

Elena Sinkiewicz-Darol

Udział czynnika genetycznego
w zmienności fenotypowej choroby
Charcot-Marie-Tooth

Rozprawa doktorska

Promotor: prof. dr hab. med. Andrzej Kochański

Zespół Nerwowo-Mięśniowy
w Zakładzie Kliniczno-Badawczym Neurochirurgii
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN

Warszawa 2012 r.

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE	7
WYKAZ SKRÓTÓW	9
1. WSTĘP	11
1.1. Charakterystyka genów wybranych do badań nad zmiennością fenotypową chorych z CMT1A/HNPP	17
1.2. Gen <i>PMP22</i>	17
1.2.1. Struktura genu <i>PMP22</i>	18
1.2.2. Ekspresja genu <i>PMP22</i>	18
1.2.3. Sekwencja regulatorowa genu <i>PMP22</i>	19
1.3. Białko PMP22	21
1.4. Gen <i>LITAF/SIMPLE</i>	23
1.4.1. Struktura genu <i>LITAF/SIMPLE</i>	23
1.4.2. Ekspresja genu <i>LITAF/SIMPLE</i>	24
1.5. Białko LITAF/SIMPLE	25
1.6. Rola układu immunologicznego w neuropatiach genetycznie uwarunkowanych	28
2. CEL PRACY	31
3. MATERIAL	32
3.1. Grupa badana	32
3.2. Grupa kontrolna.....	35
4. METODY	36
4.1. Izolacja DNA.....	36
4.2. Izolacja RNA.....	36
4.3. Pomiar spektrofotometryczny	36
4.4. Rozdział elektroforetyczny	36
4.5. Reakcja łańcuchowa polimerazy DNA z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym (Real-time PCR).....	36
4.6. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR).....	38
4.6.1. Gen <i>PMP22</i>	39
4.6.2. Gen <i>LITAF/SIMPLE</i>	39
4.6.3. Gen <i>TNF alfa</i>	39
4.7. Oczyszczanie produktów PCR.....	40
4.8. Sekwencjonowanie produktów PCR.....	40
4.9. Analiza bioinformatyczna	40
4.10. Skalowanie polineuropatii CMT1A i HNPP	42
4.11. Analiza statystyczna danych	43
5. WYNIKI	44
5.1. Warianty sekwencyjne w regionie regulatorowym i promotorowym genu <i>PMP22</i>	46
5.1.1. Warianty sekwencyjne -819C>T i -4785G>T	47
5.1.2. Warianty sekwencyjne -4210T>C, -4759T>A, -4800C>T.....	47

5.1.3.	Konserwowanie nukleotydowe wariantów SNP w sekwencji regulatorowej genu <i>PMP22</i>	49
5.1.4.	Analiza <i>in silico</i> wariantów SNP w sekwencji regulatorowej genu <i>PMP22</i>	49
5.2.	Warianty sekwencyjne w regionie kodującym genu <i>PMP22</i>	50
5.2.1.	Wariant sekwencyjny c.215C>T (Ser72Leu)	50
5.2.2.	Wariant sekwencyjny c.353C>T (Thr118Met).....	51
5.2.3.	Konserwowanie międzygatunkowe aminokwasów w białku <i>PMP22</i>	53
5.2.4.	Analiza <i>in silico</i> zidentyfikowanych wariantów w genie <i>PMP22</i> w kierunku motywów regulujących splicing.....	54
5.3.	Warianty sekwencyjne w regionie kodującym genu <i>LITAF</i>	54
5.3.1.	Wariant sekwencyjny c.234 (Thr78Thr).....	55
5.3.2.	Wariant sekwencyjny c.234 G>A (Ile92Val)	56
5.3.3.	Analiza średniego wieku wystąpienia pierwszych objawów choroby w badanych grupach	58
5.3.4.	Analiza parametrów klinicznych w grupie chorych z CMT1A z początkiem choroby po 10-tym roku życia.....	60
5.3.5.	Analiza parametrów klinicznych w grupie chorych z CMT1A z początkiem choroby poniżej 10 roku życia.....	62
5.3.6.	Wariant sekwencyjny c.274A>G (Ile92Val) w grupie chorych CMT/polineuropatia zapalna	65
5.3.7.	Wariant sekwencyjny c.333C>T (Ala111Ala)	67
5.3.8.	Wariant sekwencyjny c.233 G>A (Gly112Ser).....	67
5.3.9.	Wariant sekwencyjny c.585C>T (3'UTR).....	69
5.3.10.	Konserwowanie międzygatunkowe dla aminokwasów w białku <i>LITAF/SIMPLE</i>	70
5.3.11.	Analiza <i>in silico</i> zidentyfikowanych wariantów w genie <i>LITAF</i> w kierunku motywów regulujących splicing.....	71
5.4.	Warianty sekwencyjne w promotorze genu <i>TNF alfa</i>	72
5.5.	PODSUMOWANIE WYNIKÓW	73
6.	DYSKUSJA	74
6.1.	Warianty sekwencyjne w regionie regulatorowym genu <i>PMP22</i>	75
6.1.1.	Niepatogenne warianty w sekwencji regulatorowej genu <i>PMP22</i>	75
6.1.2.	Potencjalnie patogenne warianty w sekwencji regulatorowej genu <i>PMP22</i>	76
6.2.	Warianty sekwencyjne w regionie kodującym genu <i>PMP22</i>	79
6.2.1.	Wariant sekwencyjny c.353C>T (Thr118Met).....	79
6.2.2.	Wariant sekwencyjny c.215C>T (Ser72Leu)	83
6.3.	Warianty sekwencyjne w genie <i>LITAF</i>	87
6.3.1.	Rzadkie warianty sekwencyjne genu <i>LITAF</i>	88
6.3.2.	Wariant sekwencyjny c.274A>G (Ile92Val)	91
6.3.3.	Wariant sekwencyjny c.274A>G (Ile92Val) w grupie chorych CMT/polineuropatia zapalna.....	93
6.3.4.	Wariant sekwencyjny c.332G>A (Gly112Ser).....	95
6.4.	Warianty sekwencyjne w genie <i>TNF alfa</i>	98
6.4.1.	Wariant sekwencyjny -308G>A w sekwencji promotorowej genu <i>TNF alfa</i>	98

7. WNIOSKI	99
8. SUPLEMENT	100
9. PIŚMIENNICTWO	109

Składam serdeczne podziękowania

Panu prof. dr hab. med. Andrzejowi Kochańskiemu za cenne wskazówki, sugestie, przekazaną wiedzę, poświęcony czas oraz opiekę merytoryczną.

Pani prof. dr hab. med. Irenie Hausmanowej-Petrusewicz za uwagi merytoryczne oraz możliwość realizowania niniejszej pracy w Zespole Nerwowo-Mięśniowym.

Wszystkim Koleżankom i Pracownikom z Zespołu Nerwowo-Mięśniowego za życzliwość, pomocną dłoń oraz miłą atmosferę pracy.

Część wyników została opublikowana w następujących artykułach:

Sinkiewicz-Darol E., Kabzińska D., Moszyńska I., Kochański A.; The 5' regulatory sequence of the *PMP22* in the patients with Charcot-Marie-Tooth disease. *Acta Biochimica Polonica* 2010; 57(3):373-7.

Potulska-Chomik A.*, **Sinkiewicz-Darol E.***, Kostera-Pruszczyk A., Drac H., Kabzińska D., Zakrzewska-Pniewska B., Kochański A.; Charcot-Marie-Tooth type 1C disease coexisting with central demyelination – overlapping syndrome or continuum of symptoms? *Folia Neuropathologica* 2012 (praca w druku). * równy udział współautorów.

Badania przedstawione w rozprawie doktorskiej zostały wykonane w ramach grantu MNiSW NN402276336 „Zmienność przebiegu klinicznego choroby Charcot-Marie-Tooth typu 1A w świetle badań molekularnych genu *PMP22*” (kierownik grantu prof. dr hab. med. Andrzej Kochański).

STRESZCZENIE

W ostatnim dziesięcioleciu dokonano spektakularnych odkryć w zakresie identyfikacji nowych *loci* i genów odpowiedzialnych za powstanie licznych dziedzicznych chorób neurodegeneracyjnych. Choć identyfikacja nowego genu i mutacji sprawczych pozostaje kluczowym zadaniem badania nad etiopatogenezą choroby genetycznie uwarunkowanej, to jednak w żaden sposób nie pozwala na określenie dynamiki procesu chorobowego i zmienności fenotypowej. Choroba Charcot-Marie-Tooth typu 1A (CMT1A) jest najczęstszą dziedziczną chorobą obwodowego układu nerwowego człowieka. Od 1991 r. istnieje możliwość identyfikacji głównej mutacji sprawczej w CMT1A tj. mikroduplikacji w regionie 17p11.2-p12, obejmującej gen *PMP22*. Przebieg kliniczny choroby CMT1A i bliźniaczej (allelicznej) względem niej dziedzicznej neuropatii z nadwrażliwością na ucisk (HNPP) bywa bardzo różny. Chorzy, u których stwierdzono duplikację genu *PMP22* charakteryzują się dużą zmiennością objawów klinicznych (zanik mięśni odsiebnych, wady kostne, objawy dodatkowe). Podobnie w neuropatii uciskowej (HNPP) nie sposób określić początku choroby, liczby, lokalizacji i częstości epizodów niedowładu na podstawie wyniku badania genetycznego. Tak więc, zarówno w chorobie CMT1A jak i HNPP wynik badania genetycznego nie posiada żadnej wartości rokowniczej. Rodzi się więc pytanie o rolę dodatkowych czynników genetycznych (modyfikator) w kształtowaniu różnorodności fenotypowej chorób CMT1A/HNPP. Jak dotąd, pomimo 22 lat badań nad etiopatogenezą chorób CMT1A/HNPP w kilkunastu ośrodkach na świecie, nie udało się zidentyfikować genu modyfikatora w chorobach CMT1A/HNPP. Podstawowym problemem w ocenie zmienności fenotypowej chorób CMT1A/HNPP pozostaje brak powszechnie uznanych kryteriów oceny fenotypu.

W ostatnich latach próbowano wprowadzić skale oceny fenotypu polineuropatii genetycznie uwarunkowanych, ale ich użyteczność jest przedmiotem dyskusji. Oznacza to, że obiektywna ocena fenotypu CMT1A/HNPP (z wyjątkiem przypadków skrajnych) jest nadzwyczaj trudna.

W wielu opracowaniach udowodniono, że istnieje korelacja pomiędzy ekspresją genu *PMP22* a przebiegiem klinicznym polineuropatii. W tym ujęciu sekwencja regulatorowa (promotorowa) genu *PMP22* wydaje się odgrywać ważną rolę w kształtowaniu fenotypu CMT1A/HNPP. Nie można odrzucić tezy, że warianty sekwencyjne w obrębie dodatkowej (trzeciej) kopii genu *PMP22* (część kodująca) mogą także wpływać na przebieg kliniczny choroby CMT1A.

Genem funkcjonalnie związanym z *PMP22* jest gen *LITAF* (*Lipopolysaccharide-Induced Tumor Necrosis Factor*) biorący prawdopodobnie udział w degradacji białka *PMP22*. Obecnie diskutowany jest związek funkcjonalny genu *LITAF* i genu kodującego czynnik *TNF alfa*. Białko *LITAF/SIMPLE* prawdopodobnie funkcjonuje jako czynnik transkrypcyjny dla genu *TNF alfa*. Wydaje się, że warianty w sekwencji promotorowej genu *TNF alfa* mogą choć w części odpowiadać za wystąpienie komponentu centralnego i zapalnego w polineuropatiach obwodowych.

Głównym celem pracy była próba odpowiedzi na pytanie jaki jest udział czynnika genetycznego – genów *PMP22*, *LITAF* i *TNF alfa* w zmienności fenotypowej chorób CMT. Ponadto w pracy podjęto próbę przyporządkowania zidentyfikowanych wariantów sekwencyjnych w powyższych genach poszczególnym fenotypom choroby.

Badania genetyczne przeprowadzono u 183 osób; w tym 92 chorych z rozpoznaniem CMT1A, 55 chorych z rozpoznaniem HNPP, 15 osób z rodzinną polineuropatią genetycznie uwarunkowaną współwystępującą z polineuropatią zapalną oraz w 11-osobowej grupie zdrowych członków rodzin. Proces gromadzenia dokumentacji medycznej i banku próbek DNA chorych z duplikacją/delecją genu *PMP22* poprzedzający rozpoczęcie badań będących przedmiotem rozprawy doktorskiej trwał 15 lat. Grupę kontrolną stanowiło 100 próbek DNA (50 kobiet, 50 mężczyzn) uzyskanych z Zakładu Genetyki Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Analizę duplikacji/delecji regionu 17p11.2-p12 wykonano metodą PCR w czasie rzeczywistym (*Real Time PCR*). Do analizy produktów reakcji PCR zastosowano technikę bezpośredniego sekwencjonowania produktów reakcji PCR opartą na metodzie Sangera z użyciem znakowanych dideoksynukleotydów.

W badanych grupach łącznie stwierdzono 14 wariantów sekwencyjnych. W genie *PMP22* 7 wariantów – 1 mutację, 4 warianty potencjalnie patogenne, 2 warianty polimorficzne. W genie *LITAF* zidentyfikowano 6 wariantów - 1 mutację, 1 wariant patogenny oraz 3 rzadkie warianty sekwencyjne. W promotorze genu *TNF alfa* zidentyfikowano 1 polimorficzny wariant sekwencyjny. Zidentyfikowane zmiany w genach *PMP22*, *LITAF*, *TNF alfa* zostały poddane analizie statystycznej oraz bioinformatycznej.

Wykazano, że wariant sekwencyjny c.274A>G (Ile92Val) w genie *LITAF* może być rozpatrywany jako modyfikator zmienności klinicznej chorób CMT1A/HNPP. Ponadto warianty SNP w sekwencji kodującej genu *PMP22* istotnie wpływają na przebieg choroby CMT1A. Wydaje się, że warianty sekwencyjne w domenie regulatorowej genu *PMP22* oraz w regionie promotorowym genu *TNF alfa* nie odgrywają istotnej roli w modulowaniu zmienności fenotypowej chorób CMT1A/HNPP.

WYKAZ SKRÓTÓW

cAMP - cykliczny adenylozomonofosforan

CdCS - Cri Du Chat Syndrome - zespół kociego płaczu

CHN - Congenital Hereditary Neuropathy - wrodzona neuropatia hipomielinizacyjna

CIDP - chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy - przewlekła polineuropatia zapalno-demielinizacyjna

CMAP - (compound muscle action potential) złożony potencjał czynnościowy rejestrowany z mięśnia po stymulacji elektrycznej włókien ruchowych nerwu

CMT - choroba Charcot-Marie-Tooth

CMT1A – choroba Charcot-Marie-Tooth typ 1A

CMTX – choroba Charcot-Marie-Tooth o dziedziczeniu sprzężonym z chromosomem X

CNTF - *ciliary neurotrophic factor* - gen kodujący rzęskowy czynnik neurotroficzny produkowany przez komórki Schwanna

Cx32 /GJB1 - *Connexin 32* (Gap Junction Protein Beta-1) – koneksyna 32, białko tworzące kanały jonowe

CREB - cAMP-responsive element binding protein – miejsce wiązania dla cyklicznego adenylozomonofosforanu

dbSNP – single nucleotide polymorphism database - baza polimorfizmów jednonukleotydowych

DSS - Déjerine-Sottasa Syndrome – zespół Déjerine’a-Sottasa

EGR2 - *Early Growth Response Gene 2*- gen wczesnej odpowiedzi 2 (czynnik transkrypcyjny)

ESE – Exonic Splicing Enhancers – eksonowe sekwencje wzmacniające składanie RNA

ESS - Exonic Splicing Silencer – eksonowe sekwencje wyciszające składanie RNA

GBS - Guillain-Barré Syndrome - zespół Guillaina–Barrego

HNPP - Hereditary Neuropathy with liability to Pressure Palsies – dziedziczna neuropatia z nadwrażliwością na ucisk

Krox20 – mysi ortolog ludzkiego genu *EGR2*

LITAF - *Lipopolysaccharide-induced Tumor Necrosis Factor* – czynnik transkrypcyjny ludzkiego promotora genu *TNF alfa* indukowany lipopolisacharydem

LMSE - late myelination Schwann cell-specific element - element dojrzałych komórek Schwanna

MAG - *Myelin-Associated Glycoprotein* – gen kodujący białko otoczki mielinowej

MBP - *Myelin Basic Protein* - gen kodujący podstawowe białko otoczki mielinowej

nkkd – niedowład kończyn dolnych

nkkg – niedowład kończyn górnych

nt - nukleotyd

OA – odruch ze ścięgna Achillesa

Oct-6 - Octamer Binding Transcription Factor 6 – czynnik transkrypcyjny

OK – odruch kolanowy

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

PD - Parkinson disease - choroba Parkinsona

PO/MPZ - *protein zero/myelin protein zero* – gen kodujący białko otoczki mielinowej

PMP22 - *peripheral myelin protein 22* - gen kodujący białko otoczki mielinowej

PRX - *Periaxin* – gen periaksyny kodujący białko tworzące kompleks dystroglikanowo-glikoproteinowy

pz – para zasad

SEMAF - *semaphorin F* - gen kodujący białko związane z migracją neuronów

SIMPLE - *Small Integral Membrane Protein Of Lysosome/Late Endosome* – gen kodujący białko zlokalizowane w błonie lizosomu/późnego endosomu

SM – sclerosis multiplex - stwardnienie rozsiane

SMA - spinal muscular atrophy - rdzeniowy zanik mięśni

SNAP - sensory nerve action potential - czuciowy potencjał czynnościowy rejestrowany z nerwu, synonim czuciowego potencjału wywołanego rejestrowanego w badaniu SCV (sensory conduction velocity)

SNP - single-nucleotide polymorphism – polimorfizm pojedynczego nukleotydu

SOX10 – SRY-Box 10 – czynnik transkrypcyjny

SREB - sterol regulatory element binding protein – miejsce wiązania dla receptora progesteronu

TNF alfa - *tumor necrosis factor alpha* - czynnik martwicy nowotworów typu alfa

UTR - untranslated region – nieulegająca translacji część mRNA

1. WSTEP

Choroby kręgu Charcot-Marie-Tooth (CMT) to jedne z częstszych dziedzicznych schorzeń obwodowego układu nerwowego. Po raz pierwszy ich opisu dokonano już w drugiej połowie XIX wieku. Ponad sto lat później badania kliniczne, elektrofizjologiczne oraz morfologiczne pozwoliły na wyodrębnienie dwóch głównych grup: CMT typu 1 określonego jako demielinizacyjny oraz aksonalną postać choroby CMT typu 2 (Harding i Thomas 1980). W roku 1989 w grupie chorych z demielinizacyjną postacią CMT wykazano sprzężenie genetyczne z *locus* 17p11.2-p12, od tej pory ta forma choroby nosi nazwę choroby CMT typu 1A (Raeymaekers i wsp. 1989). Dwa lata później belgijska grupa badaczy, a następnie amerykańska opisały pierwszą mutację w chorobach kręgu CMT, którą była mikroduplikacja regionu 17p11.2-p12 obejmująca 1,5 mln pz (Raeymaekers i wsp. 1991, Lupski i wsp. 1991). W obrębie zduplikowanego regionu znajduje się ok. 80 genów, jednakże wykazano, że w patomechanizmie choroby CMT1A bierze udział jedynie gen *PMP22* (*peripheral myelin protein 22*). Za jego patogenną rolę przemawia podobieństwo fenotypów chorych z duplikacją w regionie 17p11.2-p12 z fenotypem chorych, u których zidentyfikowano mutacje punktowe w genie *PMP22* (Roa i wsp. 1993). Dotychczas duplikacja regionu 17p11.2-p12 jest najczęściej występującym defektem skutkującym fenotypem choroby CMT1A. Przyjmuje się, że w populacji europejskiej występuje aż u 70% chorych z CMT (Nelis i in. 1996). Natomiast w populacji północno-amerykańskiej (Stany Zjednoczone) częstość zachorowania na CMT1 wynosi 1:2500 (Skre 1974). W Tabeli 1 przedstawiono dotychczas opublikowane dane populacyjne dotyczące częstości występowania duplikacji regionu 17p11.2-p12 oraz częstość mutacji w najczęściej badanych genach wywołujących polineuropatie.

Region	Duplikacja 17p11.2-p12	Mutacje punktowe				Pacjenci/Referencje
		<i>PMP22</i>	<i>GJB1</i>	<i>MPZ</i>	Inne geny	
Polska	28% (51 rodzin)	-	-	-	-	179 rodziny z rozpoznaniem choroby CMT1 (Kabzińska i wsp. 2009)*
Europa	71% (579)	3/98	10/36	14/107	-	819 chorych z CMT1 (nie wszyscy pacjenci z wykluczoną duplikacją byli badani w kierunku mutacji punktowych) (Nelis i wsp. 1996)
Ameryka Płn. (głównie USA)	52% (79)	3%(5)	7%(11)	3%(5)	2% (1 <i>EGR2</i> , 1 <i>PRX</i> , 1 <i>NEFL</i>)	153 chorych - 141 CMT1, 3 DSS, 1CHN, 6 CMT2, 2 HNPP (Boerkoel i wsp. 2002)
Australia	61% (136)	1% (3)	12% (27)	3% (7)	-	224 chorych z CMT (Nicholson 1999)

Serbia	39% (36)	1% (1)	11% (10)	3% (3)	-	93 chorych – 68 CMT1, 9 CMTX, 5 CMT2, 11 CMT (Keckarevic-Markovic i wsp. 2009)
Rosja	33% (58)	1% (2)	9% (15)	3% (6)	-	174 chorych – 108 CMT1, 32 CMT2, 34 CMT (Mersyanova i wsp. 2000)
Słowacja	33% (40 rodzin)	4,5% (6 rodzin)	-	-	-	121 rodzin – 119 z CMT, 2 z HNPP (Resko i wsp. 2011)
Włochy	58% (98)	1% (2)	7% (12)	2% (4)	-	170 chorych z CMT1 i DSS (Mostacciuolo i wsp. 2001)
Grecja	26% (63)	-	4,9%(12)	0,58% (1)	-	234 chorych z CMT1 (Karadima i wsp. 2011)
Finlandia	52% (64)	1% (3)	10% (12)	2% (3)	-	122 chorych z CMT1 i DSS (Silander i wsp. 1998)
Norwegia	14% (11)	-	6% (5)	1,2% (1)	-	81 chorych z CMT1 (Braathen i wsp. 2011)
Japonia	31% (40)	5% (6)	11% (14)	9% (12)	-	128 chorych z CMT (Numakura i wsp. 2002)
Korea	26% (15)	1% (1)	5% (3)	5% (3)	5% (1 <i>EGR2</i> , 2 <i>NEFL</i>)	57 chorych – 28 CMT1, 18 CMT2, 4 DSS, 7 CMT (Choi i wsp. 2004)
Tajwan	58% (33)	-	-	89% (5)	-	57 chorych z CMT1 (Lee i wsp. 2004)

Tabela 1 Częstość występowania duplikacji genu *PMP22* oraz mutacji punktowych w genach wywołujących polineuropatię w różnych populacjach.

*Badania opublikowane w 2009 roku prowadzone w Zespole Nerwowo-Mięśniowym IMDiK PAN w Warszawie.

U większości chorych, u których rozpoznano dziedziczną neuropatię z nadwrażliwością na ucisk (HNPP) stwierdzono delecję regionu 17p11.2-p12. Podobnie jak w przypadku chorych z CMT1A, HNPP może być także wywołane przez mutacje punktowe w genie *PMP22* (Chance i wsp. 1993).

Wśród chorych z fenotypem CMT1A/HNPP obserwuje się pewną zmienność kliniczną. W typowej („klasycznej”) postaci CMT1A objawy choroby pojawiają się w pierwszej lub drugiej dekadzie życia. Jednakże okazuje się, że wiek wystąpienia pierwszych objawów jest bardzo zmiennym parametrem klinicznym (od 1-go roku życia po 6-tą dekadę). Zmienność kliniczna dotyczy także takich parametrów jak niedowład odsebnych mięśni kończyn dolnych, kończyn górnych, zaburzenia czucia. W 70% przypadków badania przewodnictwa nerwowego wykazują obniżenie prędkości przewodzenia we włóknach ruchowych nerwu pośrodkowego (arbitralnie ustalona wartość 38 m/s). U 75% chorych obserwuje się wady kostne w postaci wydrążonych stóp oraz młotowate ustawienie palców. Skrzywienie kręgosłupa obserwuje się u 10% chorych. Około 10% pacjentów pozostaje bezobjawowych klinicznie (Reilly i wsp. 2011, Murphy i wsp. 2012).

Podobnie jak w przypadku chorych z CMT1A fenotyp chorych z HNPP jest niezwykle zmienny. Zazwyczaj obraz kliniczny chorych z delecją regionu 17p11.2-p12 jest łagodniejszy

od wywołanego mutacjami punktowymi w genie *PMP22* (Chance i wsp. 1993). HNPP charakteryzuje się nawracającymi epizodycznymi porażeniami nerwów obwodowych. Wydaje się, że ze względu na bardzo dużą zmienność fenotypową, HNPP jest rzadziej rozpoznawana niż występuje. Pierwsze objawy choroby, zwykle wywołane poprzez ucisk lub uraz, pojawiają się w drugiej lub trzeciej dekadzie życia. Jednakże podobnie jak w przypadku chorych z fenotypem CMT1A początek choroby odnotowano także przed 5-tym rokiem życia jak i w 6- 7-iej dekadzie. U większość chorych pierwsze objawy mają ostry, bezbolesny początek, poprzedzony drętwieniem i parestezjami. Zazwyczaj objawy pogarszają się w ciągu kilku dni/tygodni i u 50% chorych całkowicie ustępują. Wśród chorych z HNPP opisuje się przypadki polineuropatii „naśladującej” CMT1 (Martini i Toyka 2004). U niewielkiego odsetka chorych z „klasyczną” HNPP obserwuje się deformacje kostne. W HNPP bardzo rzadko opisuje się zajęcie nerwów czaszkowych, porażenie strun głosowych jak również współtowarzyszący polineuropatii niedosłuch (Kabzińska i wsp. 2010). Około 25% nosicieli delecji regionu 17p11.2-p12 pozostaje bezobjawowych (Duborg i wsp. 2000).

Rozwój technik molekularnych sprawił, że możliwa jest identyfikacja mutacji sprawczych w chorobach CMT1A i HNPP, jednakże wynik badania genetycznego służy tylko do weryfikacji rozpoznania, nie ma natomiast wartości rokowniczej. Poradnictwo genetyczne jest zatem ograniczone do określenia ryzyka powtórzenia choroby natomiast nie pozwala wypowiedzieć się na temat jej przebiegu oraz rokowania. Szerokie spektrum fenotypowe chorób CMT1A/HNPP utrudnia diagnostykę, jak również skłania do poszukiwania czynników genetycznych i środowiskowych wpływających na tak dużą różnorodność wśród chorych. Trudności diagnostyczne wynikają także z braku jednolitej skali oceny przebiegu klinicznego i stopnia ciężkości polineuropatii, która uwzględniałaby wiek wystąpienia pierwszych objawów choroby, hierarchię parametrów elektrofizjologicznych oraz objawy dodatkowe, w tym komponent zapalny.

Podobnie jak w przypadku innych chorób neurodegeneracyjnych, także i w kręgu chorób CMT1A/HNPP od wielu lat trwają poszukiwania biomarkera/modyfikatora zmienności fenotypowej. Nie można wykluczyć, że czynniki pozagentyczne mogą mieć istotny wpływ na modulowanie fenotypu, jednakże możliwość ich badania wydaje się być niezwykle trudna. Próba identyfikacji czynnika genetycznego jest zatem bardziej prawdopodobna. Próba wyjaśnienia roli czynnika genetycznego został podjęta m.in. w stwardnieniu rozsianym. Badania przeprowadzone metodą przeszukiwania całego genomu (GWAS – genome-wide association study) u trzech par monozygotycznych bliźniąt, z których tylko jedno było chore nie wykazały żadnych różnic genetycznych,

epigenetycznych czy transkrypcyjnych między zdrowymi i chorymi osobami (Baranzini i wsp. 2010). Rdzeniowy zanik mięśni (SMA - spinal muscular atrophy) jest chorobą o bardzo dużej zmienności klinicznej. Podstawowym genem biorącym udział w patogenezie SMA jest gen *SMN* (*survival motor neuron*) obecny w dwóch kopiach - *SMN1* i *SMN2*. W wyniku wieloletnich badań nad modyfikatorami genetycznymi SMA wykazano, że mutacje genu *SMN1* wywołują objawy choroby, natomiast liczba kopii genu *SMN2* warunkuje ich nasilenie (Harada i wsp. 2002, Helmken 2003, Jędrzejowska i wsp. 2009). W chorobie Alzheimerza udało się dotychczas wykazać szkodliwy wpływ genotypu *ApoE-4* (Saunders i wsp. 1993). W chorobie Parkinsona (PD) wykazano związek genu *PRKN* (*parkin*) z wczesnoobjawową postacią choroby w populacji europejskiej (Lucking i wsp. 2000). W innym genie związanym z patomechanizmem choroby Parkinsona - *LRRK2* (*leucine-rich repeat kinase 2*) zidentyfikowano ponad 100 różnych wariantów sekwencyjnych, których związek z ryzykiem rozwoju PD jest bardzo różny. Wśród tych wariantów istnieje wiele rzadkich potencjalnie patogennych wykrywanych w bardzo małych rodzinach lub u pojedynczych chorych, jak również warianty populacyjnie powszechne, mogące prowadzić do podwyższonego ryzyka wśród rodzinnych przypadków choroby Parkinsona.

W kręgu chorób CMT poszukiwanie modyfikatorów przeprowadzone metodą GWAS nie umożliwiło jednoznacznej identyfikacji czynników genetycznych zwiększających ryzyko zachorowania lub modulujących przebieg choroby. Fiasko badań na tak dużą skalę sugeruje, że poszukiwania modyfikatora zmienności fenotypowej CMT1A/HNPP należy przeprowadzić wśród genów biorących udział w patogenezie choroby.

Koncentracja badań nad genem *PMP22* wiąże się przede wszystkim z jego rolą w patomechanizmie chorób CMT1A i HNPP. Niezwykle istotnym zagadnieniem w tym procesie jest efekt dawki genu *PMP22* (*gene dosage effect*). Efekt dawki genu wyraża się poprzez wzrost ekspresji mRNA *PMP22* u chorych z fenotypem CMT1A (duplikacja regionu 17p11.2-p12) oraz obniżenie ekspresji u chorych z fenotypem HNPP (delecją regionu 17p11.2-p12). Wykazano, że stopień obniżenia ekspresji genu *PMP22* koreluje z ciężkością przebiegu HNPP (Schenone i wsp. 1997). W przypadku chorych z fenotypem CMT1A, u których zidentyfikowano cztery kopie genu *PMP22* nie odnotowano wyraźnie cięższego przebiegu polineuropatii (LeGuern i wsp. 1997). Na modelu zwierzęcym wykazano, że znaczne zwiększanie liczby kopii genu *PMP22* (5-6 kopii) powoduje cięższy przebieg choroby, jednakże wprowadzenie dodatkowych kopii (8-9) nie powodowało dalszego pogorszenia stanu zwierzęcia (Suter i Nave 1999). Jednakże w mysim modelu z 16 kopiami genu *PMP22* zwierzęta były prawie pozbawione mielin obwodowej (Magyar

i wsp. 1996). Dotychczasowe wyniki wskazują, że ekspresja genu *PMP22* jest niezwykle precyzyjnie kontrolowana, jednakże nie wykazano jakie czynniki mogą regulować efekt dawki genu *PMP22*. W tym ujęciu wydaje się, że sekwencja promotorowa oraz regulatorowa genu *PMP22* ma niezwykle istotne znaczenie w kształtowaniu fenotypu CMT1A/HNPP.

Efekt dawki genu został dobrze udokumentowany z zespołem Downa, który najczęściej jest skutkiem trisomii chromosomu 21. Wykazano, że pomimo trisomii całego chromosomu (ok. 250 sekwencji kodujących), krytyczny dla rozwoju fenotypu zespołu Downa jest dystalny region długiego ramienia chromosomu 21 (21q22.3). W regionie 21q22.3 zlokalizowany jest gen kodujący enzym dysmutazę nadadtlenkową – SOD1. Zwiększenie dawki genu *SOD1* (*superoxide dismutase 1*) skutkuje zwiększeniem aktywności antyoksydacyjnej dysmutazy nadadtlenkowej. Zaburzenia oksydacyjno – redukcyjne związane z obecnością dodatkowej dawki genu *SOD1* prowadzą do zaburzeń metabolicznych, które są jedną ze składowych przyczyn zespołu Downa (Gardiner 2004). Obecnie w zespole Downa postuluje się modulujący wpływ efektu dawki genu *DYRK1A* (*Dual-Specificity Tyrosine-Phosphorylated and -Regulated Kinase 1A*), którego produkt białkowy bierze udział w proliferacji, różnicowaniu i dojrzewaniu komórek neuralnych (Dierssen i Lagran 2006, Noll i wsp. 2012).

W zespole kociego płaczu (Cri Du Chat Syndrome - CdCS), który jest wywołany delecją o zmiennej wielkości w obrębie krótkiego ramienia chromosomu 5, również opisano efekt dawki genu. W obrębie ramienia 5p wyznaczono dwa krytyczne regiony (5p15.2 oraz 5p15.33) dla rozwoju cech charakterystycznych zespołu CdCS (Overhauser i wsp. 1994). W obrębie regionu 5p15.2 zidentyfikowano gen *SEMAF* (*semaphorin F*), kodujący białko związane z migracją neuronów w okresie płodowym oraz gen *CTNND2*, kodujący delta-2 kateninę wpływającą na ruchliwość komórek nerwowych we wczesnym okresie życia płodowego. Postuluje się, że zmniejszenie dawki genu *SEMAF* oraz *CTNND2* odpowiada za rozwój takich cech jak upośledzenie umysłowe i dysmorfia u pacjentów z CdCS. W regionie 5p15.33 zlokalizowany jest gen *hTERT* (*telomerase reverse transcriptase*), kodujący odwrotną transkryptazę telomeru, która poprzez zdolność syntetyzowania telomerów zabezpiecza końce chromosomów przed ich nadmiernym skracaniem się w trakcie podziałów komórkowych oraz stabilizuje ich strukturę. Zmniejszenie dawki genu *hTERT* związane jest z opóźnieniem mowy u chorych z CdCS (Medina i wsp. 2000, Zhang i wsp. 2003, Mainardi 2006).

Za patogennym charakterem genu *PMP22* przemawiają także badania z zastosowaniem mikromacierzy cDNA w szczurzym modelu choroby CMT1A, które wykazały zmiany

ekspresji 213 sekwencji cDNA. Autorzy pracy spośród zidentyfikowanych sekwencji o zmienionym wzorcu wytypowali 86 genów, których ekspresja uległa obniżeniu oraz 23 geny, których ekspresja wzrosła (w porównaniu z kontrolą), postulując generalne obniżenie ekspresji genów w nerwie obwodowym w wyniku zwiększenia dawki genu *PMP22*. Klasyfikacja zidentyfikowanych 213 genów według ich funkcji wykazała przede wszystkim silnie zredukowaną ekspresję genu *Cntf* (*ciliary neurotrophic factor*), genów biorących udział w regulacji cyklu komórkowego, kodujących białka cytoszkieletu oraz białka macierzy zewnątrzkomórowej w odpowiedzi na zwiększoną ekspresję genu *PMP22*. W nerwie obwodowym pacjentów z CMT1A wykazano nadrzędną rolę genu *PMP22* w regulacji ekspresji *CNTF* (Nobbio i wsp. 2009).

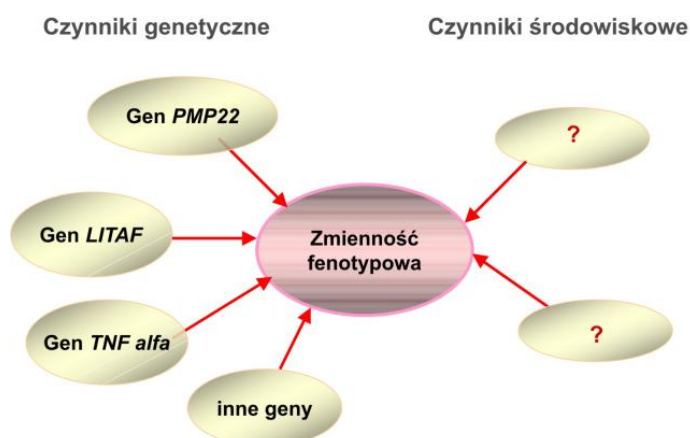
W genie *PMP22* zidentyfikowano także mutacje punktowe, które stanowią rzadszą przyczynę chorób CMT1A i HNPP. Dotychczas w genie *PMP22* zidentyfikowano 50 mutacji punktowych. Mutacje typu missens w genie *PMP22* po raz pierwszy opisano na myszach trembler (Tr) (Gly150Asp) oraz TrJ (Leu16Pro). Są one naturalnym modelem zwierzęcej postaci CMT (Suter i wsp. 1992). W genie *PMP22* zidentyfikowano także kilka mutacji wywołujących ciężkie postacie polineuropatii jak DSS oraz CHN. Mutacje typu nonsense, w miejscach splicingowych oraz zmiany ramki odczytu najczęściej skutkują fenotypem choroby HNPP, a przebieg polineuropatii jest cięższy niż w przypadku delecji regionu 17p11.2-p12. Większość mutacji w genie *PMP22* dziedziczy się w sposób autosomalny dominujący w układzie heterozygotycznym. Odnotowano rzadkie mutacje dziedziczone w sposób autosomalny recesywny, np. Arg157Trp oraz Arg157Gly (Roa i wsp.1993, Numakura i wsp. 2000). Dotychczas opisano jedną mutację punktową Arg159Cys w genie *PMP22* skutkującą fenotypem polineuropatii askonalnej (Gess i wsp. 2011). Z fenotypem polineuropatii aksonalnej powiązano także substytucję Thr118Met, która została zidentyfikowana w układzie homozygotycznym (Shy i wsp. 2006). W układzie heterozygotycznym patogenność tej zmiany jest niejasna, gdyż została zidentyfikowana zarówno w grupach badanych jak i grupach kontrolnych (Gess i wsp. 2011).

W ostatnich latach postuluje się udział innych genów biorących udział w patogenezie polineuropatii demielinizacyjnych w modulowaniu fenotypu chorych z CMT1A/HNPP. W tym ujęciu genem „kandydatem” do roli modyfikatora zmienności wydaje się gen *LITAF* (*Lipopolysaccharide-Induced Transcription Factor*), który prawdopodobnie bierze udział w degradacji białka PMP22.

W kręgu chorób Charcot-Marie-Tooth mutacje w genie *LITAF* odpowiedzialne są za łagodną postać polineuropatii demielinizacyjnej o autosomalnym dominującym sposobie

dziedziczenia – choroba CMT typu 1C (Street i wsp. 2003). Dotychczas zidentyfikowano dziewięć mutacji patogennych w genie *LITAF*. Fenotyp chorych z mutacjami w genie *LITAF* nie został dokładnie opisany, w większości chorzy reprezentują fenotyp podobny do CMT1A. Pierwsze objawy choroby pod postacią niedowładu odsiebnych mięśni kończyn dolnych (bardzo rzadko dochodzi do „zajęcia” kończyn górnych) oraz zaburzenia chodu pojawiają się w pierwszej lub drugiej dekadzie życia. Średnie wartości przewodzenia we włóknach nerwu pośrodkowego wynoszą 20-30 m/s (Bennett i wsp. 2004, Saifi i wsp. 2005, Latour i wsp. 2006). Opisano jeden rodzinny przypadek, gdzie zarówno u chorej matki, jak i u jej syna zaobserwowano ataksję (Gerding i wsp. 2009).

Funkcjonalny związek genu *LITAF* z promotorem genu *TNF alfa* może mieć znaczenie w modulowaniu komponentu zapalnego w polineuropatiach genetycznie uwarunkowanych. Nie można wykluczyć, że poza wymienionymi genami również inne geny, czynniki epigenetyczne czy pozagenetyczne mogą mieć wpływ na modulowanie fenotypu chorych z CMT1A/HNPP (Ryc.1).



Ryc.1 Modyfikatory zmienności fenotypowej chorych z CMT1A/HNPP.

1.1 Charakterystyka genów wybranych do badań nad zmiennością fenotypową chorych z CMT1A/HNPP

1.2 GEN *PMP22*

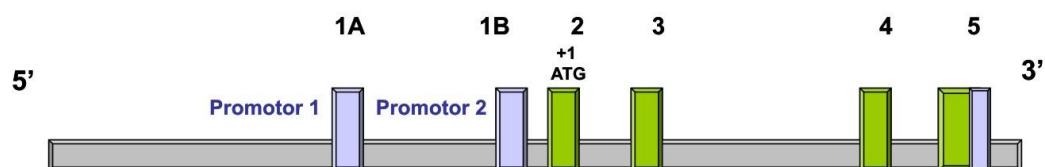
Gen *PMP22* po raz pierwszy został scharakteryzowany w mysich fibroblastach NIH3T3 jako *growth-arrest gene (gas3)*. Wykazano, że ekspresja mRNA *gas3* w komórkach linii NIH3T3 jest indukowana, gdy w kulturze wzrost komórek został zahamowany poprzez

usunięcie surowicy lub pozbawienie interakcji międzykomórkowych. Na podstawie przeprowadzonych badań pierwszą funkcją jaką przypisano genowi *gas3/PMP22* była regulacja cyklu komórkowego, udział we wzroście, różnicowaniu, oraz morfogenezie komórek Schwanna. (Manfioletti i wsp.1991). W kolejnych badaniach wyizolowano z nerwu kulszowego szczura dwa transkrypty *PMP22* – *cd25* oraz *sr13* charakteryzujące się tkankowo-specyficzną ekspresją. Obecność dwóch transkryptów wynika z transkrypcji zachodzącej z promotora 1 lub promotora 2 genu *PMP22* (Suter i wsp. 1994).

1.2.1 Struktura genu *PMP22*

Gen *PMP22* na długość 35,549 tysięcy par zasad i składa się z 5 eksonów, w tym czterech kodujących (2-5 ekson) oraz eksonu pierwszego podzielonego na dwie części (1A, 1B), który stanowi region 5'UTR (untranslated region) (Ryc.2). Dwa transkrypty mRNA *PMP22* różniące się niekodującym regionem 5' są wynikiem obecności dwóch alternatywnych promotorów zlokalizowanych w obrębie eksonu 1A (promotor 1) i 1B (promotor 2) (Suter i wsp.1994).

Sekwencja mRNA wariantu 1 *PMP22* jest złożona z 1828 par zasad, a region kodujący odpowiada fragmentowi od 209 do 691 nukleotydu. Za kodonem terminacyjnym (564 nt) znajduje się region 3'UTR, w którym zlokalizowany jest sygnał poliadenylacji - 1809-1814 nt oraz miejsce poliadenylacji (1828 nt). Sekwencja mRNA wariantu 2 *PMP22* składa się 1816 par zasad, region kodujący przypada na fragment nukleotydowy 179-661. W obrębie regionu 3'UTR znajduje się sygnał poliadenylacji 1779-1784 nt oraz miejsce poliadenylacji (1798 nt). Zarówno wariant 1 jak i 2 genu *PMP22* kodują białko PMP22 (peripheral myelin protein 22) o długości 160 aminokwasów.



Ryc.2 Schemat struktury genu *PMP22*. Kolorem zielonym zaznaczono region kodujący, kolorem szarym niekodujący obszar genu.

1.2.2 Ekspresja genu *PMP22*

Ekspresja genu *PMP22* jest tkankowo-specyficzna. Promotor 1 genu *PMP22* jest tzw. promotorem nerwowym, który aktywowany jest w obwodowym układzie nerwowym, głównie w komórkach Schwanna podczas procesu mielinizacji. Promotor 2 reguluje ekspresję w tkankach poza układem nerwowym, tj. płuca, serce, jelita, endometrium oraz mięśnie szkieletowe (Suter i wsp. 1994, Suter i Snipes 1995). W badaniach na modelu zwierzęcym zlokalizowano transkrypt *PMP22* podczas embriogenezy w trakcie rozwoju grzbietowych zwojów nerwowych, nerwów rdzeniowych oraz nerwów czaszkowych (Parmantier i wsp. 1997, Paratore i wsp. 2002).

1.2.3 Sekwencja regulatorowa genu *PMP22*

Dotychczas region 5'UTR genu *PMP22* został dobrze scharakteryzowany jedynie u myszy i w niewielkim stopniu u chorych (Hai i wsp. 2001, Saberan-Djoneidi i wsp. 2000, Nelis i wsp. 1998, Numakura i wsp. 2002). Funkcjonalna analiza promotora genu *PMP22* poprzez transfekowanie linii komórkowej mysich fibroblastów konstruktem zawierającym ludzki gen *PMP22*, umożliwiła pełną analizę sekwencji promotorowej. W obrębie promotora 1 (ekson 1A) wykazano obecność kasety TATA oraz odwróconą kasetę CCAAT - sekwencję umożliwiającą wiązanie z czynnikami transkrypcyjnymi C/EBP lub białkami. Co ciekawe, nie zidentyfikowano tych dwóch składowych w obrębie promotora 2. Ponadto zidentyfikowano dwa miejsca wiązania dla czynnika transkrypcyjnego NF1 oraz jedno miejsce wiązania dla czynnika AP-2 oraz Sp-1. Analiza bioinformatyczna wykazała w sekwencji *PMP22* motywy homologiczne między genem *PMP22* a innymi genami kodującymi białka niezbędne do tworzenia i utrzymania prawidłowego funkcjonowania mieliny, m in. *MPB* (*myelin basic protein*) czy *MPZ* (*myelin protein zero*) (Suter i wsp. 1994).

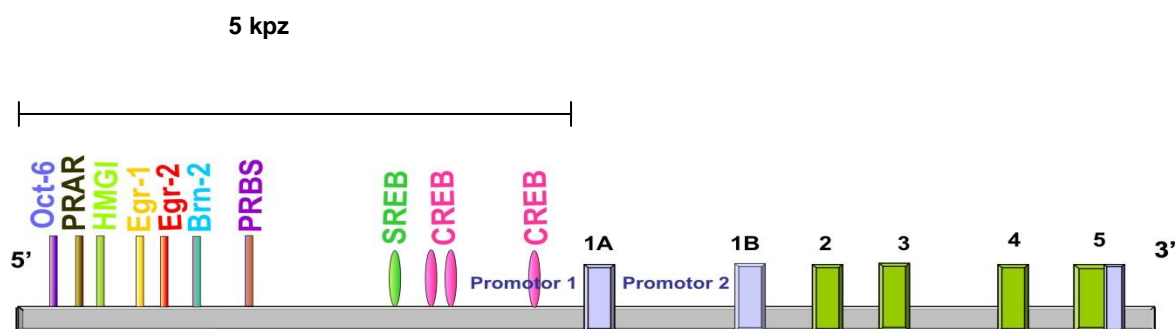
Podobnie zatem jak w przypadku genów *MPB*, *MPZ* czy *MAG*, *PRX*, *Cx32*, biorących udział w formowaniu i funkcjonowaniu osłonki mielinowej, gen *PMP22* może być regulowany przez różne swoiste czynniki transkrypcyjne. Wykazano, że gen *EGR2/Krox20*, będący czynnikiem transkrypcyjnym, ma zdolność bezpośredniego aktywowania w/w genów. Bierze udział w regulacji transkrypcji genów podczas rozwoju i segmentacji tyłomózgowia oraz mielinizacji obwodowego układu nerwowego (Topilko i wsp. 1994). W trakcie powstawania osłonki mielinowej na etapie przekształcania komórek grzebienia nerwowego w prekursorów komórek Schwanna, ekspresji ulega gen *PMP22* oraz *MPZ*. Badania na modelu

zwierzęcym wykazały, że w procesie tym dochodzi do aktywacji genu *PMP22* poprzez czynnik transkrypcyjny *Sox-10*, który działa już na wczesnych etapach migracji komórek z grzebienia nerwowego. Wraz z *Sox-10* gen *PMP22* jest aktywowany poprzez czynnik transkrypcyjny *Oct-6/SCIP*, który odgrywa rolę w późnej embriogenezie oraz okresie okołourodzeniowym. Ekspresję genu *Oct-6* wycisza *Krox20*, który obecny jest w komórkach Schwanna predestynowanych do mielinizacji (Jessen i wsp. 2002). Niezwykle istotną rolę genu *EGR2/Krox20* potwierdza fakt, iż mutacje punktowe w tym genie są m.in. przyczyną jednych z najcięższych form polineuropatii - DSS, CMT1 oraz CHN (Timmerman i wsp. 1999, Warner i wsp. 1998).

W innym badaniu regionu promotorowego genu *PMP22*, w którym analizą objęto ekson 1A oraz 6 kpz powyżej wykazano, że obszar krytyczny względem aktywności promotora wynosi 300 pz powyżej eksonu 1A – region wystarczający do aktywacji ekspresji genu reporterowego (Saberan-Djoneidi i wsp. 2000). Ponadto w regionie 2 kpz powyżej promotora 1 wykazano obecność miejsc wiązania dla receptora progesteronu (SREB - sterol regulatory element binding protein) - oraz cyklicznego adenozybonofosforanu (cAMP) (CREB - cAMP-responsive element binding protein) (Saberan-Djoneidi i wsp. 2000, Hai i wsp. 2001). Wiadomo, że progesteron może być autokrynnie wydzielany przez komórki Schwanna. Wykazano, że progesteron wzmacnia aktywność promotora genu *PMP22*, co mogłoby mieć implikacje terapeutyczne (Desernaud i wsp. 1998). W szczurzym modelu choroby CMT1A po podaniu zwierzętom antagonisty receptora progesteronu - onapristonu, odnotowano spadek ekspresji genu *PMP22* oraz poprawę mielinizacji (Sereda i wsp. 2003). Dokładny mechanizm oddziaływania między progesteronem a promotorem genu *PMP22* nie został wyjaśniony. Obecnie zastosowanie antagonistów receptora progesteronu jest na etapie badań klinicznych (Schenone i wsp. 2011). Przeprowadzono także badania z zastosowaniem kwasu askorbinowego, który obniża stężenie cyklicznego adenozybonofosforanu - cAMP poprzez obniżenie ekspresji jednej z izoform cyklazy adenyłowej (Kaya i wsp. 2007). Na mysim modelu choroby CMT1A zaobserwowano, że kwas askorbinowy podawany w dużych dawkach powodował obniżenie ekspresji genu *PMP22*. Jednakże te same próby terapeutyczne z dużymi dawkami witaminy C (1500mg/dobę) przeprowadzone wśród chorych z CMT1A nie odniosły pożądanego rezultatu (Pareyson i wsp. 2011).

W obrębie 2 kpz powyżej eksonu 1A genu *PMP22* zidentyfikowano także trakty powtórzeń (TC)_n oraz (CA)_n. Zmienność w liczbie powtórzeń u chorych z CMT1A może mieć wpływ na strukturę tego regionu oraz miejsca wiązania CREB i SREB (Sabéran-

Djoneidi i wsp. 2000). W badaniu 10 kpz sekwencji genu *PMP22* powyżej eksonu 2 Maier i wsp. wykazali, że region od -5 kpz do -4 kpz sekwencji regulatorowej jest niezbędny w prawidłowym procesie regulacji aktywności genu *PMP22* w późnych etapach mielinizacji. Obszar ten nosi nazwę LMSE (late myelination Schwann cell-specific element) (Maier i wsp. 2003). Przeprowadzone przez autorów pracy analizy bioinformatyczne wykazały, że jest to potencjalnie obszar wiązania wielu ważnych czynników (Ryc.3).



Ryc. 3 Schemat sekwencji regulatorowej genu *PMP22*. Oznaczenia CREB (cAMP-responsive element binding protein), SREB (serol regulatory element binding protein), PRBS (progesterone receptor binding site), Brn-2 (brain specific homeobox/POU3F2 POU cd 2), Egr-1 (early growth response protein 1), Egr-2 (early growth response protein 2), PRAR (peroxisome proliferator-activated receptor), Oct-6 (Octamer Binding Transcription Factor 6)– potencjalne miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych.

Wśród chorych z klinicznym rozpoznaniem choroby CMT1A i chorych z fenotypem HNPP (potwierdzona duplikacja/delecja regionu 17p11.2-p12) dotychczas nie przeprowadzono badań sekwencji promotorowej i regulatorowej genu *PMP22*. Nelis i wsp. zidentyfikowali jeden wariant sekwencyjny w obrębie eksonu 1A (+67C>G) wśród chorych CMT1A/HNPP z wykluczoną duplikacją/delecją genu *PMP22*. Zmiana wystąpiła u chorego z fenotypem CMT1A. Analiza DNA pozostałych chorych i zdrowych członków rodziny wykazała, że substytucja nukleotydu +67C>G nie segreguje z fenotypem choroby (Nelis i wsp. 1998). Przeprowadzone badania odnoszą się tylko do obszaru promotora 1, nie można zatem wykluczyć, że warianty SNP powyżej (5' upstream) przeanalizowanego fragmentu (>500 pz) mogą zaburzać wiązanie czynników transkrypcyjnych, zwiększając lub zmniejszając efektywność transkrypcji, wpływać na translację mRNA oraz jego stabilność. Ponadto SNP w sekwencji promotorowej wśród chorych z duplikacją/delecją regionu 17p11.2-p12 mogłyby powodować nieprawidłowy splicing eksonów promotorowych (1A i 1B) lub użycie nieprawidłowego miejsca startu translacji.

1.3 Białko PMP22

Gen *PMP22* koduje 160-aminokwasowe białko PMP (peripheral myelin protein) o masie cząsteczkowej 22 kDa. Białko PMP22 jest hydrofobową glikoproteiną z czterema transbłonowymi domenami. Po raz pierwszy zostało ono zidentyfikowane wraz z białkiem PO/MPZ (protein zero/myelin protein zero) jako jedn z najważniejszych komponentów mieliny obwodowego układu nerwowego (Uyemura 1993). Transbłonowe białko PO/MPZ stanowi ponad 50% białek osłonki mielinowej. Jego główną funkcją jest adhezja blaszek mieliny niezbędna dla utrzymania integralności warstw osłonki mielinowej. Wykazano, że białko PO/MPZ wchodzi w interakcje z białkiem PMP22, które podobnie może pełnić funkcje adhezyjne (D'Urso i wsp. 1999, Hasse i wsp. 2004). Przemawia za tym również fakt, że w strukturze białka PMP22 zidentyfikowano epitop L2/HNK1, który uważa się za pośredniczący w procesach adhezyjnych (Snipes i wsp. 1993). Obecność epitopu L2/HNK1 może także sugerować zaangażowanie białka PMP22 w polineuropatie o charakterze zapalnym (Suter i Snieps 1995). Co ciekawe, wydaje się, że układ immunologiczny może modulować przebieg genetycznie uwarunkowanej choroby CMT1A. Wśród chorych z fenotypem CMT1A oraz potwierdzoną duplikacją genu *PMP22* wykazano współistnienie nabytej polineuropatii zapalnej. W takich przypadkach polineuropatia genetycznie uwarunkowana miała cięższy przebieg niż „klasyczna” (Desurkar i wsp. 2009, Marques i wsp 2010).

Białko PMP22 może także pełnić funkcje w rozwoju, migracji i apoptozie komórek oraz regulować cykl komórkowy (Fabbretti i wsp. 1995, Brancolini i wsp. 2000, Roux i wsp. 2005). Większość informacji na temat funkcjonowania białka PMP22 w komórkach pochodzi z analizy jego mutantów. Myszy pozbawione jednej kopii genu *PMP22* rozwijają fenotyp podobny do chorych z HNPP. Deficyt jednej kopii genu prowadzi do produkcji białka w ilościach niewystarczających do zapewnienia prawidłowego funkcjonowania mieliny. Podobnie jak w przypadku duplikacji genu *PMP22*, patomechanizm HNPP na poziomie komórkowym nie został dokładnie wyjaśniony (Adlkofer i wsp.1997, Chance 2004). Nowosyntetyzowane białko PMP22 ma bardzo krótki okres półtrwania w mielinizujących komórkach Schwanna. Prawie 80% białka bardzo szybko podlega zależnej od ubikwityny degradacji w proteasomach, pozostała część PMP22 zostaje wbudowana w błonę komórkową (Pareek i wsp. 1997, Notterpeak i wsp. 1999, Ryan i wsp. 2002). W degradację PMP22 najprawdopodobniej zaangażowane jest białko LITAF/SIMPLE, biorące udział w procesach sortowania i degradacji białek. Dokładna interakcja pomiędzy białkami PMP22 i LITAF nie

została dotychczas opisana (Niemann i wsp. 2006). Postuluje się, iż przez funkcjonalny związek białka PMP22 z białkiem LITAF, warianty sekwencyjne w genie *LITAF* mogą wpływać na przebieg polineuropatii CMT1A/HNPP. W literaturze akcentuje się potencjalną rolę substytucji Ile92Val w białku LITAF w modulowaniu zmienności fenotypowej CMT1A (Meggouh 2005).

Mutacje punktowe w genie *PMP22* dziedziczące się w sposób dominujący powodują zaburzenia w prawidłowym transporcie białka PMP22. W większości zbadanych przypadków zmutowane białko nie jest w stanie dotrzeć do błony komórkowej i powraca do retikulum endoplazmatycznego. Dodatkowo, zarówno zmutowana jak i dzika forma białka PMP22 może tworzyć kompleksy, które zakłócają proporcje i transport dzikiej formy białka poprzez *dominujący efekt negatywny* (Naef i Suter 1999, Shames i wsp. 2003). Postuluje się, że zwiększona asocjacja między zmutowaną a dziką formą białka PMP22 w retikulum endoplazmatycznym może prowadzić do uszkodzeń białek czaperonowych. W przeciwieństwie do mutacji autosomalnych dominujących, mutacje w genie *PMP22* dziedziczone w sposób autosomalny recesywny nie powodują tworzenia agregatów białka i zarówno dzika, jak i zmutowana forma białka są wbudowane do błony komórkowej komórek Schwanna (Niemann i wsp. 2006).

1.4 GEN *LITAF/SIMPLE*

Gen *LITAF/SIMPLE* po raz pierwszy został opisany jako gen *PIG-7* (*p53 inducible gene-7*) indukujący apoptozę (Polyak i wsp. 1997). Następnie został on wyizolowany z linii ludzkich monocytów THP-1 indukowanych lipopolisacharydem jako czynnik transkrypcyjny ludzkiego promotora genu *TNF alfa* (*Lipopolysaccharide-Induced Transcription Factor*) (Myokai i wsp. 1999, Tang i wsp. 2003). Dodatkowo zidentyfikowano produkt białkowy kodowany przez ten gen w ludzkich monocytach stymulowanych immunogenną ścianą komórkową *Mycobacterium bovis*, który został nazwany SIMPLE (small integral membrane protein of the lysosome/late endosome) (Moriwaki i wsp. 2001).

1.4.1 Struktura genu *LITAF/SIMPLE*

Gen *LITAF/SIMPLE* został zmapowany w *locus* 16p13.1-p12.3, jego długość wynosi 39,47 tysięcy par zasad. Gen składa się z czterech eksonów, w tym trzech stanowiących region kodujący (eksony 2-4) oraz eksonu pierwszego, poprzedzonego promotorem, stanowiącego region 5'UTR (Ryc.4). Sekwencja mRNA jest złożona z 2368 nukleotydów

a region kodujący odpowiada fragmentowi od 234 do 920 nukleotydu. Za kodonem terminacyjnym (920 nt) znajduje się niekodujący region 3'UTR, w którym zlokalizowany jest sygnał poliadenylacji (2333-2338 nt) oraz miejsce poliadenylacji (2356 nt).



Ryc.4 Schemat struktury genu *LITAF/SIMPLE*. Kolorem żółtym zaznaczono region kodujący, kolorem niebieskim niekodujący obszar genu.

1.4.2 Ekspresja genu *LITAF/SIMPLE*

Gen *LITAF* ulega ekspresji w różnych tkankach. Obecność transkryptu *LITAF* odnotowano w układzie pokarmowym (żołądek, wątroba, trzustka, śledziona, jelito cienkie, okrężnica), płciowym (jądro, jajnik, gruczoł krokowy), krwionośnym (mięsień sercowy), wydalniczym (nerka), oddechowym (płuca), odpornościowym (grasica) oraz w limfocytach krwi obwodowej. Wykazano także ekspresję *LITAF* w nerwie kulszowym, mięśniach oraz w mózgu. W badaniach *in vitro* wykazano wysoki poziom białka *LITAF* w komórkach Schwanna (Moriwaki i wsp. 2001, Lee i wsp. 2011). Występuje znaczne zróżnicowanie poziomu ekspresji genu *LITAF*, najwyższy jest w limfocytach krwi obwodowej a najniższy w mózgu. W badaniach na modelu zwierzęcym potwierdzono ekspresję transkryptu *LITAF* w różnych strukturach centralnego układu nerwowego szczura, tj. pień mózgu, rdzeń kręgowy oraz mózdzek. Ponadto wykazano, że poziom ekspresji *LITAF* jest stały podczas rozwoju nerwu kulszowego oraz nie stwierdza się żadnych różnic w poziomie transkrypcji po indukowanym uszkodzeniu nerwu kulszowego (Street i wsp. 2003).

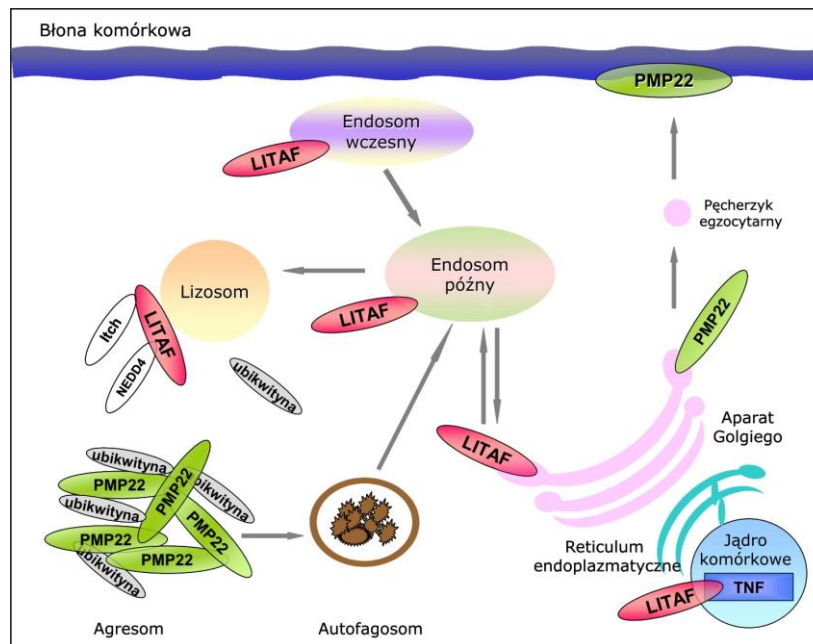
Ekspresja genu *LITAF/SIMPLE* zachodzi głównie pod wpływem lipopolisacharydu. Białkowy produkt ma zdolność do translokacji do jądra komórkowego, gdzie może pełnić rolę czynnika transkrypcyjnego dla promotora genu *TNF alfa* (*tumor necrosis factor alpha*) (Tang i wsp. 2003, Tang i wsp. 2005).

1.5 Białko *LITAF/SIMPLE*

Gen *LITAF/SIMPLE* koduje 161-aminokwasowe białko o przewidywanej masie cząsteczkowej 18 kDa (Lee i wsp. 2011). Analizy Western blot zlokalizowały także białko

LITAF na wysokości odpowiadającej masie 19 kDa w wątrobie i nerkach. Prawdopodobnie jest to wynik opóźnienia migracji białka spowodowanego fosforylacją bogatego w prolinę N-końca (Moriwaki i wsp. 2001, Street i wsp. 2003, Lee i wsp. 2011). W wątrobie oraz jelitach dodatkowo zidentyfikowano białkowy produkt genu *LITAF* o przewidywanej masie cząsteczkowej 17 kDa, który jest najprawdopodobniej produktem degradacji (Lee i wsp. 2011). Sekwencja aminokwasowa LITAF na N-końcu zawiera dwa motywy PPXY (PY) bogate w prolinę, które odpowiadają za interakcje z domeną WW oksydoreduktazy (WWOX), zależnej od ubikwityny ligazy Nedd4 (Neuronally expressed developmentally downregulated 4) oraz z enzymem TSG101 (tumor suppressor gene 101) (Jolliffe i wsp. 2000, Ludes-Meyers i wsp. 2004, Shirk i wsp. 2005). Na C-końcu białka LITAF znajduje się 68-aminokwasowy fragment, stanowiący zmodyfikowaną domenę RING o strukturze palca cynkowego (pozycja 96-152 aminokwas). W obrębie domeny RING podobnej, w regionie 91-160 znajduje się domena SLD (SIMPLE-like domain). Wykazano, że jest ona silnie konserwowana międzygatunkowo (drożdże, rośliny, owady, zwierzęta, ludzie) i najprawdopodobniej reprezentuje nową rodzinę białek o nieznanym funkcji. W obrębie domeny SLD na karboksylowym końcu zlokalizowana jest sortująca sekwencja sygnałowa YXX ϕ (ϕ aminokwas z rozbudowanym łańcuchem hydrofobowym) kierująca do lizosomów (Moriwaki i wsp. 2001, Eaton i wsp. 2011).

Białko LITAF zostało zidentyfikowane w błonie lizosomu, późnego endosomu, aparacie Golgiego oraz w błonie komórkowej (Ludes-Meryers i wsp. 2004, Shirk i wsp. 2005). Lee i wsp. wykazali także lokalizację białka LITAF w błonie wczesnego endosomu (Lee i wsp. 2011). Różnorodność lokalizacji nastręcza trudności w dokładnym poznaniu funkcji białka LITAF. Postuluje się jego udział w procesie sortowania i degradacji białek regulowanym ubikwityną, m.in. w degradacji białka PMP22 (Ryc.5).



Ryc.5 Schemat wewnątrzkomórkowej lokalizacji i funkcji białka LITAF (Niemann i wsp. 2006, modyfikowany).

Przemawia za tym obecność domeny RING podobnej, która wykazuje aktywność ligazy E3 ubikwityny. Ligaza E3 pełni kluczową rolę w zależnych od ubikwityny procesach degradacji białek, a domena RING jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania enzymu (Eaton i wsp. 2011).

Dwa motywy PPXY w białku LITAF są niezbędne do interakcji z ligazą ubikwitynową Nedd4. Ligaza Nedd4 należy do rodziny białek HECT (Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus), zawierających także ligazy E3. Białka te charakteryzują się podobną strukturą. Na N-końcu białka znajduje się domena C2, posiadają 2-4 domeny WW (domena, która ma zdolność do wiązania się z bogatymi w prolinę ligandami) oraz C-końcową domenę HECT. Ligaza Nedd4 funkcjonuje w błonie komórkowej oraz aparacie Golgiego, gdzie pełni rolę w rozpoznawaniu i sprzęganiu białkowych substratów z ubikwityną, co umożliwia kierowanie do degradacji w lizosomach (Ingham i wsp. 2004). Prawdopodobnie białko LITAF może odgrywać rolę łącznika między białkiem związanym z ubikwityną a klatryną (Sachse i wsp. 2002, Saifi i wsp. 2005). Za udziałem białka LITAF w procesach wewnątrzkomórkowego sortowania białek przemawia także jego lokalizacja w błonie wczesnego endosomu oraz podobieństwo do białka Hrs (Hepatocyte growth regulated tyrosine kinase substrate), integralnego składnika błony wczesnego endosomu (Shekhtman i wsp. 2002, Lee i wsp. 2011). Dodatkowo białko LITAF posiada motyw P(S/T)AP, umożliwiający wiązanie z enzymem TSG101, wchodzącym w skład endosomalnego kompleksu sortującego – ESCRT-1

(Endosomal Sorting Complex Required for Transport), który umożliwia właściwe ukierunkowanie na drogę lizosomalnej degradacji (Saifi i wsp. 2005, Eaton i wsp. 2011).

Dwa motywy PPXY w białku LITAF odpowiadają także za interakcję z ligazą Itch, która m.in. bierze udział w degradacji substratów w proteasomie. Ligaza Itch podobnie jak Nedd4 należy do rodziny białek HECT. Została zlokalizowana w strukturach aparatu Golgiego oraz w błonie późnego endosomu (Eaton i wsp. 2011). Po raz pierwszy białko Itch zostało opisane u myszy, u których zmiany w genie *Itch* (*Itchy E3 ubiquitin protein ligase homolog*) skutkowały upośledzeniem układu immunologicznego („*itchy mouse*”) (Perry i wsp. 1998). Itch bierze udział w odpowiedzi immunologicznej poprzez wiązanie czynników transkrypcyjnych c-jun i JunB do domen WW powodując ich ubikwitynację i degradację wpływając tym samym na proces różnicowania limfocytów T. Dodatkowo Itch reguluje inaktywację limfocytów T regulując tym samym odpowiedź immunologiczną na specyficzny antygen (Melino i wsp. 2008, Neesar i wsp. 2011).

Prawdopodobnie białko LITAF bierze udział w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej, zarówno poprzez interakcję z ligazą Itch, jak również poprzez stymulację ekspresji genu *TNF alfa*. Postuluje się, że LITAF może pełnić rolę czynnika transkrypcyjnego, który ma zdolność wiązania się do sekwencji CTCC zawartej w sekwencji promotorowej *TNF alfa* (Tang i wsp. 2003). Podwyższony poziom TNF alfa w surowicy chorych odnotowano w wielu chorobach autoimmunologicznych, schorzeniach układu immunologicznego oraz polineuropatiach immunozależnych jak również w polineuropatiach genetycznie uwarunkowanych. W ostatnich latach pojawiło się wiele doniesień literaturowych o roli wariantów sekwencyjnych w 5' sekwencji regulatorowej genu *TNF alfa*.

W regionie promotorowym genu *TNF α* zidentyfikowano osiem polimorficznych wariantów sekwencyjnych wpływających na regulację transkrypcji. Rola polimorfizmów genu *TNF alfa* w kontekście ich wpływu na zapadalność na chorobę oraz wpływu na jej przebieg została zbadana m.in. w stwardnieniu rozsianym, reumatoidalnym zapaleniu stawów, astmie, trądzie, malarii, wirusowym zapaleniu wątroby typu B i C, wstrząsie septycznym, toczniu rumieniowatym układowym (Ramagopalan i wsp. 2011, Danis i wsp. 1995, Cvetkovic i wsp. 2002, Witte i wsp. 2002, Roy i wsp. 1997, De Bandt i wsp. 2002, Schroder i wsp. 1995, Mira i wsp. 1999, Wilson i wsp. 1994). Do najczęściej występujących SNP w regionie promotorowym genu *TNF alfa* należą -238G>A, -308G>A oraz -863C>A. Szczególną uwagę zwrócono na substytucję guaniny w adeninę w pozycji -308. Wykazano, że SNP w pozycji -308 genu *TNF alfa* może modulować transkrypcję genu. W obrębie

sekwencji nukleotydowej otaczającej pozycję –308 zidentyfikowano szereg miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych. Substytucja guaniny w adeninę wpływa na zaburzenie prawidłowego wiązania czynników transkrypcyjnych oraz formowanie błędnych miejsc wiązania, skutkując zwiększoną ekspresją *TNF alfa* (Abraham i Kroeger 1999, Hajerr i Hutchinson 2002).

1.6 Rola układu immunologicznego w polineuropatiach genetycznie uwarunkowanych

Wpływ układu immunologicznego na przebieg polineuropatii został dotychczas dobrze scharakteryzowany w polineuropatiach zapalnych. Opisano zaledwie kilka przypadków chorych z CMT1A, u których stwierdzono także przewlekłą polineuropatię zapalno-demielinizacyjną (CIDP - chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy) lub zespół Guillaina–Barrego (GBS - Guillain-Barré syndrome) (Dyck i wsp. 1982, Mouton i wsp. 1999, Ginsberg i wsp. 2004, Desurkar i wsp. 2009, Marques i wsp. 2010). Scelsa opisał także rodzinę w której stwierdzono CMT1A wywołaną duplikacją regionu 17p11.2-p12 współistniejącą z zespołem Lewisa-Sumnera (Scelsa 2009). Współwystępowanie polineuropatii genetycznie uwarunkowanej z nabytą polineuropatią zapalną może być wynikiem działania czynników genetycznych, które predysponują do rozwoju polineuropatii zapalnej na tle choroby CMT.

W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się roli układu immunologicznego w przebiegu polineuropatii genetycznie uwarunkowanych - CMT, gdzie pierwotny defekt genetyczny jest związany z mutacjami w genach kodujących białka strukturalne i funkcjonalne mieliny. Okazało się bowiem, że w pewnych przypadkach określenie defektu genetycznego w pełni nie tłumaczy procesu demielinizacji. W rodzinie z tą samą mutacją, pierwsze objawy choroby oraz stopień jej nasilenia mogą się znacznie różnić. Choroba może przebiegać bezobjawowo przez wiele lat poprzedzających nagły epizod neuropatii. Sugeruje to, że czynniki inne niż mutacje skutkujące fenotypem polineuropatii są związane z zapoczątkowaniem choroby. Ocena morfologiczna nerwu chorych z CMT1 wskazuje na to, że odpowiedź immunologiczna może modulować przebieg polineuropatii, jednakże niejasne pozostaje czy jest to odpowiedź wrodzona czy nabyta. W biopsjach nerwów chorych z CMT1A wielokrotnie odnotowano makrofagi oraz limfocyty T. Morfologiczne obserwacje sugerują, że makrofagi mogą inicjować procesy uszkodzające tkankę nerwową u chorych z CMT1, wskazując na to, że wrodzona odpowiedź immunologiczna jest częścią patofizjologii choroby. W innym badaniu wskazano, że również nabyta odpowiedź

immunologiczna może brać udział w patologii choroby CMT1A. Ritz i wsp. stwierdzili u większości badanych przez nich chorych z CMT1A obecność przeciwciał anti-PMP22 w surowicy krwi obwodowej, co mogłoby odzwierciedlać autoimmunologiczną odpowiedź na zwiększoną produkcję białka PMP22 wywołaną duplikacją genu *PMP22* (Ritz i wsp. 2000). Co ciekawe u wielu chorych z fenotypem CMT1 z mutacjami w innych genach niż *PMP22* oraz wykluczoną duplikacją regionu 17p11.2-p12, jak również u chorych z fenotypem CMT2 stwierdzono obecność przeciwciał anti-PMP22 w surowicy krwi obwodowej (Gabriel i wsp. 2000, Ritz i wsp. 2000).

Jeżeli układ immunologiczny pełni znaczącą rolę w patologii choroby CMT, strategie terapeutyczne mające na celu modulowanie funkcji komórek odpornościowych mogłyby wspomóc leczenie pewnych form choroby CMT. Dotychczas opisano kilka przypadków chorych z CMT, którzy odpowiedzieli pozytywnie na leczenie immunosupresyjne. Wykazano, że stosowanie prednisonu u chorych z duplikacją regionu 17p11.2-p12 spowodowało złagodzenie objawów choroby CMT1A, jednakże po zaprzestaniu stosowania leku stan pacjentów ponownie uległ pogorszeniu (Rajabally i wsp. 2000). Pomimo zachęcających wyników stosowania leków immunosupresyjnych w chorobach kręgu CMT nie przeprowadzono systematycznych badań nad wpływem tych leków na przebieg polineuropatii.

Rola układu immunologicznego w przebiegu polineuropatii została dobrze udokumentowana na zwierzęcych modelach choroby. W chorobie CMT1A przykładem może być linia myszy C61 charakteryzująca się niskim poziomem nadekspresji białka PMP22 (Huxley i wsp. 1998). Histopatologiczne badania nerwów obwodowych myszy z linii C61 wykazały wysoką liczbę limfocytów CD8⁺ oraz makrofagów w nerwach obwodowych, w których doszło do procesu demielinizacji w przeciwieństwie do nerwów nie dotkniętych tym procesem. Ponadto liczba leukocytów wzrastała wraz z rozwojem choroby (Kobsar i wsp. 2005). Pomimo, że badania te sugerują, iż w mysim modelu C61 komórki układu immunologicznego mogą powodować demielinizację, nie można wykluczyć, że są one wtórną odpowiedzią na zaistniały już proces rozpadu mieliny. W mysim modelu choroby CMT1A odnotowano także interakcje między aksonami dotkniętymi procesem demielinizacji a makrofagami (Martini i Toyka 2004). Pomimo dużego podobieństwa między chorobą CMT1A u ludzi a jej mysim modelem rola układu immunologicznego w modulowaniu przebiegu CMT1A jest niejasna, a mechanizmy molekularne i komórkowe leżące u podstaw rozwoju nabytej polineuropatii zapalnej na tle polineuropatii genetycznie uwarunkowanej dotychczas nie zostały wyjaśnione.

2. CEL PRACY

Założeniem pracy jest próba odpowiedzi na pytanie jaki udział w zmienności klinicznej choroby Charcot-Marie-Tooth odgrywa czynnik genetyczny. Czy możliwe jest wyodrębnienie modyfikatora, który mógłby spełniać rolę biomarkera choroby CMT? Czy geny *PMP22*, *LITAF*, *TNF alfa* mają wpływ na zmienność fenotypową choroby CMT?

Szczegółowe cele projektu obejmują:

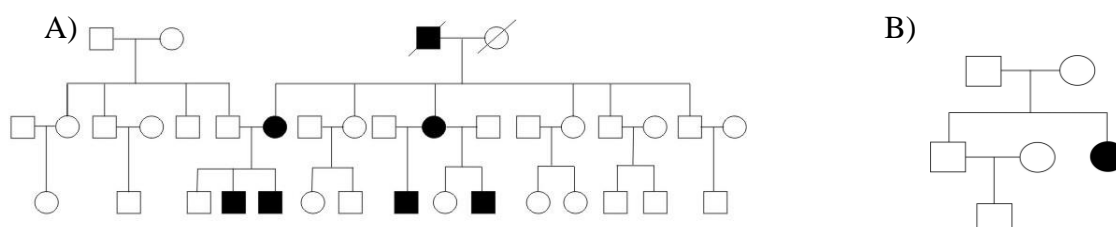
1. Wpływ polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP) na ekspresję genu *PMP22*:
 - 1a) Analiza sekwencji regulatorowej 5'UTR oraz promotora genu *PMP22* w grupie chorych z fenotypem CMT1A/HNPP i w grupie kontrolnej.
 - 1b) Analiza sekwencji kodującej genu *PMP22* w grupie chorych z fenotypem CMT1A/HNPP i w grupie kontrolnej.
2. Analiza sekwencji kodującej genu *LITAF* w grupie chorych z fenotypem CMT1A/HNPP i w grupie kontrolnej.
3. Analiza sekwencji kodującej genu *LITAF* w grupie chorych, gdzie w rodzinie współistnieje polineuropatia genetycznie uwarunkowana z przewlekłą polineuropatią zapalną i w grupie kontrolnej.
4. Analiza sekwencji promotorowej genu *TNF-alfa* w grupie chorych z fenotypem CMT1A/HNPP, oraz w grupie chorych, gdzie w rodzinie współistnieje polineuropatia genetycznie uwarunkowana z przewlekłą polineuropatią zapalną i w grupie kontrolnej.

3. MATERIAL

3.1 Grupa badana

Grupa badana składa się z chorych z fenotypem choroby Charcot-Marie-Tooth oraz ich rodzin, od których uzyskano próbki DNA zebrane w ciągu 12 lat badań prowadzonych w Zespole Chorób Nerwowo-Mięśniowych IMDiK PAN.

W badanej grupie przeprowadzono badania w kierunku duplikacji/delecji genu *PMP22* (Tab. 2). We wszystkich rodzinach wykreślono co najmniej trzypokoleniowy rodowód. Wśród rodowodów można wyróżnić przypadki rodzinne choroby CMT (50%), przypadki sporadyczne (40%) (Ryc.6), w nielicznych rodzinach przypadki „pseudorecesywnego” sposobu dziedziczenia CMT (10%).



Ryc. 6 A) Rodzinna postać choroby CMT1A, b) sporadyczny przypadek choroby HNPP.

Grupę badaną stanowiło 182 osoby, pochodzące ze 114 rodzin, od których pobrano próbki DNA. Grupa badana została podzielona na trzy podgrupy. Do pierwszej podgrupy zostało włączonych 109 pacjentów, w tym 72 chorych z rozpoznaniem choroby CMT1A i potwierdzoną badaniem genetycznym duplikacją genu *PMP22* oraz 37 chorych z HNPP i potwierdzoną delecją genu *PMP22* (Tabela 2).

Kolejną podgrupę stanowiło 66 osób z rozpoznaniem polineuropatii demielinizacyjnej i odpowiednio wykluczoną duplikacją/delecją genu *PMP22*.

Trzecią podgrupę stanowiło 11 zdrowych osób będących członkami rodzin chorych. U wszystkich wykluczono duplikację/delecję genu *PMP22* (Tabela 2).

W badanej grupie dla części chorych dysponowano danymi klinicznymi i elektrofizjologicznymi.

Badanie sekwencji promotorowej i regulatorowej genu *PMP22* wykonano u 45 osób, sekwencji kodującej u 111 osób. Analizę sekwencji kodującej genu *LITAF* przeprowadzono u 122 osób, natomiast analizę sekwencji promotorowej genu *TNF alfa* u 90 osób.

Tabela 2 Charakterystyka grupy badanej.

Rodzina	Nr prób	Kod	Wstępne rozpoznanie	Test dup/del genu <i>PMP22</i>	Badane geny
R1	1	R1.ChI	HNPP	del	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
	2	R1.ChS	HNPP	del	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
R2	3	R2.DE	CMT1A	dup	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
	4	R2.DT	CMT1A	dup	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
R3	5	R3.DE	CMT1A	dup	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
R4	6	R4.HA	CMT1A	dup	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
	7	R4.HJ	CMT1A	dup	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
R5	8	R5.KJ	CMT1A	dup	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
	9	R5.KE	CMT1A	dup	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
	10	R5.KT	CMT1A	dup	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
R6	11	R6.KK	CMT1A	dup	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
	12	R6.KT	CMT1A	dup	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
	13	R6.KTo	CMT1A	dup	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
R7	14	R7.KA	CMT1A	dup	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
	15	R7.KJ	CMT1A	dup	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
	16	R7.KZ	CMT1A	dup	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
R8	17	R8.LE	HNPP	del	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
R9	18	R9.MK	CMT1A	dup	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
	19	R9.MT	CMT1A	dup	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
R10	20	R10.SA	CMT1A	dup	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
	21	R10.ST	CMT1A	dup	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
	22	R10.SG	CMT1A	dup	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
R11	23	R11.SJ	HNPP	del	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
R12	24	R12.SE	CMT1A	dup	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
	25	R12.SA	CMT1A	dup	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
R13	26	R13.MA	CMT1A	dup	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
R14	27	R14.TJ	CMT1A	dup	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
R15	28	R15.LB	CMT1A	dup	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
	29	R15.LŁ	CMT1A	dup	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
	30	R15.LW	CMT1A	dup	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
R16	31	R16.GA	CMT1A	dup	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
R17	32	R17.KE	HNPP	del	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
	33	R17.KW	HNPP	del	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
	34	R17.KM	HNPP	del	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
R18	35	R18.SZ	HNPP	del	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
R19	36	R19.MA	CMT1A	dup	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
R20	37	R20.CM	CMT1A	dup	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
R21	38	R21.ZK	CMT1A	dup	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
R22	39	R22.BA	CMT1A	dup	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
	40	R22.BJ	CMT1A	dup	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
R23	41	R23.TP	CMT1A	dup	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
	42	R23.TS	CMT1A	dup	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
	43	R23.TR	CMT1A	dup	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
	44	R23.TJ	zdrowy	norma	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
R24	45	R24.KK	CMT1A	dup	<i>PMP22, LITAF</i>
R25	46	R25.IK	CMT1A	dup	<i>PMP22, LITAF</i>
R26	47	R26.AM	HNPP	del	<i>LITAF, TNF alfa</i>
	48	R26.AJ	HNPP	del	<i>LITAF, TNF alfa</i>
R27	49	R27.BA	CMT1A	dup	<i>LITAF, TNF alfa</i>
	50	R27.BP	CMT1A	dup	<i>LITAF, TNF alfa</i>
R28	51	R28.BD	HNPP	del	<i>LITAF, TNF alfa</i>
	52	R28.BM	HNPP	del	<i>LITAF, TNF alfa</i>

Rodzina	Nr prób	Kod	Wstępne rozpoznanie	Test dup/del genu <i>PMP22</i>	Badane geny
R29	53	R29.CA	CMT1A	dup	<i>LITAF, TNF alfa</i>
	54	R29.CS	CMT1A	dup	<i>LITAF, TNF alfa</i>
R30	55	R30.CA	CMT1A	dup	<i>LITAF, TNF alfa</i>
	56	R30.Can	CMT1A	dup	<i>LITAF, TNF alfa</i>
R31	57	R31.DT	HNPP	del	<i>LITAF, TNF alfa</i>
R32	58	R32.JA	CMT1A	dup	<i>LITAF, TNF alfa</i>
R33	59	R33.KD	HNPP	del	<i>LITAF, TNF alfa</i>
	60	R33.KP	HNPP	del	<i>LITAF, TNF alfa</i>
	61	R33.KPi	HNPP	del	<i>LITAF, TNF alfa</i>
	62	R33.KS	zdrowy	norma	<i>LITAF, TNF alfa</i>
R34	63	R34.KA	HNPP	del	<i>LITAF</i>
	64	R34.KŁ	HNPP	del	<i>LITAF</i>
R35	65	R35.KK	HNPP	del	<i>LITAF</i>
	66	R35.KR	HNPP	del	<i>LITAF</i>
R36	67	R36.KK	CMT1A	dup	<i>LITAF</i>
	68	R36.KM	CMT1A	dup	<i>LITAF</i>
	69	R36.KR	CMT1A	dup	<i>LITAF</i>
R37	70	R37.KE	CMT1A	dup	<i>LITAF</i>
	71	R37.KS	CMT1A	dup	<i>LITAF</i>
R38	72	R38.KSB	CMT1A	dup	<i>LITAF</i>
	73	R38.KSB	CMT1A	dup	<i>LITAF</i>
R39	74	R39.ME	CMT1A	dup	<i>LITAF</i>
	75	R39.MM	CMT1A	dup	<i>LITAF</i>
R40	76	R40.MP	CMT1A	dup	<i>LITAF</i>
	77	R40.Mpa	CMT1A	dup	<i>LITAF</i>
	78	R40.MR	CMT1A	dup	<i>LITAF</i>
R41	79	R41.NH	CMT1A	dup	<i>LITAF</i>
R42	80	R42.SS	HNPP	del	<i>LITAF</i>
R43	81	R43.SK	CMT1A	dup	<i>LITAF</i>
	82	R43.SM	CMT1A	dup	<i>LITAF</i>
R44	83	R44.SF	HNPP	del	<i>LITAF</i>
R45	84	R45.TK	HNPP	del	<i>LITAF</i>
R46	85	R46.ZM	CMT1A	dup	<i>LITAF</i>
	86	R46.ZMi	CMT1A	dup	<i>LITAF</i>
	87	R46.ZP	CMT1A	dup	<i>LITAF</i>
R47	88	R47.KZ	CMT1A	dup	<i>LITAF, TNF alfa</i>
	89	R47.KSS	CMT1A	dup	<i>LITAF, TNF alfa</i>
	90	R47.KSt	CMT1A	dup	<i>LITAF, TNF alfa</i>
	91	R47.KJ	CMT1A	dup	<i>LITAF, TNF alfa</i>
	92	R47.KK	zdrowy	norma	<i>LITAF, TNF alfa</i>
R48	93	R48.KIE	CMT1A	dup	<i>LITAF, TNF alfa</i>
	94	R48.ID	CMT1A	dup	<i>LITAF, TNF alfa</i>
R49	95	R49.KP	HNPP	del	<i>LITAF, TNF alfa</i>
	96	R49.KA	HNPP	del	<i>LITAF, TNF alfa</i>
	97	R49.KE	zdrowy	norma	<i>LITAF, TNF alfa</i>
R50	98	R50.WA	CMT1A	dup	<i>LITAF, TNF alfa</i>
	99	R50.WH	zdrowy	norma	<i>LITAF, TNF alfa</i>
	100	R50.WT	zdrowy	norma	<i>LITAF, TNF alfa</i>
	101	R50.KT	CMT1A	nb	-
	102	R50.RE	CIDP	norma	<i>LITAF, TNF alfa</i>
	103	R50.WM	zdrowy	norma	<i>LITAF, TNF alfa</i>
R51	104	R51.RT	GBS	norma	<i>LITAF, TNF alfa</i>
	105	R51.RA	CMT1A + CIDP	dup	<i>LITAF, TNF alfa</i>
	106	R51.RR	CMT1A	dup	<i>LITAF, TNF alfa</i>
	107	R51.RM	zdrowy	norma	<i>LITAF, TNF alfa</i>
R52	108	R52.SA	CMT1A	dup	<i>LITAF, TNF alfa</i>
R53	109	R53.CD	CMT	norma	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
R54	110	R54.RA	CMT	norma	<i>PMP22, LITAF</i>
R55	111	R55.ZJ	CMT	norma	<i>PMP22, LITAF</i>

Rodzina	Nr prób	Kod	Wstępne rozpoznanie	Test dup/del genu <i>PMP22</i>	Badane geny
R56	112	R56.HN	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R57	113	R57.ZN	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R58	114	R58.CS	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R59	115	R59.NB	CMT	norma	<i>PMP22</i>
	116	R59.NM	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R60	117	R60.KJ	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R61	118	R61.KB	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R62	119	R62.GM	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R63	120	R63.GP	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R64	121	R64.ST	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R65	122	R65.DP	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R66	123	R66.WM	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R67	124	R67.MB	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R68	125	R68.PK	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R69	126	R69.SD	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R70	127	R70.KG	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R71	128	R71.HD	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R72	129	R72.SA	CMT1C	norma	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
	130	R72.SJ	CMT1C	norma	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
	131	R72.SR	zdrowy	norma	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
	132	R72.SF	CMT1C	norma	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
R73	133	R73.TR	CMT	norma	<i>PMP22, LITAF</i>
R74	134	R74.TJ	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R75	135	R75.BAB	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R76	136	R76.CP	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R77	137	R77.DM	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R78	138	R78.MJ	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R79	139	R79.OM	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R80	140	R80.SO	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R81	141	R81.SB	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R82	142	R82.KD	CMT	norma	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
R83	142	R83.GS	CMT	norma	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
R84	143	R84.MR	CMT	norma	<i>PMP22</i>
	144	R84.MK	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R85	145	R85.KA	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R86	146	R86.WE	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R87	147	R87.RN	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R88	148	R88.ŁK	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R89	149	R89.PK	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R90	150	R90.UZ	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R91	151	R91.CŁ	CMT	norma	<i>PMP22</i>
	152	R91.CW	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R92	153	R92.NM	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R93	154	R93.PN	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R94	155	R94.KJ	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R95	156	R95.SzI	HNPP	del	<i>PMP22, LITAF</i>
	157	R95.SzK	HNPP	del	<i>PMP22, LITAF</i>
R96	158	R96.SD	HNPP	del	<i>LITAF, TNF alfa</i>
R97	159	R97.CK	HNPP + GBS	del	<i>LITAF, TNF alfa</i>
R98	160	R98.TR	HNPP	del	<i>LITAF, TNF alfa</i>
R99	161	R99.CP	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R100	162	R100.KM	CMT	norma	<i>PMP22</i>
	163	R100.KMa	HNPP	del	<i>PMP22, LITAF, TNF alfa</i>
R101	164	R101.DD	HNPP	del	<i>LITAF</i>
	165	R101.DM	HNPP	del	<i>LITAF</i>
	166	R101.DW	HNPP	del	<i>LITAF</i>

Rodzina	Nr prób	Kod	Wstępne rozpoznanie	Test dup/del genu <i>PMP22</i>	Badane geny
R102	167	R102.CA	CMT1A	dup	<i>LITAF</i>
	168	R102.KE	CMT1A	dup	<i>LITAF</i>
R103	169	R103.GR	HNPP	del	<i>LITAF</i>
R104	170	R104.ŻD	HNPP	del	<i>LITAF</i>
R105	171	R105.M	HNPP	del	<i>LITAF</i>
R106	172	R106.ŁK	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R107	173	R107.KK	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R108	174	R108.CW	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R109	175	R109.MA	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R110	176	R110.OM	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R111	177	R111.SA	CMT	norma	<i>PMP22</i>
	178	R111.SP	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R112	179	R112.JZ	CMT	norma	<i>PMP22</i>
	180	R112.JP	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R113	181	R113.KR	CMT	norma	<i>PMP22</i>
R114	182	R114.GW	CMT	norma	<i>PMP22</i>

R1.XY – R1- rodzina numer, XY- inicjały badanej osoby.

CMT1A - Charcot-Marie-Toot typ1A, CMT1C - Charcot-Marie-Toot typ1C, HNPP- dziedziczna neuropatia z nadwrażliwości na ucisk, CMT – chorzy z polineuropatią demielinizacyjną, u których wykluczono duplikację/delecję genu *PMP22*, CIDP - przewlekła zapalna poliradiokuloneuropatia demielinizacyjna, GBS - zespół Guillain-Barré.

3.2 Grupa kontrolna

Grupę kontrolną stanowiło 100 zdrowych osób (50 kobiet, 50 mężczyzn), od których uzyskano próbki DNA. Materiał pochodził z Zakładu Genetyki Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Na wykonanie badań otrzymano zgodę Komisji Bioetycznej Nr 120/2008 WUM.

Od każdego chorego oraz zdrowych członków rodzin otrzymano uświadomioną zgodę na przeprowadzenie badań. U większości chorych udzielono porady genetycznej (zespół: neurolog, internista, genetyk kliniczny).

4.METODY

4.1 Izolacja DNA

Preparaty DNA uzyskano z leukocytów krwi obwodowej (10-15 ml). Krew pobierano za pomocą strzykawek z EDTA S-MMONOVETTE (Sarsted). Izolacja DNA odbywała się metodą stopniowego wysalania białek nasyconym roztworem NaCl przy użyciu proteinazy K wg Millera i wsp. (1988). Uzyskane DNA zawieszano w 10mM buforze TE (Tris, EDTA) pH=8 i przechowywano w 4°C lub -20°C. Stężenie DNA oceniano spektrofotometrycznie.

4.2 Izolacja RNA

Preparaty RNA uzyskano z leukocytów krwi obwodowej (10-15 ml). Procedura pobierania krwi przebiegała jak przy izolacji DNA. Izolację RNA przeprowadzono wg modyfikowanej metody Chomczyńskiego z zastosowaniem TRIzol Reagent (Invitrogen) (Chomczyński i Sacchi 1987). Uzyskane RNA zawieszano w końcowej objętości 20-30 μ l wody traktowanej DEPC (H_2O_{DEPC} – dietylopirowęglan). Stężenie RNA oceniano spektrofotometrycznie oraz elektroforetycznie.

4.3 Pomiar spektrofotometryczny

Ilość preparatów DNA i RNA sprawdzano spektrofotometrycznie za pomocą urządzenia Nano-Drop ND 1000. Dodatkowo jakość preparatów RNA sprawdzano elektroforetycznie. Do dalszych analiz preparaty DNA rozcieńczano do 20 ng/ μ l.

4.4 Rozdział elektroforetyczny

Jakość preparatów RNA oraz wielkość fragmentów DNA oceniano techniką elektroforezy w 1-1,5% żelu agarozowym w buforze 1xTBE (Tris-Borate-EDTA). Wizualizację zaamplifikowanych fragmentów przeprowadzono w świetle ultrafioletowym.

4.5 Reakcja łańcuchowa polimerazy DNA z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym (Real-time PCR)

Reakcję (Real-time PCR) zastosowano do wykrywania duplikacji/delecji regionu 17p11.2-p12. W celu określenia ilości kopii genu *PMP22* (ekson 3) wykorzystano

degradujące sondy specyficzne do sekwencji TaqMan. Genem badanym był gen *PMP22* natomiast genem referencyjnym, gen albuminy surowicy ludzkiej (*HSA*).

Startery oraz sondy używane do amplifikacji eksonu 3-go genu *PMP22* oraz eksonu 12-go genu *HSA* oraz warunki reakcji zaprojektowano wg Aarskog i Vedeler (Aarskog i Vedeler 2000) z modyfikacjami (Kabzińska 2009) (Tabela 3, 4).

Gen <i>PMP22</i>		
Symbol startera	Fragment	Sekwencja startera
PMP22-F	Ekson 3	5'TCTGTCCAGGCCACCATGA 3'
PMP22-R		5'GAAGAGTTGGCAGAAGAACAGGA 3'
Gen <i>HSA</i>		
HSA-F	Ekson 12	5'TGTTGCATGAGAAAACGCCA 3'
HSA-R		5'GTCGCCTGTTACCAAGGAT3'

Tabela 3 Sekwencje starterów używanych do reakcji Real-time PCR.

Gen <i>PMP22</i>		
Symbol sondy	Fragment	Sekwencja sondy
SPMP22	Ekson 3	FAM-5'CCTGTGCGATCATCTTCAGCATTCTGTCTCT3'-TAMRA
Gen <i>HSA</i>		
SHSA	Ekson 12	VIC-5'AAGTGACAGAGTCACCAAATGCTGCACAG3'-TAMRA

Tabela 4 Sekwencje sond TaqMan używanych do reakcji Real-time PCR.

Dla genu *PMP22* jako reportera używano fluorochromu FAM, a jako wygaszacza TAMRA. W przypadku genu *HSA* jako reportera używano fluorochromu VIC, a jako wygaszacza TAMRA. Reakcję przeprowadzono metodą multipleks PCR, umożliwiającą amplifikowanie zarówno genu *PMP22* jak i *HSA* w jednej reakcji Real-time PCR.

Reakcję przeprowadzono w 96-dółkowych płytkach, w objętości 25µl, w trzech powtórzeniach dla: 26 chorych i członków ich rodzin, 2 kontroli (osoby zdrowe), 3 prób pozytywnych (2x duplikacja, 1x delecja), 1 próby wodnej. Reakcję przeprowadzono metodą multipleks PCR w aparacie ABI 7500 (Applied Biosystems).

Warunki reakcji PCR w czasie rzeczywistym obejmowały wstępną denaturację 10 min. w 95°C, 40 cykli - denaturacja 95°C przez 15sek., przyłączanie starterów 60°C przez 1 min. Mieszanina reakcyjna zawierała: 1x Taq Man Universal Master Mix, 4500nM startery, 1000 nM oraz DNA w stężeniu 20ng/µl.

Po zakończeniu właściwej amplifikacji przeprowadzono analizę krzywej topnienia produktów PCR. Relatywną ilość genu *PMP22* opisaną jako współczynnik $\Delta\Delta C_T$ obliczono metodą

porównawczego C_T . Liczba C_T określa liczbę cykli reakcji PCR, po których poziom fluorescencji przekroczy zdefiniowany próg, tzw. linię progową. C_T jest stosowana do obliczenia względnej liczby kopii genu.

Współczynnik $\Delta\Delta C_T$ dla genu *PMP22* w populacji polskiej został ustalony wg Kabzińska i wsp. (2009):

Kontrola	0.700-1.090
CMT1A/duplikacja	1.176-2.324
HNPP/delecja	0.359-0.595

Na podstawie wartości współczynnika $\Delta\Delta C_T$ dla genu *PMP22* i wyliczonego zakresu tego współczynnika dla kontroli określa się występowanie duplikacji lub delecji genu *PMP22*.

4.6 Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)

Otrzymane DNA stosowano jako matrycę do amplifikacji genów *PMP22*, *LITAF* oraz *TNF alfa*. Startery używane do reakcji PCR zostały wykonane w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN.

W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły odczynniki przedstawione w Tabeli 5. Najczęściej stosowano protokół przedstawiony w Tabeli 6, do którego w zależności od rodzaju starterów wprowadzano modyfikacje.

Tabela 5 Skład mieszaniny reakcyjnej PCR.

Mieszanina reakcyjna	Końcowe stężenie w mieszaninie reakcyjnej
H ₂ O	zmienna objętość
Bufor PCR 10x	1X
MgCl ₂ (25mM)	1,5 mM
dNTP mix (2,5mM)	0,2 mM
Starter F (10μM)	0,5 μM
starter R (10μM)	0,5 μM
PolimerazaTaq DNA (1U/μl)	0,5 U
DNA	80-100 ng/μl

Tabela 6 Profil termiczny reakcji PCR.

Etap	Temperatura	Czas
Wstępna denaturacja	95 °C	2min
Denaturacja	95 °C	1min
Przyłączanie starterów	zależna od starterów	zależny od starterów
Synteza	72 °C	1 min
Synteza uzupełniająca	72 °C	7 min

} 30-33 cykle

4.6.1 Gen *PMP22*

Zestaw starterów do amplifikacji regionu promotora 1 genu *PMP22* pochodzi z pracy Nelis i wsp. (1998). Zestaw starterów do powielania promotora 2 oraz sekwencji regulatorowej genu *PMP22* został zaprojektowany przy użyciu programu Primer3 (9 par starterów).

Zestaw starterów do amplifikacji sekwencji kodującej genu *PMP22* pochodzi z pracy Roa i wsp.(1993). Sekwencje starterów używanych do amplifikacji oraz warunki reakcji zostały przedstawione w Tabeli I oraz w Tabeli II (Suplement).

4.6.2 Gen *LITAF/SIMPLE*

Zestaw starterów do amplifikacji sekwencji kodującej eksonu 2 i 3 genu *LITAF/SIMPLE* wraz z flankującymi sekwencjami intronowymi pochodzi z pracy Street i wsp. (2003). Startery do amplifikacji sekwencji kodującej eksonu 4 zostały zaprojektowane przy użyciu programu Primer3.

Sekwencje starterów używanych do amplifikacji oraz warunki reakcji zostały przedstawione w Tabeli III (Suplement).

4.6.3 Gen *TNF alfa*

Zestaw starterów do amplifikacji sekwencji promotorowej genu *TNF alfa* został zaprojektowany przy użyciu programu Primer3.

Sekwencje starterów używanych do amplifikacji oraz warunki reakcji zostały przedstawione w Tabeli IV (Suplement).

4.7. Oczyszczanie produktów PCR

Produkty reakcji PCR oczyszczano z niewłączonych nukleotydów oraz starterów za pomocą zestawu enzymów ExoSAP (Fermentas) lub metodą kolumnkową (Invitrogen) zgodnie z zaleceniami producenta.

4.8. Sekwencjonowanie produktów PCR

Reakcję sekwencjonowania przeprowadzano zmodyfikowaną techniką opartą na metodzie Sanger i wsp. z zastosowaniem terminacji kwasów nukleinowych poprzez przyłączenie ddNTP (dideoksy) wyznakowanych czterema różnymi fluorochromami (Sanger i wsp. 1977).

Do reakcji zastosowano ABI PRISM BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems). Matrycę do reakcji stanowiły oczyszczone produkty reakcji PCR. Reakcję przeprowadzano w końcowej objętości 10 µl wg zaleceń producenta. Produkty reakcji PCR oczyszczano za pomocą kolumnek z Sephadexem G-50 (Sigma Aldrich) lub za pomocą BigDye® XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems) wg zaleceń producenta.

Sekwencjonowanie oczyszczonych produktów PCR wykonano w Pracowni Sekwencjonowania i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN oraz z Zakładzie Genetyki Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego metodą elektroforezy kapilarnej w analizatorze kwasów nukleinowych ABI Prim Genetic Analyzer 3130.

4.9 Analiza bioinformatyczna

Analiza *in silico* została wykonana przy pomocy następujących programów:

BLAST <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> - porównywanie otrzymanych wyników sekwencjonowania z sekwencjami referencyjnymi badanych genów,

NCBI dbSNP <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> - baza polimorfizmów jednonukleotydowych oraz innych wariantów sekwencyjnych,

Primer3 <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/> - projektowanie starterów do reakcji PCR,

IPNMDB <http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/> - baza danych w której opisano mutacje w CMT,

MatInspector <http://www.genomatix.de/matinspector.html> - program do analizy regionu promotorowego,

PESEX <http://cubweb.biology.columbia.edu/pesx/> - program do poszukiwania potencjalnych elementów wzmacniających/wyciszających (Enhancers/Silencers) transkrypcję,

TFSEARCH <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html> - program do poszukiwania motywów regulujących transkrypcję,

TESS www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess - program do lokalizacji miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych.

Poszukiwanie i analiza sekwencji regulujących splicing:

ESEfinder <http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home> poszukiwanie i analiza sekwencji regulujących splicing,

NNsplice www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html - program do analizy miejsc splicingowych,

RESCU-ESE <http://genes.mit.edu/burgelab/rescue-ese/> - poszukiwanie i analiza sekwencji regulujących splicing,

FAS-ESE <http://genes.mit.edu/fas-ess/> - poszukiwanie i analiza sekwencji regulujących splicing,

Human Splicing Finder Version 2.4.1 <http://www.umd.be/HSF/> – analiza sekwencji pod kątem miejsc splicingowych i elementów regulujących splicing (ESE, ESS, ISE, ISS).

Analiza sekwencji aminokwasowych białek:

ClustalW <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html> – porównywanie sekwencji białkowych pomiędzy różnymi gatunkami.

GeneDoc www.nrbsc.org/gfx/genedoc/ - porównywanie sekwencji białkowych pomiędzy różnymi gatunkami, tworzenie alignmentów.

4.10 Skalowanie polineuropatii CMT1A i HNPP

Skala					
Parametry	0	1	2	3	4
zaburzenia czucia	żadnych	ograniczone do palców stóp	powyżej palców stóp, może obejmować staw skokowy	powyżej stawu skokowego, może obejmować staw kolanowy	powyżej stawu kolanowego
deficyt ruchowy w kończynach górnych	żadnych	zredukowane do palców rąk/nóg	trudności w zapinaniu guzików, zachowana zdolność do pisania	chory nie może samodzielnie pisać, używać klawiatury	zajęcie mięśni dosiebnych
deficyt ruchowy w kończynach dolnych	żadnych	opadanie stopy	orteza (stabilizator) stawu skokowego przynajmniej na jednej nodze	operacja stawu skokowego	wózek inwalidzki używany przez większość czasu
czucie bólu dotyku	norma	zredukowane do palców rąk/nóg	zredukowane powyżej palców, może obejmować nadgarstek/staw skokowy	zredukowane powyżej nadgarstka/stawu skokowego, może obejmować staw łokciowy/kolanowy	zredukowane powyżej stawu łokciowego/kolanowego
czucie wibracji	norma	zredukowane w palcach rąk/nóg	zredukowane w nadgarstku/stawie skokowym	zredukowane w stawie łokciowym/kolanowym	zredukowane powyżej stawu łokciowego/kolanowego
CMAP w nerwie łokciowym	>6 mV	4,0-5,9 mV	2,0-3,9 mV	0,1-1,9 mV	brak
SNAP w nerwie łokciowym	>9 μ V	6,0-8,9 μ V	3,0-5,9 μ V	0,1-2,9 μ V	brak
niedowład kończyn dolnych	norma	łagodny	średnio nasilony	o znacznym nasileniu	-
niedowład kończyn górnych	norma	łagodny	średnio nasilony	o znacznym nasileniu	-
wydrążenie stóp	norma	łagodne	nasilone	operacyjna korekta deformacji	-
skolioza	norma	łagodna	średnio nasilona	o znacznym nasileniu	-
odruch kolanowy	obecny	-	-	brak	-
odruch ze ścięgna Achillesa	obecny	-	-	brak	-

Tabela 7 Zmodyfikowana skala polineuropatii Charcot-Marie-Tooth wg skali Haberlovej i Seimana (Haberlová i Seeman 2010).

4.11 Analiza statystyczna danych

Analizowane zmienne (parametry kliniczne) nie mają rozkładu normalnego, jak również stosunkowo małe liczebności chorych w grupach ze względu na rzadką jednostkę chorobową.

Analizie statystycznej poddano wyniki badań molekularnych 87 osób. We wszystkich przypadkach dysponowano danymi dotyczącymi wieku wystąpienia pierwszych objawów choroby. Analiza statystyczna chorych, dla których dysponowano pełnym zestawem danych klinicznych i elektrofizjologicznych umożliwiającym ocenę polineuropatii wg zmodyfikowanej skali Haberlovej i Seemana została przeprowadzona dla 60 osób, przydzielonych do grup liczących od 5 do 16 przypadków. Do analizy statystycznej wybrano metody nieparametryczne.

W analizie zmiennych ilościowych (zmienna wiek w zdefiniowanych grupach badanych) wyniki przedstawiono jako wartości średnie z odchyleniem standardowym. W ocenie istotności statystycznej obserwowanych różnic pomiędzy grupami użyto testu U Manna-Whitneya. W analizie pozostałych zmiennych, które są zmiennymi jakościowymi (przedstawionych jako liczebności i/lub procenty) w ocenie istotności statystycznej obserwowanych różnic zastosowano test χ^2 lub jego odpowiednią modyfikację (dokładny test Fishera), zgodnie z zaleceniami literaturowymi (Domański 1990, Luszniwicz i Słaby 2001). Analizy przeprowadzono w programie statystycznym STATISTICA wersji 5.0 Polska.

5. WYNIKI

1. Analiza sekwencji regulatorowej 5'UTR oraz promotora genu *PMP22* w grupie chorych z fenotypem CMT1A/HNPP i w grupie kontrolnej pozwoliła na identyfikację pięciu wariantów sekwencyjnych tj.: -819C>T, -4210T>C, -4759T>A, -4785G>T oraz -4800C>T.
2. Analiza sekwencji kodującej genu *PMP22* w grupie chorych z fenotypem CMT1A/HNPP i w grupie kontrolnej pozwoliła na identyfikację wariantu sekwencyjnego c.215C>T (Ser72Leu) oraz c.353C>T (Thr118Met).
3. Analiza sekwencji kodującej genu *LITAF* w grupie chorych z fenotypem CMT1A/HNPP i w grupie kontrolnej pozwoliła na identyfikację pięciu wariantów sekwencyjnych tj.: c.234G>A (Thr78Thr), c.274A>G (Ile92Val), c.333C>T (Ala111Ala), c.334G>A (Gly112Ser) oraz c.585C>T (3'UTR).
4. Analiza sekwencji kodującej genu *LITAF* w grupie chorych, gdzie w rodzinie współistnieje polineuropatia genetycznie uwarunkowana z przewlekłą polineuropatią zapalną i w grupie kontrolnej wykazała obecność wariantu sekwencyjnego c.274A>G (Ile92Val).
5. Analiza sekwencji promotorowej genu *TNF alfa* w grupie chorych z fenotypem CMT1A/HNPP oraz w grupie chorych, gdzie w rodzinie współistnieje polineuropatia genetycznie uwarunkowana z przewlekłą polineuropatią zapalną i w grupie kontrolnej pozwoliła na identyfikację wariantu sekwencyjnego -308G>A.

Wyniki zbiorcze przeprowadzonych analiz genów *PMP22*, *LITAF/SIMPLE* oraz *TNF alfa* znajdują się w **Tabeli V** (Suplement).

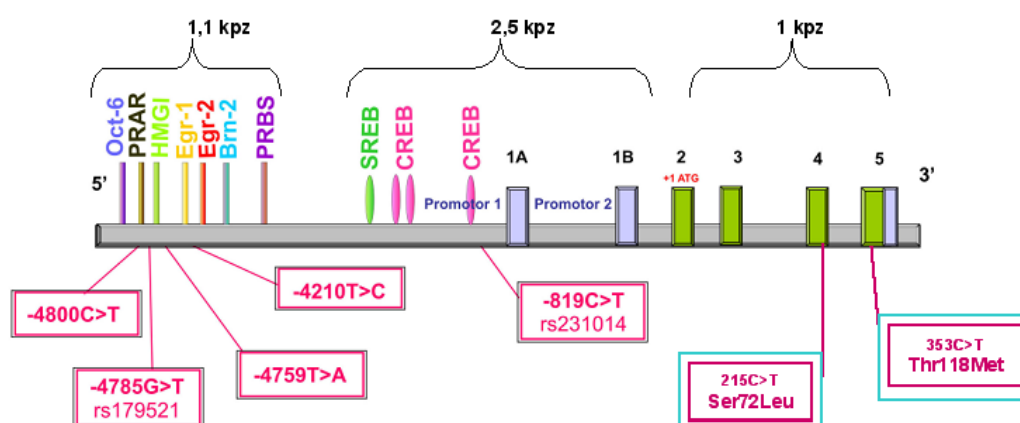
Tabela 8 Charakterystyka kliniczna chorych ocenianych wg zmodyfikowanej skali Haberlová i Seeman, u których zidentyfikowano zmiany w genach *PMP22* i *LITAF*.

Chory/Kod	Wiek badanego	Wiek początek choroby	Test dup/del	PMP22	LITAF	z.cz.	def. ruch. w kkg	def. ruch. w kkd	Czucie dotyku bólu	Czucie wibracji	CMAP	SNAP	Skolioza	Stopy	nkgg	nkkd	OK	OA	Chodzi od	Inne/uwagi
R11.SJ	72	71	del	-4210T>C		1	1	1	2	1	0	0	1	2	0	0	brak	brak	13 mż	niedostuch drżenie
R17.KE	20	13	del	-4759T>A -4800C>T	Ile92Val				0	0	0	4	0	1	0	1	jest	jest	12 mż	
R17.KW	57	57 (bo)	del						0	0			0	1	0	0	jest	jest	12 mż	
R17.KM	31	12	del	-4759T>A -4800C>T	Ile92Val	1			0	0			1	0			jest	jest	12 mż	
R12.SA	12	10	dup		Ile92Val 78Thr78	0	0	0	0	0	2	4	0	1	0	2	brak	brak	14 mż	ból i obrzęk kończyn dolnych
R12.SE	47	37	dup	Thr118Met	78Thr78	0	0	1	0	0	2	0	0	1	0	2	brak	brak	12 mż	
R80.SO	27	23	norma	Thr118Met		0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	jest	brak	14 mż	wada postawy krótkie paliczki dystalne w stopach
R88.LK	4	1,5	norma	Ser72Leu		0	3	4	0	0	0	3	3	3	3	3	brak	brak	3 rż	
R30.CA	11,5	1,5	dup		Ile92Val 78Thr78	0	1	1	0	0	2	4	1	2	1	2	brak	brak	16 mż	drżenie
R30.CAn	54	54 (bo)	dup			0	0	1	0	0	1	4	0	0	1	2	brak	brak	12 mż	
R23.TR	58	7	dup		Ile92Val	0	0	1	0	0	0	2	0	1	0	1	jest	jest	12 mż	
R23.TS	5	1,3	dup		Ile92Val 585C>T (3'UTR)	0	1	1	0	0	2	1	0	0	1	3	jest	jest	16 mż	
R23.TP	33	25	dup		Ile92Val	0	0	0	0	0	1	4	0	0	0	0	brak	brak	12 mż	
R50.WA	16	2	dup		Ile92Val	0	1	1	0	0			3	3	1	2	brak	brak	20 mż	CIDP
R50.RE	28	25	norma		Ile92Val	1	0	2	0	0	0	2	0	0	0	3	jest	brak	12 mż	CIDP
R51.RA	3	3	dup		Ile92Val	0	1	2	0	0	3	4	0	1	1	2		brak	20 mż	
R51.RR	30	30 (bo)	dup			0	0	0	0	0	1	4	0	0	0	0	jest	jest	12 mż	
R97.CK	21	21	del		Ile92Val	0	1	0	0	0	0	3	2	0	1	0	jest	jest	12 mż	GBS
R2.DE	46		dup		Ala111Ala						4	4		0		2	jest	jest	12 mż	
R2.DT	24	24	dup			1								0					12 mż	
R4.HJ	27	21	dup										1	1	1	1	brak	brak	12 mż	drżenie
R4.HA	56	56	dup		Ala111Ala								0	0	0	0			12 mż	
R72.SF	38	bo	norma		Gly112Ser	0	0	0	0	0	1	3	2	1	0	0	jest	brak	14 mż	wada postawy
R72.SJ	59	bo	norma		Gly112Ser	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	jest	brak	12 mż	
R72.SA	25	23	norma		Gly112Ser	1	1	2	1	1	0	0	0	1	0	2	brak	brak	12 mż	demielinizacja w OUN

bo – bezobjawowy, z.cz. – zaburzenia czucia, def. ruch. w kkg – deficyt ruchowy w kończynach górnych, def. ruch. w kkd - deficyt ruchowy w kończynach dolnych, nkgg – niedowład kończyn górnych, nkkd – niedowład kończyn dolnych, CMAP - złożony potencjał czynnościowy rejestrowany z mięśnia po stymulacji elektrycznej włókien ruchowych nerwu, SNAP - czuciowy potencjał czynnościowy rejestrowany z nerwu OK. – odruch kolanowy, OA – odruch ze ścięgna Achillesa.

5.1. Warianty sekwencyjne w regionie regulatorowym i promotorowym genu *PMP22*

Na podstawie pracy Maier i wsp. oraz przy użyciu programu *ClustalW* i *VISTA* porównano ludzką i mysią sekwencję regulatorową genu *PMP22* (ok.5 kbp). Na podstawie wykonanej analizy wyznaczono w obu sekwencjach regiony charakteryzujące się ponad 80% homologią, łącznie 3,6 kbp. Następnie zidentyfikowane regiony zostały poddane analizie bioinformatycznej – program *TESS* oraz *MatInspector*, która wykazała szereg potencjalnych miejsc przyłączania czynników transkrypcyjnych (Ryc. 7).



Ryc.7 Schemat genu *PMP22*. Kolorem zielonym zaznaczono region kodujący, kolorem szarym region nie kodujący genu *PMP22*. W obrębie sekwencji regulatorowej zaznaczono potencjalne miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych CREB, SREB, PRBS, Brn-2, Egr-1, Egr-2, PRAR, Oct-6. Kłami zaznaczono wielkość analizowanych fragmentów, kolorem czerwonym zidentyfikowane zmiany.

Analiza sekwencji regulatorowej genu *PMP22* wraz z promotorem 1 i promotorem 2 w 45-osobowej grupie chorych z fenotypem CMT1A/HNPP (z odpowiednio potwierdzoną duplikacją/delecją genu *PMP22*) i 100-osobowej grupie kontrolnej pozwoliła na identyfikację pięciu wariantów sekwencyjnych (Tab. 9).

Zmiana nukleotydowa	Baza SNP	Częstość występowania					
		W grupie badanej				W grupie kontrolnej (n=100)	
		CMT1A (n=37)		HNPP (n=8)			
		htz	hz	htz	hz	htz	hz
-819C>T	rs231014	13	4	1	3	40	8
-4210T>C		0	0	0	1	0	0
-4759T>A		0	0	0	2	0	0
-4785G>T	rs179521	12	7	2	3	23	20
-4800C>T		0	0	0	2	0	0

Tabela 9 Wyniki badań dla sekwencji regulatorowej genu *PMP22*. CMT1A – chorzy z klinicznym rozpoznaniem choroby Charcot-Marie-Tooth typu 1A i potwierdzoną duplikacją genu *PMP22*, HNPP - chorzy z klinicznym rozpoznaniem dziedzicznej neuropatii z nadwrażliwości na ucisk i potwierdzoną delecją genu *PMP22*. rsXXXXXX – oznaczenie polimorfizmów na podstawie bazy dbSNP NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov.SNP>). Numeracja zmian w sekwencji regulatorowej od pierwszego nukleotydu eksonu 1A wg Nelis i wsp. (1998), htz – zmiana w układzie heterozygotycznym, hz - zmiana w układzie homozygotycznym.

W grupie 45 chorych w regionie promotora 2 genu *PMP22* nie zidentyfikowano wariantów sekwencyjnych.

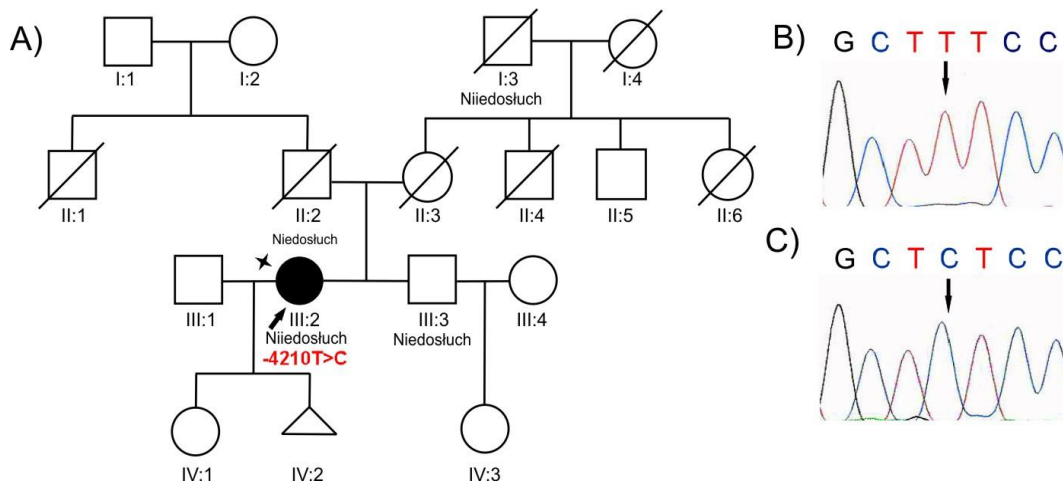
5.1.1. Warianty sekwencyjne -819C>T i -4785G>T

Dwa warianty sekwencyjne -819C>T i -4785G>T zostały zidentyfikowane zarówno w grupie badanej jak i grupie kontrolnej. Wariant sekwencyjny -819C>T wystąpił ze zbliżoną częstością zarówno w grupie badanej jak i kontrolnej, odpowiednio 0,46 i 0,48. Uzyskane wyniki są podobne do danych z bazy dbSNP NCBI (rs231014) – 0,48. Podobnie wariant sekwencyjny -4785G>T wystąpił z dużą częstością zarówno w grupie badanej jak i kontrolnej, odpowiednio 0,53 i 0,43. Uzyskane częstości są zbliżone do danych z bazy dbSNP NCBI (rs179521) – 0,49.

5.1.2. Warianty sekwencyjne -4210T>C, -4759T>A, -4800C>T

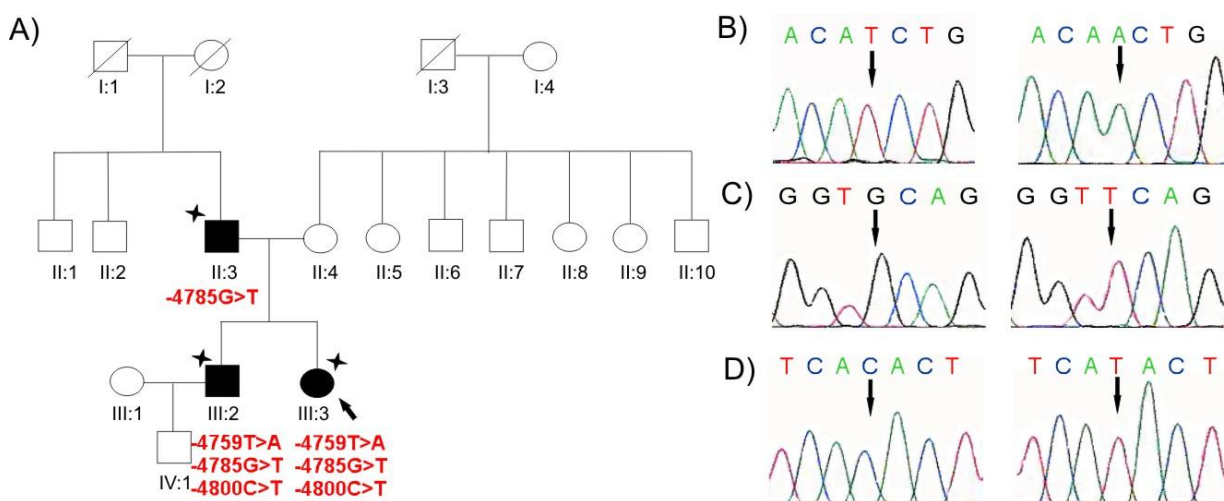
Trzy warianty sekwencyjne: -4210T>C, -4759T>A oraz -4800T>A zostały zidentyfikowane wyłącznie w grupie chorych.

Wariant sekwencyjny zamiany tyminy w cytozynę w pozycji -4210 w homozygotycznym układzie został zidentyfikowany u chorej z rodzinnym niedosłuchem i sporadycznym przypadkiem dziedzicznej neuropatii z nadwrażliwością na ucisk (R11.SJ) (Ryc. 8).



Ryc. 8 A) Rodzowód cztero-pokoleniowej rodziny z niedosłuchem i sporadycznym przypadkiem choroby HNPP (R11). Strzałka wskazuje probanda, gwiazdkami zaznaczono osoby, u których wykonano badanie sekwencji genu *PMP22*. B) Fragment sekwencji genu *PMP22* ze zmianą -4210T>C, C) fragment dzikiej sekwencji genu *PMP22*.

Kolejne dwa warianty sekwencyjne podstawienie tyminy w miejscu adeniny w pozycji -4759 oraz cytozyny w miejscu tyminy w pozycji -4800C>T zostały zidentyfikowane u dwóch chorych (III:2,R17.KM; III:3,R17.KE) w rodzinie z rozpoznaniem dziedzicznej neuropatii z nadwrażliwością na ucisk (Ryc.9). Warianty te wystąpiły w układzie homozygotycznym. Dodatkowo w rodzinie tej zidentyfikowano polimorficzny wariant rs179521.



Ryc. 9 A) Rodzowód cztero-pokoleniowej rodziny z rozpoznaniem choroby HNPP (R17). Strzałka wskazuje probanda, gwiazdkami zaznaczono osoby, u których wykonano badanie sekwencji genu *PMP22*. B) Fragment sekwencji genu *PMP22* ze zmianą -4759T>A oraz fragment sekwencji dzikiej. C) Fragment sekwencji ze zmianą -4785G>T oraz fragment sekwencji dzikiej. D) Fragment sekwencji ze zmianą -4800C>T oraz fragment sekwencji dzikiej.

5.1.3. Konserwowanie nukleotydydowe wariantów SNP w sekwencji regulatorowej genu

PMP22

	-4800C>T	-4785G>T	-4759T>A
H.sapiens:	...CTGAGGTTTCA C ACTTGATAAGTGGT G CAGGGG...GAAAACAT T CTGGTCTCC...		
M.musculus:	...CTAAGGTTTCA C ACTTGAAAAGCAGC C GAGGCT...GTGAACAT T CTGGGAAAG...		
R.norvegicus:	...AGTGCCTTTCA C ACTCAAAACAGTG C TCCCTCC...GTGAACAT T CTGGGAGAG...		
M.malatta:	...CCAACTCTTCA C ACTCACCAAGGGGG G CAGGTT...GAAAACAT T CTGGACGCT...		
P.troglodytes:	...TGATGAAGTCA C ACTGACAAATTCT C ACCTTCC...GAAAACAT T CTGGACACT...		
G.gallus:	...CACTTTATTCA C ACTGCTTGGATCCA T GTAAAG...AAACACAT T CTGGTACAG...		

	-4210T>C	-819C>T
H.sapiens:	...AAAGACTGCT T TCCCCCCT.....CTTGATT C GGGCACA....	
M.musculus:	...GGAGGATGCT T TCCCCAAG.....ATCTATT C GGGATGG....	
R.norvegicus:	...TGTGAGTGCT T TCTGGAGA.....CTTGATT T AAGAAAT....	
M.malatta:	...ATTGGATGCT T TCCATAAA.....GGAGATT T GGGGTTC....	
P.troglodytes:	...TGAAGTGCCT T TCCCCGTCA.....CCTTATT C GGTGGTA....	
G.gallus:	...CTGTCTGTT T TCCCCAGA.....TGTGATT T TGGCAGCT....	

Ryc. 10 Konserwowanie międzygatunkowe wariantów SNP w sekwencji regulatorowej genu *PMP22*. Kolorem czerwonym zaznaczono warianty zidentyfikowane wyłącznie w grupie chorych, kolorem żółtym warianty zidentyfikowane w grupie chorych i w grupie kontrolnej.

H.sapiens – człowiek, M.musculus – mysz domowa, R.norvegicus – szczur wędrowny, M. Malatta – małpa wąskonosna, P.troglodytes – szympan, G.galus – kurczak.

Cytozyna w pozycji -4800, tymina w pozycji -4759 oraz -4210 wykazują wysoki stopień konserwowania międzygatunkowego (6/6 analizowanych gatunków).

5.1.4. Analiza *in silico* wariantów SNP w sekwencji regulatorowej genu *PMP22*

Analiza bioinformatyczna pięciu zidentyfikowanych wariantów sekwencyjnych, przeprowadzona z wykorzystaniem programów *MatInspector* oraz *TFSEARCH* nie wykazała wpływu zidentyfikowanych zmian na przyłączanie, powstawanie lub zanik miejsc przyłączania czynników transkrypcyjnych.

Analiza z wykorzystaniem programu *PESEX* wykazała, że zmiana -4210T>C wpływa na powstanie nowego potencjalnego wzmacniacza transkrypcji genu, natomiast zmiana -4759T>A wpływa na utratę potencjalnego wzmacniacza transkrypcji genu *PMP22*.

5.2. Warianty sekwencyjne w regionie kodującym genu *PMP22*

Region kodujący genu *PMP22* wraz z flankującymi sekwencjami intronowymi (łączna długość ok. 1000 pz) został przeanalizowany w 45-osobowej grupie chorych z fenotypem CMT1A/HNPP, u których wcześniej stwierdzono duplikację lub delecję genu *PMP22* oraz w 66-osobowej grupie chorych z rozpoznaniem polineuropatii demielinizacyjnej (chorzy oznaczeni w tabeli - CMT) i odpowiednio wykluczoną duplikacją i delecją genu *PMP22*. Grupę kontrolną stanowiło DNA uzyskane od 50 zdrowych osób (100 chromosomów).

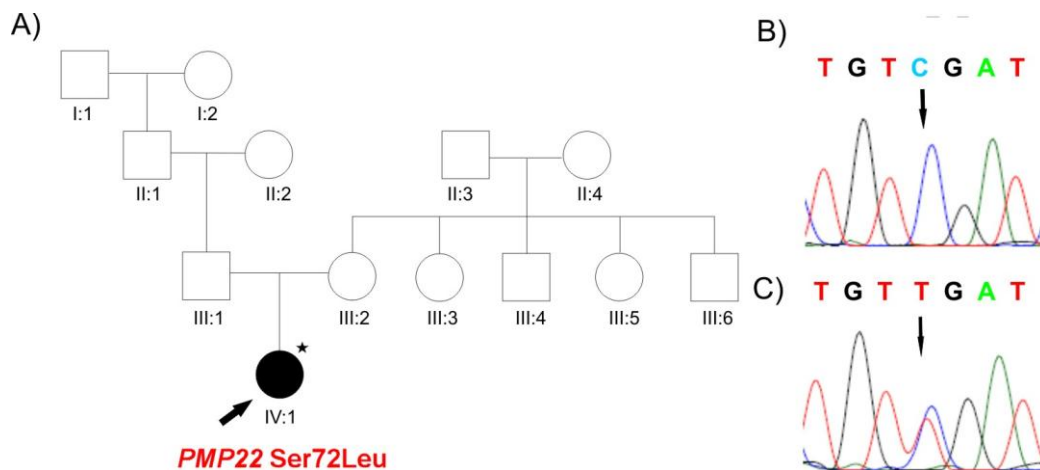
W grupie chorych zostały zidentyfikowane dwa warianty sekwencyjne, które nie występowały w grupie kontrolnej (Tab.10).

Zmiana nukleotydowa	Zmiana aminokwasowa	Baza SNP	Częstość występowania							
			W grupie badanej						W grupie kontrolnej (n=50)	
			CMT1A (n=37)		HNPP (n=8)		CMT (n=66)			
			htz	hz	htz	hz	htz	hz	htz	hz
c.215C>T	Ser72Leu	rs104894621	0	0	0	0	1	0	0	0
c.353C>T	Thr118Met	rs104894619	1	0	0	0	1	0	0	0

Tabela 10 Wyniki badań dla sekwencji kodującej genu *PMP22*. CMT1A – chorzy z klinicznym rozpoznaniem choroby Charcot-Marie-Tooth typu 1A i potwierdzoną duplikacją genu *PMP22*, HNPP - chorzy z klinicznym rozpoznaniem dziedzicznej neuropatii z nadwrażliwości na ucisk i potwierdzoną delecją genu *PMP22*, CMT – chorzy, u których wykluczono duplikację/delecję genu *PMP22*.

5.2.1. Wariant sekwencyjny c.215C>T (Ser72Leu)

Zmiana cytozyny w tyminę w pozycji 215 skutkuje substytucją seryny w leucynę w kodonie 72-gim białka *PMP22*. Zidentyfikowana zmiana jest mutacją patogenną trzecią w populacji polskiej. Mutacja wystąpiła w jednej rodzinie (R88), ze sporadycznym przypadkiem choroby CMT, w której wcześniej wykluczono duplikację/delecję genu *PMP22*. Mutacja ta odpowiada za ciężką formę choroby Charcot-Marie-Tooth – neuropatię hipomielinizacyjną.



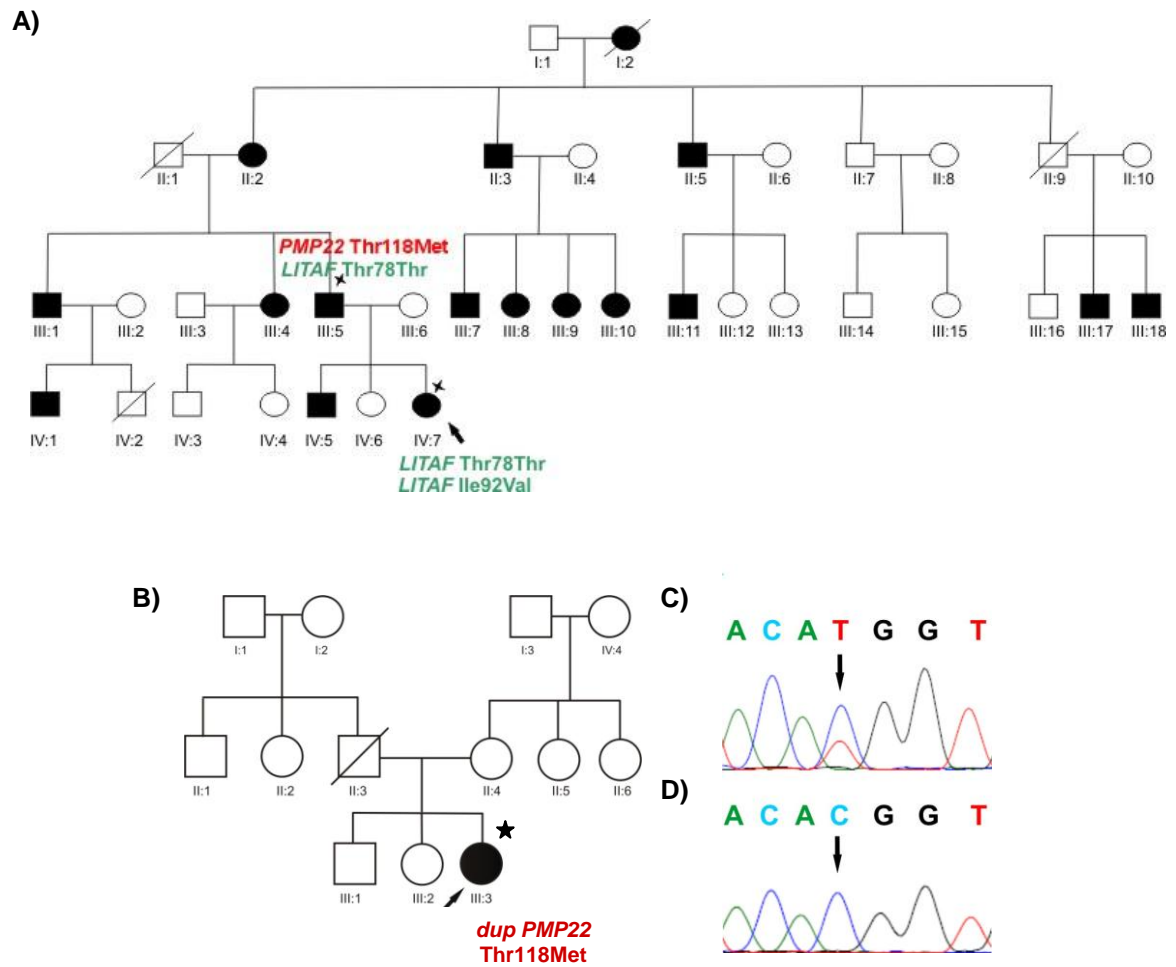
Ryc. 11 A) Rodowód czteropokoleniowej rodziny z rozpoznaniem choroby CMT (R88). Strzałka wskazuje probanda, gwiazdkami zaznaczono osoby, w których wykonano badanie sekwencji genu *PMP22*. B) Fragment dzikiej sekwencji genu *PMP22*, C) fragment sekwencji genu *PMP22* ze zmianą c.215C>T.

5.2.2. Wariant sekwencyjny c.353C>T (Thr118Met)

Kolejny zidentyfikowany wariant sekwencyjny c.353C>T skutkuje substytucją treoniny w metioninę w kodonie 118-tym białka PMP22. Wariant ten został zidentyfikowany w dwóch niespokrewnionych rodzinach (R12, R80). W rodzinie R12 z rozpoznaniem CMT1A i stwierdzoną duplikacją genu *PMP22* zmiana w układzie heterozygotycznym została znaleziona u chorego ojca probandki (R12.SE). Zmiany nie zidentyfikowano u chorej (R12.S.A.), (Ryc.12A). Dodatkowo u chorych przeprowadzono badanie sekwencji genu *LITAF*, które wykazało obecność wariantu sekwencyjnego c.234G>A (Thr78Thr) u obojga chorych oraz wariantu c.274A>G (Ile92Val) u chorej R12.S.A.

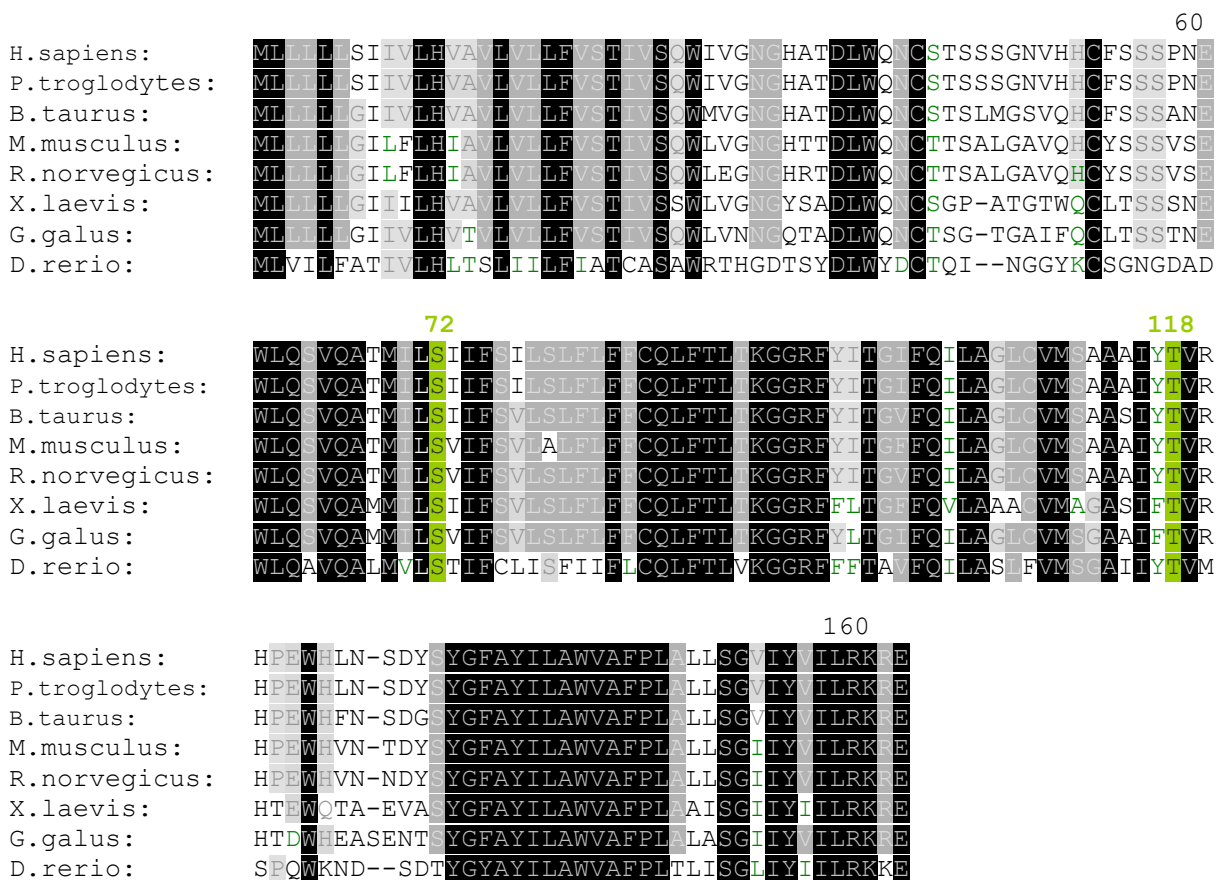
Zmiana Thr118Met została także w układzie heterozygotycznym zidentyfikowana u chorej R80.SO w rodzinie ze sporadycznym przypadkiem CMT. U chorej wcześniej wykluczono duplikację/delecję genu *PMP22* (Ryc. 12B).

Zidentyfikowana zmiana nie występowała w 50-osobowej grupie kontrolnej.



Ryc. 12 A) Rodowód czteropokoleniowej rodziny z rozpoznaniem choroby CMT1A (R12). B) Rodowód trzypokoleniowej rodziny ze sporadycznym przypadkiem choroby CMT1 (R80). Strzałka wskazuje probanda, gwiazdkami zaznaczono osoby, u których wykonano badania molekularne. C) Fragment sekwencji genu *PMP22* ze zmianą c.353C>T, D) fragment dzikiej sekwencji genu *PMP22*.

5.2.3. Konserwowanie międzygatunkowe aminokwasów w białku PMP22.



Ryc. 13 Konserwowanie międzygatunkowe dla aminokwasów białka PMP22. Kolorem zielonym zaznaczono analizowane aminokwasy oraz ich pozycje w białku PMP22.

H.sapiens – człowiek, P.troglodytes – szympan, B.taurus – bydło domowe, M.musculus – mysz domowa, R.norvegicus – szczur wędrowny, X.laevis – żaba szponiasta, G.galus – kurczak, D.rerio – danio przegowany.

Seryna w kodonie 72-gim białka PMP22 oraz treonina w kodonie 118-tym są silnie konserwowane międzygatunkowo

5.2.4. Analiza *in silico* zidentyfikowanych wariantów w genie *PMP22* w kierunku motywów regulujących splicing

Podstawienie nukleotydowe	Zmiana aminokwasowa	Białka SR				
		SF2/ASF	SF2/ASF (IgM-BRCA1)	SC35	SRp	SRp55
c.215C>T	Ser72Leu	↓	↓			
c.353C>T	Thr118Met	↓			↓	↑

Tabela 11 Wyniki analizy *in silico* wariantów sekwencyjnych w genie *PMP22* przeprowadzone w programie *ESEfinder* oraz *Human Splicing Finder*. ↓ – utrata motywu ESE, ↓ spadek efektywności wiązania, ↑ powstanie nowego motywu ESE, ↑ zwiększenie efektywności wiązania.

Analiza potencjalnego wpływu substytucji nukleotydowej c.353C>T na splicing pierwotnego transkryptu *PMP22* przeprowadzona w programie *ESEfinder* oraz w *Human Splicing Finder* ujawniła utratę motywu ESE dla białek SF2/ASF, obniżenie efektywności wiązania z białkiem SRp40 oraz powstanie dodatkowego motywu dla białka SRp55. Analiza przeprowadzona w programie *RESCUE-ESE* wykazała, że tymina w pozycji 353 powoduje powstanie nowego motywu ESE.

Zmiana c.215C>T powoduje natomiast utratę motywu ESE dla białka SF2/ASF oraz SF2/ASF (IgM-BRCA1). Analizy przeprowadzone w programie *RESCUE-ESE* oraz *FAS-ESS* nie wykazały różnic między sekwencją dziką a zmutowaną.

5.3. Warianty sekwencyjne w regionie kodującym genu *LITAF*

Region kodujący genu *LITAF* wraz z flankującymi sekwencjami intronowymi (łącznie długość ok. 650 pz) został przeanalizowany w 106-osobowej grupie chorych z fenotypem CMT1A/HNPP, 15-osobowej grupie chorych, gdzie w rodzinie współistnieje polineuropatia genetycznie uwarunkowana z polineuropatią nabytą (CMT/polineuropatia zapalna). Do tej podgrupy włączono także chorych z rozpoznaniem polineuropatii demielinizacyjnej typu CMT1C. Sekwencję genu *LITAF* zbadano także w 11-osobowej grupie zdrowych członków rodzin oraz w 50-osobowej grupie kontrolnej. W grupie badanej wcześniej wykonano analizę duplikacji/delecji genu *PMP22*.

Analiza sekwencji kodującej genu *LITAF* pozwoliła na identyfikację pięciu wariantów sekwencyjnych tj.: c.234G>A (Thr78Thr), c.274A>G (Ile92Val), c.333C>T (Ala111Ala), c.334G>A (Gly112Ser) oraz c.585C>T (3'UTR) (Tab. 12)

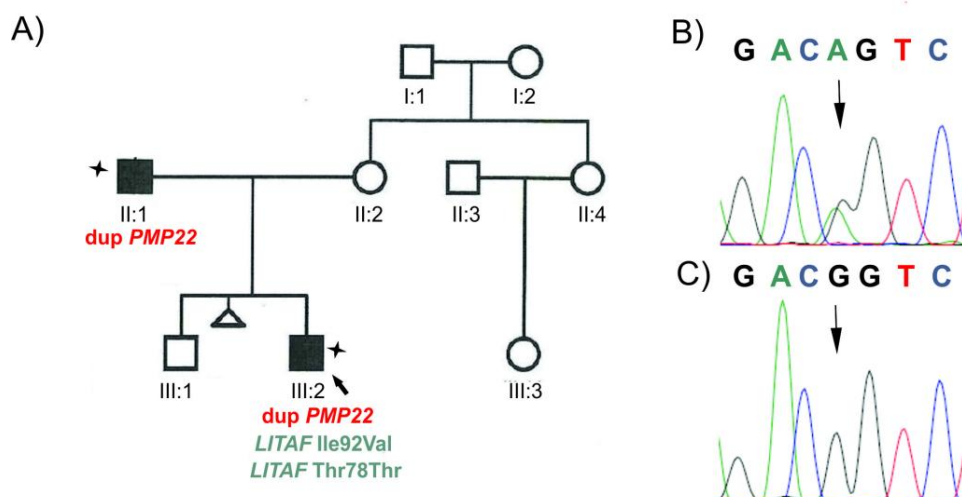
Zmiana nukleotydowa	Zmiana aminokwasowa	Baza SNP	Częstość występowania										
			W grupie badanej								W grupie kontrolnej (n=50/100)		
			CMT1A (n=69)		HNPP (n=37)		CMT/neuropatia zapalna (n=15)		zdrowy (n=11)				
			htz	hz	htz	hz	htz	hz	htz	hz	htz	hz	
c.234G>A	Thr78Thr	rs9282774	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
c.274A>G	Ile92Val	rs4280262	21	13	16	4	4	1	3	0	9	2	
c.333C>T	Ala111Ala	rs34448402	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
c.334G>A	Gly112Ser		0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	
c.585C>T (3'UTR)			1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Tabela 12 Wyniki badań dla sekwencji kodującej genu *LITAF*.

5.3.1. Wariant sekwencyjny c.234 (Thr78Thr)

Wariant sekwencyjny c.234G>A (Thr78Thr) został zidentyfikowany wyłącznie w grupie badanej. Zmiana c.234G>A (Thr78Thr) w heterozygotycznym układzie wystąpiła w rodzinie z rozpoznaniem CMT1A (R12) u dwójki chorych (R12.SE, R12.SA). W rodzinie tej wcześniej zidentyfikowano wariant c.215C>T skutkujący substytucją Thr118Met w białku PMP22 (Ryc.12A).

W układzie homozygotycznym wariant sekwencyjny c.234G>A wystąpił u chorego z CMT1A (R30.CA). Zmiana nie została zidentyfikowana u chorego ojca (R30.CAn). Dodatkowo u chorego z wariantem c.234G>A zidentyfikowano w genie *LITAF* zmianę c.274A>G (Ile92Val) (Ryc. 14).



Ryc. 14 Rodowód trzypokoleniowej rodziny z rozpoznaniem choroby CMT1A (R30). Strzałka wskazuje probandę, gwiazdkami zaznaczono osoby, u których wykonano badania sekwencji genu *PMP22*, *LITAF*. B) Fragment sekwencji genu *LITAF* ze zmianą c.234G>A, C) fragment dzikiej sekwencji genu *LITAF*.

5.3.2. Wariant sekwencyjny c.274 G>A (Ile92Val)

Wariant sekwencyjny c.274A>G w genie *LITAF* skutkuje substytucją izoleucyny w walinę w kodonie 92-gim białka *LITAF*. Zmiana ta została zidentyfikowana u 54 osób w grupie chorych z fenotypem CMT1A/HNPP. Ponadto zmiana Ile92Val wystąpiła u 5 chorych i 3 zdrowych osób w rodzinach, gdzie polineuropatia genetycznie uwarunkowana współwystępuje z przewlekłą polineuropatią zapalną oraz u 11 osób w grupie kontrolnej (Tab. 12). Wariant c.274A>G występował w układzie hetero- i homozygotycznym zarówno u chorych jak i w grupie kontrolnej. Częstość występowania substytucji Ile92Val jest większa w grupie badanej niż kontrolnej.

W przypadku 87 chorych w tym 63 z CMT1A oraz 24 z HNPP dysponowano danymi dotyczącymi wieku wystąpienia pierwszych objawów choroby. Dodatkowo dla 60 chorych w tym 34 z CMT1A oraz 26 z HNPP dysponowano danymi klinicznymi lub przeprowadzono dodatkowe badania uwzględniające parametry zawarte w skali Haberlovej i Seemana oceny polineuropatii Charcot-Marie-Tooth (Tabela VI Supplement).

Chorych do dalszych analiz podzielono na dwie grupy:

1 – chorzy z CMT1A lub HNPP, u których pierwsze objawy choroby wystąpiły po 10-tym roku życia

2 – chorzy z CMT1A lub HNPP, u których pierwsze objawy choroby wystąpiły przed 10-tym rokiem życia.

Następnie wyodrębniono podgrupy:

1a – **HNPP >10rż + Ile92Val** – chorzy z HNPP, u których pierwsze objawy choroby wystąpiły po 10-tym roku życia i u których zidentyfikowano substytucję Ile92Val w białku LITAF,

1b - **HNPP >10rż** - chorzy z HNPP, u których pierwsze objawy choroby wystąpiły po 10-tym roku życia, bez zmiany Ile92Val w białku LITAF,

1c – **CMT1A >10rż + Ile92Val** – chorzy z CMT1A, u których pierwsze objawy choroby wystąpiły po 10-tym roku życia i u których zidentyfikowano substytucję Ile92Val w białku LITAF,

1d - **CMT1A >10rż** – chorzy z CMT1A, u których pierwsze objawy choroby wystąpiły po 10-tym roku życia, bez zmiany Ile92Val w białku LITAF,

2a - **HNPP <10rż + Ile92Val** - chorzy z HNPP, u których pierwsze objawy choroby wystąpiły przed 10-tym rokiem życia i u których zidentyfikowano substytucję Ile92Val w białku LITAF,

2b - **HNPP <10rż** - chorzy z HNPP, u których pierwsze objawy choroby wystąpiły przed 10-tym rokiem życia, bez zmiany Ile92Val w białku LITAF,

2c – **CMT1A <10rż + Ile92Val** - chorzy z CMT1A, u których pierwsze objawy choroby wystąpiły przed 10-tym rokiem życia i u których zidentyfikowano substytucję Ile92Val w białku LITAF,

2d – **CMT1A <10rż** - chorzy z CMT1A, u których pierwsze objawy choroby wystąpiły przed 10-tym rokiem życia, bez zmiany Ile92Val w białku LITAF.

Ze względu na zbyt małą liczbę chorych analizy statystyczne w przypadku parametru jakim był wiek wystąpienia pierwszych objawów choroby nie przeprowadzono w grupie HNPP<10rż +Ile92Val oraz HNPP<10rż.

W przypadku pozostałych badanych parametrów, ze względu na zbyt małą liczbę danych klinicznych, analizie statystycznej poddano następujące grupy chorych: CMT1A>10rż +Ile92Val, CMT1A>10rż, CMT1A<10rż +Ile92Val, oraz CMT1A<10rż.

5.3.3. Analiza średniego wieku wystąpienia pierwszych objawów choroby w badanych grupach.

Badane grupy chorych	Parametry	Wiek wystąpienia pierwszych objawów choroby (lata)	p-value
HNPP>10 rż + I92V	średnia ± SD (n) mediana min-max	18±6 (16) 17.5 11-32	0,023
HNPP>10 rż	średnia ± SD (n) mediana min-max	37±21 (7) 36 14-71	
CMT1A>10 rż + I92V	średnia ± SD (n) mediana min-max	23±10 (15) 20 11-47	0,005
CMT1A>10 rż	średnia ± SD (n) mediana min-max	36±14 (30) 35.5 13-67	
CMT1A<10 rż + I92V	średnia ± SD (n) mediana min-max	4.8±3.2 (11) 4 1.3-10	0.963
CMT1A<10 rż	średnia ± SD (n) mediana min-max	5.4±4.4 (7) 3 1.5-10	

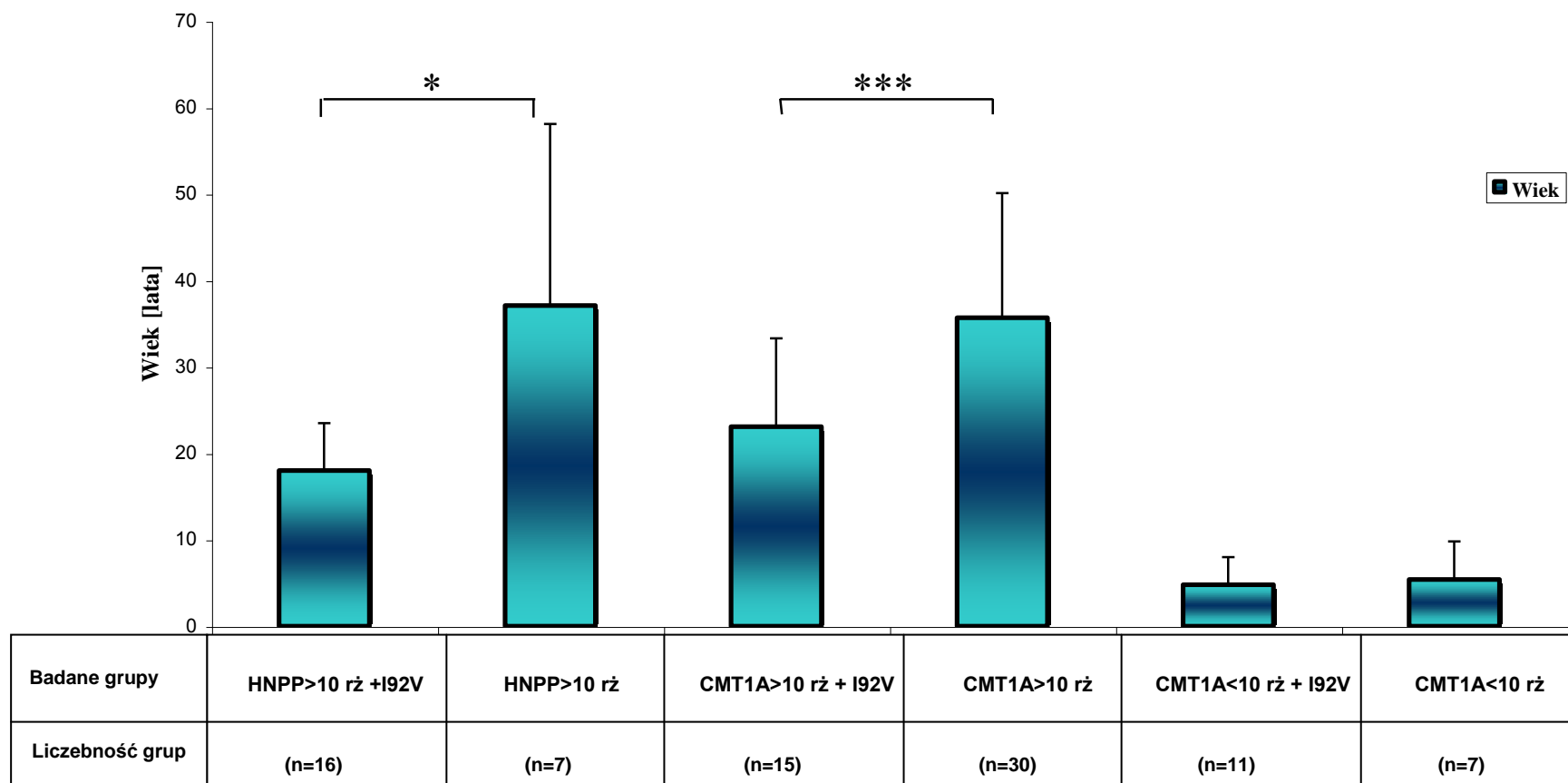
Tabela 13 Zależność między genotypem a wiekiem wystąpienia pierwszych objawów choroby w badanych grupach chorych.

W grupie chorych z HNPP z początkiem choroby po 10-tym roku życia wykazano, że wariant sekwencyjny c.234 G>A (Ile92Val) w genie *LITAF* wpływa na wcześniejszy wiek wystąpienia pierwszych objawów dziedzicznej neuropatii z nadwrażliwością na ucisk. Obserwowane różnice między grupą chorych HNPP>10rż + Ile92Val a grupą HNPP>10rż są istotne statystycznie ($p<0,05$).

W grupie chorych z CMT1A oraz początkiem choroby po 10-tym roku życia również wykazano, że wariant sekwencyjny c.234 G>A (Ile92Val) w genie *LITAF* wpływa na wcześniejszy wiek wystąpienia pierwszych objawów choroby Charcot-Marie-Tooth 1A. Obserwowane różnice między grupą chorych CMT1A>10rż + Ile92Val a grupą CMT1 >10rż są istotne statystycznie ($p<0,05$).

W przypadku chorych z CMT1A i początkiem choroby przed 10-tym rokiem życia nie wykazano wpływu zmiany c.234 G>A (Ile92Val) w genie *LITAF* na wiek wystąpienia pierwszych objawów choroby.

Średni wiek wystąpienia pierwszych objawów choroby CMT1A/HNPP

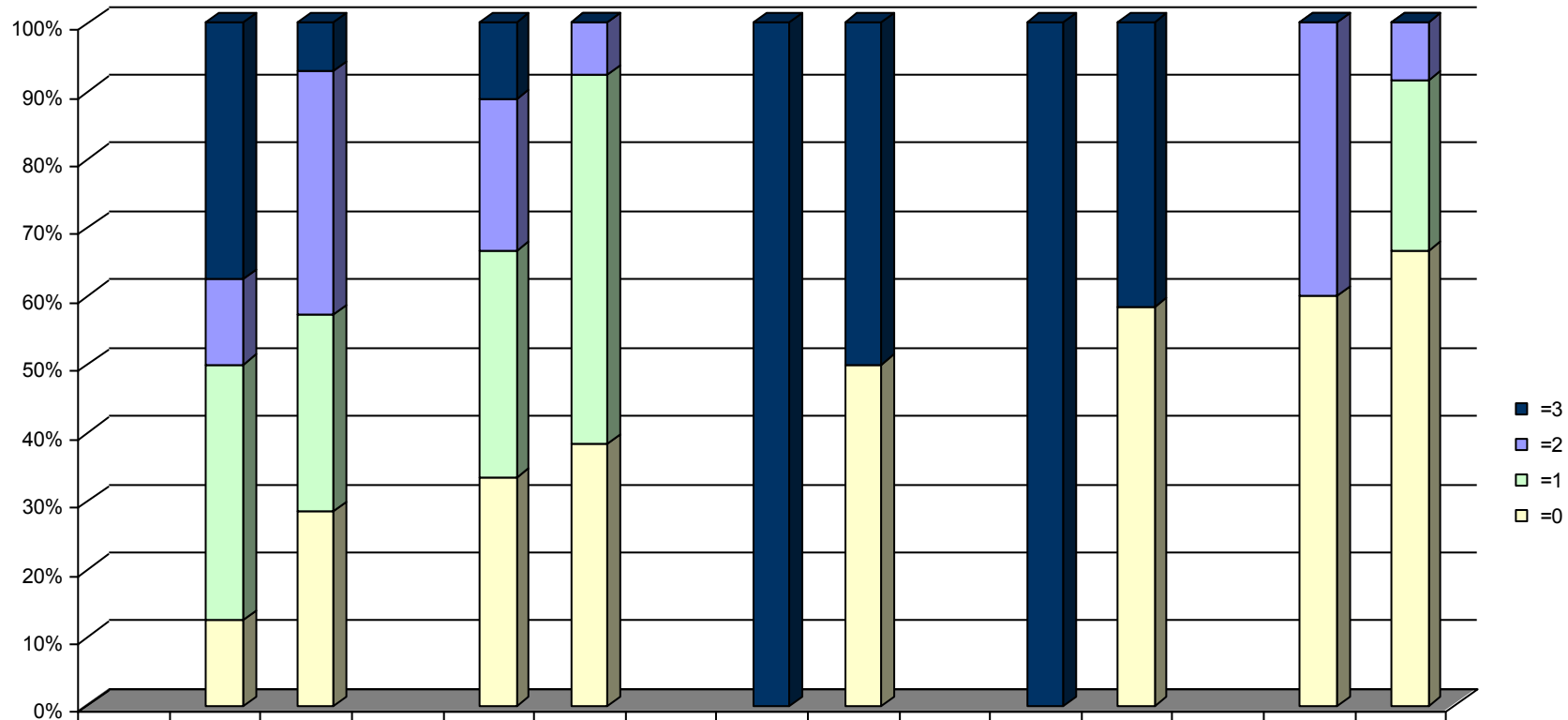


Wykres 1 Średni wiek [±SD] wystąpienia pierwszych objawów choroby w badanych grupach chorych.

5.3.4. Analiza parametrów klinicznych w grupie chorych z CMT1A z początkiem choroby po 10-tym roku życia

Analiza statystyczna parametrów klinicznych ocenianych wg zmodyfikowanej skali Haberlovej i Seemana w grupie chorych z CMT1A z początkiem choroby powyżej 10 roku życia wykazała pogorszenie takich parametrów klinicznych jak: niedowład kończyn dolnych, deformacja stóp, odruchy ze ścięgien Achillesa oraz odruchy kolanowe, jak również niedowład kończyn górnych w grupie chorych ze zmianą Ile92Val w białku LITAF (Wykres 2).

Analiza parametrów klinicznych chorych z CMT1A > 10rż



Parametry	nkkd		deformacja stóp		OK		OA		nkgg	
Badane grupy	CMT1A>10rż +I92V	CMT1A>10rż	CMT1A>10rż +I92V	CMT1A>10rż	CMT1A>10rż +I92V	CMT1A>10rż	CMT1A>10rż +I92V	CMT1A>10rż +I92V	CMT1A>10rż	CMT1A>10rż +I92V
Liczebność grup	(n=8)	(n=14)	(n=9)	(n=13)	(n=8)	(n=12)	(n=7)	(n=12)	(n=6)	(n=12)

Wykres 2 Porównanie parametrów klinicznych chorych z CMT1A z początkiem choroby po 10-tym roku życia z/bez zmiany Ile92Val w białku LITAF. nkkd – niedowład kończyn dolnych, OK. – odruch kolanowy, OA – odruch ze ścięgna Achillesa, nkgg – niedowład kończyn górnych.

W grupie chorych z CMT1A>10rż + Ile92Val obserwuje się większy odsetek chorych (37%) ze znacznym (w skali Haberlovej i Seemana = 3) niedowładem kończyn dolnych, który w grupie CMT1A>10rż wystąpił tylko u 7% chorych. Dodatkowo w grupie chorych ze zmianą Ile92Val obserwuje się grupę chorych ze silnie zdeformowanymi stopami (korekta ortopedyczna) (11%), jak również większy jest odsetek chorych ze znacznym wydrążeniem stóp (w skali Haberlovej i Seemana =2). W obu porównywanych grupach odsetek chorych, u których nie stwierdzono deformacji stóp jest zbliżony (ok. 36%).

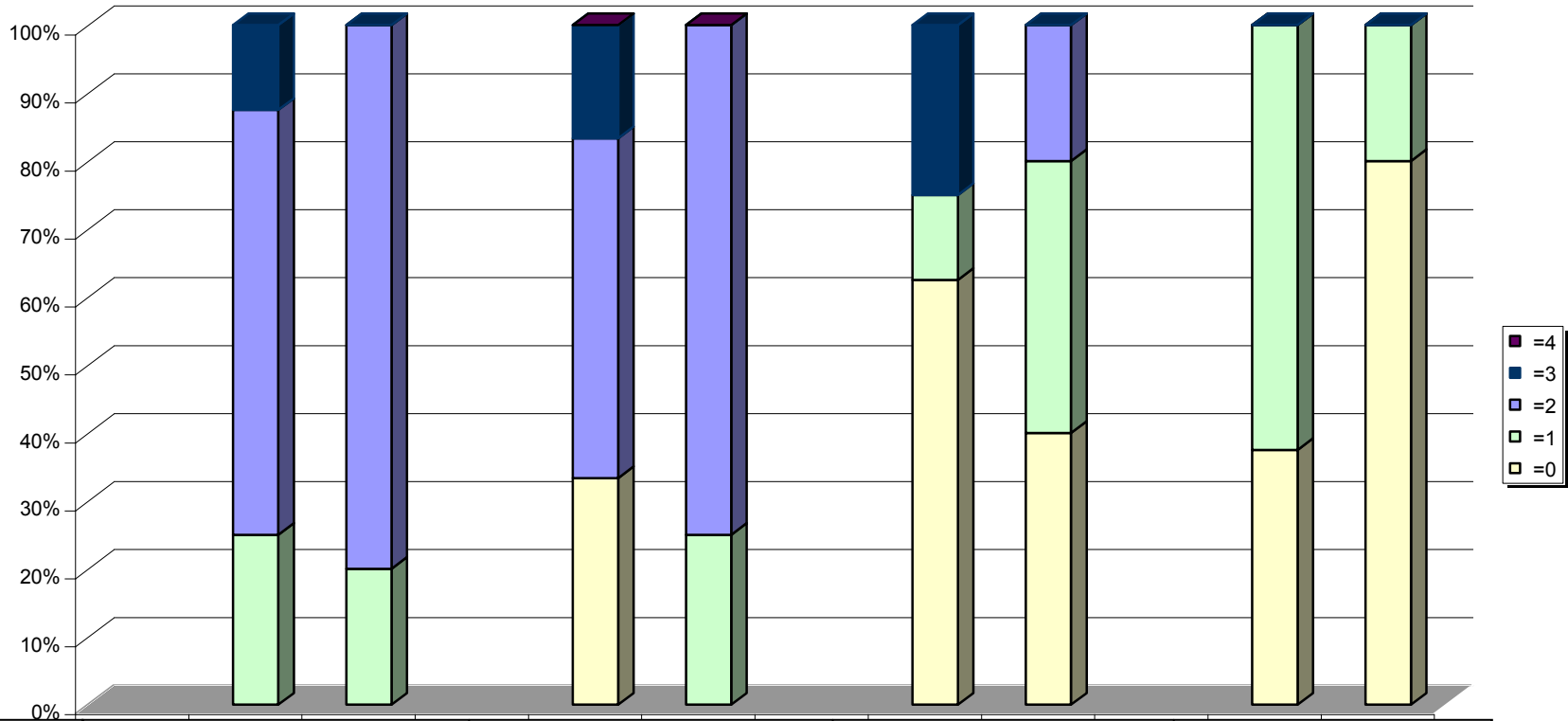
Ponadto u wszystkich chorych w grupie CMT1A>10rż + Ile92Val stwierdzono zniesienie odruchów ze ścięgien Achillesa oraz zniesienie odruchów kolanowych w przeciwieństwie do grupy CMT>10rż, w której odruchy zostały zachowane odpowiednio u 50% i 50% chorych. Obserwowane różnice są znamienne statystycznie (OA, $p=0,0168$; OK, $p=0,011$).

W grupie chorych CMT1A>10rż + Ile92Val obserwuje się także większy niedowład kończyn górnych (nkg = 2, 40% chorych). W tej samej grupie nie obserwuje się niedowładu na poziomie =1, który jest obecny w grupie chorych CMT1A>10rż (25%). Odsetek chorych, u których nie stwierdzono niedowładu w kończynach górnych jest zbliżony w obu grupach (60-67%).

5.3.5. Analiza parametrów klinicznych w grupie chorych z CMT1A z początkiem choroby poniżej 10 roku życia

Analiza statystyczna parametrów klinicznych ocenianych wg zmodyfikowanej skali Haberlovej i Seemana w grupie chorych z CMT1A z początkiem choroby poniżej 10 roku życia wykazała pogorszenie takich parametrów klinicznych jak: niedowład kończyn dolnych, CMAP, skolioza, jak również niedowład kończyn górnych w grupie chorych ze zmianą Ile92Val w białku LITAF (Wykres 3).

Analiza parametrów klinicznych chorych z CMT1A < 10rż



Parametry	nkkd		CMAP		skolioza		nkkg	
Badane grupy	CMT1A<10rż +I92V	CMT1A<10rż	CMT1A<10rż +I92V	CMT1A<10rż	CMT1A<10rż +I92V	CMT1A<10rż	CMT1A<10rż +I92V	CMT1A<10rż +I92V
Liczebność grup	(n=8)	(n=14)	(n=9)	(n=13)	(n=8)	(n=12)	(n=7)	(n=12)

Wykres 3 Porównanie parametrów klinicznych chorych z CMT1A z początkiem choroby przed 10-tym rokiem życia z/bez zmiany Ile92Val w białku LITAF. nkkd – niedowład kończyn dolnych, CMAP - złożony potencjał czynnościowy rejestrowany z mięśnia po stymulacji elektrycznej włókien ruchowych nerwu, nkkg – niedowład kończyn górnych.

W grupie chorych CMT1A<10rż + Ile92Val obserwuje się odsetek chorych z ciężkim niedowładem kończyn dolnych (13%). Odsetek chorych z niedowładem kończyn dolnych w przyjętej skali Haberlovej i Seemana =1 jest zbliżony w obu badanych grupach (20-25%). W grupie chorych ze zmianą Ile92Val obserwujemy także odsetek chorych (17%), u których CMAP w skali Haberlovej wynosi 3. Natomiast w przypadku grupy CMT1A<10rż odnotowuje się większą liczbę chorych z CMAP w skali Haberlovej i Seemana równym 1 (25%) oraz 2 (75%), jak również nie obserwuje się grupy chorych, w której nie odnotowano zmian w CMAP.

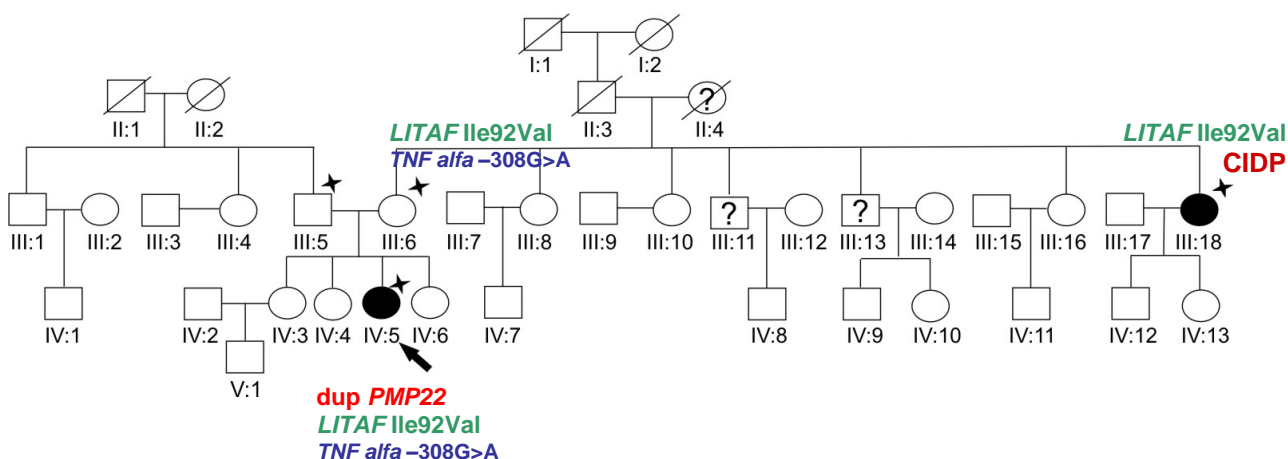
Dodatkowo w grupie CMT1A<10rż + Ile92Val obserwujemy pewny odsetek chorych (25%), u których skolioza w skali Haberlovej i Seemana =3, która w tym stopniu nie występuje w grupie CMT1A<10rż. Natomiast w grupie CMT1A<10rż większy jest odsetek chorych z łagodną (40%) i średnio nasiloną skoliozą (20%) w skali Haberlovej i Seemana odpowiednio =1 i =2.

W grupie chorych CMT1A<10rż +Ile92Val obserwuje się także większy odsetek (62%) chorych z niedowładem kończyn górnych w porównaniu do grupy CMT1A<10rż, w której u większości chorych nie odnotowano niedowładów.

5.3.6. Wariant sekwencyjny c.274A>G (Ile92Val) w grupie chorych CMT/polineuropatia zapalna

Substytucja Ile92Val została także zidentyfikowana w 15-osobowej grupie chorych, gdzie w rodzinie polineuropatia genetycznie uwarunkowana współistnieje z polineuropatią nabytą (zapalną). U wszystkich chorych w tej grupie przeprowadzono także analizę sekwencji promotorowej genu *TNF alfa*.

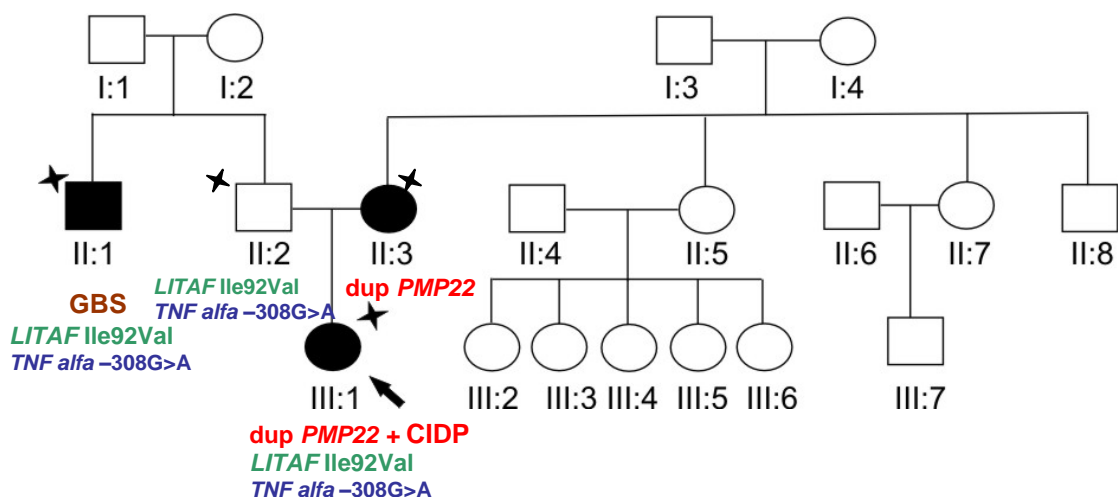
W rodzinie z rozpoznaniem CMT1A (R50) oraz współistniejącą w rodzinie przewlekłą polineuropatią zapalną – CIDP zmiana Ile92Val została znaleziona u chorej probandki (IV:5, R50.WA), jej zdrowej matki (III:6) oraz u chorej z CIDP (III:18, R50.RE). Dodatkowo analiza sekwencji promotorowej genu *TNF alfa* pozwoliła na identyfikację substytucji –308G>A w/w członków rodziny (Ryc.15).



Ryc. 15 Rodzowód pięciopokoleniowej rodziny z rozpoznaniem CMT1A (IV:5) oraz CIDP (III:18). Strzałka wskazuje probanda, gwiazdkami zaznaczono osoby, u których wykonano badanie sekwencji genu *PMP22*, *LITAF* oraz promotora genu *TNF alfa*.

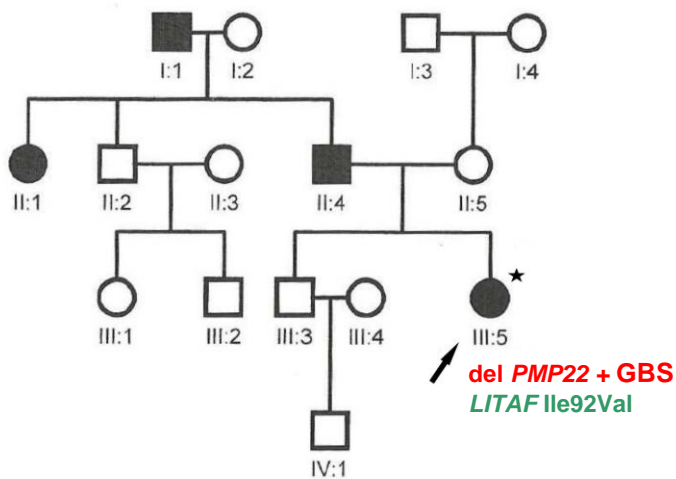
W rodzinie R51 z rozpoznaniem CMT1A oraz współistniejącą w rodzinie nabytą polineuropatią zapalną (CIDP, GBS) zmiana Ile92Val w genie *LITAF* została wykryta u chorej probandki (III:1, R51.RA) oraz u jej wuja (II:1, R51.RT), który przeżył zespół Guillain-Barré.

Dodatkowo analiza sekwencji promotorowej genu *TNF alfa* pozwoliła na identyfikację substytucji –308G>A u dwójki w/w członków rodziny (Ryc. 16).



Ryc. 16 Rodowód trzypokoleniowej rodziny z rozpoznaniem CMT1A + CIDP (III:1), CMT1A (II:3) oraz zespołem Guillain-Barré (II:1). Strzałka wskazuje probanda, gwiazdkami zaznaczono osoby, u których wykonano badanie sekwencji genu *PMP22*, *LITAF* oraz promotora genu *TNF alfa*.

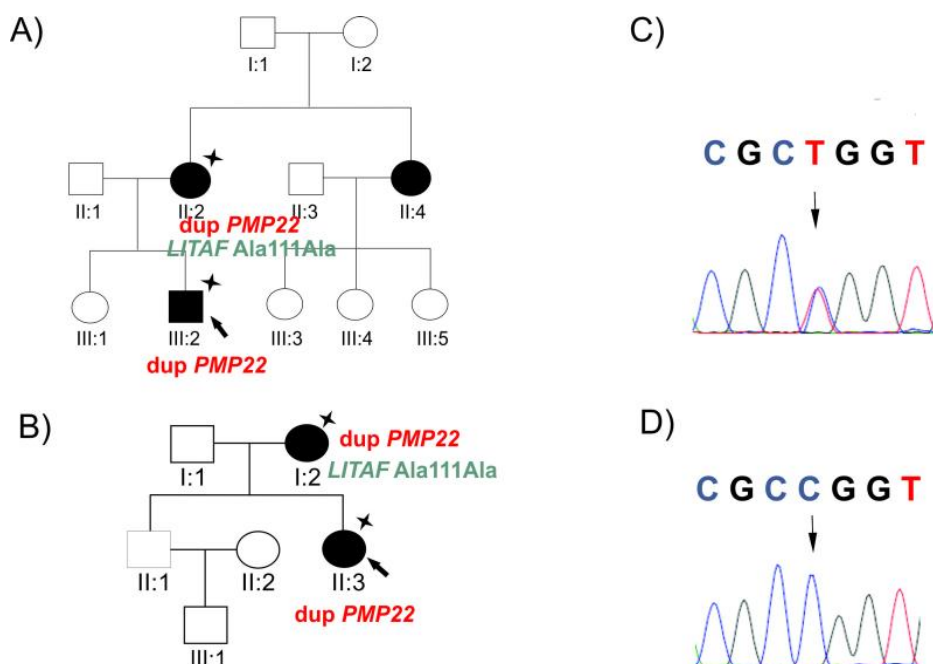
Substytucja Ile92Val została także zidentyfikowana u chorej z rozpoznaniem choroby HNPP oraz zespołu Guillain-Barré (III:5, R.97.CK) (Ryc.17). Analiza sekwencji promotorowej genu *TNF alfa* nie wykazała u chorej obecności wariantu sekwencyjnego -308G>A.



Ryc. 17 Rodowód czteropokoleniowej rodziny z rozpoznaniem HNPP oraz zespołem Guillain-Barré (III:5). Strzałka wskazuje probanda, gwiazdkami zaznaczono osoby, u których wykonano badanie sekwencji genu *PMP22*, *LITAF* oraz promotora genu *TNF alfa*.

5.3.7. Wariant sekwencyjny c.333C>T (Ala111Ala)

Wariant sekwencyjny c.333C>T (Ala111Ala) w genie *LITAF* w heterozygotycznym układzie został zidentyfikowany u dwóch niespokrewnionych chorych (R2.DE, R4.HA) z rozpoznaniem CMT1A oraz potwierdzoną duplikacją genu *PMP22*. Zmiana nie segregowała z fenotypem choroby (Ryc. 18). Podobnie jak substytucja c.234G>A (Thr78Thr) wariant c.333C>T jest zmianą synonimiczną.



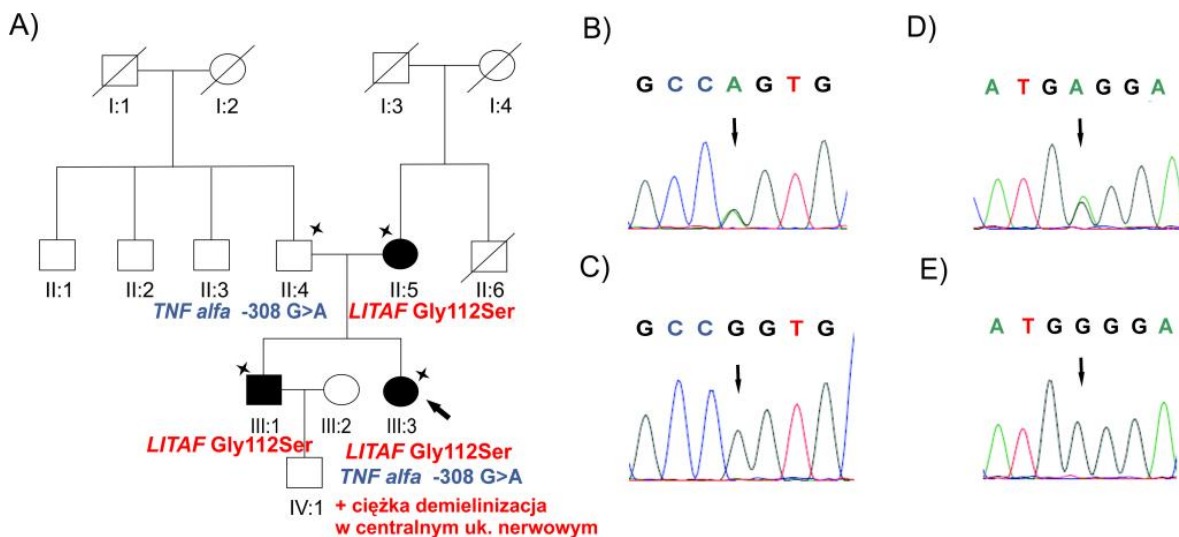
Ryc. 18 A), B) Rodowody trzypokoleniowych rodzin z rozpoznaniem choroby CMT1A (R2, R4). Strzałka wskazuje probandę, gwiazdkami zaznaczono osoby, u których wykonano badanie sekwencji genu *PMP22* i *LITAF*. C) Fragment sekwencji genu *LITAF* ze zmianą c.333C>T, D) fragment dzikiej sekwencji genu *LITAF*.

5.3.8. Wariant sekwencyjny c.334 G>A (Gly112Ser)

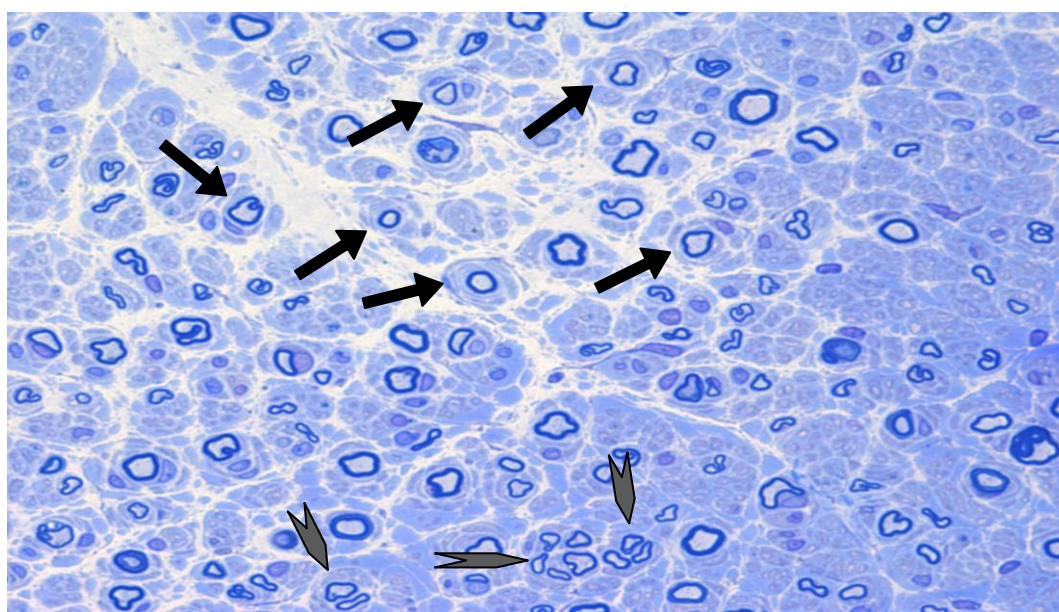
Analiza sekwencji kodującej genu *LITAF* pozwoliła na identyfikację w układzie heterozygotycznym jednego wariantu sekwencyjnego c.334G>A (Gly112Ser) u trzech spokrewnionych chorych.

Zmiana guaniny w adeninę w pozycji 334 skutkująca substytucją glicyny w serynę w kodonie 112-gim białka *LITAF* jest mutacją patogenną. Mutacja Gly112Ser odpowiada za łagodną polineuropatię demielinizacyjną. Wariant sekwencyjny c.334G>A został zidentyfikowany w rodzinie z rozpoznaniem choroby CMT1C (R72) u trzech jej chorych członków (R72.SA., R72.SJ, R72.SF). Ponadto u chorej probandki stwierdzono ciężką postać

demielinizacji w centralnym układzie nerwowym. Przeprowadzone badania sekwencji promotorowej genu *TNF alfa* pozwoliły na zidentyfikowanie u chorej oraz jej ojca wariantu sekwencyjnego -308G>A w heterozygotycznym układzie (Ryc.19).



Ryc. 19 A) Rodowód czteropokoleniowej rodziny z rozpoznaniem choroby CMT1C (R72) oraz ciężką formą demielinizacji w centralnym układzie nerwowym (III:3, R72.SA). Strzałka wskazuje probanda, gwiazdkami zaznaczono osoby, u których wykonano badanie sekwencji genu *LITAF* promotoru genu *TNF alfa*. B) Fragment sekwencji genu *LITAF* ze zmianą c.334 G>A, C) fragment dzikiej sekwencji genu *LITAF*. D) Fragment sekwencji promotorowej genu *TNF alfa* ze zmianą -308G>A, fragment dzikiej sekwencji genu *TNF alfa*.

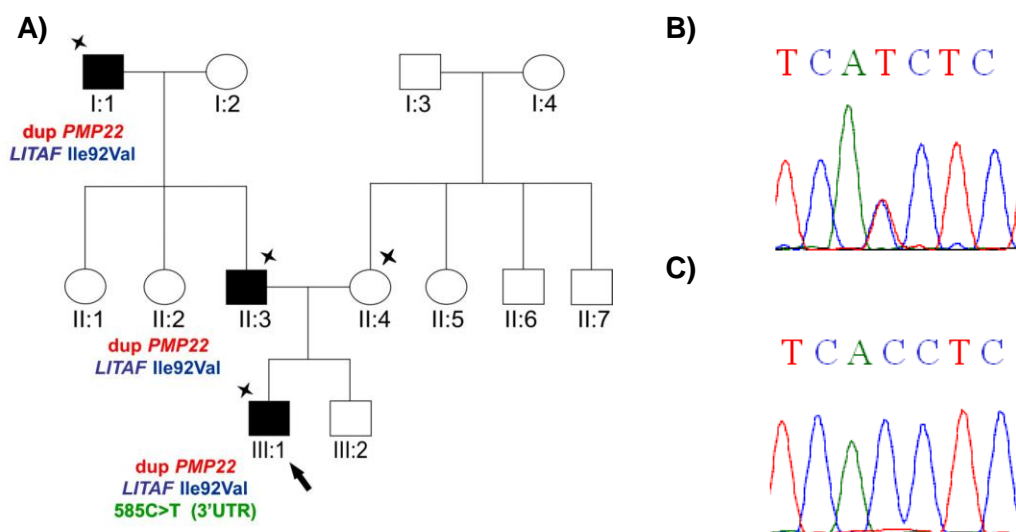


Ryc. 20 Biopsja nerwu łydkowego chorej III:3, R72.SA. ➔ wskazuje różnej wielkości struktury cebulopodobne. ➞ wskazuje nieliczne włókna regenerujące.

5.3.9. Wariant sekwencyjny c.585C>T (3'UTR)

Wariant sekwencyjny c.585C>T (3'UTR) w heterozygotycznym układzie został zidentyfikowany u jednego chorego (III:1, R23.TS) w rodzinie z rozpoznaniem choroby CMT1A. Wariant ten nie wystąpił u pozostałych chorych i zdrowych członków rodziny jak również nie wystąpił w 50-osobowej grupie kontrolnej.

Dodatkowo u wszystkich chorych w rodzinie R23 w sekwencji genu *LITAF* zidentyfikowano wariant SNP skutkujący substytucją Ile92Val (Ryc. 21).



Ryc. 21 A) Rodzowód trypokoleniowej rodziny z rozpoznaniem choroby CMT1A (R23). Strzałka wskazuje probanda, gwiazdkami zaznaczono osoby, u których wykonano badanie sekwencji genu *PMP22* oraz *LITAF*. B) Fragment sekwencji genu *LITAF* ze zmianą c.585C>T, C) fragment dzikiej sekwencji genu *LITAF*.

5.3.11 Analiza *in silico* zidentyfikowanych wariantów w genie *LITAF* w kierunku motywów regulujących splicing

Podstawienie nukleotydowe	Zmiana aminokwasowa	Białka SR				
		SF2/ASF	SF2/ASF (IgM-BRCA1)	SC35	SRp40	SRp55
c.234G>A	Thr78Thr	↓	↓			
c.274A>G	Ile92Val	↑		↓↑		↑
c.333C>T	Ala111Ala	↓	↓	↓		
c.334G>A	Gly112Ser	↓		↓		
c.585C>T	-	↓			↑↓	

Tabela 14 Wyniki analizy *in silico* wariantów sekwencyjnych w genie *LITAF* przeprowadzone w programie *ESEfinder* oraz *Human Splicing Finder*. ↓ – utrata motywu ESE, ↓ – spadek efektywności wiązania, ↑ powstanie nowego motywu ESE, ↑ zwiększenie efektywności wiązania.

Substytucja nukleotydowa c.234G>A nie zmienia sensu kodonu 78-go białka *LITAF* jednak analiza jej ewentualnego wpływu na splicing pre-mRNA wykazała utratę motywu ESE dla białka SC35 oraz SF2/ASF (IgM-BRCA1) oraz spadek efektywności wiązania z białkiem SF2/ASF.

Analiza *in silico* wpływu zmiany c.274A>G na splicing pierwotnego transkryptu *LITAF* ujawniła powstanie motywu ESE dla białek SF2/ASF i SRp55 oraz zwiększenie efektywności wiązania z białkiem SC35.

Wariant sekwencyjny c.333C>T podobnie jak c.234G>A nie zmienia sensu kodonu 111-tego jednakże analiza *in silico* wykazała utratę motywu ESE dla białka SC35 oraz SF2/ASF (IgM-BRCA1) oraz spadek efektywności wiązania z białkiem SF2/ASF.

Substytucja nukleotydowa c.334G>A, będąca mutacją patogenną powoduje utratę motywu ESE dla białka SC35 oraz SRp40 jak również zmniejszenie efektywności wiązania z białkiem SF2/ASF.

W przypadku zmiany c.585C>T analiza *in silico* wykazała utratę motywu ESE dla białka SF2/ASF oraz SRp40 oraz zwiększenie efektywności wiązania innego motywu ESE z białkiem SRp40.

Analiza w programie *NNsplice* wszystkich zidentyfikowanych wariantów w genie *LITAF* nie wykazała ich ewentualnego wpływu na proces składania pre-mRNA podobnie jak analiza w programie *FAS-ESS*. Natomiast analiza w programie *RESCUE-ESE* wykazała dla wariantu sekwencyjnego c.274A>G oraz c.585C>T utratę motywu wzmacniającego splicing.

5.4. Warianty sekwencyjne w promotorze genu *TNF alfa*

Zmiana nukleotydowa	Baza SNP	Częstość występowania									
		W grupie badanej								W grupie kontrolnej (n=50)	
		CMT1A (n=45)		HNPP (n=21)		CMT/neuropatia zapalna (n=13)		zdrowy (n=11)			
		htz	hz	htz	hz	htz	hz	htz	hz	htz	hz
-308G>A	rs1800629	13	1	5	0	5	0	3	0	14	2

Tabela 15 Wyniki badań dla sekwencji promotorowej genu *TNF alfa*.

Wariant sekwencyjny -308G>A został zidentyfikowany zarówno w grupie badanej jak i grupie kontrolnej. Wystąpił on ze zbliżoną częstością zarówno w grupie badanej jak i kontrolnej, odpowiednio 0,30 i 0,32. Uzyskane wyniki są podobne z danymi z bazy dbSNP NCBI (rs1800629) – 0,31.

5.5 PODSUMOWANIE WYNIKÓW

- Wyniki przeprowadzonych badań sekwencji regulatorowej genu *PMP22* wskazują, że jest ona silnie konserwowana, a jej regulacja precyzyjnie kontrolowana. Sekwencja regulatorowa genu *PMP22* jest najprawdopodobniej pozbawiona istotnych dla regulacji ekspresji genu wariantów sekwencyjnych.
- W sekwencji kodującej genu *PMP22* zidentyfikowano dwa warianty sekwencyjne, które w mechanizmie dawki genu lub innym nieznanym procesie wpływają na przebieg choroby CMT1A.
- W sekwencji kodującej genu *LITAF* zidentyfikowano 6 wariantów sekwencyjnych. Szczególną uwagę zwraca istotna statystycznie korelacja między wiekiem wystąpienia pierwszych objawów choroby CMT1A/HNPP, a obecnością substytucji Ile92Val. Sugeruje to, że wariant sekwencyjny c.274A>G (Ile92Val) w genie *LITAF* może stanowić modyfikator genetyczny zmienności fenotypowej CMT1A/HNPP. Wariant Ile92Val prawdopodobnie pełni także ważną rolę w modyfikacji przebiegu klinicznego u chorych z CMT1A i komponentem zapalnym.
- W sekwencji promotorowej trzeciego badanego genu - *TNF alfa* nie stwierdzono wariantów sekwencyjnych istotnych dla przebiegu choroby CMT1A/HNPP. Wydaje się, że pomimo związku związku pomiędzy genami *LITAF* i *TNF alfa*, sekwencja promotorowa genu *TNF alfa* nie odgrywa istotnej roli w modyfikacji fenotypu chorób CMT1A/HNPP.

6. DYSKUSJA

Już w pierwszych XIX-wiecznych pracach J. M. Charcota, P. Marie oraz H. H. Tootha zwrócono uwagę na zmienność przebiegu klinicznego polineuropatii rodzinnych. W wieku XX również Jule Déjerine i Sottas oraz Gustave Roussy i Emmanuel Levy wskazywali na zmienność fenotypową chorych z tym samym rozpoznaniem klinicznym. Wprowadzenie badań molekularnych do diagnostyki chorób kręgu CMT, w tym identyfikacja pierwszych mutacji sprawczych – duplikacji/delecji regionu 17p12.2-p12, pozwoliła jedynie na weryfikację rozpoznania klinicznego, odpowiednio choroby CMT1A bądź HNPP. Wynik badania genetycznego w CMT1A/HNPP dla chorych nie stanowi jednak nadal wartości rokowniczej. Do dziś pytania o wiek wystąpienia pierwszych objawów choroby, jej przebieg nastrożają wiele trudności klinicytom. Trudności diagnostyczne zwiększa także obserwowane zjawisko bezobjawowego nosicielstwa duplikacji bądź delecji genu *PMP22*. Nieznane są także mechanizmy zjawiska antycypacji obserwowane wśród chorych z CMT1A. Dodatkowo spektrum fenotypowe poszerzają chorzy, u których obok polineuropatii genetycznie uwarunkowanej współwystępuje nabyta polineuropatia zapalna.

Dotychczas zidentyfikowano mutacje w 14 genach, które skutkują fenotypem choroby CMT1. Wprowadzenie nowych technik, takich jak sekwencjonowanie eksomu pozwala na jednoczesne zbadanie wielu genów, ale ogranicza się głównie do badania sekwencji kodujących nie uwzględniając regionów 5'UTR i 3'UTR. Dodatkowo bardzo wysokie koszty takich analiz zmuszają do prowadzenia badań nad tłem zmienności fenotypowej ograniczając je do genów biorących udział w patomechanizmie choroby oraz genów funkcjonalnie z nimi związanych. Niezwykle trudne jest również wyłonienie modyfikatora genetycznego spośród setek wariantów sekwencji wykrytych metodą sekwencjonowania eksomu.

Celem pracy była próba określenia udziału czynnika genetycznego w zmienności fenotypowej chorób kręgu CMT. Podjęto próbę identyfikacji modyfikatora zmienności fenotypowej wśród chorych z CMT1A oraz HNPP, który mógłby być biomarkerem mającym wartość rokowniczą. W tym celu w pierwszym etapie badań przeprowadzono analizę sekwencji promotorowej i regulatorowej genu *PMP22*. Potencjalne zmiany w tych regionach mogłyby wpływać na regulację transkrypcji genu, a tym samym modulować efekt dawki genu *PMP22*.

Kolejnym etapem badań była analiza sekwencji kodującej genu *PMP22* przeprowadzona, podobnie jak analiza promotora i regulatora genu *PMP22*, po raz pierwszy w grupie chorych CMT1A/HNPP, u których potwierdzono duplikację/delecję genu *PMP22*.

Dodatkowo sekwencję kodującą zbadano w grupie chorych z CMT1, u których wykluczono duplikację bądź delecję genu *PMP22*. Niezwykle ważnym etapem pracy była analiza genów funkcjonalnie związanych z genem *PMP22*.

Do dalszych badań wybrano gen *LITAF*, którego udział w patomechanizmie chorób CMT1A/HNPP dotychczas nie został jasno określony oraz gen *TNF alfa*, funkcjonalnie związany z genem *LITAF*. Modulujący wpływ genu *LITAF* badano przede wszystkim wśród chorych, gdzie w rodzinie współistnieje polineuropatia genetycznie uwarunkowana z nabytą polineuropatią zapalną, ale również sprawdzono częstość jego występowania w grupie chorych CMT1A/HNPP.

6.1 Warianty sekwencyjne w regionie regulatorowym genu *PMP22*

Gen *PMP22* jest genem wrażliwym na dawkę. Zwiększenie ekspresji tylko genu *PMP22* w regionie 17p12.2-p12, który ulega duplikacji skutkuje fenotypem choroby Charcot-Marie-Tooth typu 1A. Delecja tego samego regionu, a tym samym obniżenie o połowę ilości transkryptu *PMP22* skutkuje fenotypem dziedzicznej neuropatii z nadwrażliwością na ucisk. Efekt dawki genu *PMP22* wskazuje na precyzyjnie kontrolowaną transkrypcję genu. Kluczową rolę w regulacji transkrypcji genu *PMP22* odgrywa promotor rdzeniowy (proksymalny), w przypadku genu *PMP22* jest to obszar eksonu 1A, dodatkowo w jego regulację zaangażowane są sekwencje regulatorowe tzw. wzmacniacze (enhancery) położone w znacznej odległości od genu.

W pierwszym etapie badań, w którym analizą objęto region promotora proksymalnego (promotor 1), promotora dystalnego (2 kpz powyżej eksonu 1A) oraz region promotora 2 zidentyfikowano jeden wariant SNP (-819C>T). Poszerzenie badań do 5kpz sekwencji regulatorowej zaowocowało identyfikacją kolejnych czterech wariantów (-4210T>C, -4759T>A, -4785G>T, -4800C>T).

6.1.1 Niepatogenne warianty w sekwencji regulatorowej genu *PMP22*

Dwa ze zidentyfikowanych wariantów -819C>T (rs231014), -4785G>T (rs179521) należą do grupy polimorfizmów, których częstość występowania w grupie badanej i kontrolnej była podobna i zbliżona do danych z bazy dbSNP. Ze względu na wysoką częstość występowania i podobne wyniki uzyskane dla grupy badanej i kontrolnej należy wykluczyć modulujący wpływ wariantów -819C>T oraz -4785G>T na zmienność fenotypową chorych CMT1A/HNPP.

6.1.2 Potencjalnie patogenne warianty w sekwencji regulatorowej genu *PMP22*

Dwa ze zidentyfikowanych wariantów sekwencyjnych wystąpiły wyłącznie w grupie chorych.

Wariant -4210T>C wystąpił u chorej ze sporadycznym przypadkiem dziedzicznej neuropatii z nadwrażliwością na ucisk (potwierdzoną delecją genu *PMP22*) i rodzinnym niedosłuchem. Zidentyfikowany przypadek jest atypowy. Chora do 70 roku życia nie przejawiała żadnych objawów polineuropatii, pierwsze objawy zostały wywołane podczas rehabilitacji (ucisk na nadgarstek). Stwierdzono u niej nieznaczne zaburzenia czucia dotyku, bólu, zaburzenia czucia wibracji. Nie odnotowano zmian w CMAP i SNAP (Tabela 8). Dodatkowo u chorej oraz w jej rodzinie stwierdzono niedosłuch.

W pewnych formach CMT niedosłuch jest stałą wadą współtowarzyszącą polineuropatii. W genie *MPZ* czy *Cx32* zidentyfikowano mutacje skutkujące fenotypem polineuropatii, którym towarzyszy niedosłuch (Kabzińska i wsp. 2007, Seeman i wsp. 2004, Karadima i wsp. 2004, Casanovas i wsp. 2006). W genie *PMP22* dotychczas zidentyfikowano 9 mutacji skutkujących fenotypem choroby CMT, której współtowarzyszy niedosłuch, w tym mutację Ser112Arg w populacji polskiej (Kabzińska i wsp. 2010). Ze względu na brak dostępności do próbek DNA od pozostałych członków rodziny chorej (odmowa współpracy) i brak możliwości prześledzenia segregacji zmiany nie można jednoznacznie stwierdzić, czy niedosłuch występujący u chorej współtowarzyszy zidentyfikowanej zmianie w sekwencji regulatorowej genu *PMP22*.

Zidentyfikowany wariant sekwencyjny -4210T>C może odpowiadać za późniejsze wystąpienie objawów i wcześniejszy bezobjawowy przebieg choroby. Jednakże brak danych o innych członkach rodziny uniemożliwia analizę ewentualnej segregacji zmiany z chorobą. Ze względu na bardzo niski poziom ekspresji genu *PMP22* w leukocytach krwi obwodowej w celu potwierdzenia modulującego wpływu wariantu SNP należałoby wykonać biopsję nerwu łydkowego, aby dokonać analizy ekspresji mRNA genu *PMP22*.

Kolejne dwa warianty sekwencyjne -4759T>A oraz -4800C>T zostały zidentyfikowane u dwojga chorych (R17.KM, R17.KE) z rozpoznaniem dziedzicznej neuropatii z nadwrażliwością na ucisk. Warianty te nie wystąpiły u chorego ojca, który do 4 dekady życia pozostawał bezobjawowy. U dwójki chorych dzieci pierwsze objawy choroby wystąpiły ok. 10 roku życia (dane kliniczne – Tabela 8). Zidentyfikowane warianty mogłyby zatem odpowiadać za wcześniejszy początek choroby i jej cięższy przebieg. Podobnie jak

w przypadku wariantu -4210T>C, w celu określenia modulującego wpływu należałoby przeprowadzić biopsję nerwu łydkowego celem oceny ekspresji genu *PMP22 in situ*.

Wykazano, że krytyczny względem aktywności promotora 1 region znajduje się ok. 300 pz powyżej eksonu 1A. Jednakże w badaniach z użyciem konstruktów zawierających nawet do 2 kpz powyżej promotora 1 wykazano, że region ten jest niewystarczający do regulacji ekspresji w nerwie obwodowym na tym samym poziomie jak w przypadku endogennego *PMP22*. Sugeruje to, udział innych elementów regulatorowych (Maier i wsp. 2003). W dwóch niezależnych badaniach zidentyfikowano regiony powyżej wcześniej analizowanych 2 kpz, które wpływają na ekspresję *PMP22* w komórkach Schwanna (Maier i wsp. 2002, Orfali i wsp. 2005). Obszar *LMSE* jest niezbędny w prawidłowym procesie regulacji aktywności genu w późnych etapach mielinizacji (Maier i in. 2003). Region, który bierze udział w regulacji ekspresji na wczesnych etapach rozwojowych został zidentyfikowany w obrębie najdłuższego intronu genu *PMP22*, 11 kpz powyżej kodonu startu translacji (Jones i wsp. 2011).

Proksymalne elementy regulatorowe, w tym m.in. promotory genów, są w pierwszej kolejności elementami badanymi pod kątem regulacji transkrypcji genu. Jednakże istnieje wiele genów, które podlegają regulacji poprzez wzmacniacze położone tysiące par zasad powyżej genu. Analiza CNV (copy number variation) u chorych z łagodnymi postaciami CMT wykazała duplikacje powyżej genu *PMP22*, które swym zasięgiem jego nie obejmują (Weterman i wsp. 2010, Zhang i wsp. 2010). Zidentyfikowane duplikacje pokrywają się na odcinku 168 kb. Ponieważ duplikacja tych regionów skutkuje fenotypem podobnym do CMT1A wywołanym nadekspresją genu *PMP22*, jednakże gen ten nie zawiera się w zduplikowanym regionie zaproponowano, że regiony te zawierają elementy regulatorowe genu *PMP22* (Weterman i wsp. 2010, Zhang i wsp. 2010). W obrębie regionu *LMSE* zidentyfikowano miejsca wiązania dla tak ważnych czynników transkrypcyjnych jak *EGR2* i *SOX10* (Jones i wsp. 2011, Jones i wsp. 2012). Czynniki transkrypcyjne *EGR2* jest kluczowym regulatorem genu *PMP22*, jak również innych genów kodujących białka osłonki mielinowej we wczesnych etapach rozwoju (Decker i wsp. 2006). *SOX10* również bierze udział w regulacji ekspresji genu *PMP22*, ponadto jest on niezbędny na wielu etapach różnicowania komórek Schwanna. Wykazano także, że *EGR2* i *SOX10* funkcjonują synergistycznie jako aktywatory takich genów jak *Cx32*, *MPZ* czy *MBP* (Denarier i wsp. 2005, Jang i Svaren 2009, Srinivasan i wsp. 2012).

W badaniach z zastosowaniem metody immunoprecypitacji chromatyny (CHIP), która umożliwia badanie oddziaływań DNA-białko (lub RNA-białko) w warunkach *in vivo* wykazano, że pomimo zidentyfikowania potencjalnych miejsc wiązania EGR2 i SOX10, te oddziaływania nie są tak silne jak w przypadku elementu regulującego zlokalizowanego +11 kp. Jednakże wykazano, że region *LMSE* jest w obszarze euchromatyny, która jest cechą charakterystyczną dla wzmacniaczy (Jones i wsp. 2012). Podobny mechanizm działania EGR2 oraz SOX10 w regionie regulatorowym zidentyfikowano w genie *Mpz*. Prawdopodobnie miejsca wiązania tych czynników transkrypcyjnych wpływają na „architekturę” chromatyny prowadząc do aktywności transkrypcyjnej (Jang i Svaren 2009).

W genie *MPZ* opisano rzadki wariant zlokalizowany w obrębie sekwencji niekodującej skutkujący fenotypem choroby Charcot-Marie-Tooth 1B. Wariant c.126-1086T>A w intronie pierwszym, w heterozygotycznym układzie został zidentyfikowany u jednego chorego spośród 192 chorych objętych badaniem (Antonellis i wsp. 2010). W regulację genu *MPZ* podobnie jak *PMP22* zaangażowane są przynajmniej dwa wcześniej opisane elementy regulacyjne – promotor genu *MPZ* oraz intronowy element wzmacniający transkrypcję. Elementami wzmacniającymi transkrypcję genu *MPZ* podobnie jak w przypadku genu *PMP22* są czynniki SOX10 i EGR2 (Jones i wsp. 2007) Wykazano, że zidentyfikowany wariant znajduje się w obrębie miejsca wiązania czynnika transkrypcyjnego SOX10, wpływając na obniżenie poziomu transkrypcji. Za patogennym charakterem wariantu w regionie niekodującym przemawia także jego brak w 257-osobowej grupie kontrolnej oraz brak informacji na jego temat w bazie dbSNP. Co ciekawe wariant został sklasyfikowany jako patogenny pomimo braku informacji dotyczących segregacji w rodzinie.

Dwa warianty zidentyfikowane w badaniach własnych również nie wystąpiły w grupie kontrolnej (200 chromosomów), jak również nie występują w bazie dbSNP. Podobnie jak w przypadku wariantu w genie *MPZ*, zmiany w sekwencji genu *PMP22* nie segregują z fenotypem choroby. Jednakże za patogennym charakterem zmian przemawia wysoki stopień konserwowania międzygatunkowego. Zidentyfikowane zmiany znajdują się w regionie *LMSE*, dla którego wykazano wysoki stopień homologii między mysią, szczurzą i ludzką sekwencją.

Zidentyfikowane w pracy zmiany nie znajdują się bezpośrednio w obszarze wiązania EGR2 czy SOX10, jednakże przeprowadzone analizy *in silico* wykazały, że wariant sekwencyjny -4210T>C wpływa na powstanie potencjalnego nowego miejsca wzmacniającego transkrypcję. Zwiększenie aktywności transkrypcyjnej, a tym samym zwiększona produkcja białka PMP22 mogłaby kompensować utratę jednej kopii genu

PMP22. Nie można zatem wykluczyć modulującego wpływu wariantu -4210T>C na przebieg choroby. Jednakże w celu potwierdzenia tej tezy wskazane byłoby wykonanie biopsji nerwu łydkowego celem określenia poziomu ekspresji genu *PMP22* (co jest niemożliwe ze względów etycznych).

W przypadku wariantu sekwencyjnego -4800C>T analizy *in silico* wykazały utratę potencjalnego miejsca wzmacniającego transkrypcję. Dodatkowe obniżenie transkrypcji genu u chorych, u których wcześniej zidentyfikowano delecję genu *PMP22* mogłoby wpłynąć na nasilenie i wcześniejsze wystąpienie pierwszych objawów choroby. Podobnie jak w przypadku chorej ze zmianą -4210T>C, w celu potwierdzenia modulującego efektu zidentyfikowanej zmiany niezbędne jest wykonanie biopsji nerwu łydkowego.

Zarówno antagonistom progesteronu jak i kwasu askorbinowego przypisywano rolę modyfikatorów poziomu ekspresji genu *PMP22*, skutkującym łagodniejszym przebiegiem neuropatii w mysim i szczurzym modelu choroby CMT1A (Sereda i wsp. 2003, Passage wsp. 2004, Kaya i wsp. 2007). Badanie szlaków bezpośredniego oddziaływania kwasu askorbinowego i jego antagonistów na promotor genu *PMP22* poprzez miejsca wiązania cAMP (CREB) nie przyniosły spodziewanych efektów u chorych. Badania oddziaływania progesteronu poprzez miejsca wiązania receptora progesteronu do promotora genu *PMP22* oraz zastosowanie jego antagonistów są w fazie badań klinicznych. Nie wykazano jednoznacznie wpływu kwasu askorbinowego na ekspresję genu *EGR2* czy *SOX10*, jednakże *EGR2* jest indukowany w szlaku cAMP. W przypadku progesteronu wykazano, że wpływa on zarówno na ekspresję *EGR2* jak i *SOX10*, a podanie antagonisty powoduje obniżenie poziomu transkrypcji (Magnaghi i wsp. 2007). Identyfikacja wariantów SNP w obrębie wiązania tych czynników może zatem modulować przebieg choroby CMT1A.

6.2. Warianty sekwencyjne w regionie kodującym genu *PMP22*

6.2.1. Wariant sekwencyjny c.353C>T (Thr118Met)

Badanie sekwencji kodującej genu *PMP22* pozwoliło na zidentyfikowanie u dwóch niespokrewnionych chorych heterozygotycznej zmiany c.353C>T, która skutkuje substytucją treoniny w metioninę w kodonie 118-tym białka PMP22.

Patogenność zidentyfikowanego wariantu jest kontrowersyjna. Na przestrzeni 18 lat badań substytucja Thr118Met została opisana w 17 rodzinach chorych z polineuropatiami obwodowymi, współtowarzysząc fenotypom CMT1, HNPP oraz CMT1A. Pierwszy opis

substytucji Thr118Met dotyczy chorego z ciężką postacią CMT1 oraz potwierdzoną delecją regionu 17p12.2-p12. U dwójki dzieci pacjenta stwierdzono tylko delecję regionu 17p12.2-p12 oraz „klasyczny” fenotyp HNPP, obecność substytucji Thr118Met wykazano u trzeciego zdrowego dziecka. Autorzy pracy sugerowali, iż substytucja Thr118Met jest mutacją recesywną (Roa i wsp. 1993). Już w pierwszej pracy narosły pytania o postawioną w niej tezę, badacze poza przedstawionym dwupokoleniowym rodowodem nie dysponowali pełnymi danymi klinicznymi.

W kolejnych latach wykazano obecność zmiany Thr118Met w rodzinach z CMT1A oraz potwierdzoną duplikacją regionu 17p12.2-p12. U części rodzin odnotowano łagodniejszy fenotyp chorych o złożonym genotypie w porównaniu do chorych członków rodziny, u których występowała tylko duplikacja (Seeman wsp. 1999, Marques i wsp. 2003, Shy i wsp. 2006).

Substytucja Thr118Met została także wykryta u chorych z CMT1 oraz wykluczoną duplikacją i delecją regionu 17p12.2-p12 oraz dodatkowo wykluczonymi mutacjami w takich genach jak *GJB1*, *MPZ*, *EGR2* czy *LITAF* (Mersiyanova i wsp. 2000, Grskovic i wsp. 2002, Shy i wsp. 2006, Keckarevic-Markovic i wsp. 2009, Russo i wsp. 2011). W większości przypadków cechy kliniczne, elektrofizjologiczne i morfologiczne chorych były zbliżone do fenotypu choroby HNPP.

Dotychczas odnotowano jeden przypadek chorej z polineuropatią aksonalną, u której zidentyfikowano homozygotyczną zmianę c.353C>T, wariant ten w układzie heterozygotycznym znaleziono także u obojga zdrowych rodziców (Shy i wsp. 2006). Chorą charakteryzowało wczesne wystąpienie pierwszych objawów choroby (5r.ż.), do których należało osłabienie siły mięśniowej oraz zaburzony chód na palcach i piętach. W wieku 8 lat stwierdzono deformację stóp - *pes cavus* z silnym wyszczupleniem pięty prawej stopy (operowana), zanik odruchów ze ścięgna Achillesa. W wieku lat dziesięciu ze względu na pogłębiające się problemy z chodzeniem zaczęła używać chodzika. W tym samym czasie w badaniu EMG wykazano przewlekłą, częściową denerwację we wszystkich badanych mięśniach. Nie wykazano demielinizacji włókien nerwowych.

Niejednoznaczny jest wpływ zmiany Thr118Met w genie *PMP22* na uszkodzenia aksonów. Najprawdopodobniej zmiana ta oprócz wpływu na prawidłowe funkcjonowanie mieliny wpływa także na biologiczne funkcje białka PMP22. Obecność dwóch kopii zmutowanego allelu mogłaby prowadzić do zaburzeń interakcji aksonów z komórkami Schwanna bez wpływu na prawidłowe formułowanie osłonki mielinowej, tym samym prowadząc do fenotypu neuropatii aksonalnej. Podobnie w genie *MPZ*, którego mutacje

punktowe głównie powiązane są z demielinizacyjną formą CMT, zidentyfikowano mutacje punktowe prowadzące do aksonalnej postaci CMT, w której nie obserwowano demielinizacji (Shy 2005). Nie można także wykluczyć, że uszkodzone zmianą białko PMP22, które najprawdopodobniej jest zaangażowane w prawidłowy przebieg cyklu komórkowego, wpływa na zaburzenie procesu tworzenia komórek nerwowych, który jest niezależny od procesu mielinizacji. Przedstawiony przypadek przemawiałby za patogennym charakterem zmiany Thr118Met, gdyż jak dotąd nie udało się zidentyfikować osoby zdrowej z homozygotyczną zmianą c.353C>T. W związku z tym wysoce prawdopodobne jest nosicielstwo tej zmiany w układzie heterozygotycznym.

W klasycznym ujęciu mutacja patogenna współlistnieje z wyraźnie zdefiniowanym fenotypem klinicznym, segreguje z fenotypem choroby, nie występuje w grupach kontrolnych, powoduje podstawienie aminokwasowe w regionie białka o wysokim stopniu konserwowania międzygatunkowego co prowadzi do zaburzeń strukturalnych i/lub funkcjonalnych w białku. Z danych literaturowych jak i badań własnych wynika, że zmiana Thr118Met nie segreguje z fenotypem choroby, co kwestionowałoby jej ewentualną patogenność. Ponadto za polimorficznym charakterem substytucji przemawia jej obecność w grupach kontrolnych. W szwedzkiej populacji jej częstość w układzie heterozygotycznym wynosi 1,9%, niemieckiej 0,7% , angielskiej 0,5% (Nelis i wsp. 1996, Young i wsp. 2000, Russo i wsp. 2011). Wysoka częstość występowania wariantu sekwencyjnego c.353C>T w populacji szwedzkiej może być związana z jej etnicznością. W 50-osobowej polskiej grupie kontrolnej substytucja Thr118Met nie została zidentyfikowana. Podobnie nie znaleziono jej wśród 150 zdrowych osób w populacji brazylijskiej (300 chromosomów) (Marques i wsp. 2003). Bezobjawowe nosicielstwo heterozygotycznego wariantu c.353C>T w rodzinach chorych oraz jej obecność w grupach kontrolnych może być wytłumaczone poprzez zredukowaną penetrację mutacji Thr118Met (Marques i wsp. 2003, Shy i wsp. 2006, Russo i wsp. 2011).

Za patogennym charakterem zmiany może przemawiać wysoki stopień konserwowania treoniny w kodonie 118-tym białka PMP22. Dodatkowo tranzycja c.353C>T zlokalizowana jest w obrębie dinukleotydów CpG, które bardzo często podlegają zmianom ze względu na tendencję do metylacji cytozyny i następnie jej deaminacji do tyminy. Dinukleotydy CpG stanowią miejsca predestynowane („hotspot”). Dotychczas opisano jeden „hotspot” dla seryny w kodonie 72-gim białka PMP22 (Marques i wsp. 1998).

Przeprowadzone badania funkcjonalne koekspresji 118Met z dziką formą PMP22 w komórkach NIH-3T3 wykazały proapoptotyczny charakter zmiany (Fabbretti i wsp. 1995).

Ekspresja wyłącznie zmutowanego PMP22 w komórkach COS7 wykazała zaburzony wewnątrzkomórkowy transport białka PMP22. Większość formy zmutowanej pozostawała uwięziona w retikulum endoplazmatycznym, niewielka część była transportowana do błony komórkowej komórek Schwanna. Istnieje zatem możliwość inkorporacji mniejszej ilości prawidłowego białka PMP22 do mieliny i tym samym jej częściowego prawidłowego funkcjonowania. Obserwowane zmiany nie były tak poważne jak w przypadku innych mutacji punktowych w genie *PMP22*, np. His12Gln, Ser72Leu, Ser79Cys oraz Leu105Arg czy Leu147Arg (Naef i Suter 1999).

Na podstawie badań *in vitro* stwierdzono, że obecność jednej kopii zmutowanego allelu Thr118Met oraz jednej kopii normalnego allelu *PMP22* prawdopodobnie mogłaby prowadzić do rozwoju fenotypu podobnego do HNPP. W pracy w grupie badanej zidentyfikowano heterozygotyczną zmianę Thr118Met u chorej z rozpoznaniem HNPP. Pierwsze objawy choroby wystąpiły w drugiej dekadzie życia – epizodyczne opadnięcie stóp i niecałkowita poprawa po lewej stronie. Dotychczas w literaturze opisano 11 pacjentów z substytucją Thr118Met, wykluczoną delecją i duplikacją genu *PMP22* oraz wykluczonymi innymi mutacjami w genach odpowiedzialnych za polineuropatie demielinizacyjne (6 przypadków z klinicznym rozpoznaniem HNPP oraz 5 przypadków z klinicznym rozpoznaniem CMT1). Różnorodność opisanych fenotypów nastrocza trudności w identyfikacji korelacji genotyp-fenotyp. Większość chorych charakteryzował łagodny przebieg polineuropatii. Jednakże opisano chorych, u których stwierdzono objawy dodatkowe tj. niedosłuch, parestezje, obustronne opadanie powiek, osłabienie mięśni twarzy, drżenie mięśni policzkowych i ust (Keckarevic-Markovic i wsp. 2009, Russo i wsp. 2011).

Według przeprowadzonych badań *in vitro* chorzy z potwierdzoną delecją regionu 17p11.2-12 oraz zmianą Thr118Met w rezultacie posiadaliby jeszcze mniejsze ilości prawidłowego białka PMP22, a tym samym cięższy fenotyp choroby. U chorych z duplikacją regionu 17p11.2-12 i wariantem sekwencyjnym c.353C>T zaburzony wewnątrzkomórkowy transport PMP22 mógłby prowadzić do obniżenia efektu dawki oraz do wytworzenia łagodniejszego fenotypu w porównaniu z „klasycznym” CMT1A. W badaniach własnych zidentyfikowałam heterozygotyczną zmianę c.353C>T u chorego, u którego podobnie jak u jego córki stwierdzono duplikację regionu 17p12.2-p12. Dotychczas w literaturze opisano 12 pacjentów o złożonym genotypie, w tym 10-ciu z duplikacją genu *PMP22* i substytucją Thr118Met. Większość chorych prezentowała łagodny przebieg polineuropatii, u niektórych nie zanotowano istotnych różnic w porównaniu z typową formą

CMT1A. Chorego R12.SE charakteryzuje bezobjawowe nosicielstwo duplikacji genu *PMP22* w przeciwieństwie do córki, która zachorowała w wieku 10 lat (dane kliniczne – Tabela 8).

Złożony genotyp w CMT w większości przypadków został opisany wśród chorych posiadających mutacje w różnych genach, które zostały odziedziczone po rodzicach. Tym samym cięższa postać choroby mogłaby być wytłumaczona dysfunkcją większej liczby genów, a mutacje wykazywałyby efekt addytywny. Odnotowano przypadki chorych z mutacją w genie *PMP22* skutkującą neuropatią Déjerine'a-Sottasa oraz delecją genu *PMP22*, u których przebieg polineuropatii był bardzo ciężki. Jednakże złożony genotyp nie zawsze musi prowadzić do cięższej postaci choroby.

Dodatkowo za patogennością zmiany mogą przemawiać przeprowadzone analizy *in silico*, które wykazały utratę motywu ESE dla białek SF2/ASF, obniżenie efektywności wiązania z białkiem SRp40 oraz powstanie dodatkowego motywu dla białka SRp55. Przeprowadzone analizy świadczą o wpływie wariantu sekwencyjnego c.353C>T na splicing pierwotnego transkryptu *PMP22*.

W świetle najnowszych doniesień literaturowych zidentyfikowana przeze mnie zmiana c.353C>T jest wariantem sekwencji genu *PMP22*, który może modulować przebieg choroby CMT. Ze względu na funkcjonalne powiązanie białka PMP22 z LITAF, nie można wykluczyć wpływu dodatkowych zmian zidentyfikowanych w genie *LITAF*. W przypadku chorej (R12.SA) zidentyfikowano także warianty Thr78Thr oraz Ile92Val, natomiast w przypadku ojca chorej (R12.SE) zmianę Thr78Thr. Wariant Thr78Thr należy do rzadkich wariantów sekwencyjnych, których patogenność nie została wyjaśniona. Natomiast w przypadku wariantu sekwencyjnego c.274A>G (Ile92Val) w genie *LITAF* postuluje się jego modulujący wpływ na przebieg kliniczny choroby CMT1A (Meggouh i wsp. 2005).

6.2.2. Wariant sekwencyjny c.215C>T (Ser72Leu)

Badanie sekwencji kodującej genu *PMP22* pozwoliło na zidentyfikowanie u jednej chorej heterozygotycznej zmiany c.215C>T, która skutkuje substytucją seryny w leucynę w kodonie 72-tym białka PMP22. Wariant ten jest mutacją patogenną.

Mutacje punktowe w genie *PMP22* są rzadszą przyczyną chorób kręgu CMT (1-5% wszystkich przypadków CMT). Dotychczas w genie *PMP22* zidentyfikowano 61 mutacji punktowych, 15 delecji oraz dwie insercje w obrębie regionu kodującego genu *PMP22*, jedną translokację oraz kilka mutacji w miejscach splicingowych jak również kilka substytucji obejmujących niekodujący region eksonu 1A oraz 3'UTR. Większość zidentyfikowanych

mutacji jest dziedziczona w sposób autosomalny dominujący, z wyjątkiem Arg157Trp, która została zidentyfikowana w homozygotycznym układzie, substytucji Arg157Gly w układzie hemizygotycznym oraz wariantu Thr118Met, który został znaleziony zarówno w układzie heterozygotycznym jak i homozygotycznym (<http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/>). Fenotypy chorych wynikające z mutacji punktowych w genie *PMP22* są zazwyczaj cięższe niż w przypadku klasycznej duplikacji lub delecji genu *PMP22*.

Dotychczas w literaturze substytucja Ser72Leu została opisana w 14 rodzinach chorych z fenotypem wrodzonej neuropatii hipomielinizacyjnej oraz neuropatii Déjerine'a-Sottasa pochodzących z różnych grup etnicznych – Ameryka, Azja, Europa. Mutacja ta nie została znaleziona w żadnej, łącznie z polską 50-osobową, grupie kontrolnej (badania własne).

Po raz pierwszy wariant sekwencyjny c.215C>T w układzie heterozygotycznym został zidentyfikowany u chorej z rozpoznaniem neuropatii Déjerine'a-Sottasa, mutacja wystąpiła *de novo*. Zmianę stwierdzono także u chorej córki probandki. Jest to jedyny opisany przypadek transmisji mutacji Ser72Leu (Roa i wsp. 1993). Łącznie opisano siedmiu chorych z substytucją Ser72Leu i fenotypem neuropatii Déjerine'a-Sottasa. Neuropatia Déjerine'a-Sottasa określana jest mianem neuropatii przerostowej, charakteryzuje ją bardzo wczesny początek choroby. Chorych cechuje niedowład kończyn dolnych i górnych, opóźniony rozwój ruchowy, deformacje kostne, znaczącego stopnia zaburzenia czucia, pogrubienie nerwów stwierdzone palpacyjnie oraz niskie wartości przewodzenia we włóknach nerwowych. W płynie mózgowo-rdzeniowym odnotowuje się podwyższony poziom białka. W biopsji nerwu charakterystyczne są duże, typowe struktury cebulopodobne, składające się z koncentrycznie ułożonych warstw wypustek komórek Schwanna, które przedzielone są włóknami kolagenowymi. Obserwuje się także demielinizację i remielinizację włókien, ubytek włókien mielinowych oraz rozpad włókien kolagenu (Drac 2005).

Neuropatię Déjerine'a-Sottasa wywołują także inne mutacje punktowe w genie *PMP22* oraz w genach *MPZ*, *EGR-2*, *PRX*, *GJB1* oraz *GDAP1* (<http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/>). Pomimo heterogennego tła neuropatii Déjerine'a-Sottasa dotychczas opisani chorzy z mutacją Ser72Leu wykazują szereg cech wspólnych. Jest to przede wszystkim bardzo wczesne wystąpienie pierwszych objawów choroby, hypotonia, opóźniony rozwój ruchowy, skrzywienia kręgosłupa oraz silnie zredukowane przewodzenie we włóknach nerwowych. Chorzy nie są w stanie samodzielnie chodzić, a część z nich korzysta z wózka inwalidzkiego (Ionasescu i wsp. 1995, Ionasescu i wsp. 1996, Marques i wsp. 1998, Ceuterick-de Groote i wsp. 2001, Mostacciolo i wsp. 2001, Marques i wsp.

2004). Odnotowano także objawy dodatkowe takie jak niedosłuch, oczopląs oraz zapalenie dróg moczowych (Ionasescu i wsp. 1996, Marques i wsp. 1998).

W 1999 roku włoska grupa badaczy opisała chorego chłopca z wrodzoną neuropatią hipomielinizacyjną, u którego została zidentyfikowana substytucja Ser72Leu. Pierwsze objawy choroby pojawiły się w pierwszych tygodniach życia, a neuropatia miała bardzo ciężki przebieg. U chłopca zaobserwowano opóźnienie w rozwoju ruchowym, zaburzony chód, obustronne opadanie stóp, zanik mięśni dystalnych i proksymalnych kończyn dolnych i górnych, skoliozę, zaburzone czucie wibracji. Dodatkowo problemy z przetykaniem oraz nawracające infekcje górnych dróg oddechowych. Wartości przewodzenia w nerwie środkowym w wieku lat czterech wynosiły 2,3 m/s, w wieku 7 lat 2 m/s. W biopsji nerwu zaobserwowano aksony pozbawione mieliny, bądź z bardzo cienką otoczką mielinową, struktury cebulopodobne składały się jedynie z warstwy błony podstawnej komórki Schwanna (Simonati i wsp. 1999).

Dotychczas w literaturze opisano siedmiu chorych z fenotypem wrodzonej neuropatii hipomielinizacyjnej oraz zidentyfikowaną heterozygotyczną substytucją c.215C>T. W populacji polskiej mutacja Ser72Leu została opisana u dwóch niespokrewnionych chorych (Kochański i wsp. 2004). W badaniach własnych zidentyfikowano trzecią w populacji polskiej heterozygotyczną zmianę c.215C>T u chorej z klinicznym rozpoznaniem CMT1 (R88.ŁK). Chorą charakteryzuje bardzo wczesne wystąpienie pierwszych objawów choroby (okres niemowlęcy), silne opóźnienie rozwoju ruchowego, problemy z chodzeniem (obecnie 5 r.ż), skrzywienie kręgosłupa (dane kliniczne – Tabela 8). Ze względu na znaczną wiotkość mięśni u chorej podejrzewano rdzeniowy zanik mięśni, który po przeprowadzeniu badań genetycznych został wykluczony. Badanie ENG wykazało szybkość przewodzenia we włóknach ruchowych w nerwie łokciowym - 3,6 m/s.

Za wrodzoną neuropatią hipomielinizacyjną uważa się przypadki z początkiem choroby przed urodzeniem lub w niemowlęctwie. Choroba ta manifestuje się również syndromem wiotkiego dziecka. Neuropatia ma ciężki przebieg kliniczny. Dziedziczona jest autosomalnie dominująco lub recesywnie. Najcięższą formą wrodzonej neuropatii z grupy hipomielinizacyjnej jest neuropatia amielinizacyjna charakteryzująca się całkowitym brakiem zmielinizowanych aksonów w nerwie. W biopsji nerwu obecne są duże niezmielinizowane lub słabo zmielinizowane aksony, nie obserwuje się struktur degradacji/rozpadu mieliny. Badania ENG chorych wykazują bardzo niskie wartości przewodzenia (Boerkoel i wsp. 2001, Drac 2005).

W przypadkach klinicznie i morfologicznie odpowiadających fenotypowi neuropatii hipomielinizacyjnej oprócz mutacji w genie *PMP22* opisano chorych z mutacjami w genach *MPZ*, *EGR-2*, *MTMR2* oraz *SOX10* (<http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/>).

Ze względu na współistnienie substytucji Ser72Leu z fenotypem neuropatii hipomielinizacyjnej oraz neuropatii Déjerine'a-Sottasa ustalenie korelacji genotyp-fenotyp bywa trudne. W obu grupach pierwsze objawy choroby mogą zacząć się bardzo wcześnie i mieć ciężki przebieg. Wartości przewodzenia w obu neuropatiach są bardzo niskie. W diagnostyce pomocna może być biopsja nerwu łydkowego, która wykazuje podstawowe różnice między chorobami.

Grupa francuskich badaczy opisała przypadek chorego chłopca, u którego zidentyfikowano substytucję Ser72Leu oraz na podstawie biopsji nerwu łydkowego przeprowadzonej w pierwszym miesiącu życia zdiagnozowano neuropatię hipomielinizacyjną. Biopsja u tego samego pacjenta wykonana w wieku lat 14-stu wykazała obok słabo zmielinizowanych aksonów obecne liczne, blisko siebie ułożone struktury cebulopodobne w swej ultrastrukturze charakterystyczne dla neuropatii Déjerine'a-Sottasa. Autorzy pracy sugerują syndrom nałożenia dwóch jednostek chorobowych oraz heterogenność neuropatii hipomielinizacyjnej (Planeté-Bordeneuve i wsp. 2001).

Spektrum fenotypowe chorych z mutacją Ser72Leu poszerza przypadek chorego ojca i córki, u których substytucja występowała w złożonym genotypie – u obojga stwierdzono duplikację regionu 17p12.2-p12 obejmującą gen *PMP22*. Polineuropatia miała łagodny przebieg, charakteryzowała się głównie uogólnionym bólem, bez oznak deficytów nerwowo-czuciowych. Badania ENG wykazały wartości przewodzenia od 26 m/s do 32 m/s. Wartości te całkowicie odbiegają od opisanych u chorych ze zidentyfikowaną substytucją Ser72Leu, natomiast są bliższe „klasycznej” postaci CMT1A. Wykorzystując analizę restrykcyjną (RFLP) wykazano, że wariant sekwencyjny c.215C>T występował tylko w jednej z trzech kopii genu *PMP22* (Gouvea i wsp. 2010). Można zatem przypuszczać, że zwiększona ilość białka *PMP22* wywołana duplikacją genu *PMP22* jest kompensowana poprzez mutację Ser72Leu, która jak się przypuszcza odpowiada za zahamowanie transportu białka do błony komórkowej komórek Schwanna (Naef i Suter 1999). Nie można także wykluczyć, że efekt mutacji Ser72Leu jest kompensowany poprzez duplikację genu *PMP22*, gdyż dwie jego kopie są nadal aktywne.

Dotychczas nie ustalono jednoznacznie wpływu mutacji Ser72Leu na funkcje białka *PMP22*. Kodon 72-gi w białku *PMP22* wydaje się pełnić niezwykle istotną rolę, zidentyfikowane w nim dwie inne mutacje – c.214T>C (Ser72Pro) oraz c.215C>G (Ser72Trp)

skutkują ciężkimi postaciami CMT (Ainsworth i wsp. 1998, Ekici i wsp. 2001, Tyson i wsp. 1997). Wszystkie opisane substytucje znajdują się w obrębie dinukleotydów CpG dlatego zaproponowano miejsce „hotspot” dla seryny w kodonie 72-gim (Marques i wsp. 1998).

6.3. Warianty sekwencyjne w genie *LITAF*

Kolejnym etapem badań była analiza genu funkcjonalnie związanego z genem *PMP22*, który mógłby wpływać na zmienność fenotypową chorych z CMT1A/HNPP. W tym przypadku badaniem objęto gen *LITAF*, którego produkt białkowy prawdopodobnie bierze udział w sortowaniu i degradacji białka PMP22 (Saifi i wsp. 2005). Jednakże w procesach tych biorą udział także inne białka, nie można zatem wykluczyć, że również inne geny mogą być zaangażowane w modulowanie przebiegu choroby.

Ostatnie doniesienia literaturowe wskazują, że zaburzenia w prawidłowym funkcjonowaniu białek opiekuńczych w retikulum endoplazmatycznym, w tym kalneksyny, kalretikuliny oraz oksydoreduktazy ERp57 mogą wpływać na biologię białek mieliny (Jung i wsp. 2011). Kalneksyna i kalretikulina są chaperonami zależnymi od wapnia, które współdziałają z białkiem opiekuńczym ERp57. Tak utworzony kompleks umożliwia prawidłowe fałdowanie białek (Hubert i Molinari 2007). Wykazano, że fałdowanie białek i właściwości adhezyjne PMP22 i MPZ są zakłócone w przypadku braku kalneksyny. Dodatkowo deficyt *kalneksyny* u myszy prowadzi do demielinizacji o cechach polineuropatii obwodowej (Kraus i wsp. 2010). Jednakże do dziś nie zidentyfikowano żadnej mutacji w genie *kalneksyny* skutkującej fenotypem choroby CMT.

W przypadku braku oksydoreduktazy ERp57 dochodzi do nieprawidłowego fałdowania białka MPZ na skutek zaburzenia struktury mostków dwusiarczkowych, tym samym zakłócone zostają interakcje między PMP22 a MPZ. Ze względu na odmienny fenotyp chorych z polineuropatią CMT1B, wywołaną mutacjami w genie *MPZ*, w porównaniu do chorych z fenotypem CMT1A/HNPP, wydaje się mało prawdopodobne, że warianty SNP w genie *ERp57* czy w genie *MPZ* mogą pełnić rolę modyfikatorów zmienności fenotypowej chorych z CMT1A/HNPP. W tym ujęciu fenotyp chorych z łagodną postacią choroby CMT1A jest bardzo zbliżony do fenotypu choroby CMT1C. Dodatkowo białko PMP22 oraz *LITAF* wykazują cechę wspólną jaką jest tworzenie agresomów. Do tworzenia agresomów dochodzi, gdy system degradacji na drodze ubikwityna – proteasom jest „przeciążony” (Eaton i wsp. 2012).

Decyzja o badaniu genu *LITAF* wynika także z jego funkcji jako czynnika transkrypcyjnego dla genu *TNF alfa*, a tym samym ewentualnym modyfikowaniu przebiegu nabytej polineuropatii zapalnej na tle polineuropatii genetycznie uwarunkowanej. Za udziałem białka LITAF w tym procesie przemawiać może także jego interakcja z ligazą Itch, bezpośrednio biorącą udział w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej.

Analiza sekwencji genu *LITAF* pozwoliła na identyfikację pięciu wariantów sekwencyjnych: c.234G>A (Thr78Thr), c.274A>G (Ile92Val), c.333C>T (Ala111Ala), c.332G>A (Gly112Ser) oraz c.585C>T (3'UTR).

6.3.1. Rzadkie warianty sekwencyjne genu *LITAF*

W genie *LITAF* zidentyfikowano w heterozygotycznym układzie trzy warianty - c.234G>A (Thr78Thr), c.333C>T (Ala111Ala) oraz c.585C>T (3'UTR), które wystąpiły wyłącznie w grupie chorych. Wszystkie trzy zmiany zostały zidentyfikowane u chorych z klinicznym rozpoznaniem choroby CMT1A i potwierdzoną duplikacją genu *PMP22*.

Patogenność w/w zmian jest niejasna. Za ewentualnym patogennym charakterem zmian przemawia m.in. segregacja z fenotypem choroby oraz wysoki stopień konserwowania międzygatunkowego badanych aminokwasów w białku. W przypadku wariantu sekwencyjnego c.234G>A (Thr78Thr) w jednej z dwóch rodzin, w których wystąpił, segregował on z fenotypem choroby (R12.SE, R12.SA). Jednakże w rodzinie tej zidentyfikowano także wariant c.274A>G (Ile92Val) w genie *LITAF* oraz substytucję Thr118Met w *PMP22*. W drugiej rodzinie zmiana Thr78Thr wystąpiła tylko u chorego ojca (R30.CAn), nie została zidentyfikowana u chorego syna. Dlatego jednoznaczne ustalenie modulującego wpływu wariantu Thr78Thr jest niezmiernie trudne.

Za patogennym charakterem zmiany przemawiać może wysoki stopień konserwowania treoniny w kodonie 78 białka LITAF, jednak wariant c.234G>A nie zmienia sensu kodonu 78-go. Do określenia potencjalnego wpływu zmiany c.234G>A na proces składania mRNA przeprowadzono analizę *in silico*. Wykazała ona utratę motywów wzmacniających splicing dla dwóch białek SR [SC35, SF2/ASF (IgM-BRCA1)], a dla jednego spadek efektywności wiązania (SF2/ASF). Nie można wykluczyć, że wariant Thr78Thr może, np. pośrednio wzmacniać lub osłabiać efekt wywołany duplikacją lub delecją genu *PMP22*.

Wariant sekwencyjny c.234G>A w literaturze dotychczas został opisany dwukrotnie wśród chorych, głównie z fenotypem polineuropatii demielinizacyjnej, u których wcześniej wykluczono duplikację/delecję genu *PMP22* (Bennett i wsp. 2004, Latour i wsp. 2006).

W przypadku pracy Bennett i wsp. nie została podana częstości występowania zmiany ani w grupie badanej ani w grupie kontrolnej oraz status, jaki przypisują jej autorzy (Bennet i wsp 2004). W przypadku badań Latour i wsp. nie opisano chorych, u których zidentyfikowano Thr78Thr, jednakże wiadomo, że wariant c.234G>A w grupie kontrolnej wystąpił z częstością 0,037. Autorzy zaklasyfikowali zidentyfikowaną zmianę do rzadkich wariantów polimorficznych.

Kolejny ze zidentyfikowanych w badaniach własnych wariant sekwencyjny c.333C>T (Ala111Ala) wystąpił w dwóch rodzinach, w żadnej nie segregował z fenotypem choroby (R2, R4). Podobnie jak wariant sekwencyjny c.234G>A jest zmianą synonimiczną. Alanina w kodonie 111-tym wykazuje dość wysoki stopień konserwowania międzygatunkowego (5/8 analizowanych gatunków). Za patogennym charakterem zmiany mogą przemawiać wyniki analizy bioinformatycznej. Wykazały ona utratę motywu ESE dla dwóch białek SR [SC35, SF2/ASF (IgM-BRCA1)], a z jednym spadkiem efektywności wiązania (SF2/ASF). Nie można zatem wykluczyć, że wariant Ala111Ala podobnie jak Thr78Thr poprzez zaburzenia w procesie składania mRNA, może pośrednio modulować przebieg choroby CMT1A/HNPP.

Za patogennym charakterem zmiany przemawia także jej lokalizacja – klaster ośmiu z dziewięciu dotychczas zidentyfikowanych mutacji w genie *LITAF*. Kodon 111-ty jest miejscem, w którym znaleziono patogenną mutację Ala111Gly (Latour i wsp. 2006). W kodonie 112-tym zidentyfikowano kolejną mutację patogenną - Gly112Ser (Saifi i wsp. 2005). Obie substytucje nukleotydowe skutkują fenotypem choroby CMT1C. Natomiast w kodonie 110-tym zidentyfikowano rzadki wariant Asn110Asn o niewyjaśnionym statusie (Brusse i wsp. 2009).

Trzeci ze zidentyfikowanych wariantów sekwencyjnych - c.585C>T (3'UTR) wystąpił u jednego chorego (R23.TS), wykluczono jego obecność u chorego ojca i dziadka chłopca. W tym przypadku również wariant nie segreguje z fenotypem choroby. Dotychczas podobnie jak wariant Ala111Ala został opisany w dwóch badaniach. W pracy Saifi i wsp. został zidentyfikowany u pięciu chorych w 192-osobowej grupie badanej. Jednakże autorzy nie przedstawiają fenotypu ani danych klinicznych chorych. W tej samej pracy zmiany c.585C>T nie zidentyfikowano w grupie kontrolnej składającej się z 91 osób (Saifi wsp. 2005). W pracy Latour i wsp. podano tylko częstość występowania wariantu sekwencyjnego c.585C>T w grupie kontrolnej, która wynosiła 0,005 (1 osoba w 200-osobowej grupie kontrolnej) (Latour i wsp. 2006). Autorzy prac zaklasyfikowali zmianę c.585C>T (3'UTR) do rzadkich wariantów sekwencyjnych, potencjalnie patogennych.

Za patogennym charakterem zmiany mogą przemawiać wyniki analizy bioinformatycznej, które wykazały utratę motywu ESE dla dwóch białek SR (SF2/ASF, SRp40) oraz zwiększenie efektywności wiązania innego motywu ESE z białkiem SRp40. Dodatkowo analiza innym programem wykazała utratę motywu wzmacniającego splicing.

Przebieg choroby chłopca, u którego zidentyfikowano wariant sekwencyjny c.585C>T charakteryzuje się bardzo wczesnym wystąpieniem pierwszych objawów choroby (15 miesięcy życia) oraz jej cięższym przebiegiem klinicznym w porównaniu do chorego ojca i dziadka (dane kliniczne Tabela 8). U całej trójki w genie *LITAF* zidentyfikowano także wariant c.274A>G (Ile92Val), który może odpowiadać za wcześniejsze wystąpienie pierwszych objawów choroby również u ojca i dziadka (odpowiednio druga i pierwsza dekada życia). Nie można wykluczyć, że rolę modyfikatora fenotypu w tej rodzinie odgrywa tylko substytucja Ile92Val. Jednakże tak wczesne wystąpienie pierwszych objawów choroby oraz ich nasilenie przed ukończeniem przez chorego chłopca 5 r. ż. (pełnoobjawowy) mogą być skutkiem addytywnego oddziaływania dwóch zidentyfikowanych zmian w genie *LITAF*.

Zaliczenie rzadkich wariantów sekwencyjnych do „niewinnych” polimorfizmów, potencjalnie patogennych lub zwiększających ryzyko choroby jest bardzo trudne. Za warianty potencjalnie patogene uznaje się te, których częstość występowania wynosi poniżej 1%. Jednakże wiele naturalnych wariantów występuje z częstością poniżej 1%. Ostatnio przeprowadzone badania 400 częstych i rzadkich wariantów sekwencyjnych (częstość występowania poniżej 1%) w genie *APP* oraz w sekwencji flankującej wśród chorych z wczesnoobjawową postacią choroby Alzheimera wykazały, że tylko niewielki odsetek wpływa na ryzyko zachorowania (Hooli i wsp. 2012). Istotnym zagadnieniem w celu oceny patogenności wariantu jest także grupa kontrolna, jednakże zwiększenie liczebności osób może zafałszować wyniki ze względu na brak wyników badań neurologicznych osób zdrowych. O patogenności zmian decyduje też konserwowanie międzygatunkowe, im wyższe w regionie kodującym, tym większe prawdopodobieństwo, iż wariant jest mutagenny. Osobnym zagadnieniem jest homozygotyczność lub heterozygotyczność. Homozygotyczna zmiana występująca u osoby zdrowej powinna być kryterium wyłączającym wariant z grupy zmian patogennych, jednakże to kryterium nie ma zastosowania do recesywnych form neuropatii.

Brak podstawienia aminokwasowego w białku *LITAF* sugeruje, że substytucje Thr78Thr, Ala11Ala oraz wariant c.585C>T są niemymi polimorfizmami, które można zaliczyć do grupy rzadkich wariantów sekwencyjnych, potencjalnie patogennych, gdyż nie zostały zidentyfikowane u innych osób z grupy badanej i kontrolnej.

6.3.2. Wariant sekwencyjny c.274A>G (Ile92Val)

Substytucja Ile92Val została po raz pierwszy opisana przez Saifi i wsp. jako wariant polimorficzny, który występuje zarówno w grupie badanej (192 chorych) jak i kontrolnej, dla których częstość występowania wynosiła odpowiednio 46% i 18% (Saifi i wsp. 2005). Dotychczas częstość występowania substytucji Ile92Val została opisana zaledwie w kilku populacji i zazwyczaj wykazywała większą częstość występowania w grupie badanej niż w grupie kontrolnej. W grupie 53 chorych z fenotypem polineuropatii demielinizacyjnej, u których wykluczono duplikację/delecję regionu 17p11.2-p12 wykazano, że częstość występowania substytucji Ile92Val wynosiła 38% i 26% odpowiednio dla grupy badanej i kontrolnej (Latour i wsp. 2006). W populacji duńskiej częstość występowania w grupie kontrolnej została oszacowana na 16,2%. Autorzy pracy nie podali częstości występowania w grupie chorych (Meggouh i wsp. 2005). Uzyskana w badaniach własnych częstość wariantu sekwencyjnego c.274G>A wynosi 50% dla chorych z fenotypem CMT1A oraz 70% dla chorych z fenotypem HNPP. Dla porównania w 50-osobowej grupie kontrolnej częstość występowania wyniosła 24%.

Większa częstość występowania wariantu Ile92Val w grupie badanej niż w grupie kontrolnej, może być spowodowana tym, że wariant sekwencyjny c.274G>A występujący w złożonym genotypie z duplikacją bądź delecją genu *PMP22* przestaje być „niewinnym” polimorfizmem, a zaczyna wykazywać modulujący wpływ na przebieg choroby. W celu zweryfikowania tej tezy w grupie 87 chorych przeprowadzono analizę statystyczną wyników badań molekularnych z wynikami badań klinicznych, mającą na celu próbę określenia udziału substytucji Ile92Val w białku LITAF w modyfikowaniu zmienności fenotypowej wśród chorych z CMT1A/HNPP. Dla części chorych dysponowano wynikami badań neurologicznych lub zostały one przeprowadzone. W ocenie neuropatii wykorzystano zmodyfikowaną skalę Haberolvej i Seemana.

Pierwotnie skala Haberolvej i Seemana dotyczyła oceny neuropatii u dzieci poniżej 10 roku życia. Modyfikacja skali dotyczyła przede wszystkim jej zastosowania do oceny chorych, u których pierwsze objawy choroby pojawiły przed jak i po 10-tym r.ż.

Analizie statystycznej poddano parametry kliniczne chorych z CMT1A i z HNPP z początkiem choroby przed i po 10 roku życia w zależności od obecności lub braku substytucji Ile92Val w białku LITAF.

Pomimo wstępnego podziału na podgrupy względem wieku wystąpienia pierwszych objawów choroby (arbitralnie przyjęta granica 10-go roku życia), zbadano czy wariant Ile92Val wpływa na wiek początku choroby. W grupie chorych z CMT1A, u których zidentyfikowano zmianę Ile92Val stwierdzono wcześniejsze wystąpienie pierwszych objawów choroby w porównaniu do chorych z CMT1A bez zmiany w genie *LITAF*. Podobnie w grupie chorych z HNPP wykazano, że wariant c.274A>G (Ile92Val) w genie *LITAF* wpływa na wcześniejszy początek choroby. Obserwowane różnice są istotne statystycznie.

W grupie chorych z CMT1A z początkiem choroby po 10-tym roku życia, u chorych ze zmianą Ile92Val dochodzi do pogorszenia takich parametrów klinicznych jak deformacja stóp, niedowład kończyn dolnych, odruch ze ścięgna Achillesa, odruch kolanowy, niedowład kończyn górnych.

W grupie chorych z CMT1A z początkiem choroby przed 10-tym rokiem życia obecność wariantu Ile92Val w genie *LITAF* wpływa na pogorszenie takich parametrów klinicznych jak niedowład kończyn dolnych, CMAP, skolioza oraz niedowład kończyn górnych.

Dla pozostałych badanych parametrów klinicznych nie uzyskano wyraźnych różnic między grupami.

Ze względu na zbyt duże różnice w liczebności podgrup chorych z HNPP lub zbyt małą ilość danych klinicznych nie zostały one poddane analizie statystycznej. Mała liczebność grup jest przede wszystkim wynikiem częstości występowania choroby CMT1A wynoszącym 1:2500, dodatkowo chorzy zostali podzieleni na grupy względem wieku wystąpienia pierwszych objawów choroby, a następnie na podgrupy w zależności od obecności lub braku zmiany Ile92Val.

Zwiększenie liczebności grup oraz przede wszystkim ich zrównoważenie może wykazać, czy obserwowane różnice w badanych grupach są istotne statystycznie czy są to tendencje. W przypadku chorych z CMT1A z początkiem choroby przed 10-tym rokiem życia nie można wykluczyć, że za tak wczesne wystąpienie objawów, oprócz substytucji Ile92Val, odpowiedzialne są również inne czynniki, w tym zmiany w innych genach lub czynniki pozagenetyczne (środowiskowe).

Przeprowadzone badania sugerują, że zmiana Ile92Val może pełnić rolę modyfikatora genetycznego przebiegu chorób CMT1A/HNPP.

Za patogennym charakterem wariantu sekwencyjnego c.274G>A mogą także przemawiać wyniki analizy bioinformatycznej. Wykazały one, że adenina w pozycji 274 powoduje powstanie dwóch motywów wzmacniających splicing dla dwóch białek SR

(SF2/ASF, SRp55), a z jednym zwiększa efektywności wiązania (SC35). Analiza wpływu wariantu c.274G>A na splicing pierwotnego transkrypty *LITAF* przeprowadzona w innym programie ujawniła utratę motywu ESE.

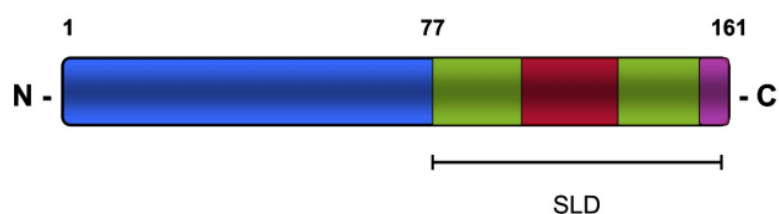
6.3.3 Wariant sekwencyjny c.274A>G (Ile92Val) w grupie chorych CMT/polineuropatia zapalna

Analizę sekwencji genu *LITAF* przeprowadzono także w trzech rodzinach, w których polineuropatia genetycznie uwarunkowana współwystępuje z nabytą polineuropatią zapalną. Biorąc pod uwagę częstość występowania neuropatii CMT1A 1:2500 (Skre 1974) oraz częstość występowania np. CIDP 1:100 000 (Lunn i wsp. 1999), prawdopodobieństwo ich wystąpienia w jednej rodzinie lub u jednego chorego jest niezwykle małe (1:2,5mln). Jednakże pojawiają się doniesienia literaturowe o częstszym współwystępowaniu neuropatii genetycznie uwarunkowanych z nabytymi neuropatiami zapalnymi niż wynikałoby to z danych epidemiologicznych. Niezwykle trudnym zagadnieniem jest próba weryfikacji, czy współwystępowanie CMT i neuropatii zapalnej jest wynikiem nałożenia się dwóch jednostek chorobowych, czy może istnieją czynniki predysponujące do rozwoju polineuropatii zapalnej na tle polineuropatii genetycznie uwarunkowanej.

Badanie sekwencji genu *LITAF* w rodzinach z CMT/polineuropatia zapalna wykazało, obecność substytucji Ile92Val u wszystkich chorych. Wariant ten wystąpił u dwójki chorych z polineuropatią genetycznie uwarunkowaną – CMT1A + CIDP (R.51RA) oraz u chorej z HNPP + GBS (R97.CK). Dodatkowo został on zidentyfikowany u chorej z CIDP (R50.RE) oraz u chorego z GBS (R51.RT).

W kręgu chorych z nabytą polineuropatią zapalną substytucja Ile92Val w białku *LITAF* została zidentyfikowana u dwójki chorych z zespołem Lewisa-Sumnera (Scelsa 2010). Jest to nabyta neuropatia ruchowo-czuciowa charakteryzująca się niesymetrycznym niedowładem kończyn dolnych. U niektórych chorych dochodzi do zajęcia nerwów czaszkowych. W pracy wykazano, że pierwsze objawy choroby oraz jej przebieg sugerowały polineuropatię CMT, dopiero dalsze diagnozowanie pozwoliło na rozpoznanie zespołu Lewisa-Sumnera z blokiem przewodzenia. W celu potwierdzenia polineuropatii genetycznie uwarunkowanej wykonano test duplikacji/delecji regionu 17p11.2-p12 oraz zbadano sekwencję genu *PMP22*, *Cx32*, *MPZ*, *EGR2*, *NEFL*, *MFN2* oraz *LITAF*. Oprócz substytucji Ile92Val nie zidentyfikowano innego wariantu sekwencyjnego. Autorzy pracy sugerują, że zmiana ta może być modyfikatorem, predysponującym do rozwoju polineuropatii zapalnej na tle polineuropatii genetycznie uwarunkowanej (Scelsa 2010).

Za ewentualnym udziałem białka LITAF w modulowaniu przebiegu polineuropatii zapalnej może przemawiać jego interakcja z ligazą Itch, która bierze udział w odpowiedzi immunologicznej. Kodon 92-gi jest zlokalizowany w obrębie silnie konserwowanej międzygatunkowo domeny SLD, oddziaływującej z ligazą Itch. Nie można wykluczyć, że substytucja Ile92Val wpływa na interakcje z ligazą.



Ryc. 23 Schemat domen i motywów w białku LITAF - N-końcówka bogata w prolinę (niebieski), silnie konserwowana międzygatunkowo domena SLD, w obrębie której znajduje się zmodyfikowana domena RING (zielony), przedzielona domeną hydrofobową,

Ligazy ubikwityny wchodzi w skład posttranslacyjnych mechanizmów, które mogą modulować odpowiedź immunologiczną poprzez aktywację receptorów TCR (T Cell Receptor). Wykazano, że ligazy ubikwityny, w tym Itch, są kluczowymi modulatorami odpowiedzi immunologicznej zarówno w ośrodkowym jak i obwodowym układzie nerwowym (Gomez-Martin i wsp. 2011).

Substytucja Ile92Val oprócz modyfikowania interakcji z ligazą Itch, może także wpływać na funkcjonowanie LITAF jako czynnika transkrypcyjnego dla promotora genu *TNF alfa*. W grupie chorych CMT/polineuropatia zapalna przeprowadzono także analizę sekwencji promotorowej genu *TNF alfa*, która pozwoliła na identyfikację wariantu sekwencyjnego -308G>A. Jednakże zmiana ta nie u wszystkich chorych współwystępowała wraz z substytucją Ile92Val.

W badaniach wpływu polimorfizmów promotora genu *TNF alfa* na przebieg nabytych polineuropatii zapalnych dotychczas wskazano udział dwóch wariantów sekwencyjnych. Wariant sekwencyjny -308G>A w homozygotycznym układzie (genotyp AA) oraz polimorfizm -853C>A wpływają na modulowanie przebiegu GBS (Geleijns i wsp. 2007, Zhang i wsp. 2007). W badaniach własnych nie zidentyfikowano wariantu -853C>A, a wariant -308G>A w homozygotycznym układzie wystąpił u jednego chorego z CMT1A oraz potwierdzoną duplikacją regionu 17p12.2-p12. Należy jednak podkreślić, że badania Geleijns i wsp. oraz Zhang i wsp. dotyczą populacji kaukaskiej oraz chińskiej oraz zgodnych etnicznie grup kontrolnych. Wyników tych nie można jednoznacznie odnieść do populacji europejskiej/polskiej.

6.3.4. Wariant sekwencyjny c.332G>A (Gly112Ser)

U trójki chorych zidentyfikowano heterozygotyczną zmianę c.332G>A, która skutkuje substytucją glicyny w serynę w kodonie 112-tym białka *LITAF*. Wariant ten jest mutacją patogenną, pierwszą zidentyfikowaną w polskiej populacji.

Dotychczas w genie *LITAF* zidentyfikowano 8 mutacji punktowych, które odpowiedzialne są za jedną z najłagodniejszych demielinizacyjnych form choroby CMT – typ 1C oraz jedną mutację Thr49Met, która została zidentyfikowana u chorego z CMT typu 2-go.

Po raz pierwszy substytucja Gly112Ser została opisana w rodzinie z rozpoznaniem choroby CMT1C przez Street i wsp. (Street i wsp. 2003). W literaturze opisano 9 rodzin z heterozygotyczną mutacją Gly112Ser i fenotypem choroby CMT1C. Zidentyfikowano tylko jeden przypadek sporadyczny choroby CMT1C wywołanej substytucją Gly112Ser, w pozostałych przypadkach mutacja segregowała z fenotypem choroby (Saifi i wsp. 2005). Mutacja ta nie została zidentyfikowana w żadnej z badanych grup kontrolnych, łącznie z polską 50-osobową grupą kontrolną (Street i wsp. 2003, Bennet i wsp. 2004, Saifi i wsp. 2005, Latour i wsp. 2006, badania własne).

Rozpoznanie choroby CMT1C jest trudne, gdyż jest ona podobna do łagodnego fenotypu chorych z CMT1A wywołanego duplikacją genu *PMP22*. Szacuje się, że ok. 0,6% mutacji w genie *LITAF* jest odpowiedzialnych za demielinizacyjną formę choroby Charcot-Marie-Tooth (Latour i wsp. 2006). Pierwsze opisy choroby sugerowały, że jej początek przypada na 2-gą dekadę życia. Dalsze badania wykazały jednak dużą zmienność w wieku wystąpienia pierwszych objawów choroby, od pierwszej aż po 6-tą dekadę życia. Chorych z fenotypem CMT1A cechuje również zmienność dotycząca wieku początku choroby. Kolejnymi cechami wspólnymi dla choroby CMT typu 1C oraz typu 1A jest obraz kliniczny. W obu przypadkach odnotowuje się osłabienie mięśni kończyn dolnych, do których mogą dołączyć mięśnie kończyn górnych, deformacje stóp typu *pes cavus*, osłabienie odruchów oraz zaburzenia czucia. Odnotowuje się także obniżone wartości prędkości przewodzenia we włóknach ruchowych rzędu 16-26 m/s. W biopsji nerwu obserwuje się cechy charakterystyczne dla demielinizacji (Bennett i wsp. 2004).

Mutacja Gly112Ser została także zidentyfikowana w złożonym genotypie. U chorego chłopca stwierdzono duplikację regionu 17p12.2-p12 współistniejącą z mutacją G112S w genie *LITAF*. U ojca chorego stwierdzono duplikację genu *PMP22* natomiast u matki substytucję Gly112Ser. Obecność mutacji w dwóch różnych genach, które biorą udział w patomechanizmie polineuropatii demielinizacyjnych, wykazując efekt addytywny

skutkowały znacznie cięższym przebiegiem choroby u chłopca w porównaniu z rodzicami. Dodatkowo u chorego oraz jego rodziców zidentyfikowano substytucję nukleotydową c.274A>G (Ile92Val) (Meggouh i wsp. 2005). Białko LITAF prawdopodobnie bierze udział w degradacji białka PMP22. Nieprawidłowe funkcjonowanie białka LITAF może zatem prowadzić do zaburzeń w sortowaniu i degradacji białek skutkując zwiększoną akumulacją białka PMP22, a tym samym cięższym fenotypem choroby.

Mutacja Gly112Ser wraz z mutacjami Ala111Gly, T115N, W116G oraz Leu122Val tworzy klaster zlokalizowany w obrębie silnie konserwowanej międzygatunkowo domeny SLD białka LITAF. Dodatkowo substytucja Gly112Ser znajduje się między dwoma motywami CXXC (X – dowolny aminokwas) wiążącymi jony Zn^{2+} , które flankują silnie hydrofobowy 19-aminokwasowy fragment białka, niezbędny do zakotwiczenia w błonie komórkowej (Saifi i wsp. 2005, Lee i wsp. 2011). Stereochemiczne zaburzenia w tym regionie mogą zatem zakłócać oddziaływanie 19-aminokwasowego fragmentu z błoną komórkową oraz wpływać na efektywność wiązania jonów cynku.

Białko LITAF poprzez motywy PPXY ma zdolność do interakcji z ligazą Nedd4 oraz TSG101. W badaniach funkcjonalnych wpływu mutacji Gly112Ser nie wykazano zaburzeń w w/w interakcjach jak również nie odnotowano zmian w lokalizacji dzikiej i zmutowanej formy białka w takich kompartmentach komórki jak aparat Golgiego oraz błona komórkowa. Wskazuje to na inne czynniki/mechanizmy odpowiedzialne za udział w patomechanizmie choroby CMT1C (Shirk i wsp. 2005). Badania funkcjonalne Lee i wsp. wykazały, że białko LITAF z mutacją Gly112Ser w porównaniu do formy dzikiej ulega translokacji z błony wczesnego endosomu do cytozolu oraz charakteryzuje się mniejszą stabilnością (Lee i wsp. 2011). Utrata miejsca aktywności białka może być jednym z mechanizmów powstania polineuropatii na drodze utraty funkcji przez białko. Białko LITAF w cytozolu prawdopodobnie pełni funkcje sortujące oraz bierze udział w procesie degradacji, dotknięte mutacją Gly112Ser, podobnie jak białko PMP22, ma tendencję do formowania agregatów. Tworzenie agregatów białka LITAF może zakłócać jego interakcję z innymi białkami oraz wpływać na funkcje związane z degradacją (Lee i wsp. 2011). Nieprawidłowe fałdowanie białka oraz tworzenie agregatów leży u podstaw wielu chorób neurologicznych, w tym choroby Alzheimerera czy Parkinsona (Selkoe 2004).

Kodon 112-ty białka LITAF oraz 111-ty uważa się za miejsca „hot spot”. Są one zlokalizowane w obrębie nukleotydów bogatych w CpG. W kodonie 111-tym zidentyfikowano oprócz mutacji Ala111Gly również rzadki wariant sekwencyjny Ala111Ala, którego patogenność jest niejasna. Podobnie jak wariantu w kodonie 110-tym (Asn110Asn) (Saifi

i wsp. 2005, Brusse i wsp. 2009). Kodon 111-ty oraz 112-ty są silnie konserwowane międzygatunkowo.

W pracy zidentyfikowano heterozygotyczną zmianę c.332G>A u trzech chorych w jednej rodzinie (R72). U wszystkich chorych klinicznie zdiagnozowano chorobę CMT1C. Dodatkowo u chorej R72.129 stwierdzono ciężką demielinizację w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) o cechach stwardnienia rozsianego. Niektórzy autorzy sugerują, że warianty w sekwencji promotorowej genu *TNF alfa* mogą zwiększać ryzyko zachorowania lub modulować przebieg choroby. Białko LITAF może funkcjonować jako czynnik transkrypcyjny dla promotora genu *TNF alfa*, dlatego też kolejnym etapem badań była analiza sekwencji promotora *TNF alfa* u wszystkich członków rodziny. Wyniki analizy wykazały obecność heterozygotycznej substytucji nukleotydowej -308G>A u chorej R72.129 oraz jej zdrowego ojca (R72.131).

W literaturze narosło wiele kontrowersji wokół wariantów sekwencyjnych w obrębie sekwencji promotorowej genu *TNF alfa* oraz ich wpływu na przebieg lub predyspozycje do chorób autoimmunologicznych, m.in. stwardnienia rozsianego (SM – sclerosis multiplex). W chorobie tej postulowano udział polimorfizmu G>A w pozycji -308 jako czynnika predysponującego do zachorowania lub cięższego przebiegu choroby.

W kręgu chorób CMT współistnienie polineuropatii genetycznie uwarunkowanej z demielinizacją w OUN, w tym ze stwardnieniem rozsianym zostało opisane (Kleopa i wsp. 2006). Wśród chorych z CMT1A również odnotowano demielinizację w ośrodkowym układzie nerwowym (Sacco i wsp. 2009). Parman i wsp. opisali przypadek chorego, u którego w genie *Cx32* zidentyfikowano patogenną mutację R164W skutkującą fenotypem choroby CMTX. Dodatkowo u chorego klinicznie zdiagnozowano stwardnienie rozsiane (Parman i wsp. 2007). Wykazano, że u myszy pozbawionych zarówno genu *Cx32* jak i *Cx47* dochodzi do demielinizacji w OUN (Menichella i wsp. 2003). Dodatkowo proces demielinizacji w neuropatii typu CMTX oraz w OUN wykazuje cechy wspólne. Zaburzenia w funkcjonowaniu kanałów jonowych tworzonych przez koneksynę 32, których ekspresja zachodzi w komórkach Schwanna jak i oligodendrocytach, leżą u podstaw mechanizmu demielinizacji w chorobie CMTX1 oraz OUN.

Ekspresja genu *LITAF* podobnie jak *Cx23* zachodzi także w mózgu. Nie można zatem wykluczyć, że zidentyfikowana mutacja Gly112Ser poprzez wpływ na ekspresję *TNF alfa* może nasilać reakcję zapalną prowadzącą do demielinizacji w ośrodkowym układzie nerwowym. Proces demielinizacji w OUN może być zatem wynikiem zaburzonej ekspresji *LITAF* w mózgu.

Wariant polimorficzny -308G>A genu *TNF alfa* został dotychczas opisany w kilku grupach chorych ze stwardnieniem rozsianym i grupach kontrolnych jednak wyniki badań nie są jednoznaczne. W populacjach bałkańskiej i skandynawskiej (Chorwacja, Słowenia) wykazano, że wariant sekwencyjny -308G>A występuje częściej w grupie chorych z SM w porównaniu z grupą kontrolną jednak nie predysponuje do zachorowania czy cięższego przebiegu choroby (Bayley i wsp. 2004). Jednakże wśród chorych z SM wykazano, że zmiana -308G>A wpływa na podwyższony poziom ekspresji mRNA *TNF alfa* (Ramagopalan i wsp. 2008, Ramagopalan i wsp. 2008a).

W celu ustalenia ewentualnego wpływu zmiany -308G>A jako czynnika predysponującego do SM należy przeprowadzić systematyczne badania w grupie chorych oraz etnicznie zgodnej grupie kontrolnej.

6.4. Warianty sekwencyjne w genie *TNF alfa*

6.4.1 Wariant sekwencyjny -308G>A w sekwencji promotorowej genu *TNF alfa*

Sekwencja promotorowa genu *TNF alfa* została także zbadana w grupie chorych z fenotypem CMT1A/HNPP. Uzyskane wyniki wykazały, że częstość zidentyfikowanego wariantu sekwencyjnego -308G>A jest podobna w grupie badanej i kontrolnej. Dla chorych z fenotypem CMT1A wyniosła odpowiednio 0,3, z fenotypem HNPP 0,24, a dla grupy kontrolnej 0,32. Uzyskana w pracy częstość występowania wariantu sekwencyjnego -308G>A dla zdrowych członków rodzin chorych jest również zbliżona i wynosi 0,27. Wyniki badań własnych są zbliżone do wartości podanej w bazie dbSNP, należy zatem wykluczyć wpływ wariantu SNP -308G>A na zmienność fenotypową CMT1A/HNPP.

7. WNIOSKI

- Podobnie jak w przypadku innych genów wrażliwych na efekt dawki, warianty sekwencyjne w domenie regulatorowej genu *PMP22* wydają się nie odgrywać istotnej roli w regulacji ekspresji genu *PMP22*.
- W odróżnieniu od sekwencji regulatorowej genu *PMP22*, warianty sekwencyjne w regionie kodującym istotnie wpływają na przebieg choroby CMT1A.
- Wariant sekwencyjny c.274A>G (Ile92Val) w genie *LITAF* wydaje się wpływać na przebieg kliniczny chorób CMT1A/HNPP. Potwierdzenie statusu modyfikatora genetycznego dla tego wariantu wymaga analizy dużej i zróżnicowanej etnicznie grupy chorych z genotypem CMT1A/HNPP.
- Wydaje się, że w regionie promotora genu *TNF alfa* nie występują modyfikatory zmienności fenotypowej chorych z CMT1A/HNPP, pomimo funkcjonalnego związku tego genu z genem *LITAF*.

8. SUPLEMENT

Tabela I Sekwencje starterów używanych do amplifikacji oraz warunki reakcji dla sekwencji promotorowej i regulatorowej genu *PMP22*.

Sekwencja regulatorowa i promotor 1

Starter		Sekwencja (5' 3')	Długość produktu PCR (pz)	Temperatura przyłączenia starterów
Fragment 1	1F	GCTTCAGTTACAGGGAGCACC	215	58°C
	1R	ACATCACCCAGAGGCACAGTT		
Fragment 2	2F	ACACAGGTTGGCACTTCCAGAGAGAA	334	65°C
	2R	AGAGACCCGCAGCCGACAGACTTAG		
Fragment 3	3F	AGACATTTGGCTCACTGCTG	279	60°C -10 cykli + 56°C -23cykle
	3R	CTGGAATCAGAAGGGAGA		
Fragment 4	4F	CATGAAGGTCAGCTTGATTTCG	315	61°C
	4R	CTGTGGGAAGGATCTGTGTCT		
Fragment 5	5F	GGAAACTCATGCAATGAAACCA	297	58°C
	5R	GGAAATGTGTTCTTCCGACTCT		
Fragment 6	6F	GTCATTTGCAAAGCTCTTGAGTG	409	61°C
	6R	TAGGTTCTTTGCAGCGTACCAC		
Fragment 7	7F	CATCACAGCCAGTGCCAATAA	351	58°C
	7R	CTCCATTTGGGTTCCACAACA		
Fragment 8	8F	AAGACTGTCTGGAGAGGCTG	243	61°C
	8R	GTGGAACCCAAATGGAGATG		
Fragment 9	9F	TGCAGAGACATTGCTCAACACA	505	58°C
	9R	GAACAGTGAGCATGGTTTTTGC		
Fragment 10	10F	TTGCAATCCCAAGTACACATCC	308	58°C
	10R	TGGCACAGGACTGTTCCCTAA		
Fragment 11	11F	GGATGTTACACTTTTCTTTGTT	440	58°C
	11R	GACGCATCATAGTCCCCACA		

Promotor 2

Fragment 12	12F	TTTTTCTTGAGGCGCATTTAAGG	420	56°C
	12R	TTCTCCTCCATCTCCTTCACTC		

Tabela II Sekwencje starterów używanych do amplifikacji oraz warunki reakcji dla sekwencji kodującej genu *PMP22*.

Starter		Sekwencja (5' 3')	Długość produktu PCR (pz)	Temperatura przyłączenia starterów
Ekson 2	2F	GCTTCAGTTACAGGGAGCACC	215	58°C
	2R	AACTGTGCCTCTGGGTGATGT		
Ekson 3	3F	CTCCTCGCAGGCAGAAACTC	202	61°C
	3R	CCCGTGCTCCTGCTGGTTTCCAG		
Ekson 4	4F	TCAGGATATCTATCTGATTCT	158	58°C
	4R	GGTTTTGTGCTCCATGAGCTT		
Ekson 5	5F	TGCCATGGACTCTCCGTCA	261	58°C
	5R	GTACATAGGGAAGGGAGGAA		

Tabela III Sekwencje starterów używanych do amplifikacji oraz warunki reakcji dla sekwencji kodującej genu *LITAF/SIMPLE*.

Starter		Sekwencja (5' 3')	Długość produktu PCR (pz)	Temperatura przyłączenia starterów
Ekson 2	2F	CAACTGAATTTCTTATCTGG	387	58°C
	2R	GTAAAACCTGGAACGTACTGG		
Ekson 3	3F	ATAGCCAGACGATGAACG	385	64°C
	3R	ATGGTGCAGTTGAGAACC		
Ekson 4	4F	GAACATGGTTTTGGCAGC	374	60°C
	4R	CAATTTCTGGGGTTTGGAGA		

Tabela IV Sekwencje starterów używanych do amplifikacji oraz warunki reakcji dla sekwencji promotorowej genu *TNF alfa*.

Starter		Sekwencja (5' 3')	Długość produktu PCR (pz)	Temperatura przyłączenia starterów
Fragment 1	1F	TATGAGTCTCCGGGTCAGAAT	580	59°C
	1R	TCTCGGTTTCTTCTCCATCG		

Tabela V Wyniki zbiorcze analizy genów *PMP22*, *LITAF* oraz *TNF alfa*.

Rodzi na	Nr prób	Kod	Wstępne rozpoznanie	Test dup/del genu <i>PMP22</i>	Sekwencja promotorowa <i>PMP22</i>	Sekwencja regulatorowa <i>PMP22</i>	Sekwencja kodująca <i>PMP22</i>	Sekwencja kodująca <i>LITAF</i>	Sekwencja promotorowa <i>TNF alfa</i>
R1	1	R1.ChI	HNPP	del	-819C>T	-4785G>T		Ile92Val	
	2	R1.ChS	HNPP	del					-308G>A
R2	3	R2.DE	CMT1A	dup	-819C>T	-4785G>T		Ala111Ala	
	4	R2.DT	CMT1A	dup		-4785G>T		Ile92Val	
R3	5	R3.DE	CMT1A	dup	-819C>T	-4785G>T			
R4	6	R4.HA	CMT1A	dup	-819C>T	-4785G>T		Ala111Ala	
	7	R4.HJ	CMT1A	dup		-4785G>T			
R5	8	R5.KJ	CMT1A	dup					
	9	R5.KE	CMT1A	dup		-4785G>T			
	10	R5.KT	CMT1A	dup	-819C>T				
R6	11	R6.KK	CMT1A	dup	-819C>T	-4785G>T		Ile92Val	-308G>A
	12	R6.KT	CMT1A	dup				Ile92Val	-308G>A
	13	R6.KTo	CMT1A	dup					
R7	14	R7.KA	CMT1A	dup				Ile92Val	
	15	R7.KJ	CMT1A	dup				Ile92Val	
	16	R7.KZ	CMT1A	dup	-819C>T				
R8	17	R8.LE	HNPP	del	-819C>T				
R9	18	R9.MK	CMT1A	dup		-4785G>T			
	19	R9.MT	CMT1A	dup		-4785G>T			-308G>A
R10	20	R10.SA	CMT1A	dup					
	21	R10.ST	CMT1A	dup	-819C>T				
	22	R10.SG	CMT1A	dup	-819C>T				
R11	23	R11.SJ	HNPP	del		hz -4210C>T		Ile92Val	
R12	24	R12.SE	CMT1A	dup	-819C>T	-4785G>T	Thr118Met	Thr78Thr	-308G>A
	25	R12.SA	CMT1A	dup	-819C>T	-4785G>T		Thr78Thr Ile92Val	
R13	26	R13.MA	CMT1A	dup					
R14	27	R14.TJ	CMT1A	dup	-819C>T				
R15	28	R15.LB	CMT1A	dup					
	29	R15.LŁ	CMT1A	dup	-819C>T	-4785G>T			-308G>A
	30	R15.LW	CMT1A	dup	-819C>T	-4785G>T			
R16	31	R16.GA	CMT1A	dup	-819C>T				
R17	32	R17.KE	HNPP	del	-819C>T	hz-4759T>A hz-4785G>T hz-4800C>T		Ile92Val	
	33	R17.KW	HNPP	del		hz-4785G>T			-308G>A
	34	R17.KM	HNPP	del		hz-4759T>A hz-4785G>T hz -4800C>T		Ile92Val	
R18	35	R18.SZ	HNPP	del				Ile92Val	
R19	36	R19.MA	CMT1A	dup	-819C>T			Ile92Val	
R20	37	R20.CM	CMT1A	dup	-819C>T	-4785G>T			
R21	38	R21.ZK	CMT1A	dup					
R22	39	R22.BA	CMT1A	dup	-819C>T	-4785G>T			
	40	R22.BJ	CMT1A	dup					-308G>A
R23	41	R23.TP	CMT1A	dup		-4785G>T		Ile92Val	
	42	R23.TS	CMT1A	dup		-4785G>T		Ile92Val htz 585C>T (3'UTR)	
	43	R23.TR	CMT1A	dup		-4785G>T		Ile92Val	
R24	44	R23.TJ	zdrowy	norma					
R24	45	R24.KK	CMT1A	dup					-308G>A
R25	46	R25.IK	CMT1A	dup				Ile92Val	-308G>A
R26	47	R26.AM	HNPP	del				Ile92Val	
	48	R26.AJ	HNPP	del				Ile92Val	
R27	49	R27.BA	CMT1A	dup				Ile92Val	-308G>A
	50	R27.BP	CMT1A	dup				Ile92Val	-308G>A
R28	51	R28.BD	HNPP	del					
	52	R28.BM	HNPP	del				Ile92Val	
R29	53	R29.CA	CMT1A	dup					
	54	R29.CS	CMT1A	dup				Ile92Val	
R30	55	R30.CA	CMT1A	dup				Thr78Thr Ile92Val	-308G>A
	56	R30.Can	CMT1A	dup					

R31	57	R31.DT	HNPP	del					
R32	58	R32.JA	CMT1A	dup					
R33	59	R33.KD	HNPP	del				Ile92Val	
	60	R33.KP	HNPP	del					
	61	R33.KPi	HNPP	del				Ile92Val	
	62	R33.KS	zdrowy	norma					
R34	63	R34.KA	HNPP	del				Ile92Val	
	64	R34.KŁ	HNPP	del				Ile92Val	
R35	65	R35.KK	HNPP	del					
	66	R35.KR	HNPP	del				Ile92Val	
R36	67	R36.KK	CMT1A	dup				Ile92Val	
	68	R36.KM	CMT1A	dup				Ile92Val	
	69	R36.KR	CMT1A	dup					
R37	70	R37.KE	CMT1A	dup					
	71	R37.KS	CMT1A	dup					
R38	72	R38.KSB	CMT1A	dup					
	73	R38.KSB	CMT1A	dup					
R39	74	R39.ME	CMT1A	dup					
	75	R39.MM	CMT1A	dup					
R40	76	R40.MP	CMT1A	dup				Ile92Val	
	77	R40.MPa	CMT1A	dup				Ile92Val	
	78	R40.MR	CMT1A	dup				Ile92Val	
R41	79	R41.NH	CMT1A	dup					
R42	80	R42.SS	HNPP	del					
R43	81	R43.SK	CMT1A	dup				Ile92Val	
	82	R43.SM	CMT1A	dup				Ile92Val	
R44	83	R44.SF	HNPP	del					
R45	84	R45.TK	HNPP	del				Ile92Val	
R46	85	R46.ZM	CMT1A	dup				Ile92Val	
	86	R46.ZMi	CMT1A	dup				Ile92Val	
	87	R46.ZP	CMT1A	dup				Ile92Val	
R47	88	R47.KZ	CMT1A	dup					-308G>A
	89	R47.KSS	CMT1A	dup				Ile92Val	-308G>A
	90	R47.KSt	CMT1A	dup					
	91	R47.KJ	CMT1A	dup				Ile92Val	
R48	92	R47.KK	zdrowy	norma					
	93	R48.KIE	CMT1A	dup					
	94	R48.ID	CMT1A	dup				Ile92Val	-308G>A
R49	95	R49.KP	HNPP	del				Ile92Val	
	96	R49.KA	HNPP	del				Ile92Val	
	97	R49.KE	zdrowy	norma					
R50	98	R50.WA	CMT1A	dup				Ile92Val	-308G>A
	99	R50.WH	zdrowy	norma				Ile92Val	-308G>A
	100	R50.WT	zdrowy	norma					
	101	R50.KT	CMT1A	nb					
	102	R50.RE	CIDP	norma				Ile92Val	
	103	R50.WM	zdrowy	norma				Ile92Val	-308G>A
R51	104	R51.RT	GBS	norma				Ile92Val	-308G>A
	105	R51.RA	CMT1A + CIDP	dup				Ile92Val	-308G>A
	106	R51.RR	CMT1A	dup					
	107	R51.RM	zdrowy	norma				Ile92Val	-308G>A
R52	108	R52.SA	CMT1A	dup				Ile92Val	-308G>A
R53	109	R53.CD	CMT	norma				Ile92Val	-308G>A
R54	110	R54.RA	CMT	norma					
R55	111	R55.ZJ	CMT	norma					
R56	112	R56.HN	CMT	norma					
R57	113	R57.ZN	CMT	norma					
R58	114	R58.CS	CMT	norma					
R59	115	R59.NB	CMT	norma					
	116	R59.NM	CMT	norma					
R60	117	R60.KJ	CMT	norma					
R61	118	R61.KB	CMT	norma					
R62	119	R62.GM	CMT	norma					
R63	120	R63.GP	CMT	norma					
R64	121	R64.ST	CMT	norma					
R65	122	R65.DP	CMT	norma					
R66	123	R66.WM	CMT	norma					
R67	124	R67.MB	CMT	norma					

R68	125	R68.PK	CMT	norma					
R69	126	R69.SD	CMT	norma					
R70	127	R70.KG	CMT	norma					
R71	128	R71.HD	CMT	norma					
R72	129	R72.SA	CMT1C	norma				Gly112Ser	-308G>A
	130	R72.SJ	CMT1C	norma				Gly112Ser	
	131	R72.SR	zdrowy	norma					
	132	R72.SF	CMT1C	norma				Gly112Ser	
R73	133	R73.TR	CMT	norma					
R74	134	R74.TJ	CMT	norma					
R75	135	R75.BAB	CMT	norma					
R76	136	R76.CP	CMT	norma					
R77	137	R77.DM	CMT	norma					
R78	138	R78.MJ	CMT	norma					
R79	139	R79.OM	CMT	norma					
R80	140	R80.SO	CMT	norma			htz Thr118Met		
R81	141	R81.SB	CMT	norma					
R82	142	R82.KD	CMT	norma					
R83	142	R83.GS	CMT	norma					-308G>A
R84	143	R84.MR	CMT	norma					
	144	R84.MK	CMT	norma					
R85	145	R85.KA	CMT	norma					
R86	146	R86.WE	CMT	norma					
R87	147	R87.RN	CMT	norma					
R88	148	R88.ŁK	CMT	norma			htz Ser72Leu		
R89	149	R89.PK	CMT	norma					
R90	150	R90.UZ	CMT	norma					
R91	151	R91.CŁ	CMT	norma					
	152	R91.CW	CMT	norma					
R92	153	R92.NM	CMT	norma					
R93	154	R93.PN	CMT	norma					
R94	155	R94.KJ	CMT	norma					
R95	156	R95.Szl	HNPP	del				htz Ile92Val	-308G>A
	157	R95.SzK	HNPP	del				htz Ile92Val	-308G>A
R96	158	R96.SD	HNPP	del				htz Ile92Val	-308G>A
R97	159	R97.CK	HNPP + GBS	del				htz Ile92Val	
R98	160	R98.TR	HNPP	del				htz Ile92Val	
R99	161	R99.CP	CMT	norma					
R100	162	R100.KM	CMT	norma					
	163	R100.KMa	HNPP	del					
R101	164	R101.DD	HNPP	del					
	165	R101.DM	HNPP	del					
	166	R101.DW	HNPP	del				htz Ile92Val	
R102	167	R102.CA	CMT1A	dup					
	168	R102.KE	CMT1A	dup				htz Ile92Val	
R103	169	R103.GR	HNPP	del				htz Ile92Val	
R104	170	R104.ŻD	HNPP	del				htz Ile92Val	
R105	171	R105.M	HNPP	del				htz Ile92Val	
R106	172	R106.ŁK	CMT	norma					
R107	173	R107.KK	CMT	norma					
R108	174	R108.CW	CMT	norma					
R109	175	R109.MA	CMT	norma					
R110	176	R110.OM	CMT	norma					
R111	177	R111.SA	CMT	norma					
	178	R111.SP	CMT	norma					
R112	179	R112.JZ	CMT	norma					
	180	R112.JP	CMT	norma					
R113	181	R113.KR	CMT	norma					
R114	182	R114.GW	CMT	norma					

Tabela VI Wyniki skalowania chorych (oceny neuropatii) wg zmodyfikowanej skali Haberlovej i Seemana.

Grupa	Lp	Chory	dup/del PMP22	LITAF	wiek - p.ch.	z. cz.	def. ruchowy w kkg	def. ruchowy w kkd	czucie dotyku bólu	czucie wibracji	CMAP	SNAP	skolioza	stopy	nkgg	nkkd	OK	OA	chodzi mż
HNPP >10 rż +Ile92Val	1	R33.K Ł	del	I92V	13	0	3	0	0	0	0	3	1	0	3	0	1	1	10
HNPP >10 rż +Ile92Val	2	R33.KA	del	I92V	12	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0	0	1	0	12
HNPP >10 rż +Ile92Val	3	R18.SZ	del	I92V	23								2	2	2	2			
HNPP >10 rż +Ile92Val	4	R32.KD	del	I92V	32	0	0	0	1	0	0	3	0	0	0	0	1	1	12
HNPP >10 rż +Ile92Val	5	R97.CK	del	I92V	21	0	1	0	0	0	0	3	2	0	1	0	1	1	12
HNPP >10 rż +Ile92Val	6	TR	del	I92V	21	2	1	1	3	0	0	4	0	0	1	1	0	0	12
HNPP >10 rż +Ile92Val	7	R101.DW	del	I92V	17	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1	1	12
HNPP >10 rż +Ile92Val	8	R104.ŻD	del	I92V	16	0	0	1	0	0	0	2	2		0	1	1	1	12
HNPP >10 rż +Ile92Val	9	R95.SI	del	I92V	15	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	2	1	1	12
HNPP >10 rż +Ile92Val	10	R96.SD	del	I92V	17	3	0	0	3	0	0	2	1	0	0	0	1	1	12
HNPP >10 rż +Ile92Val	11	R17.KE	del	I92V	13				0	0	0	4	0	1	0	1	1	1	
HNPP >10 rż +Ile92Val	12	R17.KM	del	I92V		1			0	0			1	0			1	1	
HNPP >10 rż +Ile92Val	13	R34.KK	del	I92V	18	1			1	0	2	0	0	1	0	0	0	0	
HNPP >10 rż +Ile92Val	14	R34.KR	del	I92V											2				
HNPP >10 rż +Ile92Val	15	R32.KP	del	I92V	11	3	0	2	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	15
HNPP >10 rż +Ile92Val	16	AM	del	I92V	26														
HNPP >10 rż +Ile92Val	17	BM	del	I92V	18														
HNPP >10 rż +Ile92Val	18	TK	del	I92V	15														
HNPP >10 rż	18	R49.KP	del		40										0	2			
HNPP >10 rż	19	R101.DM	del		25	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	1	1	12
HNPP >10 rż	20	R17.KW	del		57				0	0			0	1	0	0	1	1	
HNPP >10 rż	21	R8.LE	del		17	1					2	2	0	2	0	3	0	1	12
HNPP >10 rż	22	R32.KE	del		14										0	0			

	23	BD	del		36														
HNPP >10 rż	24	R1.ChS	del		71									0	3				
HNPP<10rż +Ile92Val	25	R49.KA	del	I92V	4	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	2	1	1	12
CMT1A >10 rż +Ile92Va	26	R53.SA	dup	I92V	11	0	0	3	0	0	2	0	1	3	0	2	0	0	12
CMT1A >10 rż +Ile92Val	27	R35.KK	dup	I92V	31	0	0	1	1	1	2	4	2	2	0	1		0	12
CMT1A >10 rż +Ile92Val	28	R23.TP	dup	I92V	25	0	0	0	0	0	1	4	0	0	0	0	0	0	12
CMT1A >10 rż +Ile92Val	29	R24.II	dup	I92V	47	0	2	1	2	1			0	1	2	3	0	0	12
CMT1A >10 rż +Ile92Val	30	R7.KA	dup	I92V	37						4		2	2	2	3	0	0	12
CMT1A >10 rż +Ile92Val	31	R7.KJ	dup	I92V	20	1					2		0	1		1	0	0	
CMT1A >10 rż +Ile92Val	32	R46.K-SS	dup	I92V	25				0				0	0		1	0	0	
CMT1A >10 rż +Ile92Val	33	R46.KJ	dup	I92V	19								0	1		3	0	0	
CMT1A >10 rż +Ile92Va	34	R2.DT	dup	I92V	24	1								0					
CMT1A >10 rż +Ile92Va	35	DT	dup	I92V	20														
CMT1A >10 rż +Ile92Va	36	KK	dup	I92V	14														
CMT1A >10 rż +Ile92Va	37	MA	dup	I92V	33														
CMT1A >10 rż +Ile92Va	38	BP	dup	I92V	27														
CMT1A >10 rż +Ile92Va	39	MP	dup	I92V	13														
CMT1A >10 rż +Ile92Va	40	BE	dup	I92V	23														
CMT1A >10 rż +Ile92Va	41	CzS	dup	I92V	20														
CMT1A >10 rż +Ile92Val	42	KM	dup	I92V	12														
CMT1A >10 rż	43	R30.CAn	dup		54	0	0	1	0	0	1	4	0	0	1	2	0	0	12
CMT1A >10 rż	44	R22.BJ	dup																
CMT1A >10 rż	45	R48.KIE	dup																
CMT1A >10 rż	46	R21.ZK	dup		18	2	0	0	2	2	2	4	3	1	0	0	1	1	12
CMT1A >10 rż	47	R24.KK	dup		23	0	0	0	0	0	0	4	1	1	0	0	0	0	12
CMT1A >10 rż	48	R20.CM	dup		26	1	1	1	3	1				1	2	2	1	1	12
CMT1A >10 rż	49	R12.SE	dup		37	0	0	1	0	0	2	0	0	1	0	2	0	1	12
CMT1A >10 rż	50	R51.RR	dup		30	0	0	0	0	0	1	4	0	0	0	0	1	1	12

CMT1A >10 rż	51	R15.LB	dup		43	0	0	1	0	0	3	3	0	1	0	1			
CMT1A >10 rż	52	R7.KZ	dup		57	1					4	1			0	2	0	0	
CMT1A >10 rż	53	R5.DA	dup		15	1					3	4	0	1	1	3	1	0	
CMT1A >10 rż	54	R46.KZ	dup		48	2			1		3	4		2	0	1	1	0	
CMT1A >10 rż	55	R46.KSt	dup		67								0	0		1	1	1	
CMT1A >10 rż	56	R2.DE	dup								4	4		0		2	1	1	
CMT1A >10 rż	57	R4.HJ	dup		21								1	1	1	1	0	0	
CMT1A >10 rż	58	DE	dup		46														
CMT1A >10 rż	59	K-SJ	dup		46														
CMT1A >10 rż	60	SA	dup		31														
CMT1A >10 rż	61	ST	dup		47														
CMT1A >10 rż	62	SG	dup		41														
CMT1A >10 rż	63	MA	dup		56														
CMT1A >10 rż	64	GA	dup		21														
CMT1A >10 rż	65	CzA	dup		31														
CMT1A >10 rż	66	ME	dup		36														
CMT1A >10 rż	67	MM	dup		13														
CMT1A >10 rż	68	NH	dup		35														
CMT1A >10 rż	69	KE	dup		29														
CMT1A >10 rż	70	KT	dup		27														
CMT1A >10 rż	71	KS	dup		16														
CMT1A >10 rż	72	KE	dup		35														
CMT1A >10 rż	73	CA	dup		23														
CMT1A >10 rż	74	R4.HA	dup		56								0	0	0	0			12
CMT1A<10 rż +I92V	75	R23.TR	dup	I92V	7	0	0	1	0	0	0	2	0	1	0	1	1	1	12
CMT1A<10 rż +I92V	76	R23.TS	dup	I92V	1,3	0	1	1	0	0	2	1	0	0	1	3	1	1	16
CMT1A<10 rż +I92V	77	R30.CA	dup	I92V	1,5	0	1	1	0	0	2	4	1	2	1	2	0	0	16
CMT1A<10 rż +I92V	78	R51.RA	dup	I92V	3	0	1	2	0	0	3	4	0	1	1	2	0	0	20

CMT1A<10 rż +I92V	79 R50.WA	dup	I92V	2	0	1	1	0	0			3	3	1	2	0	0	
CMT1A<10 rż +I92V	80 R53.CDI	dup	I92V	6	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	12
CMT1A<10 rż +I92V	81 R50.WA	dup	I92V	2	0	1	1	0	0			3	3	1	2	0	0	
CMT1A<10 rż +I92V	82 MP	dup	I92V	6														
CMT1A<10 rż +I92V	83 MR	dup	I92V	4														
CMT1A<10 rż +I92V	84 KE	dup	I92V	10														
CMT1A<10 rż +I92V	85 R12.SA	dup	I92V	10	0	0	0	0	0	2	4	0	1	0	2	0	0	14
CMT1A <10 rż	86 R14.TJ	dup		1,5	0	2	1	0	0	1	2	1	3	1	2	0	0	18
CMT1A <10 rż	87 R22.BA	dup		3	0	0	1	0	0	2	4	1	2	0	1	0	0	12
CMT1A <10 rż	88 R15.LŁ	dup		10	1	0	2	2	0	2	4	2	1	0	2	0	0	12
CMT1A <10 rż	89 R9.MT	dup		1,5	0	0	2	0	0			0	1	0	2			22
CMT1A <10 rż	90 BJ	dup		10														
CMT1A <10 rż	91 KK	dup		10														
CMT1A <10 rż	92 R48.ID	dup		1,5	0	0	2	0	0	2	4	0	1	0	2			14

HNPP >10rż + Ile92Val – chorzy z HNPP, u których pierwsze objawy choroby wystąpiły po 10-tym roku życia i u których zidentyfikowano substytucję I92V w białku LITAF, **HNPP >10rż** - chorzy z HNPP, u których pierwsze objawy choroby wystąpiły po 10-tym roku życia, bez zmiany I92V w białku LITAF, **HNPP <10rż + Ile92Val** - chorzy z HNPP, u których pierwsze objawy choroby wystąpiły przed 10-tym rokiem życia i u których zidentyfikowano substytucję I92V w białku LITAF, **HNPP <10rż** - chorzy z HNPP, u których pierwsze objawy choroby wystąpiły przed 10-tym rokiem życia, bez zmiany I92V w białku LITAF.

CMT1A >10rż + Ile92Val – chorzy z CMT1A, u których pierwsze objawy choroby wystąpiły po 10-tym roku życia i u których zidentyfikowano substytucję I92V w białku LITAF, **CMT1A >10rż** – chorzy z CMT1A, u których pierwsze objawy choroby wystąpiły po 10-tym roku życia, bez zmiany I92V w białku LITAF, **CMT1A <10rż + Ile92Val** - chorzy z CMT1A, u których pierwsze objawy choroby wystąpiły przed 10-tym rokiem życia i u których zidentyfikowano substytucję I92V w białku LITAF, **CMT1A <10rż** - chorzy z CMT1A, u których pierwsze objawy choroby wystąpiły przed 10-tym rokiem życia, bez zmiany I92V w białku LITAF.

z.cz. – zaburzenia czucia, **def. ruchowy w kkg** – deficyt ruchowy w kończynach górnych, **def. ruchowy w kkd** - deficyt ruchowy w kończynach dolnych, **CMAP** - złożony potencjał czynnościowy rejestrowany z mięśnia po stymulacji elektrycznej włókien ruchowych nerwu, **SNAP** - czuciowy potencjał czynnościowy rejestrowany z nerwu, **nkkg** – niedowład kończyn górnych, **nkkd** – niedowład kończyn dolnych, **OK.** – odruch kolanowy, **OA** – odruch ze ścięgna Achillesa.

9. PIŚMIENNICTWO

1. Aarskog NK, Vedeler CA.; Real-time quantitative polymerase chain reaction. A new method that detects both the peripheral myelin protein 22 duplication in Charcot-Marie-Tooth type 1A disease and the peripheral myelin protein 22 deletion in hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Hum Genet.*; 2000; 5:494-8.
2. Abraham LJ, Kroeger KM.; Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease. *J Leukoc Biol.*; 1999; 66(4):562-6.
3. Adlkofer K, Frei R, Neuberger DH, Zielasek J, Toyka KV, Suter U.; Heterozygous peripheral myelin protein 22-deficient mice are affected by a progressive demyelinating tomaculous neuropathy. *J Neurosci.*; 1997;17(12):4662-71.
4. Ainsworth PJ, Bolton CF, Murphy BC, Stuart JA, Hahn AF, Grattan-Smith P, Navarro C, Neitzel H, Polster T, Topaloglu H.; Genotype/phenotype correlation in affected individuals of a family with a deletion of the entire coding sequence of the connexin 32 gene. *Hum Genet.*; 1998; 103: 242-244.
5. Antonellis A, Dennis MY, Burzynski G, Huynh J, Maduro V, Hodonsky CJ, Khajavi M, Szigeti K, Mukkamala S, Bessling SL, Pavan WJ, McCallion AS, Lupski JR.; A rare myelin protein zero (MPZ) variant alters enhancer activity in vitro and in vivo. *PLoS One.* 2010 Dec 16;5(12):e14346.
6. Baranzini SE, Srinivasan R, Khankhanian P, Okuda DT, Nelson SJ, Matthews PM, Hauser SL, Oksenberg JR, Pelletier D.; Genetic variation influences glutamate concentrations in brains of patients with multiple sclerosis. *Brain*; 2010; 9:2603-11.
7. Bayley JP, Ottenhoff TH, Verweij CL.; Is there a future for TNF promoter polymorphisms? *Genes Immun.*; 2004; 5(5):315-29.
8. Bennett CL, Shirk AJ, Huynh HM, Street VA, Nelis E, Van Maldergem L, De Jonghe P, Jordanova A, Guergueltcheva V, Tournev I, Van Den Bergh P, Seeman P, Mazanec R, Prochazka T, Kremensky I, Haberlova J, Weiss MD, Timmerman V, Bird TD, Chance PF.; SIMPLE mutation in demyelinating neuropathy and distribution in sciatic nerve. *Ann Neurol.*; 2004; 5:713-20.
9. Boerkoel CF, Takashima H, Bacino CA, Daentl D, Lupski JR.; EGR2 mutation R359W causes a spectrum of Dejerine-Sottas neuropathy. *Neurogenetics.*; 2001; 3(3):153-7.
10. Boerkoel CF, Takashima H, Garcia CA, Olney RK, Johnson J, Berry K, Russo P, Kennedy S, Teebi AS, Scavina M, Williams LL, Mancias P, Butler IJ, Krajewski K, Shy M, Lupski JR.; Charcot-Marie-Tooth disease and related neuropathies: mutation distribution and genotype-phenotype correlation. *Ann Neurol.*; 2002; 2:190-201.
11. Braathen GJ, Sand JC, Lobato A, Høyer H, Russell MB.; Genetic epidemiology of Charcot-Marie-Tooth in the general population. *Eur J Neurol.*; 2011; 1:39-48.
12. Brancolini C, Edomi P, Marzinotto S, Schneider C.; Exposure at the cell surface is required for gas3/PMP22 To regulate both cell death and cell spreading: implication for the Charcot-Marie-Tooth type 1A and Dejerine-Sottas diseases. *Mol Biol Cell.*; 2000; 11(9):2901-14.
13. Brusse E, Majoor-Krakauer D, de Graaf BM, Visser GH, Swagemakers S, Boon AJ, Oostra BA, Bertoli-Avella AM.; A novel 16p locus associated with BSCL2 hereditary motor neuronopathy: a genetic modifier? *Neurogenetics*; 2009; 10(4):289-97.

-
14. Casasnovas C, Cano LM, Albertí A, Céspedes M, Rigo G.; Charcot-Marie-tooth disease. *Foot Ankle Spec.*; 2008; 1(6):350-4.
 15. Ceuterick-de Groote C, De Jonghe P, Timmerman V, Van Goethem G, Löfgren A, Ceulemans B, Van Broeckhoven C, Martin JJ.; Infantile demyelinating neuropathy associated with a de novo point mutation on Ser72 in PMP22 and basal lamina onion bulbs in skin biopsy. *Pathol Res Pract.*; 2001; 197(3):193-8.
 16. Chance PF.; Genetic evaluation of inherited motor/sensory neuropathy. *Suppl Clin Neurophysiol.*; 2004; 57:228-42.
 17. Chance PF; Charcot-Marie-Tooth syndrome. *Arch Neurol.*; 1993; 11:1180-4.
 18. Choi BO, Lee MS, Shin SH, Hwang JH, Choi KG, Kim WK, Sunwoo IN, Kim NK, Chung KW.; Mutational analysis of PMP22, MPZ, GJB1, EGR2 and NEFL in Korean Charcot-Marie-Tooth neuropathy patients. *Hum Mutat.*; 2004; 2:185-6.
 19. Chomczyński P, Sacchi N.; Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.*; 1987; 162(1):156-9.
 20. Cvetkovic J.; Susceptibility for and clinical manifestations of rheumatoid arthritis are associated with polymorphisms of the TNF-alpha, IL-1beta, and IL-1Ra genes. *J Rheumatol.*; 2002; 29(2):212-9
Danis VA, Millington M, Hyland VJ, Grennan D.; Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism. *Clin Exp Immunol.*; 1995; 99(2):303-10.
 21. De Bandt M, Vittecoq O, Descamps V, Le Loet X, Meyer O: Anti-TNF alpha-induced systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*; 2003, 22:56-61.
 22. Decker L, Desmarquet-Trin-Dinh C, Taillebourg E, Ghislain J, Vallat JM, Charnay P.; Peripheral myelin maintenance is a dynamic process requiring constant Krox20 expression. *J Neurosci.*; 2006; 26(38):9771-9.
 23. Denarier E, Forghani R, Farhadi HF, Dib S, Dionne N, Friedman HC, Lepage P, Hudson TJ, Drouin R, Peterson A.; Functional organization of a Schwann cell enhancer. *J Neurosci.*; 2005; 25(48):11210-7.
 24. Désarnaud F, Do Thi AN, Brown AM, Lemke G, Suter U, Baulieu EE, Schumacher M.; Progesterone stimulates the activity of the promoters of peripheral myelin protein-22 and protein zero genes in Schwann cells. *J Neurochem.*; 1998; 4:1765-8.
 25. Desurkar A, Lin JP, Mills K, Al-Sarraj S, Jan W, Jungbluth H, Wraige E.; Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease 1A with superimposed inflammatory polyneuropathy in children. *Neuropediatrics.*; 2009; 2:85-8.
 26. Dierssen M, Lagrán M.; DYRK1A (Dual-Specificity Tyrosine-Phosphorylated and -Regulated Kinase 1A): A Gene with Dosage Effect During Development and Neurogenesis. *TheScientificWorldJOURNAL*; 2006; 6, 1911-1922

-
27. Domański C, 1990, *Testy statystyczne*. PWE Warszawa.
28. Drac H.; Przewlekła zapalna polineuropatia demielinizacyjna i jej odmiany. *Polski Przegląd Neurologiczny*; 2009; 5 (2).
29. Dubourg O, Mouton P, Brice A.; Guidelines for diagnosis of hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Neuromuscul Disord*; 2000; 10:206–208.
30. D'Urso D, Ehrhardt P, Müller HW.; Peripheral myelin protein 22 and protein zero: a novel association in peripheral nervous system myelin. *J Neurosci.*; 1999; 9:3396-403.
31. Dyck PJ, Swanson CJ, Low PA, Bartleson JD, Lambert EH.; Prednisone-responsive hereditary motor and sensory neuropathy. *Mayo Clin Proc.*; 1982; 57(4):239-46.
32. Eaton HE, Desrochers G, Drory SB, Metcalf J, Angers A, Brunetti CR.; SIMPLE/LITAF expression induces the translocation of the ubiquitin ligase itch towards the lysosomal compartments. *PLoS One*; 2011; 6(2):e16873.
33. Eaton HE, Metcalf J, Lacerda AF, Brunetti CR., Accumulation of endogenous LITAF in aggresomes. *PLoS One.*; 2012; 7(1):e30003.
34. Ekici AB, Park O, Korinthenberg R, Grehl H, Rautenstrauss B.; T>C transition in codon 72 (TCG-CCG), S72P, a putative hotspot in PMP22. *Hum Mutat.*; 2001; 17(1):81.
35. Fabbretti E, Edomi P, Brancolini C, Schneider C.; Apoptotic phenotype induced by overexpression of wild-type gas3/PMP22: its relation to the demyelinating peripheral neuropathy CMT1A. *Genes Dev.*; 1995; 15:1846-56.
36. Gabriel CM, Gregson NA, Wood NW, Hughes RA.; Immunological study of hereditary motor and sensory neuropathy type 1a (HMSN1a). *J Neurol Neurosurg Psychiatry.*; 2002; 72(2):230-5.
37. Gardiner K.; Gene-dosage effects in Down syndrome and trisomic mouse models *Genome Biology*; 2004, 5:244-56.
38. Geleijns K, Emonts M, Laman JD, van Rijs W, van Doorn PA, Hermans PW, Jacobs BC.; Genetic polymorphisms of macrophage-mediators in Guillain-Barré syndrome. *J Neuroimmunol.* 2007; 190(1-2):127-30.
39. Gerding WM, Koetting J, Epplen JT, Neusch C.; Hereditary motor and sensory neuropathy caused by a novel mutation in LITAF. *Neuromuscul Disord.*; 2009; 10:701-3.
40. Gess B, Jeibmann A, Schirmacher A, Kleffner I, Schilling M, Young P.; Report of a novel mutation in the PMP22 gene causing an axonal neuropathy. *Muscle Nerve.*; 2011; 4:605-9.
41. Ginsberg L, Malik O, Kenton AR, Sharp D, Muddle JR, Davis MB, Winer JB, Orrell RW, King RH.; Coexistent hereditary and inflammatory neuropathy. *Brain.*; 2004; 7/1:193-202.
42. Gouvea SP, S Borghetti VH, Bueno KC, Genari AB, Lourenço CM, Sobreira C, Barreira AA, Marques W Jr.; Compound Charcot-Marie-Tooth disease may determine unusual and milder phenotypes. *Neurogenetics.*; 2010; 11(1):135-8.

-
43. Gómez-Martín D, Díaz-Zamudio M, Romo-Tena J, Ibarra-Sánchez MJ, Alcocer-Varela J.; Follicular helper T cells poise immune responses to the development of autoimmune pathology. *Autoimmun Rev.* 2011; 10(6):325-30.
44. Grsković B, Ferencak G, Rukavina AS, Karija M, Furac I, Kubat M.; Mutation analysis of the MPZ and PMP22 genes in Croatian patients. *Clin Chem Lab Med.*; 2002; 40(6):559-62.
45. Haberlová J, Seeman P.; Utility of Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Score in children with type 1A disease. *Pediatr Neurol.*; 2010; 6:407-10.
46. Hai M, Bidichandani SI, Patel PI.; Identification of a positive regulatory element in the myelin-specific promoter of the PMP22 gene. *J Neurosci Res.*; 2001; 6:508-19.
47. Hajeer AH, Hutchinson IV; Influence of TNFalpha gene polymorphisms on TNFalpha production and disease. *Hum Immunol.*; 2001; 11:1191-9.
48. Harada Y, Sutomo R, Sadewa AH, Akutsu T, Takeshima Y, Wada H, Matsuo M, Nishio H.; Correlation between SMN2 copy number and clinical phenotype of spinal muscular atrophy: three SMN2 copies fail to rescue some patients from the disease severity. *J Neurol.*; 2002; 249:1211–1219
49. Harding AE, Thomas PK.; The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain*; 1980; 103(2):259-80.
50. Hasse B, Bosse F, Hanenberg H, Müller HW.; Peripheral myelin protein 22 kDa and protein zero: domain specific trans-interactions. *Mol Cell Neurosci.*; 2004; 4:370-8.
51. Hebert DN, Molinari M., In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiol Rev.*; 2007; 87(4):1377-408.
52. Hooli BV, Mohapatra G, Mattheisen M, Parrado AR, Roehr JT, Shen Y, Gusella JF, Moir R, Saunders AJ, Lange C, Tanzi RE, Bertram L.; Role of common and rare APP DNA sequence variants in Alzheimer disease. *Neurology.*; 2012; 78(16):1250-7.
53. Huang Y, Ren XH, Zhang SF, Zhang JW.; Different doses transplanted microglia effect on β -amyloid protein in rat Alzheimer's models. 2011; 33:2353-7.
54. Huizinga TW, Westendorp RG, Bollen EL, Keijsers V, Brinkman BM, Langermans JA, Breedveld FC, Verweij CL, van de Gaer L, Dams L, Crusius JB, García-Gonzalez A, van Oosten BW, Polman CH, Peña AS.; TNF-alpha promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients.
55. Huxley C, Passage E, Robertson AM, Youl B, Huston S, Manson A, Sabéran-Djoniedi D, Figarella-Branger D, Pellissier JF, Thomas PK, Fontés M.; Correlation between varying levels of PMP22 expression and the degree of demyelination and reduction in nerve conduction velocity in transgenic mice. *Hum Mol Genet.*; 1998; 7(3):449-58.
56. Ingham RJ, Gish G, Pawson T.; The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity within a common modular architecture. *Oncogene.*; 2004; 23(11):1972-84.
57. Ionasescu VV, Ionasescu R, Searby C, Neahring R.; Dejerine-Sottas disease with de novo dominant point mutation of the PMP22 gene. *Neurology.*; 1995; 45(9):1766-7.

-
58. Ionasescu VV, Searby C, Greenberg SA.; Dejerine-Sottas disease with sensorineural hearing loss, nystagmus, and peripheral facial nerve weakness: de novo dominant point mutation of the PMP22 gene. *J Med Genet.*; 1996; 33(12):1048-9.
59. Jang SW, Svaren J.; Induction of myelin protein zero by early growth response 2 through upstream and intragenic elements. *J Biol Chem.*; 2009; 284(30):20111-20.
60. Jedrzejowska M, Milewski M, Zimowski J, Borkowska J, Kostera-Pruszczyk A, Sielska D, Jurek M, Hausmanowa-Petrusewicz I.; Phenotype modifiers of spinal muscular atrophy: the number of SMN2 gene copies, deletion in the NAIP gene and probably gender influence the course of the disease. *Acta Biochim Pol.*; 2009; 56(1):103-8.
61. Jessen KR, Mirsky R.; Signals that determine Schwann cell identity. *J Anat.*; 2002; 4:367-76.
Jolliffe CN, Harvey K, Haines BP, Parasivam G, Kumar S.; Identification of multiple proteins expressed in murine embryos as binding partners for the WW domains of the ubiquitin-protein ligase Nedd4. *The Biochemical Journal*; 2000; 351:557–565.
62. Jones EA, Brewer MH, Srinivasan R, Krueger C, Sun G, Charney KN, Keles S, Antonellis A, Svaren J.; Distal enhancers upstream of the Charcot-Marie-Tooth type 1A disease gene PMP22. *Hum Mol Genet.*; 2012; 21(7):1581-91.
63. Jones EA, Jang SW, Mager GM, Chang LW, Srinivasan R, Gokey NG, Ward RM, Nagarajan R, Svaren J.; Interactions of Sox10 and Egr2 in myelin gene regulation. *Neuron Glia Biol.*; 2009; 3(4):377-87.
64. Jones EA, Lopez-Anido C, Srinivasan R, Krueger C, Chang LW, Nagarajan R, Svaren J.; Regulation of the PMP22 gene through an intronic enhancer. *J Neurosci.*; 2011; 31(11):4242-50.
65. Jung J, Coe H, Michalak M.; Specialization of endoplasmic reticulum chaperones for the folding and function of myelin glycoproteins P0 and PMP22. *FASEB J.*; 2011; 25(11):3929-37.
66. Kabzińska D, Korwin-Piotrowska T, Drechsler H, Drac H, Hausmanowa-Petrusewicz I, Kochański A.; Late-onset Charcot-Marie-Tooth type 2 disease with hearing impairment associated with a novel Pro105Thr mutation in the MPZ gene. *Am J Med Genet A.*; 2007; 143A(18):2196-9.
67. Kabzińska D, Pierscinska J, Kochanski A.; Screening of the 17p11.2-p12 region in a large cohort of patients with Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease or hereditary neuropathy with liability to pressure palsies (HNPP). *J Appl Genet.*; 2009; 3:283-8.
68. Kabzińska D, Sinkiewicz-Darol E, Hausmanowa-Petrusewicz I, Kochański A.; Charcot-Marie-Tooth type 1A disease caused by a novel Ser112Arg mutation in the PMP22 gene, coexisting with a slowly progressive hearing impairment. *J Appl Genet.*; 2010; 2:203-9.
69. Karadima G, Floroskufi P, Koutsis G, Vassilopoulos D, Panas M.; Mutational analysis of PMP22, GJB1 and MPZ in Greek Charcot-Marie-Tooth type 1 neuropathy patients. *Clinical Genetics*; 2011, 80/ 5:497–499.
70. Karadima G, Panas M, Floroskufi P, Kalfakis N, Vassilopoulos D.; A V38A mutation in X-linked Charcot-Marie-Tooth neuropathy with unusual clinical features. *J Neurol.*; 2004; 251(2):222-3.

-
71. Kaya F, Belin S, Bourgeois P, Micaleff J, Blin O, Fontés M.; Ascorbic acid inhibits PMP22 expression by reducing cAMP levels. *Neuromuscul Disord.*; 2007; 3:248-53.
72. Keckarevic-Markovic M, Milic-Rasic V, Mladenovic J, Dackovic J, Kecmanovic M, Keckarevic D, Savic-Pavicevic D, Romac S.; Mutational analysis of GJB1, MPZ, PMP22, EGR2, and LITAF/SIMPLE in Serbian Charcot-Marie-Tooth patients. *J Peripher Nerv Syst.*; 2009; 2:125-36.
73. Kleopa KA, Scherer SS.; Molecular genetics of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med*; 2006; 8: 107-22.
74. Kobsar I, Hasenpusch-Theil K, Wessig C, Müller HW, Martini R.; Evidence for macrophage-mediated myelin disruption in an animal model for Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1A. *J Neurosci Res.*; 2005; 6:857-64.
75. Kochański A, Kabzińska D.; De novo Ser72Leu mutation in the peripheral myelin protein 22 in two Polish patients with a severe form of Charcot-Marie-Tooth disease. *Acta Biochim Pol.*; 2004; 51(4):1047-50.
76. Kraus A, Groenendyk J, Bedard K, Baldwin TA, Krause KH, Dubois-Dauphin M, Dyck J, Rosenbaum EE, Korngut L, Colley NJ, Gosgnach S, Zochodne D, Todd K, Agellon LB, Michalak M.; Calnexin deficiency leads to dysmyelination. *J Biol Chem.*; 2010; 285(24):18928-38.
77. Latour P, Gonnaud PM, Ollagnon E, Chan V, Perelman S, Stojkovic T, Stoll C, Vial C, Ziegler F, Vandenberghe A, Maire I.; SIMPLE mutation analysis in dominant demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease: three novel mutations. *J Peripher Nerv Syst.*; 2006; 2:148-55.
78. Lee SM, Olzmann JA, Chin LS, Li L.; Mutations associated with Charcot-Marie-Tooth disease cause SIMPLE protein mislocalization and degradation by the proteasome and aggresome-autophagy pathways. *J Cell Sci.*; 2011; 19:3319-31.
79. Lee YC, Soong BW, Lin KP, Lee HY, Wu ZA, Kao KP.; Myelin protein zero gene mutations in Taiwanese patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 1. *J Neurol Sci.*; 2004; 219(1-2):95-100.
80. LeGuern E, Gouider R, Mabin D, Tardieu S, Birouk N, Parent P, Bouche P, Brice A.; Patients homozygous for the 17p11.2 duplication in Charcot-Marie-Tooth type 1A disease. *Ann Neurol.*; 1997; 41(1):104-8.
81. Lücking CB, Dürr A, Bonifati V, Vaughan J, De Michele G, Gasser T, Harhangi BS, Meco G, Denèfle P, Wood NW, Agid Y, Brice A; French Parkinson's Disease Genetics Study Group; European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease; Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *N Engl J Med.* 2000; 21:1560-7.
82. Ludes-Meyers JH, Kil H, Bednarek AK, Drake J, Bedford MT, Aldaz CM.; WWOX binds the specific proline-rich ligand PPXY: identification of candidate interacting proteins. *Oncogene.*; 2004;23(29):5049-55.
83. Lunn MP, Manji H, Choudhary PP, Hughes RA, Thomas PK.; Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: a prevalence study in south east England. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.*; 1999; 66(5):677-80.
84. Lupski JR, de Oca-Luna RM, Slaugenhaupt S, Pentao L, Guzzetta V, Trask BJ, Saucedo-Cardenas O, Barker DF, Killian JM, Garcia CA, Chakravarti A, Patel PI.; DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell*; 1991; 66(2):219-32.

-
85. Luszniwicz A, Słaby T, 2001, Statystyka z pakietem komputerowym STATISTICA TM PL. Teoria i zastosowania. Wydawnictwo CH Beck Warszawa.
86. Magnaghi V, Ballabio M, Roglio I, Melcangi RC.; Progesterone derivatives increase expression of Krox-20 and Sox-10 in rat Schwann cells. *J Mol Neurosci.*; 2007; 31(2):149-57.
87. Magyar JP, Martini R, Ruelicke T, Aguzzi A, Adlkofer K, Dembic Z, Zielasek J, Toyka KV, Suter U.; Impaired differentiation of Schwann cells in transgenic mice with increased PMP22 gene dosage. *J Neurosci.*; 1996; 17:5351-60.
88. Maier M, Berger P, Nave KA, Suter U.; Identification of the regulatory region of the peripheral myelin protein 22 (PMP22) gene that directs temporal and spatial expression in development and regeneration of peripheral nerves. *Mol Cell Neurosci.*; 2002; 20(1):93-109.
89. Maier M, Castagner F, Berger P, Suter U.; Distinct elements of the peripheral myelin protein 22 (PMP22) promoter regulate expression in Schwann cells and sensory neurons. *Mol Cell Neurosci.*; 2003; 3:803-17.
90. Mainardi PC, Pastore G, Castronovo C, Godi M, Guala A, Tamiazzo S, Provera S, Pierluigi M, Bricarelli FD.; The natural history of Cri du Chat Syndrome. *Eur J Med Genet.*; 2006; 5:363-83.
91. Manfioletti G, Ruaro ME, Del Sal G, Philipson L, Schneider C. A growth arrest-specific (gas) gene codes for a membrane protein. *Mol Cell Biol.*; 1990;10(6):2924-30.
92. Marques W Jr, Funayama CA, Secchin JB, Lourenço CM, Gouvêa SP, Marques VD, Bastos PG, Barreira AA.; Coexistence of two chronic neuropathies in a young child: Charcot-Marie-Tooth disease type 1A and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Muscle Nerve.*; 2010; 42(4):598-600.
93. Marques W Jr, Neto JM, Barreira AA.; Dejerine-Sottas' neuropathy caused by the missense mutation PMP22 Ser72Leu. *Acta Neurol Scand.*; 2004; 110(3):196-9.
94. Marques W Jr, Sweeney MG, Wood NW.; Thr(118)Met amino acid substitution in the peripheral myelin protein 22 does not influence the clinical phenotype of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A due to the 17p11.2-p12 duplication. *Braz J Med Biol Res.*; 2003; 36(10):1403-7.
95. Marques W Jr, Thomas PK, Sweeney MG, Carr L, Wood NW.; Dejerine-Sottas neuropathy and PMP22 point mutations: a new base pair substitution and a possible "hot spot" on Ser72. *Ann Neurol.*; 1998; 43(5):680-3.
96. Martini R, Toyka KV.; Immune-mediated components of hereditary demyelinating neuropathies: lessons from animal models and patients. *Lancet Neurol.*; 2004; 3(8):457-65.
97. Medina M, Marinescu RC, Overhauser J, Kosik KS.; Hemizygoty of delta-catenin (CTNND2) is associated with severe mental retardation in cri-du-chat syndrome. *Genomics.*; 2000; 2:157-64.
98. Meggouh F, de Visser M, Arts WF, De Coo RI, van Schaik IN, Baas F.; Early onset neuropathy in a compound form of Charcot-Marie-Tooth disease. *Ann Neurol.*; 2005; 4:589-91.
99. Melino G, Gallagher E, Aqeilan RI, Knight R, Peschiaroli A, Rossi M, Scialpi F, Malatesta M, Zocchi L, Browne G, Ciechanover A, Bernassola F.; Itch: a HECT-type E3 ligase regulating immunity, skin and cancer. *Cell Death Differ.*; 2008; 7:1103-12.

-
100. Menichella DM, Goodenough DA, Sirkowski E, Scherer SS, Paul DL.; Connexins are critical for normal myelination in the CNS. *J Neurosci.*; 2003; 23 (13):5963-73.
101. Mersiyanova IV, Ismailov SM, Polyakov AV, Dadali EL, Fedotov VP, Nelis E, Löfgren A, Timmerman V, van Broeckhoven C, Evgrafov OV.; Screening for mutations in the peripheral myelin genes PMP22, MPZ and Cx32 (GJB1) in Russian Charcot-Marie-Tooth neuropathy patients. *Hum Mutat.*; 2000; 4:340-7.
102. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.; A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*; 1988; 11;16(3):1215.
103. Mira JP, Cariou A, Grall F, Delclaux C, Losser MR, Heshmati F, Cheval C, Monchi M, Teboul JL, Riché F, Leleu G, Arbibe L, Mignon A, Delpech M, Dhainaut JF.; Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA.*; 1999; 282(6):561-8.
104. Moriwaki Y, Begum NA, Kobayashi M, Matsumoto M, Toyoshima K, Seya T.; Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin and its cell wall complex induce a novel lysosomal membrane protein, SIMPLE, that bridges the missing link between lipopolysaccharide and p53-inducible gene, LITAF(PIG7), and estrogen-inducible gene, EET-1. *J Biol Chem.*; 2001; 25:23065-76.
105. Mostacciuolo ML, Righetti E, Zortea M, Bosello V, Schiavon F, Vallo L, Merlini L, Siciliano G, Fabrizi GM, Rizzuto N, Milani M, Baratta S, Taroni F.; Charcot-Marie-Tooth disease type I and related demyelinating neuropathies: Mutation analysis in a large cohort of Italian families. *Hum Mutat.*; 2001; 18(1):32-41.
106. Mouton P, Tardieu S, Gouider R, Birouk N, Maisonobe T, Dubourg O, Brice A, LeGuern E, Bouche P.; Spectrum of clinical and electrophysiologic features in HNPP patients with the 17p11.2 deletion. *Neurology.*; 1999; 22;52(7):1440-1446.
107. Murphy SM, Laura M, Fawcett K, Pandraud A, Liu YT, Davidson GL, Rossor AM, Polke JM, Castleman V, Manji H, Lunn MP, Bull K, Ramdharry G, Davis M, Blake JC, Houlden H, Reilly MM.; Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes and guidelines for genetic testing. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.*; 2012; 83(7):706-10.
108. Myokai F, Takashiba S, Lebo R, Amar S.; A novel lipopolysaccharide-induced transcription factor regulating tumor necrosis factor alpha gene expression: molecular cloning, sequencing, characterization, and chromosomal assignment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(8):4518-23.
109. Naef R, Suter U.; Impaired intracellular trafficking is a common disease mechanism of PMP22 point mutations in peripheral neuropathies. *Neurobiol Dis.*; 1999; 6(1):1-14.
110. Neesar A, Minghui Z, Indrajit , Polin L, Wei-Zen W, Rathinam C, Massoumi R, Venuprasad K.; The E3 ligase Itch and deubiquitinase Cyld co-operatively regulate Tak1 and inflammation. *Nat Immunol.*; 2011; 12(12): 1176-1183.
111. Nelis E, De Jonghe P, De Vriendt E, Patel PI, Martin JJ, Van Broeckhoven C.; Mutation analysis of the nerve specific promoter of the peripheral myelin protein 22 gene in CMT1 disease and HNPP. *J Med Genet.*; 1998; 7:590-3.
112. Nelis E, Holmberg B, Adolfsson R, Holmgren G, van Broeckhoven C.; PMP22 Thr(118)Met: recessive CMT1 mutation or polymorphism? *Nat Genet.*; 1997; 15(1):13-4.

-
113. Nelis E, Van Broeckhoven C, De Jonghe P, Löfgren A, Vandenberghe A, Latour P, Le Guern E, Brice A, Mostacciuolo ML, Schiavon F, Palau F, Bort S, Upadhyaya M, Rocchi M, Archidiacono N, Mandich P, Bellone E, Silander K, Savontaus ML, Navon R, Goldberg-Stern H, Estivill X, Volpini V, Friedl W, Gal A, ; 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(1):25-33.
114. Nicholson GA.; Mutation testing in Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Ann N Y Acad Sci.*; 1999; 883:383-8.
115. Niemann A, Berger P, Suter U.; Pathomechanisms of mutant proteins in Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med.*; 2006; 8(1-2):217-42.
116. Nobbio L., Fiorese F., Vigo T., Cilli M.,; Gherardi G., Grandis M., Melcangi R.M., Mancardi G., Abbruzzese M., Schenone A., Impaired expression of ciliary neurotrophic factor in Charcot-Marie-Tooth type 1A neuropathy. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 2009; 5:441-55.
117. Noll C, TliliA, Ripoll C, Mallet L, Paul JL.; Dyrk1a activates antioxidant NQO1 expression through an ERK1/2–Nrf2 dependent mechanism. *Molecular Genetics and Metabolism*; 2012; 105, 484–488.
118. Notterpek L, Ryan MC, Tobler AR, Shooter EM.; PMP22 accumulation in aggresomes: implications for CMT1A pathology. *Neurobiol Dis.*; 1999; 6(5):450-60.
119. Numakura C, Lin C, Ikegami T, Guldberg P, Hayasaka K.; Molecular analysis in Japanese patients with Charcot-Marie-Tooth disease: DGGE analysis for PMP22, MPZ, and Cx32/GJB1 mutations. *Hum Mutat.*; 2002; 5:392-8.
120. Numakura C, Lin C, Oka N, Akiguchi I, Hayasaka K.; Hemizygous mutation of the peripheral myelin protein 22 gene associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1.
121. Orfali W, Nicholson RN, Guiot MC, Peterson AC, Snipes GJ.; An 8.5-kb segment of the PMP22 promoter responds to loss of axon signals during Wallerian degeneration, but does not respond to specific axonal signals during nerve regeneration. *J Neurosci Res.*; 2005; 80(1):37-46.
122. Overhauser J, Huang X, Gersh M, Wilson W, McMahon J, Bengtsson U, Rojas K, Meyer M, Wasmuth JJ.; Molecular and phenotypic mapping of the short arm of chromosome 5: sublocalization of the critical region for the cri-du-chat syndrome. *Hum Mol Genet.*; 1994; 2:247-52.
123. Paratore C, Goerich DE, Suter U, Wegner M, Sommer L. Survival and glial fate acquisition of neural crest cells are regulated by an interplay between the transcription factor Sox10 and extrinsic combinatorial signaling. *Development.*; 2001;128(20):3949-61.
124. Pareek S, Notterpek L, Snipes GJ, Naef R, Sossin W, Laliberté J, Iacampo S, Suter U, Shooter EM, Murphy RA.; Neurons promote the translocation of peripheral myelin protein 22 into myelin. *J Neurosci.*; 1997; 17(20):7754-62.
125. Pareyson D, Reilly MM, Schenone A, Fabrizi GM, Cavallaro T, Santoro L, Vita G, Quattrone A, Padua L, Gemignani F, Visioli F, Laurà M, Radice D, Calabrese D, Hughes RA, Solari A; CMT-TRIAAL; CMT-TRAUK groups.; Ascorbic acid in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A (CMT-TRIAAL and CMT-TRAUK): a double-blind randomised trial. *Lancet Neurol.*; 2011; 4:320-8.
126. Parman Y.; Hereditary neuropathies. *Curr Opin Neurol*; 2007; 20: 542-7.

-
127. Parmantier E, Braun C, Thomas JL, Peyron F, Martinez S, Zalc B.; PMP-22 expression in the central nervous system of the embryonic mouse defines potential transverse segments and longitudinal columns. *J Comp Neurol.*; 1997;2:159-72.
128. Passage E, Norreel JC, Noack-Fraissignes P, Sanguedolce V, Pizant J, Thirion X, Robaglia-Schlupp A, Pellissier JF, Fontés M.; Ascorbic acid treatment corrects the phenotype of a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Med.*; 2004; 10(4):396-401.
129. Perry WL, Hustad CM, Swing DA, O'Sullivan TN, Jenkins NA, Copeland NG.; The itchy locus encodes a novel ubiquitin protein ligase that is disrupted in a18H mice. *Nat Genet.*; 1998; 8(2):143-6.
130. Planté-Bordeneuve V, Parman Y, Guiochon-Mantel A, Alj Y, Deymeer F, Serdaroglu P, Eraksoy M, Said G.; The range of chronic demyelinating neuropathy of infancy: a clinico-pathological and genetic study of 15 unrelated cases. *J Neurol.*; 2001; 248(9):795-803.
131. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B.; A model for p53-induced apoptosis. *Nature*; 1997; 389(6648):300-5.
132. Raeymaekers P, Timmerman V, De Jonghe P, Swerts L, Gheuens J, Martin JJ, Muylle L, De Winter G, Vandenberghe A, Van Broeckhoven C.; Localization of the mutation in an extended family with Charcot-Marie-Tooth neuropathy (HMSN I). *Am J Hum Genet.*; 1989; 45(6):953-8.
133. Raeymaekers P, Timmerman V, Nelis E, De Jonghe P, Hoogendijk JE, Baas F, Barker DF, Martin JJ, De Visser M, Bolhuis PA; Duplication in chromosome 17p11.2 in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a (CMT 1a). The HMSN Collaborative Research Group. *Neuromuscul Disord.*; 1991; 1(2):93-7.
134. Rajabally Y, Vital A, Ferrer X, Vital C, Julien J, Latour P, Vandenberghe A, Lagueny A.; Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy caused by HIV infection in a patient with asymptomatic CMT 1A. *J Peripher Nerv Syst.*; 2000; 5(3):158-62.
135. Ramagopalan S, Dymant D, Farrell R, Isobe N.; Multiple Sclerosis. *Autoimmune Dis.*; 2011; 248758.
136. Ramagopalan SV, Deluca GC, Degenhardt A, Ebers GC.; The genetics of clinical outcome in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.*; 2008; 201-202:183-99.
137. Ramagopalan SV, Deluca GC, Morrison KM, Herrera BM, Dymant DA, Lincoln MR, Orton SM, Chao MJ, Degenhardt A, Pugliatti M, Sadovnick AD, Sotgiu S, Ebers GC.; Analysis of 45 candidate genes for disease modifying activity in multiple sclerosis. *J Neurol.*; 2008; 255(8):1215-9.
138. Reilly MM, Murphy SM, Laurá M; Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst.*; 2011;16(1):1-14.
139. Resko P, Radvansky J, Odnogova Z, Baldovic M, Minarik G, Polakova H, Palffy R, Kadasi L.; Mutation analysis of PMP22 in Slovak patients with Charcot-Marie-Tooth disease and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Gen Physiol Biophys.*; 2011; 4:379-88.
140. Ritz MF, Lechner-Scott J, Scott RJ, Fuhr P, Malik N, Erne B, Taylor V, Suter U, Schaeren-Wiemers N, Steck AJ.; Characterisation of autoantibodies to peripheral myelin protein 22 in patients with hereditary and acquired neuropathies. *J Neuroimmunol.*; 2000; 1;104(2):155-63.

-
141. Roa BB, Garcia CA, Pentao L, Killian JM, Trask BJ, Suter U, Snipes GJ, Ortiz-Lopez R, Shooter EM, Patel PI, Lupski JR.; Evidence for a recessive PMP22 point mutation in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet.*; 1993; 5(2):189-94.
142. Roa BB, Garcia CA, Suter U, Kulpa DA, Wise CA, Mueller J, Welcher AA, Snipes GJ, Shooter EM, Patel PI, Lupski JR.; Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. Association with a spontaneous point mutation in the PMP22 gene. *N Engl J Med.*; 1993; 329(2):96-101.
143. Roux KJ, Amici SA, Fletcher BS, Notterpek L.; Modulation of epithelial morphology, monolayer permeability, and cell migration by growth arrest specific 3/peripheral myelin protein 22. *Mol Biol Cell.*; 2005; 3:1142-51.
144. Roy S, McGuire W, Mascie-Taylor CG, Saha B, Hazra SK, Hill AV, Kwiatkowski D.; Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. *J Infect Dis.*; 1997; 176(2):530-2.
145. Russo M, Laurá M, Polke JM, Davis MB, Blake J, Brandner S, Hughes RA, Houlden H, Bennett DL, Lunn MP, Reilly MM.; Variable phenotypes are associated with PMP22 missense mutations. *Neuromuscul Disord.*; 2011; 21(2):106-14.
146. Ryan MC, Shooter EM, Notterpek L.; Aggresome formation in neuropathy models based on peripheral myelin protein 22 mutations. *Neurobiol Dis.*; 2002; 2:109-18.
147. Sabéran-Djoneidi D, Sanguedolce V, Assouline Z, Lévy N, Passage E, Fontés M. Molecular dissection of the Schwann cell specific promoter of the PMP22 gene. *Gene.*; 2000; 248(1-2):223-31.
148. Sacco S, Totaro R, Bastianello S, Marini C, Carolei A. Brain white matter lesions in an italian family with charcot-marie-tooth disease. *Eur Neurol.*; 2004; 51: 168-71.
149. Sachse M., Urbe S., Oorschot V., Strous G.J., Klumperman J.; Bilayered clathrin coats on endosomal vacuoles are involved in protein sorting toward lysosomes. *Molecular Biology of Cell*; 2002; 13(4):1313-28.
150. Saifi GM, Szigeti K, Wiszniewski W, Shy ME, Krajewski K, Hausmanowa-Petrusewicz I, Kochanski A, Reeser S, Mancias P, Butler I, Lupski JR.; SIMPLE mutations in Charcot-Marie-Tooth disease and the potential role of its protein product in protein degradation. *Hum Mutat.*; 2005; 4:372-83.
151. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.; DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 1977; 74(12):5463-7.
152. Scelsa SN.; Familial, demyelinating sensory and motor polyneuropathy with conduction block. *Muscle Nerve.*; 2010; 4:558-62.
153. Schenone A, Nobbio L, Caponnetto C, Abbruzzese M, Mandich P, Bellone E, Ajmar F, Gherardi G, Windebank AJ, Mancardi G.; Correlation between PMP-22 messenger RNA expression and phenotype in hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Ann Neurol.*; 1997; 6:866-72.
154. Schenone A, Nobbio L, Monti Bragadin M, Ursino G, Grandis M. Inherited neuropathies. *Curr Treat Options Neurol.*; 2011; 13(2):160-79.
155. Schroder J., Stuber F., Gallatai H. et al.: Pattern of soluble TNF receptors I and II in sepsis. *Infection*; 1995; 3, 143.

-
156. Seeman P, Mazanec R, Huehne K, Suslíková P, Keller O, Rautenstrauss B.; Hearing loss as the first feature of late-onset axonal CMT disease due to a novel P0 mutation. *Neurology*; 2004; 63(4):733-5.
157. Seeman P, Mazanec R, Marikova T, Rautenstrauss B.; Charcot-Marie-Tooth 1A: heterozygous T118M mutation over a CMT1A duplication has no influence on the phenotype. *Ann N Y Acad Sci.*; 1999; 883:485-9.
158. Selkoe DJ.; Cell biology of protein misfolding: The examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat Cell Biol.*; 2004; 6(11):1054-61.
159. Sereda MW, Meyer zu Hörste G, Suter U, Uzma N, Nave KA.; Therapeutic administration of progesterone antagonist in a model of Charcot-Marie-Tooth disease (CMT-1A). *Nat Med.*; 2003; 12:1533-7.
160. Shames I, Fraser A, Colby J, Orfali W, Snipes GJ.; Phenotypic differences between peripheral myelin protein-22 (PMP22) and myelin protein zero (P0) mutations associated with Charcot-Marie-Tooth-related diseases. *J Neuropathol Exp Neurol.*; 2003; 62(7):751-64.
161. Shekhtman A., Cowburn D.; A ubiquitin-interacting motif from Hrs binds to and occludes the ubiquitin surface necessary for polyubiquitination in monoubiquitinated proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 2002; 296(5):1222-7.
162. Shirk AJ, Anderson SK, Hashemi SH, Chance PF, Bennett CL.; SIMPLE interacts with NEDD4 and TSG101: evidence for a role in lysosomal sorting and implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J Neurosci Res.*; 2005; 1:43-50.
163. Shy ME.; Charcot-Marie-Tooth disease: an update. *Curr Opin Neurol.*; 2004; 17(5):579-85.
164. Shy ME, Scavina MT, Clark A, Krajewski KM, Li J, Kamholz J, Kolodny E, Szigeti K, Fischer RA, Saifi GM, Scherer SS, Lupski JR.; T118M PMP22 mutation causes partial loss of function and HNPP-like neuropathy. *Ann Neurol.* 2006; 2:358-64.
165. Silander K, Meretoja P, Juvonen V, Ignatius J, Pihko H, Saarinen A, Wallden T, Herrgård E, Aula P, Savontaus ML.; Spectrum of mutations in Finnish patients with Charcot-Marie-Tooth disease and related neuropathies. *Hum Mutat.*; 1998; 1:59-68.
166. Simonati A, Fabrizi GM, Pasquinelli A, Taioli F, Cavallaro T, Morbin M, Marcon G, Papini M, Rizzuto N.; Congenital hypomyelination neuropathy with Ser72Leu substitution in PMP22. *Neuromuscul Disord.*; 1999; 9(4):257-61.
167. Skre H.; Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *Clin Genet.*; 1974; 6(2):98-118.
168. Snipes GJ, Suter U, Shooter EM.; Human peripheral myelin protein-22 carries the L2/HNK-1 carbohydrate adhesion epitope. *J Neurochem.*; 1993; 61(5):1961-4.
169. Srinivasan R, Sun G, Keles S, Jones EA, Jang SW, Krueger C, Moran JJ, Svaren J.; Genome-wide analysis of EGR2/SOX10 binding in myelinating peripheral nerve. *Nucleic Acids Res.*; 2012; 40(14):6449-60.
170. Street VA, Bennett CL, Goldy JD, Shirk AJ, Kleopa KA, Tempel BL, Lipe HP, Scherer SS, Bird TD, Chance PF.; Mutation of a putative protein degradation gene LITAF/SIMPLE in Charcot-Marie-Tooth disease 1C. *Neurology*; 2003; 1:22-6.

-
171. Suter U, Nave KA.; Transgenic mouse models of CMT1A and HNPP. *Ann N Y Acad Sci.*; 1999; 883:247-53.
172. Suter U, Snipes GJ.; Peripheral myelin protein 22: facts and hypotheses. *J Neurosci Res.*; 1995; 2:145-51.
173. Suter U, Snipes GJ, Schoener-Scott R, Welcher AA, Pareek S, Lupski JR, Murphy RA, Shooter EM, Patel PI.; Regulation of tissue-specific expression of alternative peripheral myelin protein-22 (PMP22) gene transcripts by two promoters. *J Biol Chem.*; 1994; 41:25795-808.
174. Suter U, Welcher AA, Ozcelik T, Snipes GJ, Kosaras B, Francke U, Billings-Gagliardi S, Sidman RL, Shooter EM; Trembler mouse carries a point mutation in a myelin gene. *Nature*; 1992; 6366:241-4.
175. Tang X., Fenton MJ., Amar S.; Identification and functional characterization of a novel binding site on TNF-alpha promoter. *PNAS*; 2003; 100(7):4096-101.
176. Tang X, Marciano DL, Leeman SE, Amar S.; LPS induces the interaction of a transcription factor, LPS-induced TNF- α factor, and STAT6(B) with effects on multiple cytokines. *PNAS*; 2005; 14(6):1122-8.
177. Timmerman V, Beuten J, Irobi J, De Jonghe P, Martin JJ, Van Broeckhoven C.; Distal hereditary motor neuropathy type II (distal HMN type II): phenotype and molecular genetics. *Ann N Y Acad Sci.*; 1999; 883:60-4.
176. Topilko P, Schneider-Maunoury S, Levi G, Baron-Van Evercooren A, Chennoufi AB, Seitanidou T, Babinet C, Charnay P.; Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature*; 1994; 371:796-799.
179. Tyson J, Ellis D, Fairbrother U, King RH, Muntoni F, Jacobs J, Malcolm S, Harding AE, Thomas PK.; Hereditary demyelinating neuropathy of infancy. A genetically complex syndrome. *Brain.*; 1997; 120 (1):47-63.
180. Uyemura K.; Functional glycoproteins expressed in Schwann cell membrane. *Neurosci Res.*; 1993; 1:9-13.
181. Warner LE, Mancias P, Butler IJ, McDonald CM, Keppen L, Koob KG, Lupski JR. Mutations in the early growth response 2 (EGR2) gene are associated with hereditary myelinopathies. *Nat Genet.*; 1998;18(4):382-4.
182. Weterman MA, van Ruissen F, de Wissel M, Bordewijk L, Samijn JP, van der Pol WL, Meggouh F, Baas F.; Copy number variation upstream of PMP22 in Charcot-Marie-Tooth disease. *Eur J Hum Genet.*; 2010; 18(4):421-8.
183. Wilson, A. G., de Vries, N., Pociot, F., di Giovine, F. S., van der Putte, L. B. A., Duff, G. W.; An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor a promoter region is strongly associated with HLA-A1, B8, DR3 alleles. *J. Exp. Med.*; 1993; 177, 557-560.
184. Witte JS, Palmer LJ, O'Connor RD, Hopkins PJ, Hall JM.; Relation between tumour necrosis factor polymorphism TNF α -308 and risk of asthma. 2002; 10;1, 82-85.
185. Young P, Stögbauer F, Eller B, de Jonghe P, Löfgren A, Timmerman V, Rautenstrauss B, Oexle K, Grehl H, Kühlenbäumer G, Van Broeckhoven C, Ringelstein EB, Funke H.; PMP22 Thr118Met is not a clinically relevant CMT1 marker. *J Neurol.*; 2000; 247(9):696-700.

-
186. Zhang A, Zheng C, Hou M, Lindvall C, Li KJ, Erlandsson F, Björkholm M, Gruber A, Blennow E, Xu D.; Deletion of the telomerase reverse transcriptase gene and haploinsufficiency of telomere maintenance in Cri du chat syndrome. *Am J Hum Genet.*; 2003; 4:940-8.
187. Zhang F, Seeman P, Liu P, Weterman MA, Gonzaga-Jauregui C, Towne CF, Batish SD, De Vriendt E, De Jonghe P, Rautenstrauss B, Krause KH, Khajavi M, Posadka J, Vandenberghe A, Palau F, Van Maldergem L, Baas F, Timmerman V, Lupski JR.; Mechanisms for nonrecurrent genomic rearrangements associated with CMT1A or HNPP: rare CNVs as a cause for missing heritability. *Am J Hum Genet.*; 2010; 86(6):892-903.
188. Zhang J, Dong H, Li B, Li CY, Guo L.; Association of tumor necrosis factor polymorphisms with Guillain-Barré syndrome. *Eur Neurol.*; 2007; 58(1):21-5.

SUMMARY

In the last decade there have been spectacular discoveries in the field of identification of new *loci* and genes responsible for development of inherited neurodegenerative diseases. Although the identification of a new gene or the causative mutation is the main case of the study of pathogenesis of inherited diseases, it doesn't specify the dynamics of the disease and phenotypic variability.

The Charcot-Marie-Tooth disease type 1A (CMT1A) is the most common hereditary disease of the peripheral nervous system. Since 1991, it is possible to identify the causative mutation in the CMT1A disease ie mikroduplication in the region 17p11.2-p12, which includes the *PMP22* gene.

The clinical course of the CMT1A disease and the twin (allelic) disorder - hereditary neuropathy with liability to pressure palsies (HNPP) can be very different. Patients with duplication of *PMP22* gene are characterized by variable clinical symptoms (muscle atrophy, bone defects, additional symptoms). Similary to CMT1A, on the basis of genetic test result, in patients with HNPP it is difficult to determine the age of onset or the number, location and frequency of episodes of paralysis. Thus, both in CMT1A disease and HNPP genetic test has no prognostic value. This raises the question about the role of additional genetic factors (modifier) in phenotypic variability of CMT1A/HNPP.

So far, despite of 22 years of research on the pathogenesis of the CMT1A/HNPP disorders, no one has identified a gene modifier of CMT1A/HNPP diseases. The main problem in the evaluation of phenotypic variability of CMT1A/HNPP diseases is the lack of criteria for assessing the severity of the phenotype (age of onset, electrophysiological parameters, inflammatory component).

Many studies proved that there is a correlation between the expression of *PMP22* gene and the course of polyneuropathy. In this perspective, the regulatory sequence of the *PMP22* gene seems to play an important role in the creation of the phenotype CMT1A/HNPP. There is also the possibility that sequence variants within the extra (third) copy of the *PMP22* gene may also influence the clinical course of the CMT1A disease.

The *LITAF* (*Lipopolysaccharide-Induced Tumor Necrosis Factor*) gene is functionally linked with the *PMP22* gene. The *LITAF* is probably taking part in degradation of *PMP22* protein. Currently under discussion is a functional relationship between *LITAF* gene and the gene encoding *TNF-alpha factor*. *LITAF/SIMPLE* probably acts as a transcription factor for *TNF alpha* gene. It seems that the variants in the promoter sequence of the *TNF alpha* gene

may be at least in part responsible for the occurrence of an inflammatory component in the central and peripheral neuropathies.

The aim of this study was to determinate the influence of genetic factor - the *PMP22*, *LITAF* and *TNF-alpha* genes on phenotypic variability of CMT disease. In addition, the study attempts to assign the identified sequence variants in these genes to particular phenotype of disease.

Genetic testing was performed on 183 individuals, including 92 patients with CMT1A and 55 patients with HNPP, 15 patients with inherited polyneuropathy coexisting with inflammatory polyneuropathy. The control group consisted of 100 DNA samples (50 women, 50 men) obtained from the Department of Genetics, Medical University of Warsaw. Analysis of duplication/deletion of the 17p11.2-p12 region was determined by real-time PCR (Real Time PCR). The products of PCR reaction were analysed by direct sequencing based on the Sanger method using labeled dideoxynucleotide.

In the analyzed groups there were identified 14 sequence variants. In the *PMP22* gene - 1 mutation, 4 potentially pathogenic variants, two SNP variants. In the *LITAF* gene - 1 mutation, 1 pathogenic and 3 rare sequence variants. In the promoter sequence of *TNF alpha* gene there was identified one SNP variant. The identified sequence variants have been subjected to statistical and bioinformatics analysis .

It has been shown that the sequence variant c.274A>G (Ile92Val) in the *LITAF* gene may be considered as a disease modifier of clinical variability of CMT1A/HNPP. In addition, SNP variants the coding sequence of the *PMP22* gene substantially affect the process of the CMT1A disease. It seems that sequence variants in a regulatory domain of *PMP22* gene and the promoter region of *TNF-alpha* gene do not play an important role in modulating the phenotypic variability of CMT1A/HNPP diseases.