

АНАЛИЗА МУТАЦИЈА У РЕГИОНУ ХРОМОЗОМА 17p11.2 КОД ОСОБА С ОБОЉЕЊЕМ ШАРКО-МАРИ-ТУТ, ТИП ЈЕДАН, И ОСОБА ОБОЛЕЛИХ ОД ТОМАКУЛОЗНЕ НЕУРОПАТИЈЕ

Наташа ЗАМУРОВИЋ¹, Ведрана МИЛИЋ², Јелена ДАЧКОВИЋ³,
Драган ЗАМУРОВИЋ⁴, Биљана ЧУЉКОВИЋ¹, Сања ПАВЛОВИЋ³,
Слободан АПОСТОЛСКИ³, Станка РОМАЦ¹

1. Биолошки Факултет Универзитета, Београд; 2. Институт за дечију неурологију и психијатрију
Медицинског Факултета Универзитета, Београд; 3. Институт за неурологију Клиничког центра Србије,
Београд; 4. Институт за мајку и дете, Београд

КРАТАК САДРЖАЈ: Обољење Шарко-Мари-Тут (*Charcot-Marie-Tooth*), тип један А, и наследна неуропатија са склоношћу ка компресивним парализама нерава, најчешћа су наследна обољења периферног нервног система узрокована дупликацијама и делецијама региона хромозома 17p11.2, укључујући и ген за периферни мијелински протеин 22. У овом раду испитивано је 48 болесника који припадају 29 фамилијама с клиничким и електрофизиолошким знацима обољења Шарко-Мари-Тут, један А, 20 болесника суспектованих на обољење Шарко-Мари-Тут, један А, и 17 болесника и здравих чланова њихових породица са склоношћу ка компресивним парализама нерава. Изолација *DNK*, *PCR* и анализе рестрикционим ензимима учињени су према стандардним протоколима. Од 48 болесника с дијагнозом Шарко-Мари-Тут, један А, код 25 (52 посто) нађена је тандемска дупликација 1.5 Mb на хромозому 17p11.2. Ове дупликације нису нађене ни код једног од спорадичних случајева с клиничким фенотипом Шарко-Мари-Тут, али без поузданих електрофизиолошких података. Код само 13 (45 посто) од 29 несродних болесниката с обољењем Шарко-Мари-Тут, један А, прве групе, детектована је дупликација 17p11.2. Код три од четири дијагностикована спорадична обољења Шарко-Мари-Тут, један А, нађена је дупликација 17p11.2. Код 17 болесника из шест породица са склоношћу ка компресивним парализама нерава делеција сегмента 17p11.2 доказана је код 15 болесника (88 посто), као и код пет (83 посто) од шест несродних болесника. С обзиром да је откривање склоности обољења Шарко-Мари-Тут, један А, ка компресивним парализама нерава рекомбинационог региона "хотспот" једноставан и поуздан дијагностички метод (путем *DNK*), на основу резултата ове студије може се закључити да су анализе гена корисне ради упућивања савета о генетској основи обољења болесницима и њиховим породицама само за болеснике с клинички већ потврђеном болешћу Шарко-Мари-Тут, један А, и склоношћу ка компресивним парализама нерава.

Кључне речи: Шарко-Мари-Тут, тип један А, томакулозна неуропатија, дупликација, делеција. (СРП АРХ ЦЕЛОК ЛЕК).

УВОД

Херeditарне моторне и сензорне неуропатије су најчешће дегенерационе болести периферног нервног система, с преваленцијом од једног наспрам 10 000 становника [1]. Дегенерација мијелинског омотача или аксона узрокује клиничку слику дисталне симетричне сензоримоторне, преодминантно моторне полинеуропатије. Симетричне концентричне хипотрофије мишића захватају највише стопала, потколенице и шаке, с честом деформацијом стопала и арефлексијом. Оштећеност сензибилитета свих модалитета, најчешће вибрационог, мањег је степена, с дистрибуцијом испада по типу "чарапа", ређе и "рукавица". Због најтеже захваћености нерава перонеуса болест се назива перонеусном мишићном атрофијом, а према ауторима који су је први описали и Шарко-Мари-Тутовом (*Charcot-Marie-Tooth*) болешћу [2].

Клиничка слика више типова болести Шарко-Мари-Тут је врло слична, упркос разликама у патохистолошким променама периферних живаца, електрофизиолошким одликама и начина наслеђивања. Тежина клиничке слике може бити различита, како између различитих породица, тако и између оболелих чланова исте породице [2]. Ову групу болести

одликује и велика генетичка хетерогеност. До данас је идентификовано седам гена у којима мутације могу бити одговорне за настанак болести [3, 4].

Обољење Шарко-Мари-Тут, тип један, демиелинизациони је облик болести којег одликује веома успорена брзина провођења кроз моторне и сензитивне нерве и сегментна демиелинизација и ремиелинизација влакана периферних нерава.

Показано је да је око 70 посто свих Шарко-Мари-Тутових болесника с овим обликом обољења [2] и код већине је показана корелација болести са стабилним, доминантним наслеђивањем дупликације, величине 1.5 Mb, на хромозому 17p11.2 у региону Шарко-Мари-Тут, један А [5]. Код око 70 посто несродних болесника с демиелинизирајућим обликом ове болести и код 90 посто спорадичних случајева оболевања откривена је дупликација овог региона [6].

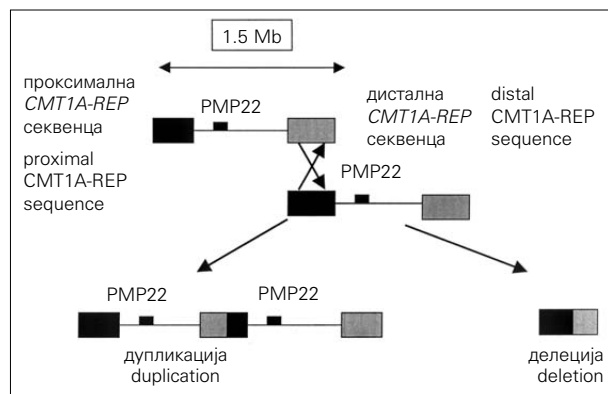
Реципрочна делеција региона, величине 1.5 Mb на хромозому 17p11.2, удружена је с клиничком сликом херeditарне неуропатије са склоношћу ка компресивним парализама нерава, која се такође назива томакулозном неуропатијом. Ово обољење се одликује великом осетљивошћу нерава на притисак или мини-

малну трауму, после чега настаје пролазна парализа. Болест се наслеђује аутозомно доминантно. Код 84 посто болесника откривена је делеција региона 17p11.2 [6].

У региону 17p11.2 налази се ген за периферни мијелински протеин 22. Овај протеин је важна компонента структуре мијелинског омотача периферних нерава и регулатор раста Шванових ћелија. Постојање три копије овог гена у геному болесника с дупликацијом доводи до повећане експресије гена и фенотипа Шарко-Мари-Тут, један. С друге стране, недовољна експресија овог гена код болесника с делецијом, односно са само једном копијом гена за периферни мијелински протеин 22, доводи до фенотипа томакулозне неуропатије [7, 8].

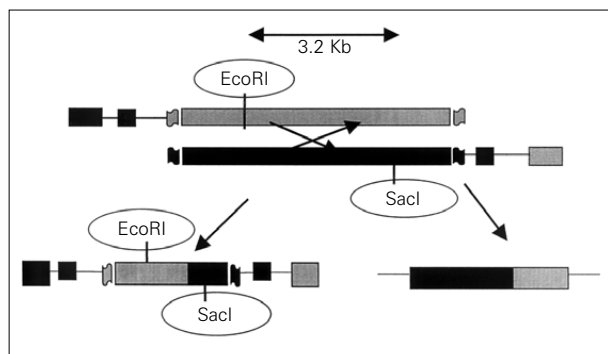
Регион 17p11.2 ограничавају две високо хомологе репетитивне секвенције: за периферни мијелински протеин 22, проксимална и дистална секвенција Шарко-Мари-Тут, један *A-REP*. Ове секвенције су дужине 24 *Kb* и готово су идентичне (хомологија ових секвенција износи 98,7 посто). Дупликације и делеције региона 17p11.2 настају као последица неједнаке рекомбинације између секвенција Шарко-Мари-Тут, један *A-REP* [9] (Слика 1).

Утврђено је да се код 80 посто болесника с дупликацијом и 95 посто болесника с делецијом региона 17p11.2 рекомбинациони догађај одиграва између



СЛИКА 1. Схематски приказ настанка дупликације и делеције региона 17p11.2

FIGURE 1. Schematic presentation of the onset of duplication and deletion of 17p11.2 segment.



СЛИКА 2. Схематски приказ рекомбинационог догађаја у оквиру региона "hot spot" којим настају хибридни елементи Шарко-Мари-Тут, тип један *A-REP*.

FIGURE 2. Schematic presentation of *CMT1A-REP* recombination hotspot.

рестрикционог места *EcoRI*, типичног за дисталну секвенцију Шарко-Мари-Тут, један *A-REP* и рестрикционог места *SacI*, типичног за проксималну секвенцију Шарко-Мари-Тут, један *A-REP* [10]. Овај регион, дужине 3,2 *Kb*, је "хот-спот" за рекомбинације, с обзиром да се рекомбинације у оквиру овог региона одигравају око 50 пута чешће него у околним секвенцијама. Рекомбинацијом настаје хибридни (рекомбиновани) елемент Шарко-Мари-Тут, један *A-REP* (Слика 2), који садржи и рестрикциона места *EcoRI* и *SacI* (у случају настанка дупликације), односно ни једно од ова два рестрикциона места (у случају настанка делеције). Потврђивање рекомбинованог елемента Шарко-Мари-Тут, један *A-REP* користи се у дијагностичким поступцима за проверу дупликације/делеције региона 17p11.2.

МЕТОД РАДА

Болесници

У овом раду је испитивано 85 болесника. Код 68 болесника (34 особа мушког и 34 женског пола) клиничка слика је била представљена различитом тежином дисталне симетричне сензоримоторне полинеуропатије с преобладавањем испољеним хипотрофијама, мишићним слабостима и арефлексијом. У овој групи је код 48 болесника из 29 породица утврђено аутозомно доминантно наслеђивање и смањена брзина провођења кроз периферне живце, што је било довољно за постављање дијагнозе Шарко-Мари-Тут-један. Код осталих 20 болесника ове групе клиничка слика није била поткрепљена подацима о наслеђивању или су недостајала поуздана електрофизиолошка мерила, те је под сумњом на Шарко-Мари-Тут-један спроведен диференцијално-дијагностички поступак. Другу групу је чинило 17 испитаника, болесника и чланова њихових породица (12 особа мушког и 5 женског пола) с клиничком сликом мултипле мононеуропатије или симетричне сензоримоторне полинеуропатије, са склоношћу ка компресивним парализама и аутозомно-доминантним наслеђивањем. Електрофизиолошко испитивање ове групе болесника је дало резултате типичне за томакулозну неуропатију. Из леукоцита периферне крви болесника изолована је *DNK* [11].

PCR за ошкривање рекомбинованих секвенција

Шарко-Мари-Тут, један *A-REP*

У реакцији *PCR* за откривање рекомбинованих елемената Шарко-Мари-Тут, један *A-REP*, типичних за дупликације, коришћени су следећи прајмери [12]: Шарко-Мари-Тут-један *A/* склоност ка компресивним парализама нерава *FOR*: 5' *AGG TTG TTT ACT CCT TCT TC 3'* и Шарко-Мари-Тут-један *A-REV*: 5' *AGA TGG AAT AGT AGA GCT CAC 3'*, при чему низводни прајмер (Шарко-Мари-Тут-један *A-REV*) препознаје секвенцију типичну за проксимални елемент Шарко-Мари-Тут-један *A-REP*. У реакцији *PCR* за откривање рекомбинованог елемента Шарко-Мари-Тут-један *A-REP*, типичног за делеције, коришћени су прајмери Шарко-Мари-Тут-један *A/* склоност ка компресивним парализама нерава *FOR*, и склоношћу ка компресивним парализама нерава *REV*: 5' *AGA TGG AAT AGT AGA GTG AG 3'*, при чему низводни прајмер препознаје секвенцију типичну за дистални елемент Шарко-Мари-Тут-један *A-REP*. Подвучени нуклеотиди у прајмерима спарују се специфично само са секвенцијом проксималног, односно дисталног елемента Шарко-Мари-Тут-један *A-REP*. Амплификација је учињена под условима описаним у литератури [12]. Успешност амплификације *PCR* проверавана је на једнопроцентним агарозним геловима, бојеним етидијумским бромидом.

Рестрикциона дигестија EcoRI продукта PCR

Рестрикциона дигестија је учињена у дигестионој смеши финалног волумена 60 µL: 40 µL продукта PCR, 6 µL "One-Phor-All Buffer PLUS", 1 U EcoRI (2µµL, Pharmacia Biotech). Дигестионе смеше су инкубисане преко ноћи на 37°C, а реакције су прекидане инкубацијом 10 min на 65°C. Анализа продукта дигестије вршена је на 0,8-процентним агарозним геловима, бојеним етидијум-бромидом.

РЕЗУЛТАТИ

У протоколу PCR за откривање рекомбинационог догађаја који доводи до дупликације региона 17p11.2 [12], амплификују се фрагменти дужине 3,6 Kb, пореклом из проксималног и, ако се налази, рекомбинованог Шарко-Мари-Тут, тип један, елемента A-REP. Уколико после дигестије EcoRI продукта PCR дигестија генерише фрагмент дужине 3,2 Kb, то указује на постојање рекомбинованог елемента Шарко-Мари-Тут, тип један, A-REP, односно на дупликацију региона 17p11.2 (Слика 3).

Од 48 болесника са сигурном дијагнозом Шарко-Мари-Тут, тип један, код 25 болесника (52 посто) потврђена је дупликација региона 17p11.2, настала услед неједнаке рекомбинације у региону "hot spot". Код преосталих 20 болесника с клиничким фенотипом сличним Шарко-Мари-Тут, тип један, али без сигурних података о наслеђивању, као и без поузданих електрофизиолошких мерила, није откривена дупликација региона 17p11.2 ни код једног испитаника.

У групи од 48 болесника са сигурном дијагнозом Шарко-Мари-Тут, тип један, било је укључено 29 не-

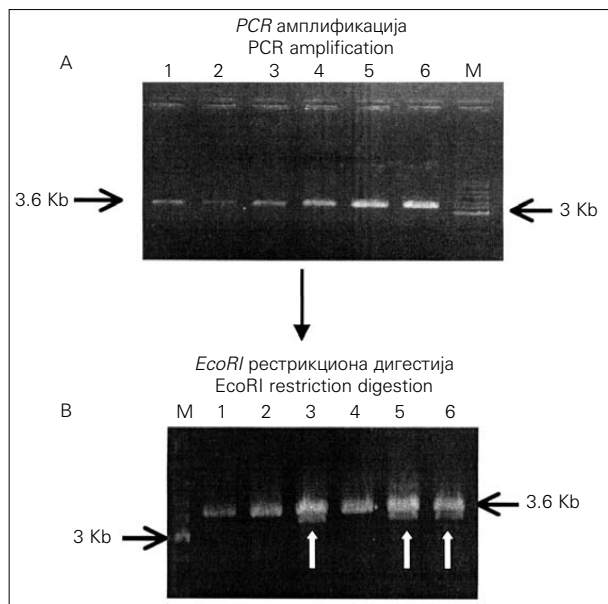
сродних болесника, и само код 13 (45 посто) је показана дупликација региона 17p11.2.

Од четири спорадична болесника са сигурном клиничком и електрофизиолошком дијагнозом Шарко-Мари-Тут, тип један, (при томе су оба родитеља без клиничких и електрофизиолошких знакова), код троје је детектована дупликација региона 17p11.2.

Детекција рекомбинационог догађаја који доводи до делеције региона 17p11.2 [12] заснива се на амплификацији PCR дисталног сегмента дужине 3,6 Kb и, ако се налази, рекомбинованог елемента Шарко-Мари-Тут, тип један A-REP. После рестрикционе дигестије EcoRI продукта PCR појава недигерираниог фрагмента од 3,6 Kb указује на делецију (Слика 4). Овим методом може се детектовати око 95 посто делеција у гену за периферни мијелински протеин 22 [12]. Анализом 17 болесника из шест породица с клиничком и електрофизиолошком дијагнозом томакулозне неуропатије, делеција региона 17p11.2 доказана је код 15 (88 посто) болесника. Од шест несродних болесника делеција региона 17p11.2 откривена је код пет болесника.

ДИСКУСИЈА

Наслеђивање демиелинизујућег облика херeditарне моторне и сензитивне неуропатије (Шарко-Мари-Тутове болести, тип један) врло је комплексно. Разлог ове комплексности вероватно лежи у великом бро-

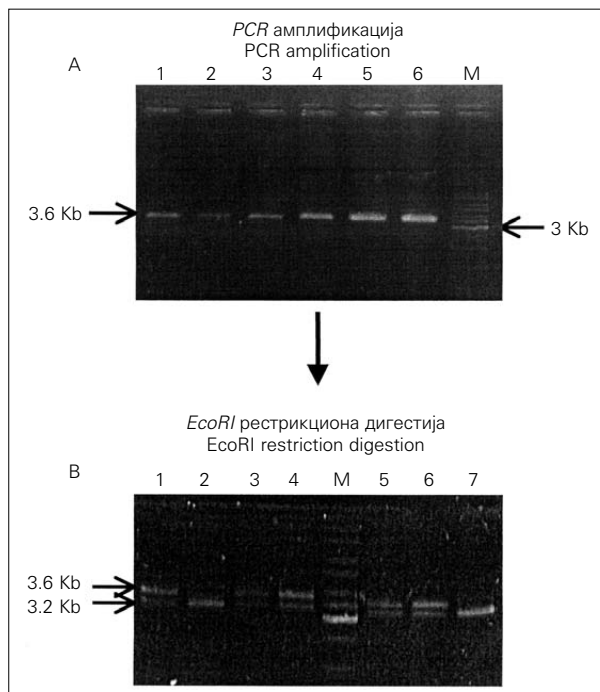


СЛИКА 3. Молекуларно-генетичка дијагностика дупликације региона 17p11.2.

A: анализа продукта амплификације PCR на 1% агарозном гелу; Б: анализа продукта дигестије фрагмента PCR рестрикционим ензимом EcoRI на 0,8% агарозном гелу; белим стрелицама су означени продукти дигестије од 3,2Kb; 3, 5, 6: болесници код којих је детектована дупликација региона 17p11.2; M: маркер DNK.

FIGURE 3. Molecular genetic diagnostic duplication of 17p11.2 segment.

A: analysis of PCR amplification on a 1% agarase gel; B: analysis of PCR fragments digestion by EcoRI restriction enzyme on a 0.8% agarase gel; White arrows indicate 3.2 Kb digestion; 3,5,6: patients with detected duplication of 17p11.2 segment; M: DNK marker.



СЛИКА 4. Молекуларно-генетичка дијагностика делеције региона 17p11.2.

A: анализа продукта PCR амплификације на 1% агарозном гелу; Б: анализа продукта дигестије фрагмента рестрикционим PCR ензимом EcoRI на 0,8% агарозном гелу; 1, 3, 4, 5, 6: болесници код којих је детектована делеција региона 17p11.2; M: маркер DNK.

FIGURE 4. Molecular genetic diagnostic deletion of 17p11.2 segment.

A: analysis of PCR amplification on a 1% agarase gel; B: analysis of PCR fragments digestion by EcoRI restriction enzyme on a 0.8% agarase gel; 1,3,4,5,6: patients with detected deletion of 17p11.2 segment; M: DNK marker.

ју различитих мутација, у најмање седам до данас познатих гена. Дупликација региона 17p11.2 је само једна, мада најчешћа мутација која доводи до ове клиничке слике. Због њихове комплексности и обима, молекуларно-генетичке тестове не треба користити у циљу постављања дијагнозе, што је потврдила и ова студија. Појава дупликације региона 17p11.2 показана је само код болесника с потврђеном, сигурном дијагнозом Шарко-Мари-Тут, тип један (52 посто). За постављање дијагнозе постоје прецизна клиничка и електрофизиолошка мерила, док је процењивање типа мутације одговорне за настанак ове болести значајно после постављања клиничке дијагнозе, пре свега ради пружања савета болеснику о генетичком пореклу обољења.

Од четири спорадична болесника (оба родитеља су клинички и електрофизиолошки здрава) дупликација је показана код три. У свим студијама до данас показано је да је дупликација региона 17p11.2 најчешћа мутација *de novo* код болесника с демјелинизирајућим обликом болести.

Учесталост дупликације региона 17p11.2 од 45 посто у групи несродних болесника са сигурном дијагнозом Шарко-Мари-Тут, тип један, нижа је од просечне величине за Европу (70,7 посто)[6]. Мања величина добијена у овој студији може бити једним делом последица ограничених могућности метода *PCR*, којим се детектују само рекомбинациони догађаји у оквиру региона "hot spot", односно око 80 посто случајева дупликација региона 17p11.2.

Испољивање болести може бити веома различито међу члановима исте породице. У седам породица, код једног од родитеља болесне деце детаљним клиничким и електрофизиолошким прегледом дијагностикована је болест, а накнадно је потврђена дупликација. Код једне породице, за анализу су били доступни узорци четири генерације, тако да је било могуће пратити наслеђивање дупликације кроз више генерација (Схема 1). Код болесника с доказаном дупликацијом, анализа чланова породице је врло битна ради пружања савета о генетичкој природи болести, зато што често поред једног члана породице с доказаном мутацијом постоји велики број рођака који носе мутацију, а нису свесни тога.

Од 17 болесника с клиничком дијагнозом херeditарне неуропатије са склоношћу ка компресивним парализама, односно с дијагнозом томакулозне неуропатије, делеција региона 17p11.2 потврђена је код 15 (88 посто) болесника. Овај податак показује да је делеција региона 17p11.2 далеко најчешћа мутација која доводи до клиничке слике томакулозне неуропатије у југословенској популацији. Резултати учесталости делеције региона 17p11.2 код болесника с томакулозном неуропатијом, добијени у овом раду, у складу су с подацима из других европских центара

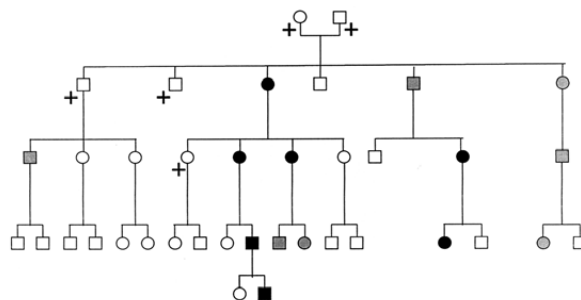


СХЕМА 1. Породично стабло. Црним кружићима су означене особе код којих је потврђена дупликација региона 17p11.2; сивим су означени суспектни чланови породице на основу породичне анамнезе.

SCHEME 1. Family tree: black circles indicate persons with documented duplication of 17p11.2 segment; gray circles indicate suspected family members on the basis of medical history.

[6]. Важно је нагласити да највећи број болесника с показаном делецијом представљају чланове породица оболелих особа, који нису били свесни да болују.

Детекција мутација код чланова породице болесника је важна, пре свега, ради пружања савета о генетици болести у смислу чувања од евентуалних повреда које су код ових болесника праћене дуготрајним парализама.

ЛИТЕРАТУРА

- Emery AEH. Population frequencis of inherited neuromuscular diseases-a world survey. *Neuromusc Disord* 1991;1:19-29.
- Dyck PJ, Chance P, Lebo R, Carney JA. Hereditary motor and sensory neuropathies. In: Dyck PJ, Thomas Pk, Griffin JW et al (Eds). *Peripheral Neuropathy*. Saunders, Philadelphia 1993;1094-136.
- Schenone A, Mancardi GL. Molecular basis of inherited neuropathies. *Current Opin Neurol* 1999;12:603-16.
- De Jonghe P, Timmerman V, Nelis E et al. Charcot-Marie-Tooth disease and related peripheral neuropathies. *J Peripher Nerv Syst* 1997;2(4):370-87.
- Lupski JR, Monies de Oca-Luna R, Slaugenhaupt S et al. DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell* 1991;66:219-39.
- Nelis E, Van Broeckhoven C et al. Estimation of the mutation frequencies in Charcot-Marie-Tooth disease type 1 and Hereditary Neuropathy with Liability to Pressure Palsies: a European Collaborative Study. *Eur J Hum Genet* 1996;4:25-33.
- Timmerman V, Nelis E, Van Hul W et al. The peripheral myelin protein gene PMP 22 is contained within the Charcot-Marie-Tooth disease type 1A duplicatin. *Nature Genet* 1992;1:171-5.
- Chance PE, Alderson MK, Leppig KA et al. DNA deletion associated with Hereditary Neuropathy with Liability to Pressure Palsies. *Cell* 1993;72:143-51.
- Pentao L, Wise CA, Chinault AC, Patel PI, Lupski JR. Charcot-Marie-Tooth type 1A duplication appears to arise from recombination at repeat sequences flanking the 1.5 Mb monimer unit. *Nat Genet* 1992;2:292-300.
- Reiter LT, Murakami T, Koeth T et al. A recombination hotspot responsible for two inherited peripheral neuropaths is located near a mariner transposon-like element. *Nat Genet* 1996;12:288-97.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd edition. Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989.
- Stronach EA, Clark C, Bell C et al. Novel PCR-based diagnostic tools for Charcot-Marie-Tooth type 1A and Hereditary Neuropathy with Liability to Pressure Palsies. *J Peripher Nerv Syst* 1999;4(2):117-22.

ANALYSIS OF MUTATIONS IN 17P11.2 REGION IN PATIENTS WITH CHARCOT-MARIE-TOOTH TYPE 1 DISEASE AND PATIENTS WITH TOMACULOSE NEUROPATHY

N. ZAMUROVITSH¹, V. MILITSH², J. DACHKOVITSH³, D. ZAMUROVITSH⁴, B. CHULJKOVITSH¹, S. PAVLOVITSH³, S. APOSTOLSKI³, S. ROMAC¹

1. School of Biology, University of Belgrade, Belgrade; 2. Institute of Children's Neurology and Psychiatry, School of Medicine, University of Belgrade, Belgrade; 3. Institute of Neurology, School of Medicine, University of Belgrade, Belgrade; 4. Mother and Child Health Institute, Belgrade

Charcot-Marie-Tooth type 1A disease (CMT1A) and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies (HNPP) are common inherited disorders of the peripheral nervous system associated with duplication and deletion, respectively, of the 17p11.2 segment including the gene of peripheral myelin protein 22. We studied 48 subjects belonging to 29 families with clinical and electrophysiological signs of definite CMT1, 20 patients with suspected CMT phenotype, and 17 patients and healthy members of their families with HNPP. Blood sampling and DNA isolation, PCR, restriction analysis, southern blotting were performed using standard procedures. Of 48 patients with diagnosis of definite CMT1 in 25 (52%) we found a 1.5 Mb tandem duplication in chromosome 17p11.2. These duplications were not found in any of 20 sporadic cases with the clinical phenotype of CMT but without reliable electrophysiological data. Only 13 (44.8%) of 29 unrelated CMT1 patients from the first group had 17p11.2 duplications. Three of 4 sporadic cases (75%) with

definite CMT1 had 17p11.2 duplications. Of 17 patients from 6 families with HNPP deletion of 17p11.2 segment was found in 15 (88.2%), as well as in 5 (83.3%) of six unrelated cases. Detection of CMT1A/HNPP recombination hotspot is a simple and reliable DNA diagnostic method, which is useful only for the patients with clinically already verified CMT1, and HNPP for further genetic counselling of patients and members of their families.

Key words: Charcot-Marie-Tooth type 1A disease, hereditary neuropathy with liability to pressure palsies, duplications, deletions. (SRP ARH CELOK LEK).

STANKA ROMAC

Biološki fakultet

11 000 Beograd, Studentski trg 16

Tel./faks: 011/639-100; pošt. fah 52

ТРЕЋИ КОНГРЕС ПЕДИЈАТАРА
ЈУГОСЛАВИЈЕ/СРБИЈЕ И ЦРНЕ ГОРЕ
с међународним учешћем
Херцег Нови, 23-26 септембра 2002. године

Области: превентивна и социјална педијатрија, пулмологија, кардиологија, нефрологија, ендокринологија, исхрана, гастроентерологија, неурологија, неонатологија, адолесценција и јувенилна гинекологија, ургентна педијатрија, имунологија, клиничка генетика и метаболизам, хематологија, дечја хирургија, болести зависности, заштита животне средине.

Информације:
Секретаријат Конгреса педијатара Југославије
81 000 Подгорица, Љубљанска б.б.
Телефон-факс: 081/242-090