezli druhou mutaci sekvenováním všech exonů genu *SH3TC2*.

Tabulka 8 – Pacienti s novými mutacemi nebo pouze s jednou mutací v genu *SH3TC2*

Rodina/pacient	Mutace
O/1	[p.Thr27Ala]+[p.Ser433Leu]
P/1	[p.Arg954Stop]
R/1	[p.Gln46Pro]
R/2	[p.Gln46Pro]
S/1	[p.Asp1229Val]
T/1	[p.Asp1229Val]
U/1	[p.Thr199Ile]
V/1	[p.Arg227Gln]

(a) <u>Pacientka z rodiny O</u>

U této pacientky jsme prokázali dvě mutace v genu *SH3TC2*. Obě mutace dosud nebyly popsány. Každá z mutací je na jedné alele genu *SH3TC2* (rodokmen je zobrazen na obrázku 13). Pacientka byla odeslána na molekulárně-genetické vyšetření na přítomnost CMT na naše pracoviště. Při vyšetření bylo zjištěno, že u pacientky nejsou žádné známky periferní neuropatie. Obtíže, které měla v minulosti, již pominuly. Pacientka je tudíž z našeho pohledu zdráva. To svědčí proti patogennímu charakteru mutací, které u ní byly prokázány.

(b) <u>Rodina R</u>

V této rodině jsou postiženi oba sourozenci. U obou jsme nalezli mutaci p.Gln46Pro v heterozygotním stavu. Druhá mutace v genu *SH3TC2* ale nebyla nalezena. Při opakovaném EMG vyšetření byl předefinován typ neuropatie na axonální. Jejich klinické obtíže jsou zejména nestabilita a deformity nohou. Svalové atrofie jsou jen mírné. Skolióza nebyla zaznamenána.

(c) <u>Rodiny S, T, U a V</u>

U těchto pacientů byla nalezena vždy pouze jedna mutace v genu *SH3TC2* v heterozygotním stavu. Hlavním klinickým příznakem byla u všech nestabilita chůze. Deformity nohou byly přítomné pouze u pacienta z rodiny V. Pacient z rodiny T má skoliózu.

Dále jsme se zaměřili na analýzu nových variant, které byly nalezeny sekvenováním a nebyly dosud v literatuře popsány. Jejich význam proto bylo potřebné objasnit. V průběhu studie jsme využili různé přístupy tak, jak jsou popsány v sekci metody.

b) Vyšetření zdravých kontrol

Vyšetření zdravých kontrol ukázalo, že mutace p.Val1158Ile, p.Gln46Pro a p.Ser433Leu jsou přítomné i ve zdravé české populaci (Tabulka 9). To svědčí proti jejich patogennímu charakteru.

Tabulka 9 - Frekvence nových variant v nepostižené populaci

Mutace	Počet vyšetřených zdravých alel/chromosomů	Četnost výskytu mutace v nepostižené populaci
p.Lys93Lys	524	0
p.Ser433Leu	598	0.167% alel
p.Thr27Ala	492	0
p.Gln46Pro	492	0.406% alel
p.Val1158Ile	386	2.5% alel
p. Asp1229Val	240	0
p.Thr199Ile	240	0
p.Arg227Gln	240	0

- Pomocí RFLP (restrikční analýzy) byly testovány tyto mutace:

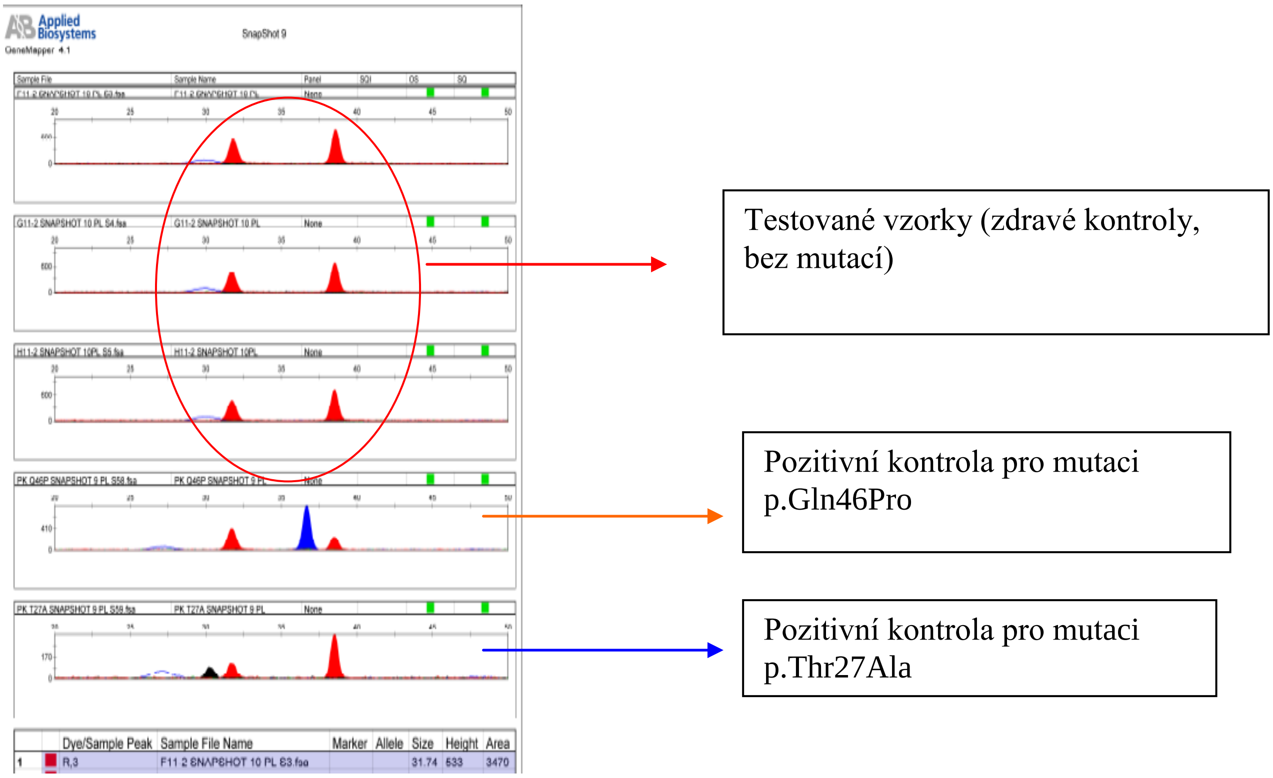
  p.Lys93Lys, p.Ser433Leu, p.Val1158Ile.

- Pomocí alelické diskriminace byly vyšetřeny tyto mutace:

  p. Asp1229Val, p.Thr199Ile, p.Arg227Gln.

- Pomocí metody SnapShot byly testovány tyto mutace (obrázek 24):

  p.Thr27Ala, p.Gln46Pro.



Obrázek 24 - Vyšetření metodou SnapShot na přítomnost záměn p.Gln46Pro a p.Thr27Ala (ukázka výsledků)

c) In silico analýzy

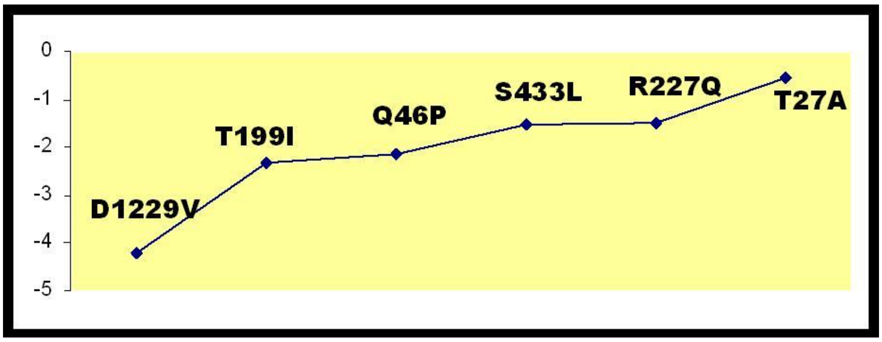
Dále jsme nově nalezené varianty testovali pomocí počítačových analýz.

- Analýza v programu **PolyPhen** ukázala, že mutace p.Asp1229Val, p.Gln46Pro, p.Ser433Leu mohou mít patogenní efekt na cílový protein (Tabulka 10).

Tabulka 10 - Výsledek z programu PolyPhen

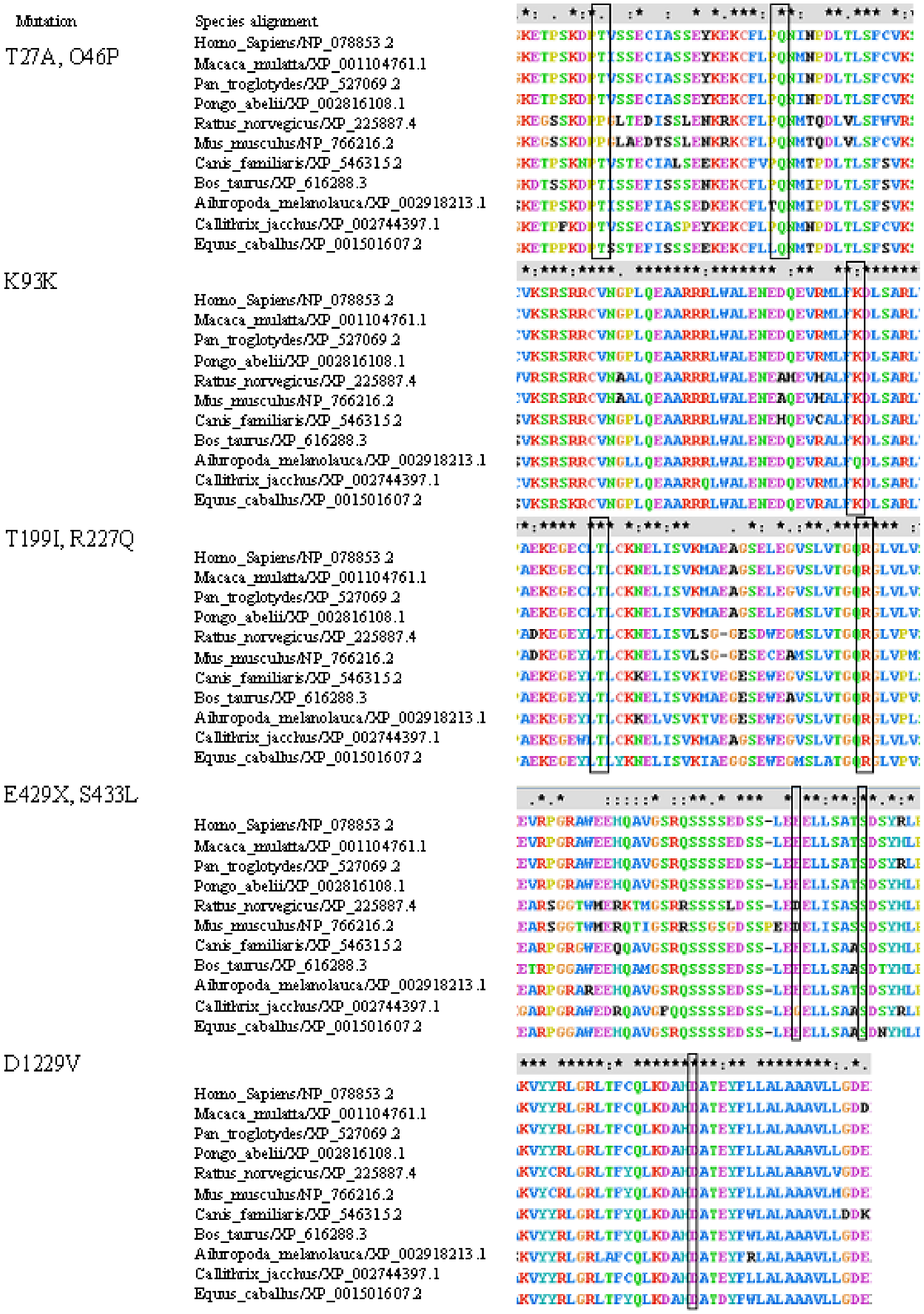
Mutace	**Výsledek (PolyPhen)**
D1229V	**probably damaging**
T199I	**benign**
Q46P	**probably damaging**
S433L	**probably damaging**
R227Q	**benign**
T27A	**benign**

- Analýza v programu **Panther** ukázala, že mutace p.Asp1229Val má pravděpodobně patogenní efekt (hodnoty menší než 3 jsou významné) (Obrázek 25).



Obrázek 25- Výsledky z programu Panther

- Analýza v programu **ClustalX**, který porovnává homologii DNA pro jednotlivé živočišné druhy, ukázala, že mutace p.Thr27Ala není vysoce konzervována (Obrázek 26).
- Analýza v programu **SIFT** ukázala, že mutace p.Asp1229Val a p.Gln46Pro mohou mít patogenní efekt.
- **Databáze ASD** potvrdila, že obě mutace, u kterých jsme to předpokládali (p.Lys93Lys a c.3676-8G>A) mohou ovlivňovat správný sestřih RNA.



Obrázek 26 - Výsledky analýzy z programu ClustalX

V. Diskuse

A. Gen *LMNA*

Z výsledků usuzujeme, že bodové mutace a větší přestavby v *LMNA* genu jsou velice vzácně příčinou onemocnění CMT2 v české populaci nebo se u nich vůbec nevyskytují. Naše výsledky jsou v souladu s mezinárodními, protože dosud nebyl celosvětově v odborných časopisech publikován další článek, který by ukazoval na možnost CMT2 následkem mutací v *LMNA* genu (kromě původní publikace o několika rodinách v severní Africe (*De Sandre-Giovannoli, et al. 2002*). Vyšetření genu *LMNA* proto nebude v budoucnu součástí rutinního testování pacientů s CMT v ČR.

B. Gen *SH3TC2*

Prokázali jsme, že mutace v genu *SH3TC2* jsou relativně častou příčinou HMSN I v české populaci. Tyto mutace jsou častější, než se původně předpokládalo. Pacienty s demyelinizačním typem dědičné neuropatie je vhodné testovat na přítomnost mutace p.Arg954Stop, nebo i jiných mutací v genu *SH3TC2*. Dříve publikované review o vhodném diagnostickém algoritmu pro pacienty s CMT z roku 2009 (*England, et al. 2009*) například vůbec nezmiňuje typ CMT4C. V naší práci jsme ukázali, že je naopak velmi vhodné zařadit tento gen do základního testování pro pacienty s HMSN I. CMT4C je v české populaci velmi časté onemocnění, četnost výskytu je porovnatelná s CMT v důsledku mutací v genu pro MPZ a je možné, že se jedná o nejčastější autozomálně recesivní formu CMT v ČR.

Prevalentní mutací v genu *SH3TC2* v ČR je p.Arg954Stop (63 % patogenních alel). Podobná situace je i v jiných populacích (*Gosselin, et al. 2008; Houlden, et al. 2009*). To usnadňuje DNA testování, protože pacienti s HMSN I budou přednostně testováni na přítomnost této mutace.

Cílené testování prevalentní mutace p.Arg954Stop a poté sekvenování celé kódující části genu *SH3TC2* pouze u těch pacientů, u kterých byla nalezena mutace p.Arg954Stop na jedné alele, zachytí 92.86 % všech CMT4C pacientů. Jenom méně než 8 % pacientů má na obou alelách genu *SH3TC2* jiné patogenní mutace než p.Arg954Stop. Z tohoto důvodu doporučujeme testovat pacienty s HMSN I, u kterých lze předpokládat autozomálně recesivní dědičnost a kteří byli testováni na CMT1A/HNPP s negativním výsledkem, na přítomnost prevalentní mutace p.Arg954Stop v genu *SH3TC2.* V případě potřeby je poté možné provést i sekvenování všech kódujících exonů genu *SH3TC2.*

U CMT4C pacientů s bialelickými patogenními mutacemi v genu *SH3TC2* bylo možné upřesnit fenotyp tak, jak je to uvedeno ve výsledkové části.

Souhrn analýzy nových mutací

Na základě analýzy nových, mutací bylo zjištěno (souhrn v tabulce 11):

I. Záměna p.Val1158Ile je pouze benigní polymorfizmus.

II. Mutace p.Thr27Ala a p.Ser433Leu jsou nepatogenními vzácnými polymorfizmy.

III. Mutace p.Thr199Ile je nepatogenní vzácný polymorfizmus.

IV. Povahu mutace p.Arg227Gln nebylo možné zcela jasně určit.

V. Mutace p.Asp1229Val může být patogenní.

Tabulka 11 – Souhrn analýzy nových mutací

Mutace\Nástroj analýzy	SIFT	PolyPhen	Panther	ClustalX	Populační frekvence	Závěr:
p.Thr27Ala	Benigní	Benigní	Benigní	Není vysoce konzervovaná	0	Benigní
p.Gln46Pro	Benigní	Patogenní	Benigní	Konzervovaná	0,406%	Benigní
p.Thr199Ile	Benigní	Benigní	Benigní	Konzervovaná	0	Benigní
p.Arg227Gln	Patogenní	Benigní	Benigní	Konzervovaná	0	?
p.Ser433Leu	Benigní	Patogenní	Benigní	Konzervovaná	0,167%	Benigní
p.Asp1229Val	Patogenní	Patogenní	Patogenní	Konzervovaná	0	Pravděpodobně patogenní

I. p.Val1158Ile

Tato záměna je častým polymorfizmem. Vyskytuje se ve zdravé populaci s frekvencí 2,5 %. Tato záměna je nyní uvedena i v databázi SNP (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp?term=rs55853803[15]).

II. p.Ser433Leu a p.Thr27Ala

Tyto záměny byly nalezeny v heterozygotním stavu u pacientky z rodiny O. Příznaky, které měla v době, kdy byla zařazena do studie, již pominuly. Při opakovaném vyšetření během studie bylo ukázáno, že pacientka opravdu nemá žádné příznaky nemoci CMT. To svědčí proti patogennímu charakteru výše zmíněných mutací. Obě mutace byly dále vyhodnoceny jako benigní většinou

použitých algoritmů. Mutace p.Ser433Leu byla nalezena i ve zdravé populaci s frekvencí 0,167 %.

III. p.Thr199Ile

Předpokládáme, že záměna p.Thr199Ile je benigní. Usuzujeme tak na základě toho, že byla vyhodnocena jako benigní ve většině použitých algoritmů. Také klinické projevy u pacienta s touto mutací jsou odlišné od CMT4C pacientů. Záměna se ale nachází ve vysoce konzervované oblasti a nebyla nalezena u zdravých kontrol, proto její patogenní charakter nelze zcela vyloučit.

IV. p.Arg227Gln

Povahu této záměny je obtížné stanovit. Vyhodnocovaní programy PolyPhen a Panther vyhodnotily tuto záměnu jako benigní. Na druhé straně, mutace se nachází ve vysoce konzervované oblasti a nebyla nalezena u zdravých kontrol. Také algoritmus SIFT jí přiřadil patogenní vlastnosti. Předpokládáme, že tato záměna bude předmětem dalších experimentů.

V. p.Asp1229Val

Tato mutace je s velkou pravděpodobností patogenní. Svědčí pro to všechny použité testovací algoritmy. Mutace samotná se nachází v důležité doméně SH3TC2 proteinu. To, že u pacientů s touto mutací nebyla nalezena mutace na druhé alele genu *SH3TC2* si vysvětlujeme několika způsoby. Je možné, že druhá mutace je v oblasti, která nebyla sekvenována (nekódující části, intronové oblasti). Je také možné, že na druhé alele genu *SH3TC2* je větší delece nebo duplikace, kterou nezachytíme sekvenováním. V neposlední řadě je možné, že

mutace je patogenní (tzn ovlivňuje alelu genu *SH3TC2*), ale není zodpovědná za nemoc CMT u tohoto konkrétního pacienta, který může mít mutace v jiných CMT genech a je pouze heterozygotním nosičem mutace p.Asp1229Val v genu *SH3TC2*.

Dále jsme se zaměřili na dvě mutace, které nezpůsobují sice záměnu aminokyselin, ale s velkou pravděpodobností ovlivňují správný sestřih RNA: **p.Lys93Lys** a **c.3676-8G>A**. Tyto mutace nebylo možné otestovat s použitím stejných algoritmů, jaké jsme použili pro missense mutace.

➢ **p.Lys93Lys**

Tato mutace byla nalezena u dvou rodin, vždy v heterozygotním stavu v kombinaci s již popsanou patogenní mutací na druhé alele genu *SH3TC2*. Klinické projevy nemoci CMT u pacientů s touto mutací odpovídaly fenotypu CMT4C. V rodině K mutace segregovala s postižením (Obrázek 13). V rodině N jsme tuto mutaci našli i u bratra pacientky, který je stejně jako jeho postižená sestra složeným heterozygotem pro mutace p.Tyr169His a p.Lys93Lys v genu *SH3TC2*. Bohužel nebylo možné ho klinicky vyšetřit. On sám tvrdí, že žádné potíže nemá.

Toto zjištění si vysvětlujeme tak, že jeho postižení může být jen mírné a on sám si to neuvědomuje. Zodpovědět tuto otázku by mohlo EMG vyšetření, to ale pacient odmítá. Je také možné, že v případě, že bratr pacientky z rodiny N je skutečně zdravý, tak by aspoň jedna z mutací, kterých je nositelem, nebyla patogenní. Lze však předpokládat, že to může být i mutace p.Tyr169His. Ta

sice byla v literatuře popsána jako patogenní (*Lupski, et al. 2010*), ale pouze v jedné rodině a tato mutace je navíc missense.

Na potvrzení patogenního charakteru mutace p.Lys93Lys plánujeme provést vyšetření pomocí ExonTrap, což je vektor, který se po zaklonování přenese do savčích buněk. S jeho využitím lze testovat sestřih RNA (http://www.mobitec.com/int/products/bio/04_vector_sys/index.php?exontrap.html[16]).

- **c. 3676-8G>A**

Tato mutace byla nalezena u pacienta z rodiny M v heterozygotním stavu v kombinaci s mutací p.Arg954Stop, která je nepochybně patogenní. Předpokládáme, že mutace c.3676-8G>A působí mechanizmem alternativního sestřihu, podobně jako mutace p.Lys93Lys. Pacient M klinicky odpovídá ostatním CMT4C pacientům (s bialelickými kauzálními mutacemi v genu SH3TC2.) Také pro tuto mutaci plánujeme použít ExonTrap.

VI. Závěr

A. Gen *LMNA*

Mutace v genu *LMNA* nejsou častou příčinou onemocnění Charcot-Marie-Tooth v české populaci. Dá se předpokládat, že stejná situace bude i v jiných evropských zemích. Analýza genu *LMNA* není opodstatněná u českých pacientů s Charcot-Marie-Tooth.

Výzkum byl proveden s podporou grantu MZČR IGA NR 8330-3.

Výsledek studie vyšetření genu pro Lamin A/C u českých pacientů s HMSN byl popsán:

Lassuthová P, Baránková L, Haberlová J, Mazanec R, Wallace A, Huehne K,Rautenstrauss B, Seeman P. **Mutations in the LMNA gene do not cause axonal CMT in Czech patients.** J Hum Genet. 2009;54(6):365-8.

B. Gen *SH3TC2*

Mutace v genu *SH3TC2* jsou překvapivě častou příčinou HMSN I mezi českými pacienty. Prevalentní mutací je p.Arg954Stop (63 % patogenních alel). Testování by primárně mělo být zaměřeno na tuto mutaci. Je obtížné stanovit patogenitu některých nově nalezených, dosud nepopsaných, mutací. Vyšetření genu *SH3TC2* doporučujeme u pacientů s HMSN I, kteří byli testováni na CMT1A/HNPP s negativním výsledkem, a u nichž lze předpokládat autozomálně recesivní typ dědičnosti.

Výzkum byl proveden s podporou granu IGA MZČR NT 11521/4

Výsledek studie vyšetření genu *SH3TC2* u českých pacientů s HMSN I byl popsán:

Laššuthová P, Mazanec R, Vondráček P, Šišková D, Haberlová J, Sabová J, Seeman P: **High frequency of SH3TC2 mutations in Czech HMSN I patiens.** Clin Genet 2011;in press

SVALOVÁ ONEMOCNĚNÍ

V průběhu svého postgraduálního studia jsem se blíže setkala se dvěmi vybranými svalovými onemocněními a zavedla pro ně DNA vyšetření. Jsou to **Autozomálně dominantně dědičná muskulární dystrofie Emery-Dreifuss** a **Centronukleární myopatie**. Obě jednotky jsou popsány níže.

I. Úvod

A. Emery-Dreifuss Muskulární Dystrofie (EDMD)

je charakterizována časnými kontrakturami loktů a Achillových šlach, svalovou slabostí a život ohrožující kardiomyopatií s převodním blokem (*Bonne, et al. 2000*). Pro EDMD je charakteristická kombinace těchto tří základních symptomů (*Colomer, et al. 2002; Zhang, et al. 2007*). Tato kombinace se zřídka vyskytuje u jiných myopatií. Časná diagnóza je velice důležitá, protože implantace kardioverter-defibrilátoru může zabránit náhlé srdeční smrti (*Cuneo, et al. 2007*). Muskulární dystrofie typu Emery-Dreifuss se může dědit gonozomálně (X-vázaná) nebo autozomálně dominantně (AD-vázaná).

1. *X-vázaná forma*

V X-vázané formě prokazujeme chybění proteinu emerinu a mutace v genu *EMD*, který se označuje taky *STA (Manilal, et al. 1996).*

2. *AD forma (AD EDMD)*

AD forma má normálně přítomný emerin a mohou být způsobené mutacemi v genu *LMNA (Bonne, et al. 1999).*

B. Kongenitální myoutubulární myopatie X-vázaná

Kongenitální myotubulární myopatie X-vázaná (X-MTM), zvaná též centronukleární, je závažné (většinou letální) geneticky podmíněné onemocnění kosterních svalů charakterizované těžkou generalizovanou svalovou slabostí a výraznou hypotonií od narození, postihující chlapce (*Jungbluth, et al. 2008*). V biopsii svalu je charakteristický nález centrálních jader, od kterých je odvozen i název (*Thomas, et al. 1990*). MTM – X vázaná je způsobená mutacemi v genu pro myotubularin 1 (*MTM1*) (*de Gouyon, et al. 1997*). Existuje i autozomálně dominantně dědičná formá centronukleární myopatie. Tato je způsobená mutacemi v genu pro dynamin 2 (*DNM2*), pacienti mají mírnější postižení, nemoc má i pozdější začátek v porovnání s X-MTM (*Jungbluth, et al. 2008*).

II. Cíle studie

A. Vyšetření *LMNA* genu

Vyšetřit gen *LMNA* u 8 pacientů, u kterých bylo na základě klinického obrazu vysloveno podezření na autozomálně dominantně dědičnou muskulární dystrofii Emery-Dreifuss (AD EDMD).

B. Vyšetření *MTM-1* genu

Vyšetřit gen *MTM-1* u dvou pacientů - dvojčat, u kterých bylo na základě klinického obrazu vysloveno cílené podezření na nemoc X-MTM (myotubulární muskulární dystrofie X-vázaná).

III. Pacienti a metody

A. Pacienti

1. Gen LMNA

Byl shromážděn soubor pacientů s AD typem svalové dystrofie typu Emery-Dreifuss (AD EDMD), která je způsobená mutacemi *LMNA* genu. U těchto 8 pacientů byla následně provedena sekvenační analýza *LMNA* genu a také detekce delecí a duplikací exonů *LMNA* genu pomocí metody MLPA.

2. Gen MTM-1

U 2 pacientů - dizygotních dvojčat, u kterých jsme klinicky diagnostikovali suspektní X-MTM, jsme vyšetřili celý kódující úsek genu *MTM1*, včetně přilehlých intronových oblastí.

B. Metody

1. *Pre-PCR zpracování vzorků*

Postup přípravy reakční směsi: pro všechny cílové geny bylo použito obdobné složení reakční směsi (Tabulka 1 - Složení amplifikační směsi).

a) Gen *LMNA*

Pro sekvenování genu *LMNA* bylo použito stejných primerů tak, jak jsou uvedeny v tabulce 2.

b) Gen *MTM1*

Primery pro vyšetřování byly navrženy programem ExonPrimer (http://ihg.gsf.de/ihg/ExonPrimer.html[17]). Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v tabulce 12.

Tabulka 12 - Primery použité pro amplifikaci genu *MTM1*

		Sekvence primerů (5′→3′)		
PCR fragment	Pokrývá exony	Forward	Reverse	Velikost produktu (bp)
1	1	TTGCTCTCAGTTGCCATATTTAAG	AATAGGCCAGCCCAAAATG	252
2	2	AGTGGCTTGTATTCCTAGTTGC	TGATCCTGCCAGACTTCTCC	209
3	3	TGCCATTTGTTGTGTATCTTGG	GCAAAGTAGAAGAGAAACAATTTAGC	235
4	4	AAGTGCTAAAAGGGCCAAGG	AGGGCCTTAGATGAACATGAG	347
5	5	CTTGCTAATTAACATGACTTTCTTTG	TTTGCAGGCAGTTTTCACAG	231
6	6	TGGTGAAATTTATTTTGCGAG	TTCAGAAAGCATGGCTGATG	261
7	7	CAAGGCCAAATCCAGAGATG	TGACTACCATTCTTATGGACTAAAAGG	274
8	8	TTGTTTGCTTGGAGATTTGC	TCACAGAAAACACTGCACTCC	308
9	9	GGGTTTGGGGTTATTTGGAG	TCCATTCCACTAAACAATTACATTC	353
10	10	TCCTGCAGCTCTTAGTGTTTC	GGCATCATGCATTTTCAAAC	494
11	11	GAAGGCACATTGCTGAATTG	TTATTTTGGGGTCAAATCCC	281
12	12	TGTGGCAGCATTTGTTTACTTC	CATGGTAGACTACATACATTTTGGC	272
13	13	TTGCTACAGGCTGCAAAATG	ACATTATCTAAGGCAAGCAGTTG	317
14	14	GTTCTCATGACGTGCGTGG	ATGCCCCAAATGAAAGTCAG	287

2. *Post-PCR zpracovávání vzorků :*

Po PCR amplifikaci byly vzorky vždy zpracovávány s použitím stejných technik, bez ohledu na cílový vyšetřovaný gen. Amplifikace byla kontrolována vizualizací na agarózovém gelu (1,5procentní). Jako interkalační činidlo byl používán Ethidium Bromid, později barvivo GelRed (Biotium, CA, USA).

Následně byly vzorky přečištěny, a to jednak buď pomocí Exo I / SAP štěpení (NEB Molecular Biology, Cleveland, Ohio, USA) nebo pomocí rozotku paramagnetických partikulí - kitem Ampure (Agencourt Ampure, Beckman Coulter, CA, USA).

Následovaly sekvenační reakce s použitím BigDye Terminator v3.1 sekvenačního kitu (Applied Biosystems, Foster City, CA) a sekvenačních primerů, které byly shodné s amplifikačními primery tak, jak je vedeno v tabulkách 2 - 4. Sekvenovalo se vždy, pokud to bylo možné, s použitím primeru forward (ve směru čtení, všechny fragmenty kromě dále uvedených), jeden fragmen byl sekvenován s použitím primeru reverse (proti směru čtení – exon 13 pro gen *MTM-1*). Po odstranění nadbytečných terminátorů s kitem Agencourt CleanSeq (Beckman Coulter, CA, USA) nebo precipitací kyselým ethanolem, byly vzorky analyzovány na přístrojích ABI 3100Avant a ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Získané sekvence byly vyhodnocovány a zpracovávány s použitím Sequencing Analysis software (Applied Biosystems, Foster City, CA). Porovnávání s referenční sekvencí a zdravou kontrolou probíhalo jednak vizuálně a jednak s použitím softwaru Mutation Surveyor Software (SoftGenetics, LLC., State College, PA) nebo také SeqMan (DNASTAR Inc., USA).

Pro jednotlivé geny byly používány tyto referenční sekvence http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez[18]:

Gen *LMNA*: NM_170707

Gen *MTM-1:* NM_000252.2

Při sekvenováni bylo dbáno obecných doporučení podle http://www.cmgs.org/BPGs/pdfscurrentbpgs/Sequencingv2.pdf (*Ellard, et al. 2009*), která jsou považována za zlatý standard.

IV. Výsledky

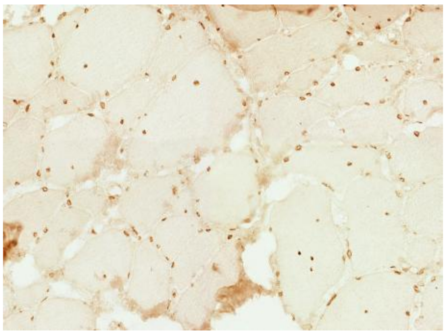
A. Gen *LMNA*

Výsledky: Analyzovala jsem gen *LMNA* u 8 pacientů s podezřením na AD EDMD. U dvou rodin (3 pacientů) jsem potvrdila mutaci v genu *LMNA*.

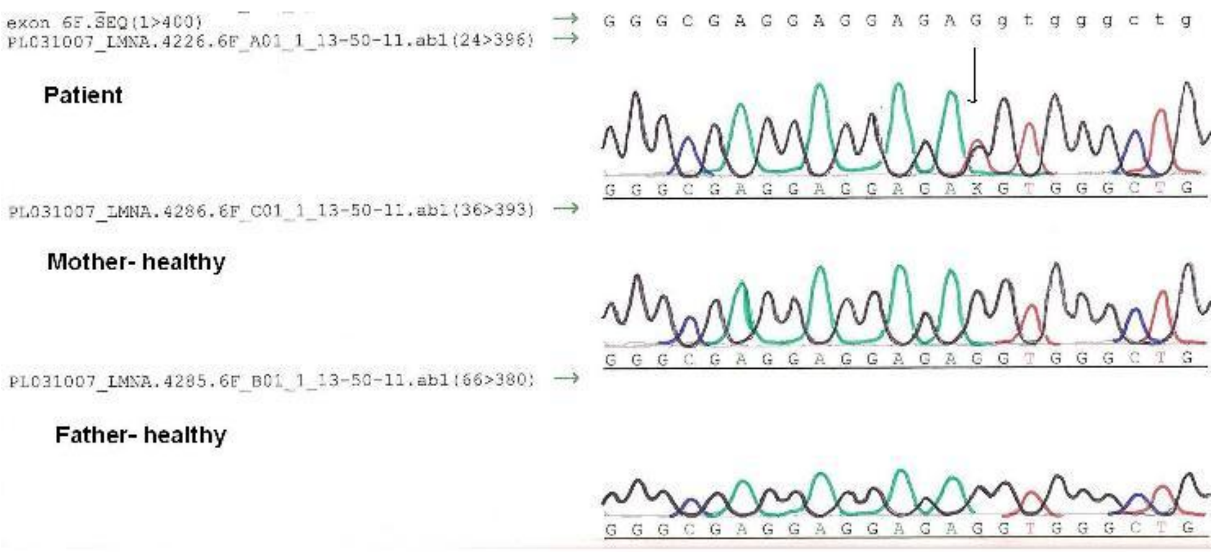
1. *Mutace p. Arg386Met*

U jednoho pacienta jsme potvrdili kauzální mutaci v exonu 6, přítomnou v heterozygotním stavu. Dosud nepopsaná mutace c.1157G>T (p.Arg386Met) způsobuje závažnou záměnu aminokyselin. Protože se nachází v poslední bázi exonu, je nejspíše i příčinou zániku tzv. sestřihového místa a následně vede k vzniku abnormálního proteinu.

Dnes 21letý pacient, u kterého je potvrzená diagnóza AD EDMD, má příznaky pomalu progredující svalové dystrofie už od druhého roku života. Kontraktury Achillových šlach se rozvíjely od 5 let, kontraktury loktů od 9 let. V současné době pacient nemá příznaky srdečního onemocnění.

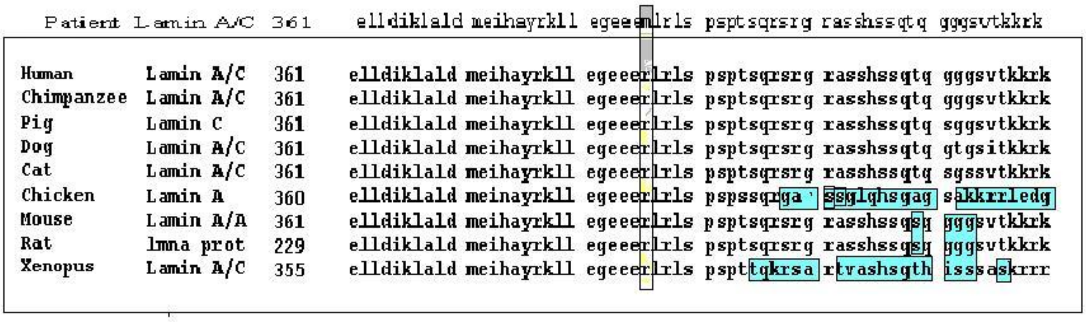


Obrázek 27 - Svalová biopsie s průkazem přítomnosti emerinu
Pacient s AD EDMD, ukázka svalové biopsie, barvení na přítomnost emerinu (40x), normální nález (fotografii laskavě poskytnul Prof. Z.Lukáš, Ústav patologie, FN Brno)



Obrázek 28 - Nález mutace v genu pro *LMNA* u pacienta s AD EDMD
Legenda: Sekvence postiženého pacienta je v horním řádku, místo mutace je vyznačeno šipkou. Oba rodiče - matka i otec mají normální sekvenci v genu *LMNA*.

Mutace se nachází ve vysoce konzervované oblasti DNA, což dále potvrzuje její patogenní charakter (Obrázek 29).

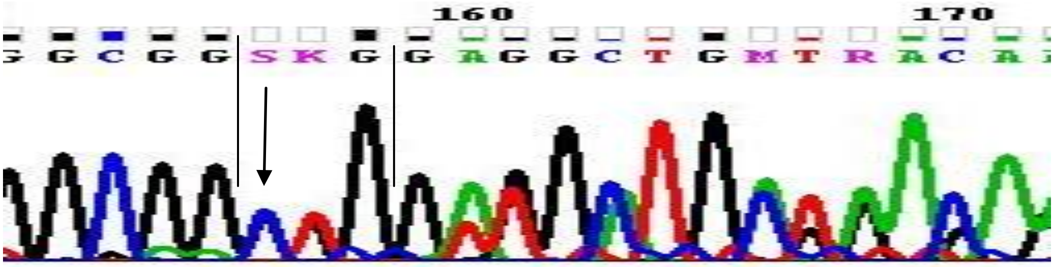


Obrázek 29 - Konzervovanost DNA v oblasti mutace Arg386Met

Legenda: Levý sloupec - jednotlivé živočišné druhy, kterým odpovídají sekvence v pravém sloupci. Oblast mutace je zvýrazněna obdélníkem, nekonzervované oblasti jsou vyznačeny barevně.

2. *Mutace c.568-570dupCGG*

Mutaci v genu *LMNA* jsme prokázali u dvou příbuzných pacientů z jedné rodiny (matka a syn). Oba dva jsou heterozygotními nosiči mutace c.568-570dupCGG. Rodinu jsme klinicky bohužel nevyšetřovali, ale z anamnézy víme, že matka je po transplantaci srdce. Mutace je zobrazena na obrázku 30.

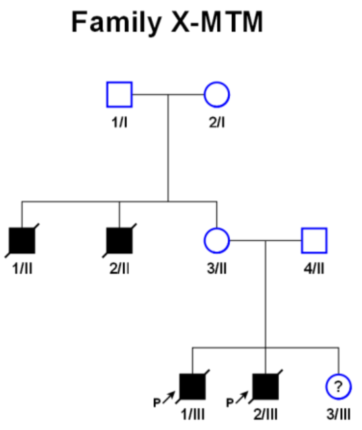


Obrázek 30 - Mutace c.568-570dup CGG v heterozygotním stavu u pacientky

Legenda: místo duplikace je vyznačeno šipkou.

B. Gen *MTM-1*

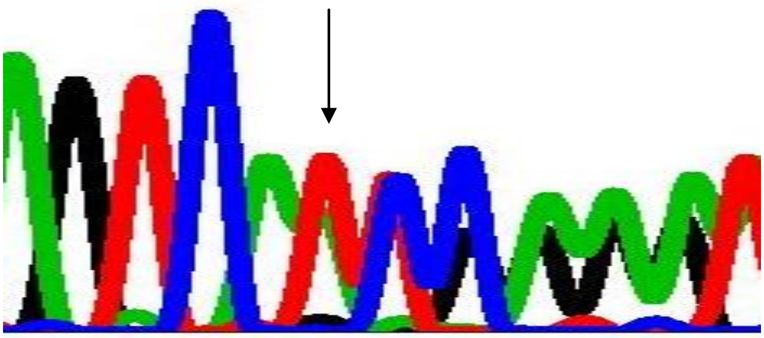
Mutaci v genu pro *MTM-1* jsme prokázali u dvou chlapců – dvojčat. Chlapci se narodili ve 28. týdnu gravidity, nápadná byla těžká hypotonie a slabost s areflexií, proto od začátku byla nutná intenzivní péče včetně umělé plicní ventilace. EMG vyšetření neprokázalo neurogenní změny ve svalech ani neuropatii. Při normálních hladinách CK mělo onemocnění čistě myogenní charakter. Z dalších příznaků byl přítomen kryptorchismus a prenatální chylothorax. Progredující oběhová a renální nedostatečnost spolu s následným nitrokomorovým mozkovým krvácením byla u obou důvodem ukončení intenzivní péče po 26 resp. 35 dnech přežívání (MUDr. V. Sebroň, Novorozenecké odd. GynPor kliniky 1.LF a VFN).



Obrázek 31 - Rodokmen rodiny s X-MTM
Legenda:
čtverec-muž,
kruh-žena,
vyplněné symboly – postižen,
prázdné symboly – nepostižen,
přeškrtnuté symboly – zemřelý,
P-proband

Ve svalové biopsii byla nalezena hypotrofická svalová vlákna a fetální myotuby spolu s centrálně lokalizovanými jádry (Doc.MUDr.J.Zámečník, Phd., Ústav patologie a molekulární medicíny, 2.LF UK a FN Motol). To vše vedlo k silnému podezření na X-vázanou myotubulární myopatii, která se potvrdila nálezem mutace c.82delA ve druhém exonu *MTM1* genu. Mutace je delece 1 báze vedoucí k předčasnému stop kodonu na pozici

43. Tato mutace sice nebyla dosud v literatuře popsána, vzhledem k charakteru je ale s vysokou pravděpodobností kauzální pro X-MTM. Matka pacientů je obligátní přenašečkou nalezené mutace s 50 % rizikem postižení dalších synů X-MTM.



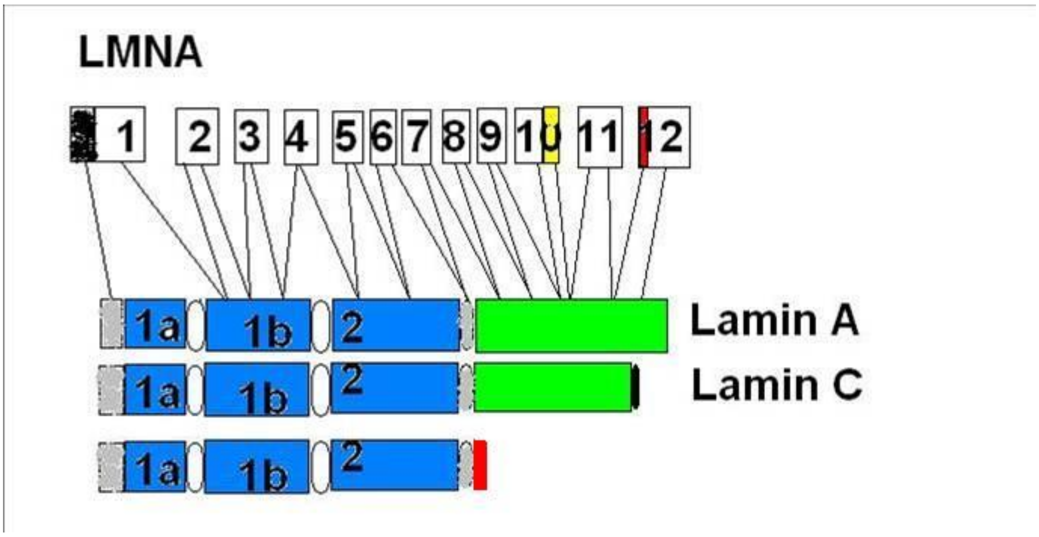
Obrázek 32 - Chromatogram části genu *MTM-1* u matky pacientů s mutací c.82delA
s vyznačeným místem delece v heterozygotním stavu

V. Diskuse

A. Gen *LMNA*

1. Mutace p.Arg386Met

Na obrázku 33 je zobrazený předpokládaný mechanizmus vzniku defektního proteinu u pacienta EDMD s mutací p.Arg386Met v genu pro *LMNA*. Protože mutace se nachází v poslední bázi exonu 6 genu *LMNA*, předpokládáme, že ovlivní sestřihový mechanizmus a způsobí vznik defektního proteinu. Prvních 386 bází je normálních, pak následuje 19 nových aminokyselin a stop kodon, což vede ke vzniku proteinu bez C-karboxy terminální domény. V tomto místě i jiní autoři prokázali jinou mutaci p.Arg386Lys. Na RNA úrovni ukázali, že tato mutace opravdu ovlivňuje správný sestřih mRNA, a tím vede ke vzniku aberantního proteinu (*Bonne, et al. 2000*).



Obrázek 33 - Předpokládaný mechanizmus působení mutace p.Arg396Met na protein
(podle: (*Bonne, et al. 2000*).

Mutaci p.Arg386Met považujeme za patogenní a kauzální pro AD EDMD u tohoto pacienta. Rodině bylo poskytnuto genetické poradenství a nabídnutá možnost prenatální diagnostiky.

B. Gen *MTM-1*

Je možné, že se jedná o první případ tohoto onemocnění molekulárně geneticky potvrzeného v ČR. Mutaci c.82delA považujeme za patogenní a kauzální pro nemoc X-MTM v této rodině, protože mutace je delece 1 báze vedoucí k posunu čtecího rámce a předčasnému stop kodónu na pozici 43 v genu *MTM-1* . Dále bylo také zjištěno, že dva bratři matky zemřeli na blíže neurčenou nemoc. Jeden z nich zemřel in utero, jeden časně postnatálně. Dá se přepokládat, že příčinou byla právě nemoc X-MTM a mutace c.82delA v genu *MTM-1,* která se v rodině dědí po maternální linii.

Klinický nález u našich pacientů se shoduje s literaturou, protože je popsáno, že nonsense mutace v genu *MTM-1* způsobují závažnější formy X-MTM než missense mutace (*de Gouyon, et al. 1997*).

VI. Závěr

A. Gen *LMNA*

Vyšetření *LMNA* genu je přínosné a jediné potvrzující u pacientů s AD EDMD splňujících diagnostická kritéria. Doporučujeme ho provést u pacientů se svalovou dystrofií s časným začátkem a kontrakturami loktů, u kterých vyšetření emerinu ve svalové biopsii nebo i jen v buňkách bukální sliznice vyloučilo chybění emerinu (prokázalo normální přítomnost emerinu). Pro pacienty s AD EDMD je vyšetření *LMNA* genu jediným způsobem k potvrzení a objasnění choroby a nález kauzální mutace je nezbytným předpokladem pro prevenci opakovaní choroby u potomstva - pro případnou prenatální či preimplantační diagnostiku.

Vyšetření *LMNA* genu proto doporučujeme u pacientů s AD EDMD, kteří splňují tyto diagnostická kritéria:

- Začátek obtíží v 1. nebo 2. životní dekádě.
- Časné kontraktury flexorů loktů, Achillových šlach a šíjového svalstva.
- Pomalu progredující bilaterální, symetrická slabost a atrofie pažního a peroneálního svalstva.
- Vyloučená X-vázaná forma s poruchou genu pro emerin.

Nález mutace v genu pro Lamin A/C u pacienta s EDMD autosomálně dominantně dědičnou jsme popsali v časopise Pediatric Neurology:

Laššuthová P, Baránková L, Kraus J, Maríková T, Seeman P.**Emery-Dreifuss muscular dystrophy: a novel mutation in the LMNA gene.** Pediatr Neurol.2009 Aug;41(2):127-30.

B. Gen *MTM-1*

Rodině bude nyní poskytnuta cílená genetická prevence. Zavedení vyšetření *MTM-1* genu může být využito k potvrzení u dalších rodin s buď dříve klinicky stanovenou dg. X-MTM nebo pro nově diagnostikované rodiny. Toto vyšetření doporučujeme u pacientů když:

- Se jedná o závažné onemocnění kosterních svalů.
- Onemocnění postihuje chlapce.
- Hlavním klinickým projevem jsou generalizovaná svalová slabost a hypotonie s nutností umělé plicní ventilace.
- Typický je nález centrálních jader ve svalové biopsii.

Použitá literatura

Arnaud, E.,Zenker, J., et al. (2009) "*SH3TC2/KIAA1985 protein is required for proper myelination and the integrity of the node of Ranvier in the peripheral nervous system.*" Proc Natl Acad Sci U S A **106**(41): 17528-17533.

Auer-Grumbach, M. (2004) "*Hereditary sensory neuropathies.*" Drugs Today **40**:385-394.

Auer-Grumbach, M. (2008) "*Hereditary sensory neuropathy type I.*" Orphanet J Rare Dis **3**: 7.

Azzedine, H.,Ravisé, N., et al. (2006) "*Spine deformities in Charcot-Marie-Tooth 4C caused by SH3TC2 gene mutations.*" Neurology **67**(4): 602-606.

Baránková, L.,Vyhnálková, E., et al. (2007) "*GDAP1 mutations in Czech families with early-onset CMT.*" Neuromuscul Disord **17**(6): 482-489.

Barisic, N.,Claeys, K. G., et al. (2008) "*Charcot-Marie-Tooth disease: a clinico-genetic confrontation.*" Ann Hum Genet **72**(Pt 3): 416-441.

Baxter, R.V.,Ben Othmane, K., et al. (2002) "*Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21.*" Nat Genet **30**: 21-22.

Berger, P.,Young, P.,Suter, U. (2002) "*Molecular cell biology of Charcot-Marie-Tooth disease.*" Neurogenetics **4**: 1-5.

Boaretto, F.,Vettori, A., et al. (2010) "*Severe CMT type 2 with fatal encephalopathy associated with a novel MFN2 splicing mutation.*" Neurology **74**(23): 1919-1921.

Bonne, G.,Di Barletta, M.R., et al. (1999) "*Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy.*" Nat Genet **21**(3): 285-288.

Bonne, G.,Mercuri, E., et al. (2000) "*Clinical and molecular genetic spectrum of autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy due to mutations of the lamin A/C gene.*" Ann Neurol. **48**(2): 170-180.

Bouhouche, A.,Benomar,A.,et al. (1999) "*A Locus for an axonal form of Autosomal Recessive Charcot-Marie-Tooth Disease Maps to Chromosome 1q21.2-q21.3.*"Am J Hum Genet **65**:722-727.

Broers, J.L.V., Peeters,E.A.G., et al. (2004) " *Decreased mechanical stiffness in LMNA-/- cells is caused by defective nucleo-cytoskeletal integrity: implications for the development of laminopathies.*"Hum Mol Genet **13:**2567-2580.

Brown, C. A.,Lanning, R.W., et al. (2001) "*Novel and Recurrent Mutations in Lamin A/C in Patients With Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy.*" Am J Med Genet **102**: 359-367.

Brožková, D.,Mazanec, R., et al. (2010) "*Clinical and in silico evidence for and against pathogenicity of 11 new mutations in the MPZ gene.*" Clin Genet **78**(1): 81-87.

Brunham, L. R.,Singaraja, R. R., et al. (2005) "*Accurate prediction of the functional significance of single nucleotide polymorphisms and mutations in the ABCA1 gene.*" PLoS Genet **1**(6): e83.

Burns, J.,Raymond, J.,Ouvier, R. A. (2009) "*Feasibility of foot and ankle strength training in childhood Charcot-Marie-Tooth disease*" Neuromuscul Disord **19**(12): 818-821.

Claramunt, R.,Sevilla, T., et al. (2007) "*The p.R1109X mutation in SH3TC2 gene is predominant in Spanish Gypsies with Charcot-Marie-Tooth disease type 4.*" Clin Genet **71**(4): 343-349.

Clark, F.,Thanaraj, T. A. (2002) "*Categorization and characterization of transcript-confirmed constitutively and alternatively spliced introns and exons from human.*" Hum Mol Genet **11**(4): 451-464.

Colomer, J.,Iturriaga, C., et al. (2002) "*Autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy: a new family with late diagnosis.*" Neuromuscul Disord **12**(1): 19-25.

Colomer, J.,Gooding, R., et al. (2006) "*Clinical spectrum of CMT4C disease in patients homozygous for the p.Arg1109X mutation in SH3TC2.*" Neuromuscul Disord **16**(7): 449-453.

Cuneo, A.,Holdt, L.M., et al. (2007) "*Cardiologic Findings in autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy (Hauptmann-Thannhauser muscular dystrophy).[Kardiologische Befunde bei Hauptmann-Thannhauser Muskeldystrophie (autosomal dominante Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie)].*" Deutsche Medizinische Wochenschrift **132**: 2006-2009.

Davis, C.J.F.,Bradley, W., Madrid,R. (1978) "*The peroneal muscular atrophy syndrome.Clinical, genetic, electrophysiological and nerve biopsy studies.*" J Génét Hum **26**: 311-349.

de Gouyon, B.M.,Zhao, W., et al. (1997) "*Characterization of mutations in the myotubularin gene in twenty six patients with X-linked myotubular myopathy.*" Hum Mol Genet **6**(9): 1499-1504.

De Sandre-Giovannoli, A.,Chaouch, M., et al. (2002) "*Homozygous Defects in LMNA, encoding Lamin A/C Nuclear-Envelope Proteins, Cause Autosomal Recessive Axonal Neuropathy in Human (Charcot-Marie-Tooth Disorder Type 2) and Mouse* " Am J Hum Genet **70**: 726-736.

Dubourg, O.,Azzedine, H., et al. (2006) "*Autosomal-recessive forms of demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease.*" Neuromolecul Med **8**(1-2): 75-86.

Dyck, P. J.,Lambert, E. H. (1968a) "*Lower motor and primary sensory neuron diseases with peroneal muscular atrophy. I. Neurologic, genetic, and electrophysiologic findings in hereditary polyneuropathies.*" Arch Neurol **18**(6): 603-618.

Dyck, P. J.,Lambert, E. H. (1968b) "*Lower motor and primary sensory neuron diseases with peroneal muscular atrophy. II. Neurologic, genetic, and electrophysiologic findings in various neuronal degenerations.*" Arch Neurol **18**(6): 619-625.

Ellard, S.,Charlton, R., et al. (2009) "*Practice guidelines for Sanger Sequencing Analysis and Interpretation.*" Retrieved 15.2, 2011, from www.cmgs.org/BPGs/pdfscurrentbpgs/Sequencingv2.pdf.

England, J. D.,Gronseth, G. S., et al. (2009) "*Practice Parameter: evaluation of distal symmetric polyneuropathy: role of laboratory and genetic testing (an evidence-based review). Report of the American Academy of Neurology, American Association of Neuromuscular and Electrodiagnostic Medicine, and American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation.*" Neurology **72**:185-192.

Gabreëls-Festen, A., van Beersum, S., et al. (1999) "*Study on the gene and phenotypic characterisation of autosomal recessive demyelinating motor and sensory neuropathy (Charcot-Marie-Tooth disease) with a gene locus on chromosome 5q23-q33.*" J Neurol Neurosurg Psychiatry **66**(5): 569-574.

Gemignani, F.,Marbini, A. (2001) "*Charcot-Marie-Tooth disease (CMT): distinctive phenotypic and genotypic features in CMT type 2.*"J Neurol Sci **184**(1)1-9.

Goizet, C.,Ben Yaou, R., et al. (2004) "*A new mutation of the the lamin A/C gene leading to autosomal dominant axonal neuropathy, muscular dystrophy, cardiac disease, and leuconychia.*" J Med Genet **41**(3): e29.

Goldman, R.D.,Gruenbaum, Y., et al. (2002) "*Nuclear lamins: building blocs of nuclear architecture.*" Genes & Development **16**: 533-547.

Gosselin, I.,Thiffault, I., et al. (2008) "*Founder SH3TC2 mutations are responsible for a CMT4C French-Canadians cluster.*" Neuromuscul Disord **18**(6): 483-492.

Haberlová, J.,Mazanec, R.,Seeman, P.(2006) "*Dědičné periferní neuropatie.*" Neurol. pro praxi **7**(3): 147-152.

Haberlová, J.,Seeman, P.(2010) "*Utility of Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Score in Children with type 1A disease.*" Pediatr Neurol **43**(6): 407-410.

Hamaguchi, A.,Ishida, C., et al. (2010) "*Charcot-Marie-Tooth disease type 2D with a novel glycyl-tRNA synthetase gene (GARS) mutation.*" J Neurol **257**(7): 1202-1204.

Harding, A. E.,Thomas, P. K. (1980a) "*The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II.*" Brain **103**(2): 259-280.

Harding, A. E.,Thomas, P. K. (1980b) "*Genetic aspects of hereditary motor and sensory neuropathy (types I and II).*" J Med Genet **17**(5): 329-336.

Harding, A. E.,Thomas, P. K. (1984) "*Peroneal muscular atrophy with pyramidal features.*" J Neurol Neurosurg Psychiatry **47**: 168-172.

Horáček, O.,Mazanec, R., et al. (2005) "*Deformity páteře u hereditární motoricko-senzitivní neuropatie.*" Čes. a slov. Neurol. Neurochir. **68**(101): 109-115.

Houlden, H.,King, R., et al. (2006) "*Clinical, pathological and genetic characterization of hereditary sensory and autonomic neuropathy type 1 (HSAN I).*" Brain **129**(Pt 2): 411-425.

Houlden, H.,Laura, M., et al. (2009) "*The phenotype of Charcot-Marie-Tooth disease type 4C due to SH3TC2 mutations and possible predisposition to an inflammatory neuropathy*." Neuromuscul Disord **19**(4): 264-269.

Chance, P. F.,Alderson, M. K., et al. (1993) "*DNA deletion associated with hereditary neuropathy with liability to pressure palsies.*" Cell **72**(1): 143-151.

Charcot, J.M.,Marie, P. (1886) "S*ur une forme particulaiere d'atrophie musculaire progressive souvent familiale debutant par les pied et les jambes et atteignant plus tard les mains.* " Rev Med. **6**: p.97-138

Chaouch, M.,Allal, Y., et al. (2003) "*The phenotypic manifestations of autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth due to a mutation in Lamin A/C gene.*"Neuromuscul Disord **13**:60-67

Irobi, J.,de Jonghe, P.,Timmerman,V. (2004) "M*olecular gentics of distal hereditary motor neuropathies.*" Hum Mol Genet **13**(Review Issue 2): R195-R202.

Irobi, J.,Dierick, I., et al. (2006) "*Unraveling the genetics of distal hereditary motor neuronopathies.*" Neuromolecular Med **8**(1-2): 131-146.

Jani-Acsadi, A.,Krajewski, K., Shy, M.E. (2008) "*Charcot-Marie-Tooth neuropathies: diagnosis and management.*" Semin Neurol **28**(2): 185-194.

Jordanova, A.,De Jonghe, P., et al. (2003a) "*Mutations in the neurofilament light chain gene (NEFL) cause early onset severe Charcot-Marie-Tooth disease.*" Brain **126**(Pt 3): 590-597.

Jordanova, A.,Thomas, F. P., et al. (2003b) "*Dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth type C maps to chromosome 1p34-p35*." Am J Hum Genet **73**(6): 1423-1430.

Jungbluth, H.,Wallgren-Pettersson, C.,Laporte, J. (2008) "*Centronucler(myotubular) myopathy.*" Orphanet J Rare Dis **3**: 26.

Kalaydjieva, L.,Lochmuller, H., et al. (2005) "*125th ENMC International Workshop: Neuromuscular disorders in the Roma (Gypsy) population, 23-25 April 2004, Naarden, The Netherlands.*" Neuromuscul Disord **15**(1): 65-71.

Kennerson, M. L.,Zhu, D., et al. (2001) "*Dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth neuropathy maps to chromosome 19p12-p13.2.*" Am J Hum Genet **69**(4): 883-888.

Kuhlenbäumer, G.,Young, P., et al. (2002) "*Clinical features and molecular genetics of hereditary peripheral neuropathies.*" J Neurol **249**: 1629-1650.

Larkin, M. A.,Blackshields, G., et al. (2007) "*Clustal W and Clustal X version 2.0.*" Bioinformatics **23**(21): 2947-2948.

Lee, M.J.,Nelson, I., et al. (2002) "*Six novel connexin 32 (GJB1) mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease.*" J Neurol Neurosurg Psychiatry **73**: 304-306.

LeGuern, E.,Guilbot, A., et al. (1996) "*Homozygosity mapping of an autosomal recessive form of demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease to chromosome 5q23-q33.*" Hum Mol Genet **5**(10): 1685-1688.

Li, J.,Krajewski, K., et al. (2002) "*Hereditary neuropathy with liability to pressure palsy: the electrophysiology fits the name.*" Neurology **58**(12): 1769-1773.

Lupo, V.,Galindo, M.I., et al. (2009) "*Missense mutations in the SH3TC2 protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4C affect its localization in the plasma membrane and endocytic pathway.*" Hum Mol Genet **18**(23): 4603-4614.

Lupski, J. R.,de Oca-Luna, R. M., et al. (1991) "*DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A.*" Cell **66**(2): 219-232.

Lupski, J.R. (1998) "*Charcot-Marie-Tooth disease: lessons in genetic mechanisms.*" Mol Med **4**(1): 3-11.

Lupski, J.R.,Reid, J.G., et al. (2010) "*Whole-genome sequencing in a patient with Charcot-Marie-Tooth neuropathy.*" N Engl J Med **362**(13): 1181-1191.

Mandich, P.,Grandis, M., et al. (2008) "*Gap junction beta 1 (GJB1) gene mutations in Italian patients with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease.*" J Hum Genet **53**(6): 529-533.

Manilal, S.,Nguyen, T.M., et al. (1996). "*The Emery-Dreifuss muscular dystrophy protein, emerin, is a nuclear membrane protein.*" Hum Mol Genet **5**(6): 801-808.

Micallef, J.,Attarian, S., et al. (2009) "*Effect of ascorbic acid in patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial.*" Lancet Neurol **8**(12): 1103-1110.

Mikešová, E.,Huehne, K., et al. (2005) "*Novel EGR2 mutation R359Q is associated with CMT type 1 and progressive scoliosis.*" Neuromuscul Disord **15**(11): 764-767.

Miller, S. A.,Dykes, D. D., Polesky, H.F. (1988) "*A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.*" Nucleic Acids Res **16**(3): 1215.

Mounkes, L.,Kozlov ,S., et al. (2003) "*The laminopathies: nuclear structure meets disease.*" Curr Opin Genet Dev. **13**(3): 223-230.

Nagase, T.,Kikuno, R., Ohara,O. (2001) "*Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XXII. The complete sequences of 50 new cDNA clones which code for large proteins.*" DNA Res **8**(6): 319-327.

Nelis, E.,Van Broeckhoven, C. , et al. (1996) "*Estimation of the 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 **4**: 25-33.

Nelis, E.,Erdem, S., et al. (2002) "*Mutations in GDAP1: autosomal recessive CMT with demyelination and axonopathy*." Neurology **59**(12): 1865-1872.

Ng, P. C., Henikoff, S. (2003) "*SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function.*" Nucleic Acids Res **31**(13): 3812-3814.

Pareyson, D. (2004) "*Differential diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease and related neuropathies*." Neurol Sci **25**: 72-82.

Pareyson, D.,Marchesi, C. (2009) "*Diagnosis, natural history, and management of Charcot-Marie-Tooth disease.*" Lancet Neurol **8**(7): 654-667.

Ramensky, V.,Bork, P., Sunyaev, S. (2002) "*Human non-synonymous SNPs: server and survey.*" Nucleic Acids Res **30**(17): 3894-3900.

Reilly, M.M. (2000) "*Classification of the hereditary motor and sensory neuropathies.*" Curr Opin Neurol **13**(5): 561-564.

Reilly, M.M.,Hanna, M.G. (2002) "*Genetic Neuromuscular disease*." J Neurol Neurosurg Psychiatry **73(Suppl II)**: ii12-ii21.

Reilly, M. M., Shy, M. E. (2009) "*Diagnosis and new treatments in genetic neuropathies."* J Neurol Neurosurg Psychiatry **80**(12): 1304-1314.

Roa, B. B.,Dyck, P. J., et al. (1993) "*Dejerine-Sottas syndrome associated with point mutation in the peripheral protein 22 (PMP22) gene.*" Nat Genet **5**: 269-273.

Rotthier, A.,Baets, J., et al. (2009) "*Genes for hereditary sensory and autonomic neuropathies: a genotype-phenotype correlation.*" Brain **132**(Pt 10): 2699-2711.

Saifi, G.M.,Szigeti, K., et al. (2003) "*Molecular mechanisms, diagnosis, and rational approaches to management of and therapy for Charcot-Marie-Tooth disease and related peripheral neuropathies.*" J Investig Med **51**(5): 261-283.

Saito, M.,Hayashi, Y., et al. (1997) "*Linkage mapping of the gene for Charcot-Marie-Tooth disease type 2 to chromosome 1p (CMT2A) and the clinical features of CMT2A.*" Neurology **49**(6): 1630-1635.

Seeman, P.,Mazanec, R., et al. (2001) "*Charcot-Marie-Tooth type X: A novel mutation in the Cx32 gene with central conduction lowing.*" Int J Mol Med **8**(4): 461 -468.

Seeman, P.,Cíbochová, R., et al. (2002) "*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 **65**(98): 206-212.

Seeman, P., et al.(2003) "*Detekce bodových mutací v genech Cx32, MPZ, EGR2 a PMP22 u pacientů s dědičnými neuropatiemi s již vyloučenou nejčastější mutací - přestavbou 17p11.2-12.*"Grant IGA MZ ČR č.NF 6504-3, r.2001-2003 závěrečná zpráva:3.

Seeman, P.,Mazanec, R., et al. (2004a) "*Divergentní fenotypy choroby CMT: demyelinizační s infantilním začátkem a axonální s pozdním začátkem a zpomalenou fotoreakcí následkem různých mutací P0 genu.*" Čes. a slov. Neurol. Neurochir **67**(100): 321-329.

Seeman, P.,Mazanec, R., et al. (2004b) "*Hearing loss as the first feature of late-onset axonal CMT disease due to a novel P0 mutation.*" Neurology **63**(4): 733-735.

Seeman, P.,Šišková, D. (2006) "*Autozomálně recesivní etnické choroby českých Romů*" Cas Lek Cesk **145**(7): 557-560; diskuze 561.

Senderek, J.,Bergmann, C, et al. (2003) "*Mutations in a gene encoding a novel SH3/TPR domain protein cause autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth type 4C neuropathy.*" Am J Hum Genet **73**(5): 1106-1119.

Sevilla, T.,Jaijo, T., et al. (2008) "*Vocal cord paresis and diaphragmatic dysfunction are severe and frequent symptoms of GDAP1-associated neuropathy.*" Brain **131**(Pt 11): 3051-3061.

Shy, M. E.,Garbern, J. Y.,Kamholz,J. (2002) "*Hereditary motor and sensory neuropathies: a biological perspective.*" Lancet Neurol **1**(2): 110-118.

Shy, M. E. (2004a) "*Charcot-Marie-Tooth disease: an update*." Curr Opin Neurol **17**(5): 579-585.

Shy, M. E.,Jani, A., et al. (2004b) "*Phenotypic clustering in MPZ mutations.*" Brain **127**(Pt 2): 371-384.

Shy, M. E. (2006) "*Peripheral neuropathies caused by mutations in the myelin protein zero.*" J Neurol Sci **242**(1-2): 55-66.

Skre, H. (1974) "*Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth`s disease.*" Clin Genet **6**: 98-118.

Smetana, P.,Teyssler, P., et al. (2008) "*Možnosti a indikace ortipedické léčby onemocnění Charcot-Marie-Tooth.*" Postgraduální medicína: odborný časopis pro lékaře **8**(10): 880-885.

Solla, P.,Vannelli, A., et al. (2010) "*Heat shock protein 27 R127W mutation: evidence of a continuum between axonal Charcot-Marie-Tooth and distal hereditary motor neuropathy.*" J Neurol Neurosurg Psychiatry **81**(9): 958-962.

Stamm, S.,Riethoven, J. J., et al. (2006) "*ASD: a bioinformatics resource on alternative splicing.*" Nucleic Acids Res **34**(Database issue): D46-55.

Street, V. A.,Bennett, C. L., et al. (2003) "*Mutation of a putative protein degradation gene LITAF/SIMPLE in Charcot-Marie-Tooth disease 1C.*" Neurology **60**(1): 22-26.

Szigeti, K.,Lupski, J. R. (2009) "*Charcot-Marie-Tooth disease.*" Eur J Hum Genet **17**(6): 703-710.

Tazir, M.,Azzedine, H., et al. (2004) "*Phenotypic variability in autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease due to the R298C mutation in lamin A/C.*" Brain **127**(Pt 1): 154-163.

Thanaraj, T. A.,Stamm, S., et al. (2004) "*ASD: the Alternative Splicing Database.*" Nucleic Acids Res **32**(Database issue): D64-69.

Thomas, N.S.,Williams, H., et al. (1990) "*X lnked neonatal centronuclear/myotubular myopathy: evidence for linkage to Xq28 DNA marker loci.*" J Med Genet **27**(5): 284-287.

Thomas, P. D.,Campbell, M. J., et al. (2003a) "*PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function.*" Genome Res **13**(9): 2129-2141.

Thomas, P. D.,Kejariwal, A., et al. (2003b) "*PANTHER: a browsable database of gene products organized by biological function, using curated protein family and subfamily classification.*" Nucleic Acids Res **31**(1): 334-341.

Thomas, P. D., Kejariwal, A. (2004) "*Coding single-nucleotide polymorphisms associated with complex vs. Mendelian disease: evolutionary evidence for differences in molecular effects."* Proc Natl Acad Sci U S A **101**(43): 15398-15403.

Thomas, P. D.,Kejariwal, A., 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): W645-650.

Thomas, P. K.,Marques, W.Jr., et al. (1997) "*The phenotypic manifestations of chromosome 17p11.2 duplication.*" Brain **120**(3): 465-478.

Tooth, H. H.(1886) "*The peroneal type of progressive muscular atrophy*." London: Lewis.

Vallat, J.M.,Tazir, M., et al. (2005) "*Autosomal-Recessive Charcot-Marie-Tooth Diseases*." J Neuropathol Exp Neurol **64**(5): 363-370.

Vance, J.M. (1991) "*Hereditary motor and sensory neuropathies.*" J Med Genet **28**: 1-5.

Verhamme, C.,van Schaik, I. N., et al. (2004) "*Clinical disease severity and axonal dysfunction in hereditary motor and sensory neuropathy Ia*." J Neurol **251**(12): 1491-1497.

Verhoeven, K.,De Jonghe, P., et al. (2003) "*Mutations in the small GTP-ase late endosomal protein RAB7 cause Charcot-Marie-Tooth type 2B neuropathy*." Am J Hum Genet **72**(3): 722-727.

Verhoeven, K.,Villanova, M., et al. (2001) "*Localization of the gene for the intermediate form of Charcot-Marie-Tooth to chromosome 10q24.1-q25.1*." Am J Hum Genet **69**(4): 889-894.

Villanova, M.,Timmerman, V., et al. (1998) "*Charcot-Marie-Tooth disease: an intermediate form*." Neuromuscul Disord **8**(6): 392-393.

Vinci, P.,Perelli, S.L.,Gargulio, P. (2009) "*About the hypothesis of overwork weakness in Charcot-Marie-Tooth disease.*" J Rehabil Med **41**, 778. Komentář k J Rehabil Med 2009, 41:32-34.

Vondráček, P.,Seeman, P., et al. (2005) "*X-linked Charcot-Marie-Tooth disease: phenotypic expression of a novel mutation Ile127Ser in the GJB1 (connexin 32) gene.*" Muscle Nerve **31**(2): 252-255.

Voo, I.,Allf, B. E., et al. (2003) "*Hereditary motor and sensory neuropathy type VI with optic atrophy*." Am J Ophthalmol **136**(4): 670-677.

Vucic, S.,Kennerson, M., et al. (2003) "*CMT with pyramidal features. Charcot-Marie-Tooth.*" Neurology **60**(4): 696-699.

Vytopil, M.,Benedetti, S., et al. (2003) "*Mutation analysis of the lamin A/C gene (LMNA) among patients with different cardiomuscular phenotypes.*" J Med Genet **40**(12): e132.

Warner, L.E.,Mancias, P., et al. (1998) " *Mutations in the early growth response 2 (EGR2) gene are associated with hereditary myelinopathies.*" Nat Genet. **Apr;18**(4): 382-384.

Wise, C.A.W., Garcia, C.A., et al. (1993) "*Molecular Analyses of Unrelated Charcot-Marie-Tooth (CMT) Disease Patients Suggest a High Frequency of the CMTIA Duplication*." Am J Hum Genet **53**: 853-863.

Young, P.,De Jonghe, P., et al. (2008) "*Treatment for Charcot-Marie-Tooth.*" Cochrane Database Syst Rev **1**: CD006052 [CIT 2011-02-26] .

Zhang, Q.,Bethmann, C., et al. (2007) "*Nesprin-1 and -2 are involved in the pathogenesis of Emery Dreifuss muscular dystrophy and are critical for nuclear envelope integrity.*" Hum Mol Genet. **16**(23): 2816-2833.

On-line zdroje

Jsou uvedeny formou poznámky v textu.

[1] **IPN Mutation database.** www.molgen.ua.ac.be [CIT 2011-02-05].

[2] Pestronk, A., **Neuromuscular disease center.** www.neuromuscular.wustl.edu [CIT 2011-02-20].

[3] **Online Mendelian Inheritance in Man,** *OMIM*™. Johns Hopkins University (Baltimore, MD). MIM Number: 605253 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/605253 [CIT 2011-02- 28].

[4] **Online Mendelian Inheritance in Man**, OMIM™. Johns Hopkins University (Baltimore, MD). MIM Number: 214400 http://www.ncbi.nlh.nih.gov/omim/214400 [CIT 2011-01-28].

[5] **The Uniprot Consortium.** Q8TF17. www.uniprot.org/uniprot/Q8TF17 [CIT 2010-12-19].

[6] Bird, T.,**Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 2.Bookshel***f*. U.S. National Library of Medicine National Institute of Health *http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1285* [CIT 2011-02-24].

[7, 18]**Pubmed.** National Center for Biotechnology Information http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez [CIT 2010-09-10].

[8] Ellard,S.,**Practice quidelines for Sanger Sequencing Analysis and Interpretation.** http://www.cmgs.org/BPGs/pdfscurrentbpgs/Sequencingv2.pdf [CIT 2011-02-15].

[9] **MLPA** ™. MRC-Holland. *http://www.mlpa.com/* [CIT 2008-04-10].

[10] **Clustal: Multiple Sequence Alignment** http://www.clustal.org/download/current/ [CIT 2010-09-05].

[11] **SIFT.** http://sift.jcvi.org/www/SIFT_aligned_seqs_submit.html [CIT 2010-09-10].

[12] **PolyPhen.** http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/ [CIT 2010-03-07].

[13] **Panther.** http://www.pantherdb.org/tools/csnpScoreForm.jsp [CIT 2010-09-20].

[14] **EBI** (European Bioinformatics Institute). http://www.ebi.ac.uk/asd/ [CIT 2010-05-15].

[15] SNP. Single Nucleotide Polymorphism database **(dbSNP BUILD 132**) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp?term=rs55853803 [CIT 2010-12-15]

[16] **MOBITEC.**MolecularBiologiseTechnologie http://www.mobitec.com/int/products/bio/04_vector_sys/index.php?exontrap.html [cit 2011-02-20]

[17] **ExonPrimer.** http://ihg.gsf.de/ihg/ExonPrimer.html [CIT 2010-09-10]

Seznam disertačních prací autorky

(součet IF 7,348)

1: **Laššuthová P**, Mazanec R, Vondráček P, Šišková D, Haberlová J, Sabová J, Seeman P: High frequency of SH3TC2 mutations in Czech HMSN I patiens**. Clin Genet 2011**; in press, **IF:3,304**

2: **Laššuthová P**, Baránková L, Kraus J, Maríková T, Seeman P. Emery-Dreifuss muscular dystrophy: a novel mutation in the LMNA gene**. Pediatr Neurol. 2009 Aug;41(2):127-30. IF:1,497**

3: **Laššuthová P**, Baránková L, Haberlová J, Mazanec R, Wallace A, Huehne K, Rautenstrauss B, Seeman P. Mutations in the LMNA gene do not cause axonal CMT in Czech patients. **J Hum Genet. 2009;54(6):365-8. IF:2,547**

Prezentace na kongresech

Přednášky:

1. **Laššuthová P**, Sebroň V, Zámečník J, Haberlová J a Seeman P: Nová mutace v MTM1 genu u dvou bratrů s těžkou kongenitální myopatií. Přednáška: Československý Neurologický sjezd 2010, Abstrakt in: Čes a Slov Neurol a Neurochirurgie, Roč.73/106, (2008),supplementum 2, s.S98
2. **Laššuthová P**, Mazanec R, Prášilová Š,Vondráček P, Šišková D, Haberlová J, Sabová J a Seeman P. Spektrum a frekvence mutací v genu SH3TC2 u českých pacientů s dědičnou neuropatií Charcot-Marie-Tooth typ 4C (CMT4C). Přednáška: 44. dny dětské neurologie, Brno, 2010, Abstrakt in: Neurologie pro praxi, Roč.11, Suppl.B (2010), s.15-16
3. **Laššuthová P**, Mazanec R, Haberlová J, a Seeman P.: Genotype-phenotype correlations for CMT4C. Přednáška MGZ a LMU Mnichov SRN, 2009
4. **Laššuthová P**, Baránková L, Haberlová J, Mazanec R,Wallace A. a Seeman P. Mutace v genu LMNA nejsou relevantní příčinou onemocnění Charcot-Marie-Tooth2 u českých pacientů. Přednáška: Hradecký den cytogenetiky a molekulární genetiky, FN Hradec Králové, 2008
5. **Laššuthová P**, Baránková L, Maříková T, Kraus J, Lukáš Z a Seeman P. Emery-Dreifuss muskulární dystrofie autosomálně dominantní v důsledku nové mutace v LMNA genu. Přednáška: 19. Československé neuromuskulární sympozium Brno, Hotel Voroněž, Brno, 23.-24.5.2008, Abstrakt in:Čes a Slov Neurol a Neurochirurgie, Roč.71/104, č.5(2008), s.617
6. **Laššuthová P**, Baránková L, Haberlová J, Mazanec R, Maříková T, Seeman P. Vyšetření genu pro LMNA A/C u českých pacientů s CMT2 a AD EDMD. Přednáška: Vědecká konference UK 2.LF 2008. 23.-24.4.2008
7. **Laššuthová P**, Baránková L, Haberlová J, Mazanec R, Maříková T, Seeman P. Vyšetření genu pro LMNA A/C u českých pacientů s CMT2 a AD EDMD. Přednáška: 11. Celostátní DNA konference molekulárně genetické diagnostiky, Lék. dům, Praha, 6.-7.12.2007. Abstrakt in:Časopis lékařů českých, Roč.147, č.3(2008), s.175-178

Postery:

1. **Lassuthová P**, Baránková L, Haberlová J, Mazanec R, Wallace A, Huehne K, Rautenstrauss B, Seeman P. LMNA is not a relevant gene for diagnostic testing in axonal Charcot-Marie-Tooth. Poster, PNS 2010 Wuerzburg, SRN, Abstract in: J Peripheral Ner System, vol.14(2009),Supplement 2, p.85
2. **Lassuthova P**, Mazanec R, Haberlova J, Seeman P. High frequency of SH3TC2 (KIAA1985) mutations in Czech HMSN I patiens. 3rd International CMT Consortium, Antwerpy
3. **Laššuthová P**, Mazanec R, Prášilová Š,Vondráček P, Šišková D, Haberlová J, Sabová J a Seeman P :High frequency of SH3TC2 (KIAA1985) mutations in Czech HMSN I patients. ICNMD Naples, Italy, 2010

Výstupy s jinou tematikou
Publikace bez IF:
Laššuthová P., Petrová Z., Turek P.: Transientní antigenemie HbsAg po očkování vakcínou proti hepatitidě B u dárkyně krve. Transfuze Hematol dnes, 14, 2008, No.2, p. 90-91.

Přednášky:

1. O. Horký, **P. Laššuthová** a kol.: Projekt mikrochimerismus. Prezentace na výroční valné hromadě skupiny CELL (Czech leukemia study group for life), Praha 2010
2. Štemberková, R., Laššuthová, P. Čechová, H., Staňková, M., Hrabáková, P., Jenčík, J., Čermák, J. a Žižková, H. Bodové mutace N-RAS genu u pacientů s myelodysplastickým syndromem jako nepříznivý prognostický faktor onemocnění. Přednáška: Olomoucké hematologické dny, 2010. Abstrakt in: Transfuze Hematol dnes, Roč.16, suppl.2(2010), s.33

3) Zahraniční stáže
18.10. - 23. 10. 2009 LMU , Mnichov, SRN,

Životopis

Jméno a příjmení:	MUDr. Petra Laššuthová
Adresa:	252 18, Ptice 130, Ptice-Úhonice
Datum narození:	02.11.1982

Vzdělání:

2007 - dosud	Univerzita Karlova, 2. LF, Praha, postgraduální studium, Obor: Neurovědy
2001 - 2007	Univerzita Karlova, 2. LF, Praha, magisterské studium, Obor: Všeobecné lékařství,
1999 - 2001	Gymnázium Jura Hronca, Bratislava, SR, obor: International Baccalaureate programme

Kvalifikační atestace :

2008	Zařazena do specializačního vzdělávání, obor: Vnitřní lékařství

Akademické tituly a vědecké hodnosti :

2007	MUDr., Univerzita Karlova, 2. LF, Praha,

Zaměstnání:

01/09 – dosud	Klinika dětské neurologie, 2.LF UK a FNM, Výzkumný VŠ pracovník
01/09 - dosud	ÚHKT, NRL pro DNA diagnostiku, U Nemocnice 1, P-2; Výzkumný VŠ pracovník
2007 – 12/08	Transfúzní odd., Fakultní Thomayerova nemocnice, Praha, lékař

Jazykové znalosti:

Angličtina	pokročilý

Seznam příloh

1: **Laššuthová P**, Mazanec R, Vondráček P, Šišková D, Haberlová J, Sabová J, Seeman P: High frequency of SH3TC2 mutations in Czech HMSN I patiens**. Clin Genet 2011**; in press,

2: **Laššuthová P**, Baránková L, Kraus J, Maríková T, Seeman P. Emery-Dreifuss muscular dystrophy: a novel mutation in the LMNA gene**. Pediatr Neurol. 2009 Aug;41(2):127-30.**

3: **Laššuthová P**, Baránková L, Haberlová J, Mazanec R, Wallace A, Huehne K, Rautenstrauss B, Seeman P. Mutations in the LMNA gene do not cause axonal CMT in Czech patients. **J Hum Genet. 2009;54(6):365-8.**