Genske mutacije u nasljednim demijelinizirajućim polineuropatijama Charcot-Marie-Tooth tipa 1 u stanovništva Republike Hrvatske

Ana, Merkler

Doctoral thesis / Disertacija

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:713405

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Ana Merkler

GENSKE MUTACIJE U NASLJEDNIM DEMIJELINIZIRAJUĆIM POLINEUROPATIJAMA CHARCOT-MARIE-TOOTH TIPA 1 U STANOVNIŠTVA REPUBLIKE HRVATSKE

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2017.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Ana Merkler

GENE MUTATIONS IN HEREDITARY DEMYELINATING POLYNEUROPATHIES CHARCOT-MARIE-TOOTH TYPE 1 IN THE POPULATION OF THE REPUBLIC OF CROATIA

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2017.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Odjelu za molekularnu laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog bolničkog centra Zagreb, pod vodstvom prof.dr.sc. Jadranke Sertić, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvala

Od srca zahvaljujem svima koji su na bilo koji način doprinijeli izradi ove doktorske disertacije.

Posebno zahvaljujem svojoj mentorici, prof.dr.sc. Jadranki Sertić na stručnom vodstvu, razumijevanju i svoj pomoći te savjetima prilikom izrade ove disertacije.

Također zahvaljujem prim.dr.sc. Zoranu Mitroviću na nesebičnoj i neizmjernoj pomoći bez koje ovo istraživanje ne bi bilo moguće.

Zahvaljujem i suradnicima iz Odjela za molekularnu laboratorijsku dijagnostiku na pomoći, posebno dr.sc. Hani Ljubić.

Hvala cijeloj široj obitelji i prijateljima na podršci tijekom izrade disertacije.

I na kraju Veliko hvala majci Jadranki i sestri Mirni i mom pokojnom ocu Marijanu kojima posvećujem ovaj rad.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorski rad

GENSKE MUTACIJE U NASLJEDNIM DEMIJELINIZIRAJUĆIM POLINEUROPATIJAMA CHARCOT-MARIE-TOOTH TIPA 1 U STANOVNIŠTVA REPUBLIKE HRVATSKE

Ana Merkler

Klinički bolnički centar Zagreb
Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku
Odjel za molekularnu laboratorijsku dijagnostiku
Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb

SAŽETAK

Nasljedne polineuropatije, poznate još i kao polineuropatije Charcot-Marie-Tooth (CMT), su genetički heterogena skupina poremećaja perifernih živaca karakterizirana sporo progresivnom slabošću i atrofijom distalnih mišića, povezana s blagim do umjerenim gubitkom osjeta, oslabljenim tetivnim refleksima i tipičnom deformacijom stopala. Najčešći podtipovi su CMT1A, HNPP (nasljedna neuropatija sa sklonošću kljenuti na pritisak), CMTX1 i CMT1B. U ovom radu ispitivana je vrsta i zastupljenost najčešćih mutacija u genima koji sudjeluju u izgradnji mijelinske ovojnice (*PMP22*, *GJB1* i *MPZ*) u populaciji ispitivanih bolesnika s CMT metodom MLPA i sekvenciranja gena. Utvrđeno je ukupno 13 mutacija u genima *PMP22* i *GJB1*, od kojih je pet bilo novih, dosad neobjavljenih. Utvrđena je slična zastupljenost podtipova CMT u Republici Hrvatskoj kao u drugim europskim zemljama s izuzetkom izostanka mutacija u genu *MPZ*. Rezultati analize neurografskih parametara ukazuju na razlikovanje demijelinizirajućeg procesa i propadanja aksona kao dva temeljna, no različita patofiziološka mehanizma u nastanku fenotipa CMT1.

(103 stranice, 42 slike, 32 tablice, 140 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: Charcot-Marie-Tooth, PMP22, GJB1, MPZ, sekvenciranje gena

Mentor: prof.dr.sc. Jadranka Sertić

Ocjenjivači:
izv.prof.dr.sc. Nada Božina
prof.dr.sc. Dubravka Hranilović
doc.dr.sc. Inga Marijanović

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral thesis

GENE MUTATIONS IN HEREDITARY DEMYELINATING POLYNEUROPATHIES CHARCOT-MARIE-TOOTH TYPE 1 IN THE POPULATION OF THE REPUBLIC OF CROATIA

Ana Merkler

University Hospital Centre Zagreb
Department of laboratory diagnostics
Division of molecular laboratory diagnostics
Kispaticeva 12, 10000 Zagreb

ABSTRACT

Hereditary polyneuropathies known as Charcot-Marie-Tooth (CMT) polyneuropathies are genetically heterogeneous group of peripheral nerve disorders characterized by slow progressive weakness and atrophy of distal muscles, associated with mild to moderate sensation loss, weakened tendon reflexes and typical foot deformity. The most common subtypes are CMT1A, HNPP (hereditary neuropathy with liability to pressure palsies), CMTX1 and CMT1B. This research examined the type and frequency of mutations in genes involved in myelin construction (*PMP22*, *GJB1* and *MPZ*) in CMT1 patients by MLPA and gene sequencing method. A total of 13 mutations in the *PMP22* and *GJB1* genes were found, of which five were new, unpublished. A similar ratio of CMT subtypes in the Republic of Croatia was found as in other European countries with the exception of absence of *MPZ* mutations. The results of neurograph parameters analysis indicate the differentiation of the demyelinating process and the axons degeneration as two fundamental but different pathophysiological mechanisms in the occurrence of CMT1 phenotypes.

(103 pages, 42 figures, 32 tables, 140 references, original in: Croatian)

Keywords: Charcot-Marie-Tooth, PMP22, GJB1, MPZ, gene sequencing

Supervisor: Prof. Jadranka Sertić, PhD

Ocjenjivači/Reviewers:
Assoc. Prof. Nada Božina, PhD
Prof. Dubravka Hranilović, PhD
Asst. Prof. Inga Marijanović, PhD

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Cilj rada 2

2. LITERATURNI PREGLED 3

2.1. Nasljedne neuropatije 3

2.2. Povijesni pregled 3

2.3. Klasifikacija CMT prema fenotipu 4

2.4. Klasifikacija CMT prema genotipu 5

2.5. Epidemiologija CMT 7

2.6. Opis gena i proteina povezanih sa čestim oblicima CMT1 9

2.6.1. Gen i protein PMP22 9

2.6.2. Gen i protein GJB1 10

2.6.3. Gen i protein MPZ 12

2.7. Schwannova stanica 13

2.8. Etiopatogeneza i patofiziologija demijelinizirajućih oblika CMT 16

2.8.1. Duplikacija gena *PMP22* kao uzrok CMT1A 16

2.8.2. Delecija gena *PMP22* kao uzrok HNPP 18

2.8.3. Točkaste mutacije u genu *PMP22* kao uzrok CMT1E 19

2.8.4. Mutacije u genu *GJB1* kao uzrok CMTX1 20

2.8.5. Mutacije u genu *MPZ* kao uzrok CMT1B 21

2.9. Kliničke karakteristike fenotipa CMT 22

2.9.1. Elektromioneurografska dijagnostika 22

2.9.2. Elektrofiziologija i patologija živaca kod CMT 23

2.9.3. Kliničke karakteristike CMT 24

2.9.4. Terapijske mogućnosti 26

3. ISPITANICI, MATERIJALI I METODE 28

3.1. Ispitanici 28

3.2. Materijali 29

3.2.1. Pribor 29

3.2.2. Laboratorijska oprema 29

3.2.3. Reagensi 30

3.2.3.1. Reagensi za izdvajanje DNA iz periferne venske krvi 30

3.2.3.2. Reagensi za analizu duplikacije ili delecije u genu *PMP22* metodom MLPA 32

3.2.3.3. Reagensi za sekvenciranje gena *GJB1*, *MPZ* i *PMP22* 33

3.3. Metode 35

3.3.1. Izdvajanje DNA iz periferne venske krvi 35

3.3.2. Određivanje čistoće i koncentacije DNA ... 36
3.3.3. Utvrđivanje duplikacija ili delecija u genu *PMP22* metodom MLPA ... 36
3.3.3.1. Denaturacija DNA i hibridizacija sondi MLPA ... 37
3.3.3.2. Reakcija ligacije ... 37
3.3.3.3. Reakcija PCR ... 38
3.3.3.4. Detekcija umnoženih sondi MLPA ... 38
3.3.3.5. Analiza rezultata ... 38
3.3.4. Sekvenciranje kodirajuće regije gena *GJB1*, *MPZ* i *PMP22* ... 41
3.3.4.1. Reakcija PCR ... 41
3.3.4.2. Provjera uspješnosti reakcije PCR ... 43
3.3.4.3. Pročišćavanje produkata reakcije PCR ... 43
3.3.4.4. Reakcija sekvenciranja ... 44
3.3.4.5. Pročišćavanje produkata reakcije sekvenciranja ... 45
3.3.4.6. Kapilarna elektroforeza produkata reakcije sekvenciranja ... 46
3.3.5. Statističke metode ... 47
3.3.6. Procjena kvalitete molekularno-genetičkih analiza ... 47
4. REZULTATI ... 49
4.1. Podjela bolesnika prema rezultatima analize DNA ... 49
4.2. CMT mutacije u Republici Hrvatskoj ... 49
4.3. Polimorfizmi utvrđeni u bolesnika s CMT u Republici Hrvatskoj ... 55
4.4. Povezanost genotipa i fenotipa u bolesnika s CMT ... 56
4.4.1. Ocjena kliničkog fenotipa u bolesnika s CMT s utvrđenim mutacijama ... 57
4.4.2. CMT karakteristike elektroneurografskog nalaza ... 62
4.4.3. Statistička analiza značajnosti razlika između skupina ... 67
5. RASPRAVA ... 76
5.1. Procjena osjetljivosti metode MLPA u odnosu na metodu PCR-RFLP ... 76
5.2. Učestalost mutacija u bolesnika s CMT u Republici Hrvatskoj ... 77
5.3. Glavne grupne karakteristike bolesnika prema utvrđenom genotipu ... 78
5.3.1. Zastupljenost prema spolu i dobi ... 78
5.3.2. Zastupljenost sporadičnih slučajeva ... 78
5.3.3. Zastupljenost asimptomatskih slučajeva ... 79
5.4. Zajedničke karakteristike neurografskog nalaza prema genotipu ... 79
5.5. Povezivanje genotipa i fenotipa prema poznatim mutacijama ... 80
5.5.1. Duplikacija gena *PMP22* (Skupina G1) ... 80
5.5.2. Delecija gena *PMP22* (Skupina G2) ... 81
5.5.3. Mutacije u genu *GJB1* (Skupina G4) ... 81
5.5.3.1. Mutacija p.Val13Met ... 81

5.5.3.2. Mutacija p.Ser49Pro 81
5.5.3.3. Mutacija p.Leu108Pro 82
5.5.3.4. Mutacija p.Val170Asp 82
5.5.3.5. Mutacija p.Arg183His 82
5.6. Nove mutacije u genima *PMP22* i *GJB1* 82
5.6.1. Mutacija p.Met1Thr u genu *PMP22* 84
5.6.2. Mutacija p.Phe20_Val21del u genu *PMP22* 84
5.6.3. Mutacija Phe29Ser u genu *GJB1* 84
5.6.4. Mutacija p.Phe141Ser u genu *GJB1* 85
5.6.5. Mutacija p.Val177Met u genu *GJB1* 85
5.6.6. Daljnji koraci analize patogenosti novih mutacija 85
5.7. Mutacija p.Thr118Met – mutacija upitnog značenja 86
6. ZAKLJUČCI 88
7. LITERATURA 89
POPIS KRATICA 102
ŽIVOTOPIS 103

1. UVOD

Nasljedne polineuropatije, poznate i po imenu M.Charcot-Marie-Tooth (M.CMT), tj. (poli)neuropatije CMT ili jednostavnije CMT, genetički su heterogena skupina bolesti perifernih živaca s prevalencijom oko 1 : 3300 u općoj populaciji (Bird, 1998.a). Fenotipski su puno homogenije, a većina je karakterizirana sporo progresivnom slabošću i atrofijom distalnih mišića, povezanim s blagim do umjerenim gubitkom osjeta, oslabljenim tetivnim refleksima i tipičnom deformacijom stopala (stopalo s visokim svodom, lat. *pes cavus*) (Harding i Thomas, 1980.). Očekivani životni vijek većine bolesnika s CMT nije skraćen.

CMT se uobičajeno klasificira na 4 osnovna tipa (CMT1, CMT2, intermedijarni tip i CMT4), a najčešći podtipovi su CMT1A (Charcot- Marie-Tooth tip 1A), HNPP (nasljedna neuropatija s kljenuti zbog pritiska, engl. *hereditary neuropathy with liability to pressure palsies*), CMTX1 i CMT1B.

CMT1A koja čini 70 do 80 % svih slučajeva CMT1 (Bird, 1998.a), uzrokovana je duplikacijom fragmenta DNA veličine 1,5 Mb na kraćem kraku kromosoma 17 (17p11.2-p12). HNPP je uzrokovana delecijom te iste regije. Iako je unutar navedene regije mapiran 21 različiti gen dokazano je da jedino broj kopija gena *PMP22* (engl. *peripheral myelin protein 22*) utječe na razvoj bolesti (Inoue i sur., 2001.). CMTX1 je uzrokovana mutacijama u genu *GJB1* (engl. *gap junction beta-1*), te je do danas identificirano preko 400 različitih patogenih mutacija. S obzirom na to da se bolest nasljeđuje na X-vezani dominantni način, simptomi su jače izraženi kod muškaraca (Bird, 1998.d). CMT1B uzrokovana je mutacijama u genu koji kodira protein MPZ (engl. *myelin protein zero*), ujedno i najzastupljeniji protein u mijelinu perifernog živčanog sustava (Bird, 1998.b).

Rezultati istraživanja europskih populacija pokazali su da je duplikacija gena *PMP22* najučestalija uzročna mutacija kod bolesnika s CMT, dok je zastupljenost ostalih mutacija i gena različita od populacije do populacije. U državama zapadne i sjeverne Europe gen *GJB1* je drugi po zastupljenosti (Braathen i sur., 2011.; Silander i sur., 1998.; Gess i sur., 2013.; Murphy i sur., 2012.; Sivera i sur., 2013.), međutim još uvijek nema objavljenih istraživanja o zastupljenosti najčešćih gena uzročnika CMT u Republici Hrvatskoj, kao ni u susjednim državama.

S obzirom na veliku genetičku heterogenost bolesti, za pristup molekularnoj dijagnostici CMT važno je detaljno kliničko i elektromioneurografsko (EMNG) ispitivanje koje ukazuje na nasljedni karakter neuropatije, sužava broj potencijalnih gena uzročnika te usmjerava i ubrzava molekularno-genetičku analizu, u čemu je od pomoći i pridržavanje

dijagnostičkog algoritma redoslijeda testiranja gena. Molekularna potvrda mutacija i karakterizacija elektrofiziološkog endofenotipa kod genskih mutacija *PMP22*, *GJB1* i *MPZ* mogla bi pomoći u rasvjetljavanju odnos povezanosti genotipa i fenotipa, što u konačnici može doprinijeti terapijskim mogućnostima.

1.1. Cilj rada

Cilj istraživanja je utvrditi vrstu i zastupljenost najčešćih mutacija u genima *PMP22*, *GJB1* i *MPZ* u populaciji naših bolesnika s dijagnozom polineuropatije CMT, koristeći se metodom višestrukog umnažanja vezanih sondi (engl. *multiplex ligation-dependent probe amplification*, MLPA) i sekvenciranja gena. Očekujemo sličnu zastupljenost najčešćih mutacija gena uzročnika CMT1 u Republici Hrvatskoj, kao i u drugim europskim državama, te otkrivanje još neopisanih, novih mutacija.

Ovim radom, također, želimo utvrditi povezanost najčešćih gena i/ili mutacija kod CMT1 i njihova elektrofiziološkog endofenotipa te na taj način pridonijeti razumijevanju patofizioloških mehanizama bolesti.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Nasljedne polineuropatije

Nasljedne polineuropatije, poznatije kao polineuropatije Charcot-Marie-Tooth (CMT), su genetički heterogena skupina bolesti perifernog živčanog sustava. Do danas je poznato više od 40 gena povezanih s CMT (Inherited Peripheral Neuropathies Mutation Database, 2011.). Iako genetički heterogena, ova skupina bolesti ipak je klinički relativno homogena. Zajedničko obilježje im je postepeno propadanje aksona perifernih živaca, osobito najdužih, koji su odgovorni za inervaciju stopala i šaka. Propadanju aksona može prethoditi demijelinizacija tj. oštećenje mijelinske ovojnice ili hipomijelinizacija (slabije stvaranje mijelina), ali glavni uzrok kliničkih simptoma - progresivne slabosti i atrofije mišića te poremećaja osjeta najvjerojatnije je oštećenje i u konačnici gubitak aksona (Mitrović i sur., 1998.; Mitrović i sur., 2015.).

2.2. Povijesni pregled

Bolest je prvi put opisana 1886. g. neovisno u Francuskoj i Velikoj Britaniji od troje znanstvenika (J. M. Charcot, P. Marie i H. H. Tooth, slika 1) pod nazivom „peronealni oblik progresivne mišićne atrofije“ (Charcot i Marie, 1886.; Pearce, 2000.). Često je bila uočena kod više članova obitelji, što je uputilo na dominantno nasljeđivanje. Zbog mišićne atrofije, bolest je u početku svrstavana u mišićne distrofije. S razvojem kliničkih, patoloških i genetičkih saznanja o nasljednim neuropatijama i miopatijama, kao i uvođenjem tehnologije mjerenja brzine provodljivosti perifernih živaca (engl. *nerve conduction velocity*, NCV), pojavila se jasna granica između ta dva glavna entiteta neuromuskularnih bolesti (Lidge i Chandler, 1953.).



Slika 1. Jean-Martin Charcot, Pierre Marie, Howard Henry Tooth (preuzeto iz http://www.slideserve.com/charles-burke/doen-a-de-charcot-marie-tooth)

Američki neurolozi P. J. Dyck i E. H. Lambert su 1968. godine prvi na temelju elektrofizioloških studija uočili da je kod određenih obitelji s CMT brzina provodljivosti u perifernim živcima usporena, dok je kod drugih normalna (Dyck i Lambert, 1968.). Na temelju tih saznanja i neuropatoloških kriterija, uveli su naziv „nasljedna motorička i senzorička neuropatija“ (engl. *hereditary motor and sensory neuropathy*, HSMN) i klasificirali neuropatije CMT na dva osnovna oblika: autosomno dominantni s usporenom brzinom provodljivosti tj. HSMN tip 1 ili CMT1 te autosomno dominantni oblik s održanom brzinom provodljivosti tj. HSMN tip 2 ili CMT2 (Banchs i sur., 2009.).

A. E. Harding i P. K. Thomas su 1980. g. ustanovili da je brzina provodljivosti *n.medianus* ispod 38 m/s povezana s demijelinizirajućim oblikom bolesti označenim kao CMT1, dok je iznad 38 m/s povezana s aksonalnim oblikom označenim kao CMT2 (Harding i Thomas, 1980.).

2.3. Klasifikacija CMT prema fenotipu

Prema fenotipu, CMT se dijeli na 4 osnovna oblika: CMT1, CMT2, intermedijarni oblik i CMT4.

Za demijelinizirajući oblik ili CMT1 karakteristična je NCV *n.medianus* manja od 38 m/s. Aksonalni oblik CMT2 je prepoznat po NCV iznad 45 m/s te smanjenom amplitudom mišićnog i senzoričkog odgovora, tzv. „složenog mišićnog akcijskog potencijala“ (engl. *compound muscle action potential*, CMAP) odnosno neuralnog ili senzoričkog potencijala (engl. *sensory nerve action potential,* SNAP).

Intermedijarni oblik kojemu pripada i CMTX (X-vezani dominantni oblik bolesti) karakteriziran je po rasponu NCV od 25 do 45 m/s. Najrjeđi CMT je autosomno recesivni oblik CMT4, kod kojeg NCV može biti i u demijelinizirajućem i u aksonalnom području (Jerath i Shy, 2015.).

Sindrom Dejerine-Sottas (DSS) se ranije smatrao zasebnim oblikom CMT (CMT3), međutim danas se taj naziv odnosi na entitet teškog fenotipa CMT već u ranoj dječjoj dobi, koji je karakteriziran s distalnom slabošću, hipotonijom, usporenim motoričkim razvojem, arefleksijom i deformitetom stopala. NCV je izrazito usporena (5 do 10 m/s) te je uobičajena senzorineuralna gluhoća. Većinom je uzrokovan heterozigotnim mutacijama u genima *PMP22*, *MPZ* ili *EGR2* te odgovara autosomno dominantnom nasljeđivanju. Većina slučajeva pojavljuje se sporadično zbog *de novo* spontanih mutacija. Autosomno recesivni oblici su rijetki, najčešće uzrokovani mutacijama u genima *PRX*, *EGR2* i *GDAP1* (Bassam, 2014.).

2.4. Klasifikacija CMT prema genotipu

Svi geni koji su uključeni u patogenezu CMT pripadaju različitim funkcijskim klasama neophodnim za razvoj i funkcioniranje perifernih živaca. Za ilustraciju broja i vrste uključenih gena, u tablicama 1 do 5 predočena je aktualna klasifikacija CMT prema genotipu.

Tablica 1. Demijelinizirajući autosomno dominantni oblik CMT (CMT1)

Podtip	Gen	Lokus	OMIM
CMT1A	PMP22	17p12	601097
CMT1B	MPZ (P0)	1q23.3	159440
CMT1C	LITAF / SIMPLE	16p13.13	603795
CMT1D	EGR2	10q21.3	129010
CMT1E	PMP22	17p12	601097
CMT1F	NEFL	8p21.2	162280
HNPP	PMP22	17p12	601097

Tablica 2. Aksonalni autosomno dominantni oblik CMT (CMT2)

Podtip	Gen	Lokus	OMIM
CMT2A1	KIF1B	1p36.22	605995
CMT2A2	MFN2	1p36.22	608507
CMT2B	RAB7	3q21.3	602298
CMT2C	TRPV4	12q24.11	605427
CMT2D	GARS	7p14.3	600287
CMT2E	NEFL	8p21	162280
CMT2F	HSPB1	7q11.23	602195
CMT2H/2K	GDAP1	8q21.11	606598
CMT2I / CMT2J	MPZ (P0)	1q23.3	159440
CMT2L	HSPB8	12q24.23	608014
CMT2N	AARS	16q22.1	601065
CMT2O	DYNC1H1	14q32.31	600112
CMT2P	LRSAM1	9q33.3-q34.1	610933
CMT2S	IGHMBP2	11q13.3	600502
CMT2T	DNAJB2	2q35	604139
CMT2U	MARS	12q13.3	156560

Tablica 3. Intermedijarni oblik CMT (DI-CMT)

Podtip	Gen	Lokus	OMIM
DI-CMTA	-	10q24.1-q25.1	-
DI-CMTB	DNM2	19p13.2	602378
DI-CMTC	YARS	1p35.1	603623
DI-CMTD	MPZ (P0)	1q23.3	159440
DI-CMTF	GNB4	3q26.33	610863

Tablica 4. X-vezani oblik CMT (CMTX)

Podtip	Gen	Lokus	OMIM
CMTX1	GJB1	Xq13.1	304040
CMTX4	AIFM1	Xq26.1	300169
CMTX5	PRPS1	Xq22.3	311850
CMTX6	PDK3	Xp22.11	300906

Tablica 5. Autosomno recesivni oblik CMT (CMT4)

Podtip	Gen	Lokus	OMIM
CMT4A	GDAP1	8q21.11	606598
CMT4B1	MTMR2	11q21	603557
CMT4B2	SBF2	11p15.4	607697
CMT4C	SH3TC2	5q32	608206
CMT4D	NDRG1	8q24.22	605262
CMT4E	EGR2	10q21.3	129010
CMT4F	PRX	19q13.2	605725
CMT4H	FGD4	12p11.21	611104
CMT4J	FIG4	6q21	609390

2.5. Epidemiologija CMT

CMT se smatra najčešćom nasljednom neuromuskularnom bolesti (van Paassen i sur., 2014.). Rezultati opsežne norveške studije iz 1974. g. ukazali su na prevalenciju bolesti u općoj populaciji od 36 : 100 000 (Skre, 1974.). Pregled svjetske literature koji je uključio više od 150 ispitivanja procjenjuje prevalenciju od 10 : 100 000 (Emery, 1991.), dok je japanska epidemiološka studija pokazala prevalenciju od 10,8 : 100 000 u zapadnom Japanu (Kurihara i sur., 2002.). Godine 2016. objavljen je sistematski pregled literature objavljenih ispitivanja na populacijama Europe (Tablica 6). Prevalencija CMT kretala se od 9,7 : 100 000 u Srbiji, pa čak do 82,3 : 100 000 u Norveškoj. Udio tipa CMT1 kretao se od 37,6 % do 84 %, s tim da je najmanja prevalencija bila u Norveškoj, a najveća na Islandu, dok je tip CMT2 (12 % do 35,9 %) bio najmanje prisutan u Ujedinjenom Kraljevstvu, a najviše u Norveškoj (Barreto i sur.,

2016.). Na različite postotke i omjere najvjerojatnije utječe razvijenost zdravstvene službe i s time povezana pristupačnost diferencijalne dijagnostike različitih tipova CMT.

Tablica 6. Genetička epidemiologija CMT u općoj populaciji (preuzeto iz Barreto i sur., 2016., uz izmjene)

Država	Broj oboljelih pojedinaca	Broj zahvaćenih obitelji	Prevalencija CMT na 100.000 stanovnika	CMT1 (%) (prevalencija/ 100.000)	CMT2 (%) (prevalencija/ 100.000)	Ostali tipovi (%)
Norveška	245	116	82,3	37,6	35,9	2,9
Švedska	104	52	20,1	81	15	4
Ujedinjeno Kraljevstvo	133	49	18,1	56	12	31
Italija	58	13	17,5	64	25	1
Turska	-	33	16	52	33	15
Egipat	5	-	12	-	-	-
Island	37	18	12	84	16	-
Engleska	352	275	11,8	56,7	17,6	25,8
Japan	19	11	10,8	-	-	-
Srbija	161	-	9,7	73	23	4
Njemačka	776	-	-	60	26	14
Italija	100	30	-	-	-	-
Ukupno	1.990	597				

U europskim populacijama najučestaliji podtip je CMT1A uzrokovan duplikacijom gena *PMP22*, slijedi ga HNPP, dok su *GJB1* i *MPZ* drugi i treći gen po zastupljenosti u državama zapadne i sjeverne Europe (Braathen i sur., 2011.; Silander i sur., 1998.; Gess i sur., 2013.; Murphy i sur., 2012.; Sivera i sur., 2013.).

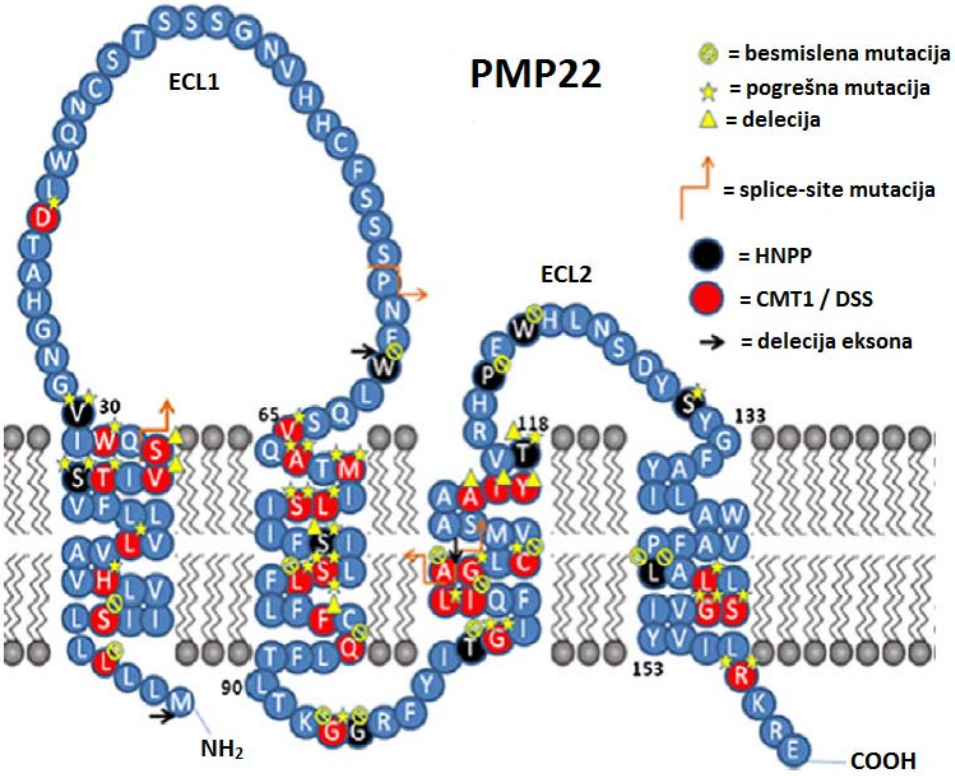
2.6. Opis gena i proteina povezanih s čestim oblicima CMT1

2.6.1. Gen i protein PMP22

Gen *PMP22* smješten je na kraćem kraku kromosoma 17p12, a sastoji se od pet eksona konzerviranih kod ljudi i glodavaca. Postoje dva identična transkripta gena u kodirajućoj regiji, ali se razlikuju u 5' netranslatiranoj regiji što upućuje na postojanje dva promotora (P1 i P2) koji reguliraju ekspresiju pojedinog transkripta. Dva eksona 1 (1a i 1b) se nalaze u nekodirajućoj regiji, dok kodirajuća regija obuhvaća ekson 2 do eksona 5. Ekson 2 kodira prvu transmembransku domenu proteina PMP22, a ekson 3 prvu ekstracelularnu domenu. Ekson 4 kodira drugu transmembransku, intracelularnu i dio treće transmembranske domene, dok ekson 5 kodira ostatak treće transmembranske domene, drugu ekstracelularnu domenu, četvrtu transmembransku domenu i 3' netranslatiranu regiju (Jetten i Suter, 2000.; Li i sur., 2013.). C-terminalni kraj i N-terminalni kraj proteina PMP22 smješteni su intracelularno (Slika 2). Prva ekstracelularna domena (ECL1) posreduje homofilnu interakciju između dva proteina PMP22, dok druga ekstracelularna domena (ECL2) posreduje heterofilnu interakciju između proteina PMP22 i MPZ (D'Urso i Muller, 1997.).

Protein PMP22 čini 2 do 5 % svih mijelinskih proteina perifernog živčanog sustava (Jerath i Shy, 2015.). U najvećem dijelu se eksprimira u Schwannovim stanicama (Snipes i sur., 1992.), međutim određena količina PMP22 mRNA je utvrđena i u drugim tkivima, uključujući i epitel (Notterpek i sur., 2001.). Transkript PMP22 koji sadrži ekson 1a pretežno se nalazi u mijelinizirajućim Schwannovim stanicama i najviše doprinosi visokoj razini PMP22 u mijeliniziranim perifernim živcima. Transkript PMP22 koji sadrži ekson 1b je prisutan u svim tkivima koja eksprimiraju PMP22. Pretpostavlja se da je promotor P1 nastao tijekom evolucije omogućujući visoku ekspresiju PMP22 u mijelinizirajućim Schwannovim stanicama. Time je dana dodatna funkcija proteinu kao strukturnoj komponenti kompaktnog mijelina (Naef i Suter, 1998.). U Schwannovim stanicama PMP22 ima važnu ulogu u formiranju i održavanju kompaktnosti mijelina u perifernom živčanom sustavu (van Paassen i sur., 2014.). Gubitak mijelina (demijelinizacija) smanjuje sposobnost perifernih motoričkih živaca za potpunu aktivaciju skeletnih mišića, a kod osjetnih živaca desinkronizira i usporava prijenos informacija od senzoričkih receptora prema mozgu (Genetics Home Reference, 2016.). Funkcionalna uloga PMP22 još nije sasvim razjašnjena, međutim, studije ukazuju na moguću ulogu u regulaciji rasta i diferencijacije Schwannovih stanica (van Paassen i sur., 2014.).

Protein je prvi put izoliran iz mišjih fibroblasta NIH3T3 kao produkt jednog od specifičnih gena zaustavljanja rasta (engl. *growth arrest specific gene, GAS3*) (Schneider i sur., 1988.). Sličan transkript je također izoliran i iz živčanih stanica štakora. Naknadno je utvrđeno da se protein nalazi u kompaktnom mijelinu perifernih živaca i ima molekularnu masu od 22 KDa, pa je na temelju toga dobio današnje ime - PMP22 (Snipes i sur., 1992.).

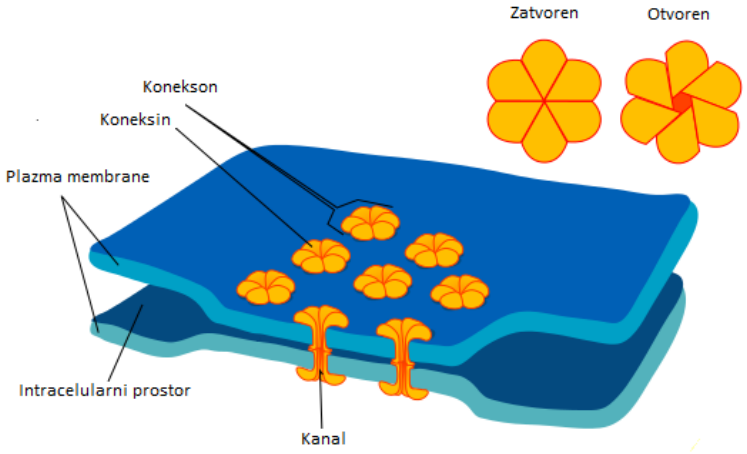


Slika 2. Protein PMP22 (preuzeto iz Li i sur., 2013., uz izmjene)

2.6.2. Gen i protein GJB1

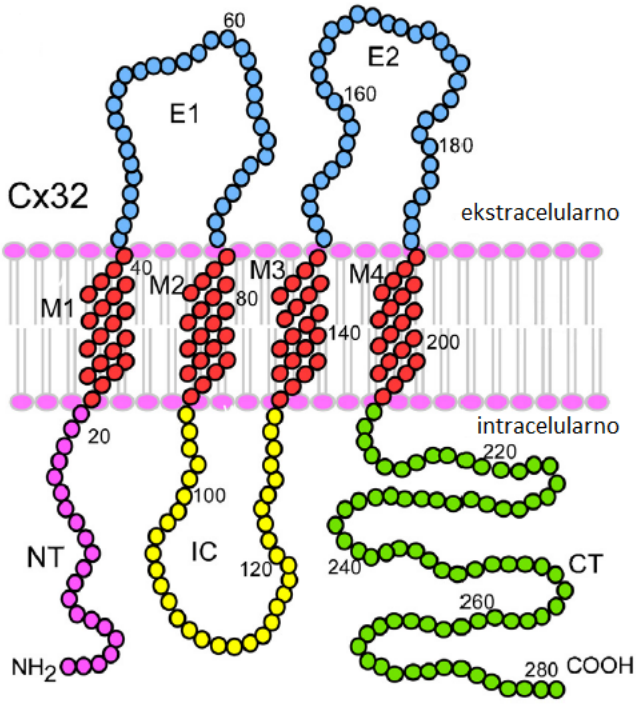
Gen *GJB1* lociran je na kromosomu Xq13.1, a kodira protein koneksin 32 (Cx32). *GJB1* se sastoji od dva eksona i visoko je konzerviran (sekvence aminokiselina ljudskog proteina Cx32 su 98 % identične s mišjim ili štakorskim Cx32). Postoje dva alternativna promotora *GJB1* kod miševa, štakora i ljudi, P1 i P2. Promotor P1 je aktivan u svim tkivima koja eksprimiraju Cx32 osim u perifernim živcima, dok je P2 aktivan u mozgu, leđnoj moždini i perifernim živcima. Kodirajuća regija i 3' netranslatirana regija nalaze se u eksonu 2 koji je prisutan u oba transkripta. Ekson 1 u oba transkripta (1a i 1b) sadrži samo 5' netranslatiranu regiju (Bone i sur., 1997.).

U Schwannovim stanicama, protein Cx32 je eksprimiran u nekompaktnom mijelinu u području Ranvierovih čvorova i ima važnu ulogu u staničnoj signalizaciji formirajući kanale odnosno spojeve s pukotinom (engl. *gap junction*) između vanjskih mijelinskih slojeva i unutrašnjosti Schwannovih stanica (Genetics Home Reference, 2009.). Šest koneksina formira hemikanal (konekson), a dva hemikanala, smještena jedan nasuprot drugog na staničnoj membrani, formiraju kanal (Slika 3). Promjer kanala je 1,2 nm, što ga čini premalim za transport proteina i nukleinskih kiselina, ali dovoljno velikim za difuziju iona i drugih malih molekula (manjih od 1000 Da) (Bone i sur., 1997.). Radijalni transport kroz kanale za 300 do 1000 puta skraćuje put između jezgre Schwannove stanice i membrane najbliže aksonu (Abrams i Freidin, 2015.).



Slika 3. Prikaz dijela plazmatske membrane sa spojevima s pukotinom (engl. *gap junction*) tj. kanalima (preuzeto iz https://www.khanacademy.org/science/biology/structure-of-a-cell/cytoskeleton-junctions-and-extracellular-structures/a/cell-cell-junctions, uz izmjene)

Protein sadrži dvije ekstracelularne, četiri transmembranske i jednu intracelularnu domenu kao i intracelularni N-terminalni i C-terminalni kraj (Slika 4). N-terminalni kraj je uključen u inserciju početnog polipeptidnog lanca u endoplazmatski retikulum te zajedno s prvom transmembranskom domenom regulira razinu napona u stanici. Ekstracelularne domene (petlje) reguliraju interakcije između koneksona i formaciju kanala. Svaka petlja sadrži tri cisteinska ostatka, koji su konzervirani u svim koneksinima, a formiraju esencijalne intramolekularne disulfidne veze. Intracelularna domena i C-terminalni kraj reguliraju razinu pH (Bone i sur., 1997.).

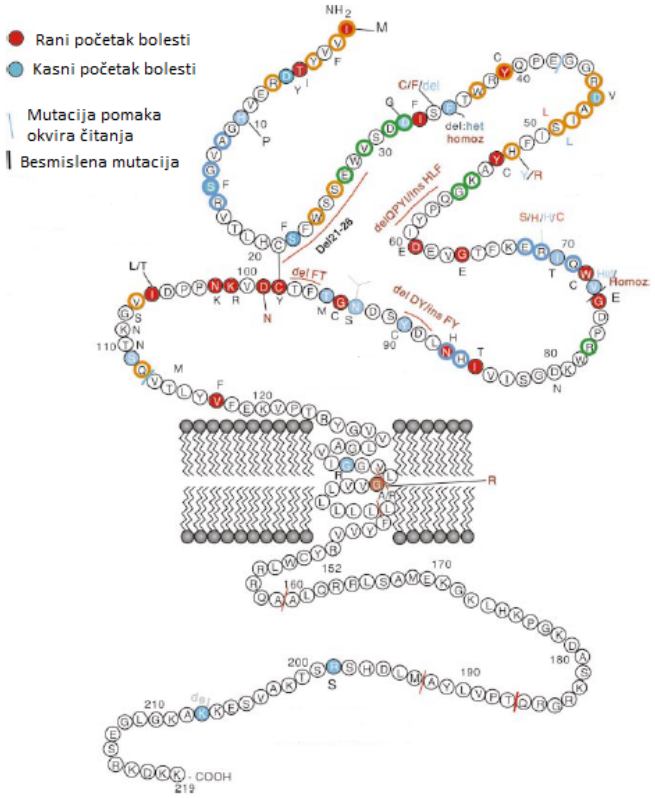


Slika 4. Protein Cx32 (preuzeto iz Kleopa i Sargiannidou, 2015., uz izmjene)

2.6.3. Gen i protein MPZ

Gen *MPZ* lociran je na kromosomu 1q22 i sadrži šest eksona. Svaki ekson gena *MPZ* odgovara određenoj funkcionalnoj domeni: ekson 1 kodira 5'-netranslatiranu regiju i veći dio amino-terminalne signalne sekvence, eksoni 2 i 3 kodiraju ekstracelularnu domenu, ekson 4 transmembransku domenu, ekson 5 dio intracelularne domene, a ekson 6 ostatak intracelularne domene i 3'-netranslatiranu regiju (Slika 5). Ekstracelularna domena sadrži N-glikozilacijsko mjesto i dva cisteina koji su odgovorni za strukturni integritet domene (Hayasaka i sur., 1993.). Njena funkcija je i posredovanje u homotipičnoj adheziji, što je osnovni proces za formiranje kompaktnog mijelina u Schwannovim stanicama (Shy, 2006.).

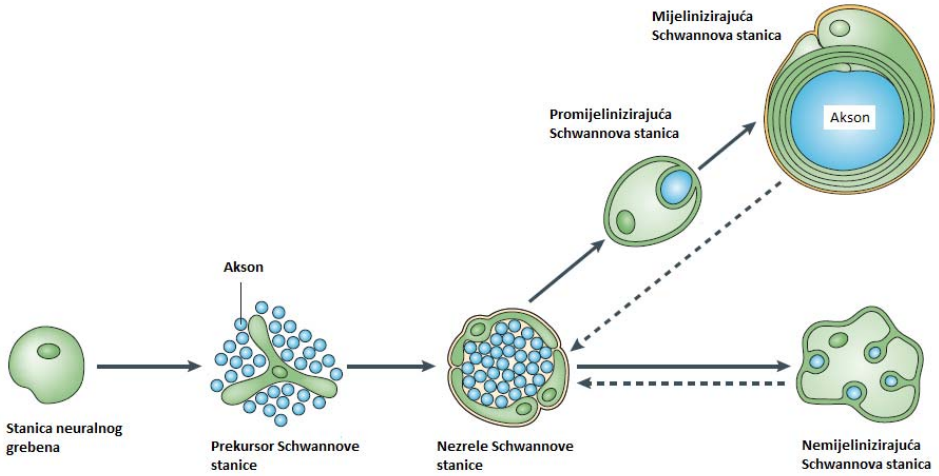
Protein MPZ čini više od 25 % mijelinskih proteina u perifernim živčanim vlaknima i izgrađuje većinu kompaktnog mijelina (Banchs i sur., 2009.). U perifernom mijelinu MPZ postoji kao tetramer koji sabija dodatne mijelinske slojeve pomoću homofilnih interakcija (Brennan i sur., 2015.). Slijed aminokiselina u proteinu MPZ je 95 % identičan kod ljudi, štakora i krava (Shy, 2006.).



Slika 5. Protein MPZ (preuzeto iz Shy i sur., 2004., uz izmjene)

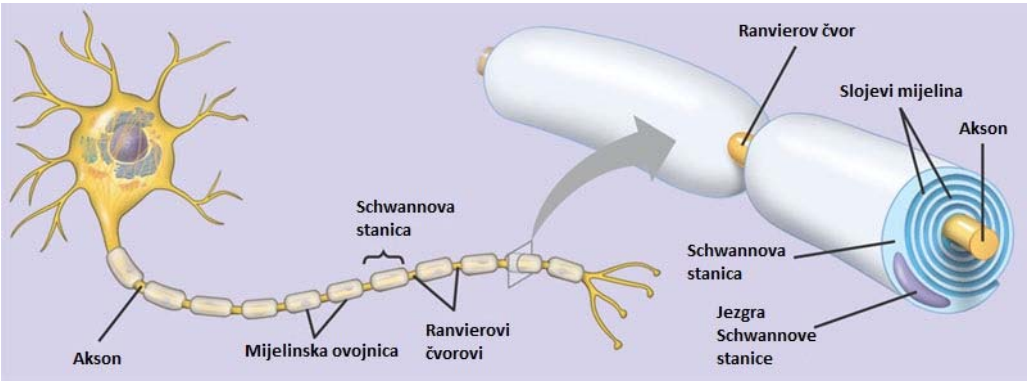
2.7. Schwannova stanica

Schwannove stanice su glija stanice perifernog živčanog sustava, prvi puta opisane 1839. godine. Tijekom njihovog razvoja, prekursori Schwannovih stanica migriraju iz neuralnog grebena do aksona u perifernom živčanom sustavu. Nezrele Schwannove stanice obavijaju nakupine aksona i diferenciraju se u mijelinizirajuće ili nemijelinizirajuće (Slika 6) ovisno o tome stvore li vezu s aksonom ili ne (Shy i sur., 2002.). Proces diferencijacije ovisi samo o debljini aksona, tj. aksoni s promjerom većim od 1 μm bit će obavijeni mijelinskom ovojnicom (Jerath i Shy, 2015.).



Slika 6. Sazrijevanje Schwannovih stanica (preuzeto iz Jessen i Mirsky, 2005., uz izmjene)

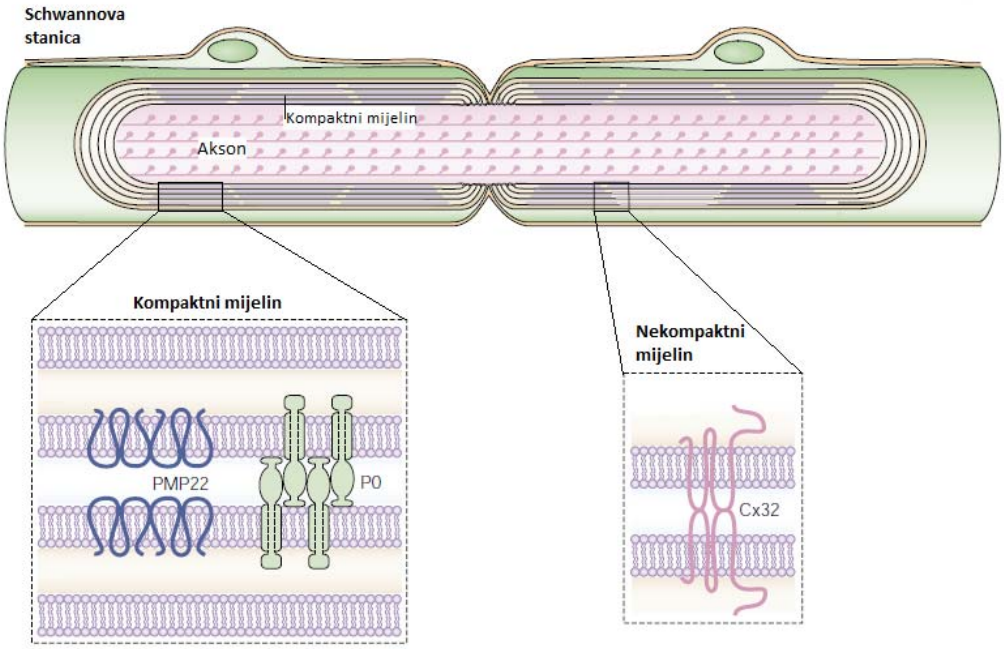
Mijelinska ovojnica je višeslojna, spiralna, lipidima bogata stanična membrana koja sprječava preskakanje živčanog impulsa s jednog živčanog vlakna na drugo u perifernom živcu te usmjerava i ubrzava provođenje živčanog impulsa. Ovojnica je isprekidana Ranvierovim čvorovima, tj. nemijeliniziranim područjima preko kojih je membrana aksona u izravnom dodiru s izvanstaničnom tekućinom što omogućuje brzo i skokovito provođenje akcijskih potencijala (Slika 7). Osim u procesu razvoja, mijelinizacija je važna i za popravak oštećenih živaca, putem remijelinizacije demijeliniziranih aksona (Li i sur., 2013.).



Slika 7. Prikaz mijelinske ovojnice i Ranvierovih čvorova (preuzeto iz https://www.pinterest.com/pin/330662797612797404/, uz izmjene)

Mijelinska ovojnica se sastoji od kompaktnih i nekompaktnih dijelova (Slika 8). U kompaktnom dijelu nalaze se mijelinski strukturni protein (MPZ), periferni mijelinski protein 22 (PMP22) i mijelinski bazični protein (MBP) koji sudjeluju u formiranju visoko

organizirane mijelinske ovojnice. Kompaktni dijelovi čine većinski udio mijelina, te uz proteine sadrže i druge spojeve kao što su kolesterol, sfingolipidi, galaktocerebrozidaze i sulfatidi (Jerath i Shy, 2015.).



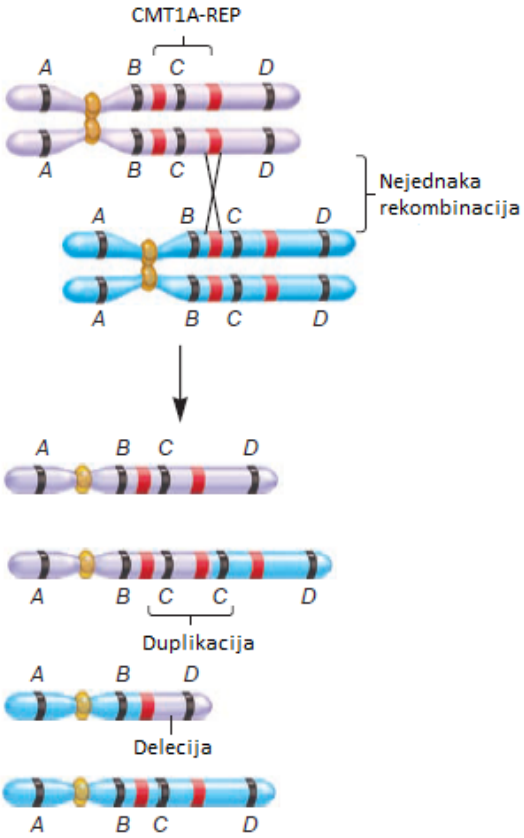
Slika 8. Kompaktni i nekompaktni mijelin (preuzeto iz Suter i Scherer, 2003., uz izmjene)

Nekompaktni mijelin se formira zbog velike udaljenosti između stanične jezgre i Schwannovih stanica i sadrži međuprostore koji omogućuju radijalni prolaz vode, iona i malih molekula. Dijeli se na dva područja: paranodalni i jukstaparanodalni. U paranodalnom dijelu se nalaze proteini Schwannovih stanica: mijelinu pridruženi glikoprotein (engl. *myelin associated glycoprotein,* MAG), koneksin 32, neurofascin 155, te aksonalni proteini Caspr i kontaktin. Ovi proteini sudjeluju u interakciji između Schwannovih stanica i aksona ili drugih Schwannovih stanica te električki izoliraju nodalnu regiju. Jukstaparanodalni dio sadrži kalijeve kanale i Caspr2, koji su eksprimirani u aksonima (Shy i sur., 2002.).

2.8. Etiopatogeneza i patofiziologija demijelinizirajućih oblika CMT

2.8.1. Duplikacija gena *PMP22* kao uzrok CMT1A

CMT1A je uzrokovana duplikacijom fragmenta DNA veličine 1,5 Mb na kraćem kraku kromosoma 17 (17p11.2-p12) (Lupski i sur., 1991.; Raeymaekers i sur., 1991.; Wise i sur., 1993.) gdje je lociran i gen *PMP22* (Bird, 1998.b). Bolest se nasljeđuje autosomno dominantno. Duplikacija, koja se u oko trećine bolesnika pojavljuje *de novo* (Bird, 1998.b), posljedica je nejednake rekombinacije odnosno *crossing-over*-a između homolognih regija odnosno ponavljajućih sekvenci nazvanih CMT1A-REP (Slika 9). Na svakom alelu kromosoma 17 postoje dvije regije CMT1A-REP, proksimalna i distalna, koje su oko 99 % identične i koje omeđuju fragment DNA veličine 1,5 Mb. Ako se tijekom mejoze homologni kromosomi pogrešno poravnaju, dolazi do nejednake rekombinacije kromosoma. Rezultat toga je duplikacija omeđenog fragmenta DNA na jednom kromosomu, odnosno delecija tog istog fragmenta na drugom (Timmerman i Lupski, 2006.).



Slika 9. Nejednaka rekombinacija dovodi do CMT1A duplikacije odnosno HNPP delecije

Nakon što je utvrđen smještaj gena *PMP22* u navedenom fragmentu DNA (Matsunami i sur., 1992.; Patel i sur., 1992.; Timmerman i sur., 1992.; Valentijn i sur., 1992.), dokazan je utjecaj broja kopija *PMP22* na razvoj bolesti, iako je na tom dijelu DNA mapiran još 21 gen (Inoue i sur., 2001.). Istraživanjem nesrodnih bolesnika s CMT1A i HNPP u Sjevernoj Americi i Europi potvrđeno je postojanje visoko konzerviranog *hotspot*-a za rekombinaciju unutar regije CMT1A-REP koji se nalazi blizu mariner transpozona (engl. *miniature inverted-repeat transposable elements*, MITE) (Reiter i sur., 1996.; Timmerman i sur., 1997.). Međutim, nove tehnologije, kao što je komparativna genomska hibridizacija na mikropostroju (engl. *microarray-based comparative genomic hybridisation* - array CGH), otkrivaju kako duplicirana regija nije uvijek veličine 1,5 Mb, odnosno ne mora biti povezana s regijom REP, ali uvijek sadrži gen *PMP22* (Choi i sur., 2011.).

Svi tipovi mutacija u genu *PMP22* (duplikacija, delecija i točkaste mutacije) rezultiraju povećanom apoptozom kulture Schwannovih stanica, fibroblasta i mijelinizirajućih Schwannovih stanica u miševa i ljudi oboljelih od CMT1A (Li i sur., 2013.). Duplikacija uzrokuje prekomjernu ekspresiju proteina PMP22 i njegovu akumulaciju u Schwannovim stanicama, što inducira stres endoplazmatskog retikuluma te rezultira programiranom staničnom smrću tj. apoptozom (Berciano i sur., 2012.).

Bolesnici s mutacijom na oba alela gena *PMP22* su rijetki. Ukupno je opisano četiri slučaja koji uz deleciju jednog alela imaju i mutaciju na drugom alelu (Roa i sur., 1993.; Abe i sur, 2010.; Al-Thihli i sur., 2008.; Saporta i sur., 2011.). U tri slučaja to su složeni heterozigoti, s delecijom cijelog gena *PMP22* na jednom i točkastom mutacijom, odnosno delecijom pojedinih eksona gena *PMP22* na drugom alelu. Četvrti slučaj je delecija cijelog gena *PMP22* na oba alela, što rezultira potpunim gubitkom funkcije proteina.

Opisano je i nekoliko bolesnika koji su složeni heterozigoti za duplikaciju *PMP22* i točkastu mutaciju u genu *PMP22* (Gouvea i sur., 2009.; Shy i sur., 2006.), kao i homozigoti za točkastu mutaciju (Shy i sur., 2006.; Parman i sur., 1999.). Homozigotna duplikacija gena *PMP22* se također rijetko pojavljuje, ali ne izaziva uvijek teži klinički fenotip (Sturtz i sur., 1997.; LeGuern i sur., 1997.; Lupski i sur., 1991.).

Objavljeno je nekoliko modela s prekomjernom ekspresijom gena *PMP22* u glodavaca (Serada i sur., 1996.; Huxley i sur., 1996.; Magyar i sur., 1996.; Robertson i sur., 2002.). Utvrđeno je da su štakori bolji model za CMT1A jer s tri kopije *PMP22* pokazuju veću sličnost s patološkim obilježjima u čovjeka. Mišji model uobičajeno sadrži velik broj kopija *PMP22* (čak do 16 kopija) jer manji broj kopija ne uzrokuje značajni fenotip te zbog toga nisu najpouzdanija prezentacija ljudskog CMT1A.

Također postoje i mišji modeli s točkastim mutacijama, Trembler (s mutacijom p.Gly150Asp) (Suter i sur., 1992.a) i Trembler-J (s mutacijom p.Leu16Pro) (Suter i sur., 1992.b), međutim oni ne predstavljaju dobar životinjski model za CMT1A jer kod njih dolazi do pogrešnog namatanja proteina PMP22, a ne do njegove prekomjerne ekspresije.

2.8.2. Delecija gena *PMP22* kao uzrok HNPP

Delecija iste regije kromosoma 17 koja je duplicirana kod CMT1A (Chance i sur., 1993.) smanjuje ekspresiju proteina PMP22, proizvodi se nestabilni mijelin što uzrokuje nasljednu neuropatiju sa sklonošću kljenuti na pritisak (engl. *hereditary neuropathy with liability to pressure palsies,* HNPP). HNPP je zaseban tip nasljedne neuropatije koji se klinički manifestira kao blaži oblik CMT1A (Berciano i sur., 2012.), a prvi put je opisana 1947. godine (De Jong, 1947.). U 20 % slučajeva, HNPP je uzrokovan i točkastim mutacijama u genu *PMP22*. Kod većine bolesnika mutacija je naslijeđena od oca ili majke, ali može se pojaviti i *de novo* (20 % slučajeva) te se nasljeđuje kao autosomno dominantna bolest (Bird, 1998.c). Karakterizirana je rekurentnom senzoričkom i motoričkom neuropatijom koja se, najčešće akutno, javlja na jednom živcu (mononeuropatija) (Pareyson i sur., 1996.). Fokalna utrnulost i mišićna slabost najčešće se javljaju u mlađoj odrasloj dobi. Simptomi HNPP su najvjerojatnije povezani s mehaničkim stresom predisponiranog živca uslijed pritiska, istezanja ili ponavljajućih pokreta. Najčešće se pojavljuju u inervaciji peronealnog živca kod traume iza glavice fibule, medijanog živca u karpalnom kanalu ručnog zgloba i ulnarnog živca u laktu (Mandich i sur., 1995.; Li i sur., 2004.). Naporna fizička aktivnost praćena „stresom“ aksona, može dovesti do paralize ekstremiteta (Horowitz i sur., 2004.). Kod većine bolesnika simptomi uglavnom nestaju nakon par dana ili tjedana. Potpuni oporavak se događa u 50 % slučajeva, a zaostali simptomi su rijetko kada teški (Bird, 1998.c).

Delecija jedne kopije gena *PMP22* smanjuje količinu dostupnog proteina za produkciju mijelina, dok točkaste mutacije uzrokuju ekspresiju vrlo malog ili promijenjenog proteina koji se brzo razgrađuje (Genetics Home Reference, 2016.).

Mišji model HNPP s homozigotnom delecijom (pmp22-/- knockout) pokazuje tešku demijelinizirajuću neuropatiju s vrlo malim brzinama provodljivosti i uočljivim fokalnim zadebljanjima mijelina (tomakula) (Slika 11). Miš s heterozigotnom delecijom (pmp22+/-) ima blaže simptome, s minimalnim usporavanjem brzina provodljivosti i manje vidljivom demijelinizacijom, ali prisutnim tomakulama (Chance, 2006.).

2.8.3. Točkaste mutacije u genu *PMP22* kao uzrok CMT1E

CMT1E se javlja u manje od 5 % svih slučajeva CMT1, a uzrokovana je točkastim mutacijama u genu *PMP22* (Bird, 1998.b). Kod čovjeka su otkrivene razne točkaste mutacije gena *PMP22*, čije kliničke manifestacije sežu od blagih nalik HNPP do teških demijelinizirajućih neuropatija (Russo i sur., 2011.). Ranije se smatralo da točkaste mutacije *PMP22* uzrokuju CMT1A, međutim nedavno je utvrđena razlika između CMT1A uzrokovane duplikacijom od one uzrokovane točkastim mutacijama, kako na molekularnoj, tako i na patofiziološkoj razini (Li i sur., 2013.).

Različite točkaste mutacije mogu uzrokovati dobitak funkcije proteina (engl. *gain of function*), smanjenu funkciju ili gubitak funkcije (engl. *loss of function*), kao i obje kombinacije. Objavljeni su slučajevi gdje mutacija istog nukleotida može uzrokovati potpuno različitu kliničku manifestaciju bolesti (Li i sur., 2013.; Nodera i sur., 2003.; Kovach i sur., 1999.), kao i slučajevi gdje bolesnici pokazuju sličan fenotip (Li i sur., 2013.; Bort i sur., 1997.; Marques i sur., 1998.). Skoro sve mutacije promjene smisla (engl. *missense*) u *PMP22* se nasljeđuju autosomno dominantno (Russo i sur, 2011.). Iako mutacije u *PMP22* utječu različito na ekspresiju proteina, većina ih ipak uzrokuje dobitak funkcije proteina, što rezultira nemogućnošću transporta proteina PMP22 iz endoplazmatskog retikuluma u plazmatsku membranu. Umjesto toga, mutirani proteini stvaraju heterodimere s proteinima PMP22 divljeg tipa koji su akumulirani u intermedijarnim pregradama između endoplazmatskog retikuluma i Golgijevog tijela, što uzrokuje stvaranje proteinskih nakupina, te se sprječava transport dijela proteina divljeg tipa do plazmatske membrane (Shames i sur., 2003.). Različite mutacije različito djeluju na formiranje proteinskih nakupina. Razina nakupljanja proteina ne korelira s težinom neuropatije, što upućuje na postojanje i nekih drugih čimbenika u patogenezi bolesti (Liu i sur., 2004.).

Bolesnici pokazuju simptome usporenog motoričkog razvoja, slabost distalnih mišića, deformacije stopala i gubitak dubokih tetivnih refleksa. Također su primijećeni i senzorički nedostaci (Li i sur., 2013.).

2.8.4. Mutacije u genu *GJB1* kao uzrok CMTX1

CMTX1 je rezultat mutacija u genu *GJB1*, a karakterizirana je umjerenim do teškim motoričkim i senzoričkim neuropatijama u oboljelih muškaraca, dok žene nositelji mutacije pokazuju blaže simptome ili su asimptomatske (Bird, 1998.d). Moguće objašnjenje varijabilnog fenotipa u žena nalazi se u inaktivaciji kromosoma X u mijelinizirajućim Schwannovim stanicama. Inaktivacija kromosoma X se događa nasumce u ranom embrionalnom razvoju te omogućava podjednaku ekspresiju gena spolnih kromosoma kod muškaraca i žena (Murphy i sur., 2012.). Kod nekih bolesnika s CMTX1 može se pojaviti i senzorineuralna gluhoća. CMTX1 obuhvaća 10 % do 20 % svih slučajeva CMT što je čini drugim najčešćim uzrokom CMT (Bird, 1998.d). Nasljeđuje se X-vezano dominantno, a *de novo* mutacije se javljaju u oko 5 % slučajeva (Dubourg i sur., 2001.). Brzina provodljivosti živaca kreće se između 30 i 40 m/s, što odgovara intermedijarnom obliku CMT. U usporedbi s CMT1A usporavanje brzine provodljivosti je manje uniformno između različitih živaca, a disperzija je jače izražena (Kleopa i sur., 2012.).

Životinjski modeli CMTX1 pokazuju korelaciju između ekspresije mutiranog Cx32 *in vivo* i transfektirane stanične kulture. *In vivo* i *in vitro* modeli bolesti upućuju da većina mutacija u *GJB1* dovode do gubitka funkcije i nemogućnosti mutiranog Cx32 za stvaranje funkcionalnih spojeva s pukotinom (tj. kanala) (Kleopa i Sargiannidou, 2015.). Cx32 je izražen u brojnim vrstama stanica, uključujući i hepatocite, u kojima je eksprimiran u većoj mjeri nego u oligodendrocitima i Schwannovim stanicama. No bez obzira, jedina klinička manifestacija mutacija *GJB1* je periferna neuropatija. Pretpostavlja se da koekspresija drugih koneksina može zaštititi neka tkiva od gubitka Cx32 (Kleopa i sur., 2012.).

S obzirom na to da je Cx32 izražen i u oligodendrocitima, mutacije u *GJB1* mogu uzrokovati promjene i u središnjem živčanom sustavu (SŽS). Međutim, klinička manifestacija bolesti u SŽS ne korelira sa stupnjem ili težinom periferne neuropatije. U nekim slučajevima bolest počinje s manifestacijom u SŽS, dok u drugim, težim slučajevima prezentacija bolesti u SŽS može izostati. Nije još razjašnjeno kako točno mutacije u *GJB1* uzrokuju promjene u SŽS, vjerojatno smanjuju broj funkcionalnih kanala između oligodendrocita i astrocita što uzrokuje poremećaj komunikacije kanala i dovodi do nemogućnosti regulacije intracelularne izmjene iona i malih molekula (Wang i Yin, 2016.).

Do danas je identificirano više od 400 mutacija u genu *GJB1* koje se nalaze po cijelom genu, a gotovo sve uzrokuju gubitak funkcije proteina u mijelinizirajućim Schwannovim stanicama (Kleopa i sur., 2012.; Shy i sur., 2007.). Ekspresija mutiranih Cx32 u stanicama

sisavaca upućuje na abnormalan intracelularni transport mutiranog proteina. Poznate su četiri vrste lokalizacije Cx32: 1) Cx32 nije detektiran iako je njegova mRNA eksprimirana, 2) Cx32 je zadržan u endoplazmatskom retikulumu, 3) Cx32 je zadržan u Golgijevom tijelu, 4) vidljive su nakupine kanala na površini stanice što znači da je mutirani Cx32 stvorio spojeve s pukotinom koji mogu imati oštećenu funkciju (Scherer i Kleopa, 2012.). Gubitak funkcionalnih spojeva s pukotinom narušava normalnu aktivnost Schwannovih stanica, kao što je proizvodnja mijelina (Genetics Home Reference, 2009.). Kod muškaraca s besmislenim (engl. *nonsense*) mutacijama bolest se javlja ranije i s težim fenotipom, nego kod onih s mutacijama promjene smisla. Opisano je nekoliko obitelji s delecijom kodirajuće regije gena *GJB1* te je utvrđeno da pokazuju tipični fenotip CMTX1 bez težih simptoma (Bird, 1998.d).

2.8.5. Mutacije u genu *MPZ* kao uzrok CMT1B

CMT1B uzrokovana je mutacijama u genu koji kodira protein MPZ nađen isključivo u Schwannovim stanicama. To je najzastupljeniji protein u mijelinu perifernog živčanog sustava, a u mijelinu SŽS nije pronađen (Banchs i sur., 2009.). Neophodan je za normalnu strukturu i funkciju mijelina i ima važnu ulogu u slaganju mijelinskih ovojnica oko živčane stanice (Genetics Home Reference, 2010.).

Pet do 10 % slučajeva CMT1 čini CMT1B (Parsons, 2015.), a fenotipski postoje dva tipa CMT1B: primarno demijelinizirajući (rani početak bolesti, dobitak funkcije proteina, teška klinička slika, niska brzina provodljivosti živaca) i primarno aksonalni (kasni početak bolesti, gubitak funkcije proteina, blaža klinička slika, normalna brzina provodljivosti živaca) koji se pojavljuju ovisno o različitim patogenim varijantama u genu (Bird, 1998.b).

Količina proteina MPZ u mijelinu je bitna, jer smanjena količina uzrokuje nestabilnost mijelina, a povećana količina tešku demijelinizaciju. MPZ je transmembranski protein koji nastaje u endoplazmatskom retikulumu gdje je podvrgnut N-glikozilaciji i tvorbi intramolekularnih disulfidnih veza. Promijenjeni protein ne može ispravno komunicirati s ostalim mijelinskim komponentama, što može narušiti stvaranje i održavanje mijelina. Mutacije mogu izmijeniti adheziju mijelina ili uzrokovati odgovor stanica na nakupljanje nesmotanih proteina (engl. *unfolded protein response,* UPR) što dovodi do apoptoze Schwannovih stanica i demijelinizacije (Jerath i Shy, 2015.).

Kod CMT1B koji se manifestira u kasnijoj životnoj dobi, mutirani protein se transportira do površine stanice i samo minimalno smanjuje adheziju MPZ, što upućuje da je uklopljen u mijelinsku ovojnicu gdje mijenja interakcije neurona i Schwannovih stanica te

uzrokuje oštećenje i gubitak aksona. Kod CMT1B koji se manifestira u ranijoj životnoj dobi postoje dva glavna patološka mehanizma. U prvom, mutirani protein se ne transportira do površine stanice i značajno smanjuje adheziju MPZ, što upućuje na to da nije uklopljen u mijelin te tako uzrokuje efekte mehanizmom dobitka funkcije (Grandis i sur., 2008.). U drugom, mutirani protein je uklopljen u mijelin, ali remeti njegovu strukturu, vjerojatno s dominantno negativnim interakcijama između mutiranog MPZ i MPZ divljeg tipa (Niemann i sur., 2006.).

Do danas je identificirano više od 100 mutacija u genu *MPZ* koje uzrokuju CMT1B, a većina ih je lokalizirana u eksonima 2 i 3 (Bird, 1998.b). Velik dio mutacija u *MPZ* otkrivenih u čovjeka i miševa dovodi do zadržavanja mutiranog proteina u endoplazmatskom retikulumu umjesto njegovog transporta do stanične membrane ili mijelinske ovojnice. Zadržavanje takvog proteina koje se ne može pravilno smotati dovodi do UPR i apoptoze odnosno demijelinizacije (Brennan i sur., 2015.).

Kod miševa heterozigotna delecija uzrokuje relativno blagi demijelinizirajući fenotip, dok miševi kojima potpuno nedostaje MPZ ne mogu stvoriti kompaktni mijelin u većini živčanih vlakana (Mathis i sur., 2015.). Kod miševa s 30 % do 80 % prekomjernom ekspresijom gena *MPZ* demijelinizirajuća neuropatija se javlja ranije i sa znatno sniženom brzinom provodljivosti (Høyer i sur., 2011.).

2.9. Kliničke karakteristike fenotipa CMT

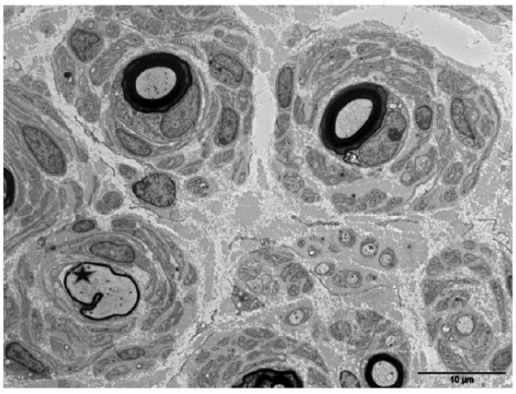
2.9.1. Elektromioneurografska dijagnostika

Patofiziološka dijagnoza polineuropatija CMT postavlja se različitim tehnikama mjerenja biopotencijala mišića i perifernih živaca, metodom kliničke elektromioneurografije (EMNG) sastavljene od dvije vrste ispitivanja. Elektromiografijom (EMG) se semikvantitativno ocjenjuje aktivnost mišića u mirovanju i zatim tijekom kontrakcije. Za ocjenu elektrofiziološkog statusa kod CMT, osobito je važna elektroneurografija (ENG) ili kraće, neurografija, kojom se nakon kratke električne stimulacije živca određuju latencije evociranog mišićnog i senzoričkog odgovora, na osnovu kojih se izračunava brzina provodljivosti motoričkih i senzoričkih živaca (MNCV, SNCV), mjeri distalna latencija motoričkog odgovora (DL), a zatim i amplituda motoričkog i senzoričkog odgovora (CMAP, SNAP) (Daube i sur., 2012.). Ovisno o stupnju usporenja brzine provodljivosti, te amplitudi i

obliku motoričkih i senzoričkih potencijala, mogu se razlikovati polineuropatije primarno aksonalnog ili demijelinizirajućeg tipa (Mitrović i sur., 2015.).

2.9.2. Elektrofiziologija i patologija živaca kod CMT

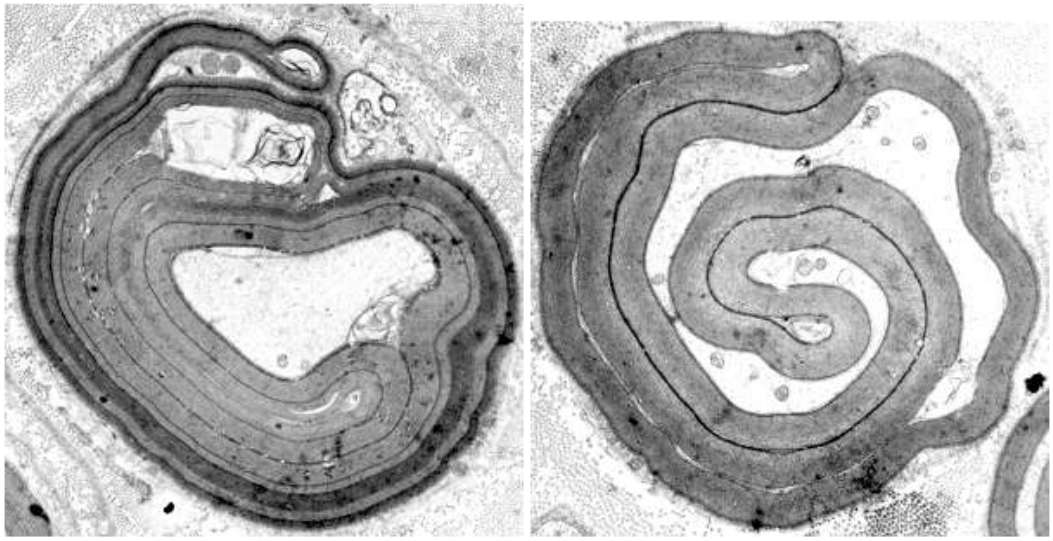
Brzina provodljivosti perifernih živaca kod bolesnika s CMT1A kreće se u rasponu od 7 do 40 m/s. Individualno uzevši, ta znatno snižena brzina provodljivosti minimalno varira između različitih živaca istog ekstremiteta, kao i između homolognih živaca različitih ekstremiteta. Pojava je tipična za CMT1A i naziva se uniformno usporavanje (engl. *uniform slowing*) (Lewis i sur., 2000.). Svi bolesnici s CMT1A imaju smanjene amplitude motoričkih i senzoričkih odgovora (Thomas i sur., 1997.). U bioptatu suralnog živca bolesnika s CMT1A nađene su strukture nalik na glavicu luka (engl. *onion bulbs*) koje utječu na gotovo svako mijelinizirano živčano tkivo (Slika 10). Te strukture su oblikovane kada Schwannove stanice proširuju svoje membrane oko aksona, ali ne formiraju kompaktni mijelin. Pretpostavlja se da su posljedica ponavljajuće demijelinizacije i remijelinizacije (Gabreels-Festen i sur., 1995.).



Slika 10. Prikaz suralnog živca elektronskim mikroskopom. Crni krugovi predstavljaju mijelinizirane aksone okružene tzv. *onion bulb* strukturama tipičnima za CMT1A (preuzeto iz Tazir i sur., 2014.)

U bolesnika s HNPP, studije provodljivosti živaca su pokazale značajno produžene DL složenog mišićnog potencijala M (CMAP) preko mjesta podložnih mehaničkom pritisku, kao što su medijalni i ulnarni živac u ručnom zglobu i peronealni u gležnju. Fokalno usporavanje brzina provodljivosti motoričkih vlakana (MNCV) gotovo uvijek je prisutno na mjestima pritiska, kao što su ulnarni živac u segmentu lakta i peronealni živac iza glavice fibule. Brzine provodljivosti drugih živaca uglavnom su normalnih vrijednosti (Amato i sur., 1996.;

Andersson i sur., 2000.). Brzine provodljivosti senzoričkih živaca (SNCV) su često smanjene, kao i amplitude senzoričkih potencijala (SNAP) (Li i sur., 2002.). Biopsija suralnog živca upućuje na prisutnost tzv. tomakula, odnosno struktura nalik kobasici (Slika 11) koje su rezultat prekomjernog nekompaktnog omatanja mijelinske ovojnice (Madrid i Bradley, 1975.).



Slika 11. Tomakula - struktura tipična za HNPP (preuzeto iz http://neuromuscular.wustl.edu/pathol/nervetomac.htm)

Elektrofiziološki i patološki nalazi živaca bolesnika s CMTX1 upućuju na raniju pojavu patoloških promjena aksona koje prethode demijelinizaciji kod CMTX1 u odnosu na druge tipove demijelinizirajućih neuropatija, kod kojih se aksonalne promjene smatraju sekundarnima u odnosu na demijelinizaciju (Kleopa i Sargiannidou, 2015.).

Većina CMT1E mutacija uzrokuje sniženu NCV i produženu DL. U bioptatu živca moguće je naći i „onion bulb“ strukture i tomakule (Lenssen i sur., 1998.) koje nisu specifične za podtipove CMT, pa se biopsija živaca rijetko indicira u cilju diferencijalne dijagnoze CMT.

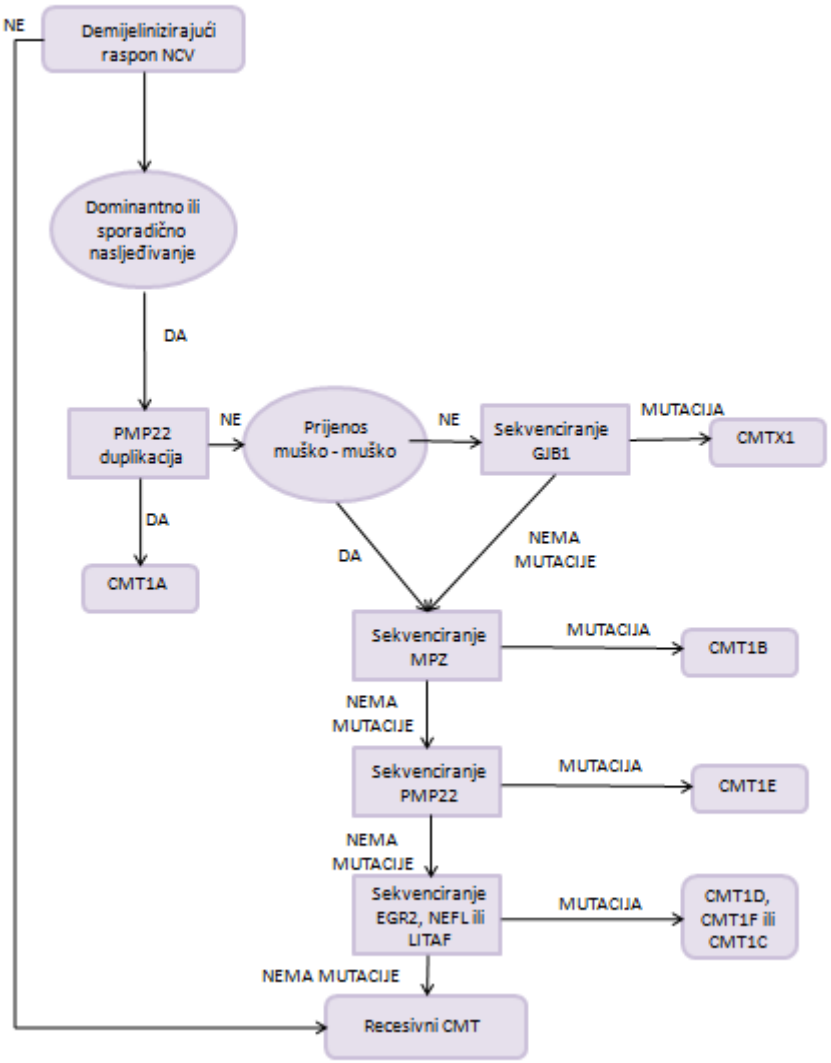
2.9.3. Kliničke karakteristike CMT

Prvi prepoznatljivi klinički simptomi CMT mogu se pojaviti u djetinjstvu i u odrasloj dobi, ali su u 85 % slučajeva prisutni prije dvadesete godine života (Parsons, 2015.). Većina pojedinaca kojima je dijagnosticiran CMT imaju normalni očekivani životni vijek, iznimke su bolesnici s respiratornim problemima ili teškom invalidnošću. Stupanj invalidnosti može jako

varirati, čak i kod članova iste obitelji, te može biti od minimalnog do visokog. CMT je gotovo uvijek sporo progresivna bolest. Razlika u pojavnosti CMT s obzirom na rasu i spol nije primijećena (iznimka je jedino X-vezani tip CMT koji zahvaća muški spol u ranijoj dobi i težem obliku nego ženski) (Parsons, 2015.).

Primijećeno je da djeca koja boluju od CMT prohodaju kasnije od svoje zdrave braće te su nespretnija. Također je često prisutna i skolioza (Mitrović i sur., 2015.). Motorička oštećenja se razvijaju prije senzoričkih, dok su senzorička uglavnom lakša od motoričkih (Parsons, 2015.). Ovisno o stupnju aksonalne degeneracije, slabost i atrofija se najprije primjećuju u mišićima stopala, gležnja i nožnih prstiju. Zbog atrofije distalnih mišića potkoljenice, dolazi do konfiguracije potkoljenica nalik na okrenutu šampanjsku bocu, a u najtežem stupnju do izgleda "rodinih nogu" (Mitrović i sur., 2015.). Deformacije stopala su česta pojava kod CMT, ali variraju čak i unutar iste obitelji i nisu specifične, te su učestalije s godinama. Najčešće se javljaju visoki lukovi stopala, ravna stopala, čekićasti prsti i zategnuta Ahilova tetiva (Parsons, 2015.). Atrofija mišića stopala može uzrokovati plegiju (paralizu) stopala, što se manifestira kao tzv. „pijetlov" hod. Atrofija mišića šake najčešće se ispoljava u obliku "šake nalik pandži" (Mitrović i sur., 2015.). Trudnoća, emocionalni stres, dulja nepokretljivost te neki lijekovi mogu biti čimbenici koji utječu na pogoršanje bolesti. Međutim, bez obzira na sve navedene kliničke manifestacije, bolesnici uglavnom nemaju značajnijih osjetnih simptoma ili bolova (Mitrović i sur., 2015.).

S obzirom na veliku genetičku heterogenost bolesti, za konačnu dijagnozu CMT bitno je, pomoću detaljnog neurološkog pregleda i EMNG ispitivanja, suziti broj potencijalnih gena uzročnika te prema tome usmjeriti molekularno-genetičku analizu koristeći dijagnostički algoritam redoslijeda testiranja gena (Slika 12).



Slika 12. Dijagnostički protokol testiranja za demijelinizirajuće neuropatije (preuzeto iz Banchs i sur., 2009., uz izmjene)

2.9.4. Terapijske mogućnosti

Trenutno ne postoji medicinski postupak koji bi zaustavio razvoj bolesti, odnosno demijelinizaciju aksona. Specifična ili genska terapija za CMT još nije razvijena. Moguće je samo ublažavanje simptoma bolesti s redovitim fizikalnim terapijama te aktivnim životom bolesnika (Mitrović i sur., 2015.). U nastavku su navedena neka od provedenih istraživanja u liječenju CMT primjenom askorbinske kiseline, antagonista progesterona i kurkumina.

Askorbinska kiselina je esencijalna za mijelinizaciju perifernog živčanog sustava i ima glavnu ulogu u formiranju bazalne lamine Schwannove stanice. Zbog toga se smatrala kao potencijalni lijek za CMT (El-Abassi i sur., 2014.). Ispitivanja na mišjim modelima pokazala

su dobre rezultate (miševima tretiranim s visokim dozama askorbinske kiseline smanjena je težina neuropatije), međutim nije utvrđena značajna razlika kod primjene različitih doza askorbinske kiseline (1 – 4 g/dan) u ljudi tijekom dvije godine (Jerath i Shy, 2015.).

Progesteron potiče mijelinizaciju u perifernom živčanom sustavu te stimulira ekspresiju PMP22 i MPZ. Ispitivanje provedeno na štakorima koji su tretirani progesteronom pokazalo je povećanje razina PMP22 i MPZ mRNA, što je imalo za posljedicu razvoj teže neuropatije. Primjenom onapristona (selektivnog antagonista progesterona) smanjila se prekomjerna ekspresija PMP22, poboljšao fenotip CMT i smanjio gubitak aksona. Međutim, s obzirom na toksičnost onapristona, u razvoju je antagonist progesterona koji bi za ljude bio sigurniji (Jerath i Shy, 2015.).

Kurkumin, kemijski sastojak koji potječe iz začina kurkume smanjuje stres endoplazmatskog retikuluma te kako je potvrđeno na Trembler i Trembler-J mišjim modelima, značajno povećava broj i veličinu mijeliniziranih aksona i ublažava fenotip CMT (El-Abassi i sur., 2014.). Derivati kurkumina bi mogli biti potencijalni lijek za neke nasljedne periferne neuropatije s obzirom na to da ne pokazuju toksične učinke (Jerath i Shy, 2015.).

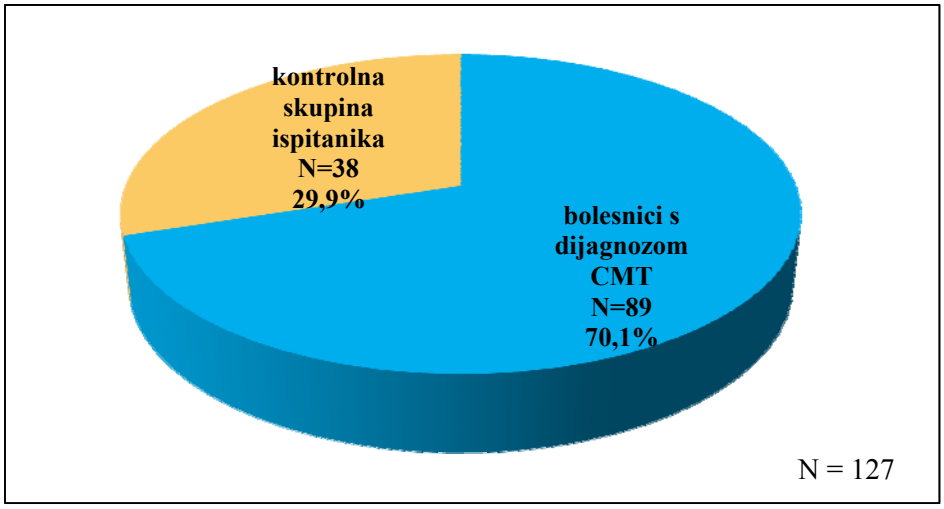
3. ISPITANICI, MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici

Istraživanje je provedeno u skladu sa svim etičkim normama prema Zakonu o zdravstvenoj zaštiti (NN 150/2008) i Zakonu o zaštiti prava pacijenata (NN 169/2004), a uz suglasnost Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Zagreb (Ur. broj: 02/21/JG) i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Ur. broj: 380-59-10106-15-168/126).

Ukupno je bilo uključeno 127 ispitanika (Slika 13), 64 (50,4 %) muškaraca i 63 (49,6 %) žene, koji su do travnja 2015. godine bili upućeni na molekularno-genetičku analizu iz Kabineta za elektrofiziologiju i praćenje nasljednih neuromuskularnih bolesti, Klinike za neurologiju i Referentnog Centra za neuromuskularne bolesti i kliničku elektromioneurografiju Ministarstva zdravstva Republike Hrvatske, nakon kliničkog pregleda i EMNG obrade. Analize DNA provedene su u razdoblju od travnja 2014. do svibnja 2017. godine.

U skupini od 89 ispitanika bolesnika s uputnom dijagnozom polineuropatije CMT, bilo je 44 (49,4 %) muškaraca i 45 (50,6 %) žena. Kontrolna skupina je obuhvatila 38 ispitanika odabranih iz arhive pacijenata Kabineta za elektrofiziologiju i praćenje nasljednih neuromuskularnih bolesti, Klinike za neurologiju, koji nisu imali kliničke simptome ni znakove polineuropatije kao niti nekog drugog organskog oštećenja perifernih živaca, a uključivala je 20 (52,6 %) muškaraca i 18 žena (47,4 %).



Slika 13. Omjer bolesnika s dijagnozom CMT i kontrolnih ispitanika

Za obje skupine (bolesnici i kontrole) uzeti su anamnestički podatci, genealogija, te ključni kvalitativni i semikvantitativni parametri neurološkog statusa i kvantitativni parametri nalaza EMNG. Na osnovu nalaza EMNG, u skupini bolesnika, klinička dijagnoza CMT je dodatno izdiferencirana na CMT1 ili CMT2 i HNPP/CMT2 ili CMTX/CMT2, nakon čega su bolesnici upućeni na molekularno-genetičku analizu, dok kontrolnoj skupini ista nije rađena. Kvantitativni parametri nalaza EMNG uspoređivani su između kontrolnih ispitanika i bolesnika podijeljenih u podskupine prema utvrđenoj mutaciji odnosno podtipu CMT.

Za potrebe genetičke analize svim bolesnicima je uzet uzorak periferne venske krvi uzorkovane u epruvetu s antikoagulantom K_3EDTA (Greiner Bio-One, Austrija) iz kojeg je izdvojena DNA.

Uzorci DNA svih bolesnika s dijagnozom polineuropatije CMT prvo su metodom MLPA analizirani na duplikaciju ili deleciju u genu *PMP22*. Bolesnicima kojima nije bila utvrđena delecija ili duplikacija, učinjena je analiza kodirajuće regije gena *GJB1*, *MPZ* i *PMP22* metodom sekvenciranja (Sanger i sur., 1977.) tim redoslijedom.

3.2. Materijali

3.2.1. Pribor

- sterilne plastične epruvete s čepom volumena 50 mL (GE Healthcare, Švedska)
- sterilne epruvete volumena 2 mL (Eppendorf, Njemačka)
- sterilne epruvete volumena 0,5 mL (Eppendorf, Njemačka)
- sterilne polipropilenske epruvete volumena 0,2 mL (Eppendorf, Njemačka)
- sterilni nastavci za pipete (Eppendorf, Njemačka)
- sterilno stakleno posuđe: Erlenmeyerove tikvice, čaše, menzura, itd.
- kalup za gel
- češljić za jažice
- pločice s bunarićima za uzorke za uređaj GA 3130xl (Applied Biosystems, SAD)
- septe za pločice za uređaj GA 3130xl (Applied Biosystems, SAD)

3.2.2. Laboratorijska oprema

- termostat (Thermo Scientific B6 Incubator, Heraeus, Njemačka)
- spektrofotometar (BioMate 3 Thermo Scientific, ThermoFisher Scientific, SAD)

- centrifuga s hlađenjem za epruvete većih volumena (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Njemačka)
- centrifuga s hlađenjem za pločice s bunarićima za uzorke (Centrifuge 5804R, Eppendorf, Njemačka)
- mikrocentrifuga (Biofuge Pico Thermo Scientific, Heraeus, Njemačka)
- uređaj za PCR (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, SAD)
- uređaj za kapilarnu elektroforezu (AB Genetic Analyzer 3130xl, Applied Biosystems, SAD)
- vrtložna miješalica (TK3S TechnoKartell, Kartell Labware, Italija)
- precizna vaga (OHAUS, SAD)
- magnetska miješalica s grijačem (TK22 TechnoKartell, Kartell Labware, Italija)
- sustav za gel elektroforezu s ispravljačem (Sub-Cell 96, BioRad, SAD)
- uređaj za snimanje i analizu gelova (G:BOX, Syngene, Velika Britanija)
- automatska pipeta volumena do 10 µL (Eppendorf, Njemačka)
- automatska pipeta volumena do 100 µL (Eppendorf, Njemačka)
- automatska pipeta volumena do 1000 µL (Eppendorf, Njemačka)

3.2.3. Reagensi

3.2.3.1. Reagensi za izdvajanje DNA iz periferne venske krvi

- **Pufer za hemolizu 10X**

Sastav:	Masa:	Koncentracija u otopini:	Kemijska formula:	Proizvođač:
1. Amonijev klorid	82,9 g	155 mM	NH_4Cl	Merck, Njemačka
2. Kalijev hidrogenkarbonat	10 g	10 mM	$KHCO_3$	Merck, Njemačka
3. Dihidrat dinatrijeve soli etilendiamintetraoctene kiseline	3,72 g	1 mM	$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$ x 2 H_2O	Kemika, Hrvatska
4. Sterilna destilirana H_2O	do volumena 1000 mL	-	H_2O	

- **Pufer SE-LIZA 10X**

Sastav:	Masa:	Koncentracija u otopini:	Kemijska formula:	Proizvođač:
1. Tris (hidroksimetil) aminometan	1,21 g	10 mM	$H_2NC(CH_2OH)_3$	Merck, Njemačka
2. Natrijev klorid	43,83 g	75 mM	NaCl	Merck, Njemačka
3. Dihidrat dinatrijeve soli etilendiamintetraoctene kiseline	89,33 g	24 mM	$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$ x 2 H_2O	Kemika, Hrvatska
4. Sterilna destilirana H_2O	do volumena 1000 mL	-	H_2O	

- **Zasićena otopina natrijevog klorida**

Sastav:	Masa:	Koncentracija u otopini:	Kemijska formula:	Proizvođač:
1. Natrijev klorid	35 g	28%	NaCl	Merck, Njemačka
2. Sterilna destilirana H_2O	do volumena 100 mL		H_2O	

- **Otopina pronaze**

Sastav:	Masa:	Koncentracija u otopini:	Kemijska formula:	Proizvođač:
1. Pronaza izdvojena iz vrste *Streptomyces griseus*	1 g	2%	-	Roche, Švicarska
2. Sterilna destilirana H_2O	do volumena 50 mL		H_2O	

- **Otopina natrijevog dodecil-sulfata (SDS)**

Sastav:	Masa:	Koncentracija u otopini:	Kemijska formula:	Proizvođač:
1. Natrijev dodecil-sulfat	50 g	10%	$C_{12}H_{25}NaSO_4$	Roche, Švicarska
2. Sterilna destilirana H_2O	do volumena 500 mL	-	H_2O	

- **Etanol** koncentracije 100% proizveden za potrebe analitičkih procesa

- **Pufer TE**

Sastav:	Masa:	Koncentracija u otopini:	Kemijska formula:	Proizvođač:
1. Tris (hidroksimetil) aminometan	1,21 g	10 mM	$H_2NC(CH_2OH)_3$	Merck, Njemačka
2. Dihidrat dinatrijeve soli etilendiamintetraoctene kiseline	0,37 g	1 mM	$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$ x 2 H_2O	Kemika, Hrvatska
3. Sterilna destilirana H_2O	do volumena 1000 mL	-	H_2O	

- **Pufer TBE 10X**

Sastav:	Masa:	Koncentracija u otopini:	Kemijska formula:	Proizvođač:
1. Tris (hidroksimetil) aminometan	1,21 g	10 mM	$H_2NC(CH_2OH)_3$	Merck, Njemačka
2. Dihidrat dinatrijeve soli etilendiamintetraoctene kiseline	9,3 g	125 mM	$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$ x 2 H_2O	Kemika, Hrvatska
3. Borna kiselina	0,47 g	1 mM	H_3BO_3	Merck, Njemačka
4. Sterilna destilirana H_2O	do volumena 1000 mL	-	H_2O	

3.2.3.2. Reagensi za analizu duplikacije ili delecije u genu *PMP22* metodom MLPA

Komplet reagensa za metodu MLPA čine smjesa sondi SALSA MLPA P033 CMT1 probemix (MRC-Holland, Nizozemska) i SALSA MLPA reagent kit (MRC-Holland, Nizozemska) koji se sastoji od pufera SALSA MLPA buffer, Ligase Buffer A i Ligase Buffer B, enzima SALSA Ligase-65 i SALSA Polymerase te početnica SALSA PCR Primer FAM. Smjesa sondi SALSA MLPA P033 CMT1 probemix sadrži 18 sondi specifičnih za slijed

nukleotida koji su prisutni u regiji CMT1A/HNPP, što uključuje 12 sondi za gen *PMP22*, dvije sonde za gen *COX10*, dvije sonde za gen *TEKT3*, dvije sonde za gen *KIF1b* te po jednu sondu za *DRC3* i *ELAC2* koje se nalaze malo izvan regije CMT1A/HNPP. Uz to još je prisutno i 18 kontrolnih sondi koje su raspršene po genomu, a koriste se u svrhu relativne kvantifikacije; četiri fragmenta Q za kontrolu količine DNA u reakciji i kontrolu uspješnosti reakcije ligacije; dva fragmenta D za kontrolu uspješnosti denaturacije DNA; te fragmenti X i Y za kontrolu potencijalne mogućnosti zamjene testiranih uzoraka. Za umnažanje produkata reakcije MLPA korišten je uređaj za PCR (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, SAD). Analiza produkata reakcije MLPA provedena je na uređaju za kapilarnu elektroforezu (AB Genetic Analyzer 3130xl, Applied Biosystems, SAD) sa 16 kapilara dužine 36 cm, korištenjem polimera (POP-7 Polymer, Applied Biosystems, SAD) kao medija za razdvajanje produkata, pufera za elektroforezu s EDTA (EDTA Running buffer 10X, Applied Biosystems, SAD), formamida visoke čistoće (Hi-Di Formamide, Applied Biosystems, SAD) i molekularnog standarda GeneScan ROX-500 (Applied Biosystems, SAD).

3.2.3.3. Reagensi za sekvenciranje gena *GJB1*, *MPZ* i *PMP22*

Za umnažanje kodirajuće regije gena *GJB1*, *MPZ* i *PMP22* lančanom reakcijom polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) u uređaju za PCR (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, SAD) korištena je sterilna destilirana voda i gotova smjesa JumpStart REDTaq ReadyMix Reaction Mix (Sigma-Aldrich, SAD) koja sadrži pufer za reakciju PCR, četiri vrste deoksiribonukleotid trifosfata (dATP, dCTP, dGTP i dTTP) i enzim Taq DNA polimerazu. Početnice pomoću kojih su umnoženi svi eksoni kodirajuće regije gena *GJB1*, *MPZ* i *PMP22* navedene su u Tablici 7.

Tablica 7. Slijed nukleotida početnica korištenih za umnažanje pojedinih eksona gena *GJB1*, *MPZ* i *PMP22* (preuzeto iz Østern i sur., 2013.)

Gen	Odsječak	Slijed nukleotida početnice u smjeru 5'-3'
GJB1 **NM_000166.5**	Ekson 2a	F: CCAGCTTTCTGACAGCTTGCT
		R: GCATAGCCAGGGTAGAGCAG
	Ekson 2b	F: CCTACACCTGGAGGAGGTGA
		R: TAGCCAGGGAAGGAAGGTTT
MPZ **NM_000530.6**	Ekson 1	F: GGGCCCTAGGGGATTTTAAG
		R: GTGGGGATTGCTGAGAGACA

Gen	Odsječak	Slijed nukleotida početnice u smjeru 5'-3'
MPZ **NM_000530.6**	Ekson 2	F: CCCATAGGTGCATCTGATTCC
		R: AGGATTTCCCCCTCCTTAGC
	Ekson 3	F: AGCTTTGACAGCTGTGTTCTCA
		R: TTCCCCCAACCTATCAGTCC
	Ekson 4 + 5	F: CCTCAATGCAGGGCATACAC
		R: GGGTTCTCCTTCCCATCTTG
	Ekson 6	F: GTGGGATGGGAACAGTCAAG
		R: CCATCTCGATGACCATCACC
PMP22 **NM_000304.2**	Ekson 2	F: CTAGTGCGCGGGACCCTC
		R: GCAGATTGCCAGAAACTTCC
	Ekson 3	F: CCCCTTTTCCTTCACTCCTC
		R: CCAATAAGCGTTTCCAGCTC
	Ekson 4	F: CTTCTGCTTCTGCTGCCTGT
		R: CATTCTGAGGCCACATCCTT
	Ekson 5	F: CTACCCAGCAATTGTCAGCA
		R: CCACCTCCACTGCTTTCTGT

Za elektroforezu se koristio agarozni gel (Agaroza DNA Grade, Invitrogen, SAD) kojem je dodana fluorescentna boja GelRed (Olerup SSP AB, Švedska), a rezultati su analizirani u uređaju za snimanje i analizu gelova (G:BOX, Syngene, Velika Britanija).

Pročišćavanje produkata reakcije PCR na kolonicama pomoću mikrocentrifuge (Biofuge Pico Thermo Scientific, Heraeus, Njemačka) izvedeno je korištenjem kompleta reagensa QIAquick PCR purification kit (QIAquick PCR purification kit, Qiagen, Njemačka).

Za reakciju sekvenciranja u uređaju za PCR (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, SAD) korišten je komplet reagensa BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems, SAD) koji se sastoji od gotove smjese pufera za reakciju sekvenciranja, enzima DNA polimeraze, četiri vrste deoksiribonukleotid trifosfata (dATP, dCTP, dGTP i dTTP) i četiri vrste fluorescentno obilježenih dideoksinukleotid trifosfata (ddATP, ddCTP, ddGTP i ddTTP).

Pročišćavanje produkata reakcije sekvenciranja učinjeno je korištenjem kompleta reagensa DyeEx 2.0 (DyeEx 2.0 spin kit, Qiagen, Njemačka) i mikrocentrifuge (Biofuge Pico Thermo Scientific, Heraeus, Njemačka).

3.3. Metode

3.3.1. Izdvajanje DNA iz periferne venske krvi

Izdvajanje DNA iz leukocita provodi se standardnom metodom isoljavanja (Miller i sur., 1988). Ova metoda zasniva se na uklanjanju staničnih proteina dehidracijom i taloženjem zasićenom otopinom NaCl u svrhu izdvajanja DNA iz stanica s jezgrom. Iz biološkog uzorka sakupljenog u epruvetu s antikoagulantom EDTA eritrociti se uklanjaju liziranjem. Proteini iz liziranih stanica s jezgrom uklanjaju se taloženjem u zasićenoj otopini NaCl, a DNA se izdvaja primjenom apsolutnog etanola. Postupak traje dva dana. Prvi dan se u plastičnu sterilnu epruvetu s čepom volumena 50 mL prelije 2 do 7 mL krvi iz epruvete s EDTA i na nju se dodaje pufer za hemolizu 1X do oznake od 40 mL na epruveti. Epruveta se pažljivo promiješa i inkubira 20 minuta pri temperaturi -20 ºC dok se eritrociti ne raspadnu. Nakon toga se centrifugira 10 minuta pri temperaturi od 4 °C i relativnoj centrifugalnoj sili 3,220 x g (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Njemačka). Supernatant se ukloni te se talog ispere od preostalih eritrocita malom količinom pufera za hemolizu 1X. Na čisti talog se doda 10 mL pufera za hemolizu 1X i resuspendira snažnim miješanjem. Ponovno se centrifugira 10 minuta pri 4 ºC i 3,220 x g te se odstrani supernatant. Talog se ispere malom količinom pufera za hemolizu 1X, a višak pufera se odstrani prislanjanjem ruba epruvete uz staničevinu. Na talog se doda 3 mL pufera SE-LIZA 1X te se snažno protrese nekoliko sekundi. Zatim se doda 200 µL otopine pronaze koncentracije 2 %, epruveta se pažljivo promiješa te se doda 400 µL 10 % SDS. Epruvetu se zatvori i držeći ju vodoravno lagano se nekoliko puta okrene. Uzorak se inkubira preko noći u termostatu (Thermo Scientific B6 Incubator, Heraeus, Njemačka) pri temperaturi od 37 °C. Drugi dan u uzorak se doda 1 mL zasićene otopine NaCl, snažno se promiješa 10 do 15 sekundi na vrtložnoj miješalici (TK3S TechnoKartell, Kartell Labware, Italija) i centrifugira 10 minuta pri 4 ºC i 3,220 x g. U novu, sterilnu epruvetu od 50 mL doda se 10 mL apsolutnog etanola u koji se nakon centrifugiranja prenese supernatant koji sadrži DNA. Epruvetu se lagano okreće dok izdvojena DNA ne bude vidljiva. DNA se prenese pomoću pipete u sterilnu epruvetu od 2 mL. U otvorenoj epruveti DNA se suši jedan sat u termostatu pri 37 °C dok etanol potpuno ne ishlapi. Osušena DNA otopi se u 500 µL pufera TE koji sprječava brzu degradaciju DNA te se otopljeni uzorak inkubira preko noći u termostatu pri temperaturi od 37 °C. Uzorak DNA pohranjuje se trajno pri temperaturi 2 do 8 ºC.

3.3.2. Određivanje čistoće i koncentracije DNA

Za određivanje koncentracije DNA na spektrofotometru (BioMate 3 Thermo Scientific, ThermoFisher Scientific, SAD) mjeri se optička gustoća (eng. *optical density*, OD) pri valnoj duljini od 260 nm, koju nukleinske kiseline karakteristično apsorbiraju. Uzorak DNA se razrijedi puferom TE u omjeru 1:100 te se izračunava koncentracija DNA (OD=1 odgovara približno 50 μg/mL dvolančane DNA) prema formuli:

$$\text{Konc. DNA } (\mu g/mL) = OD260 \times 100 \text{ (razrjeđenje)} \times 50$$

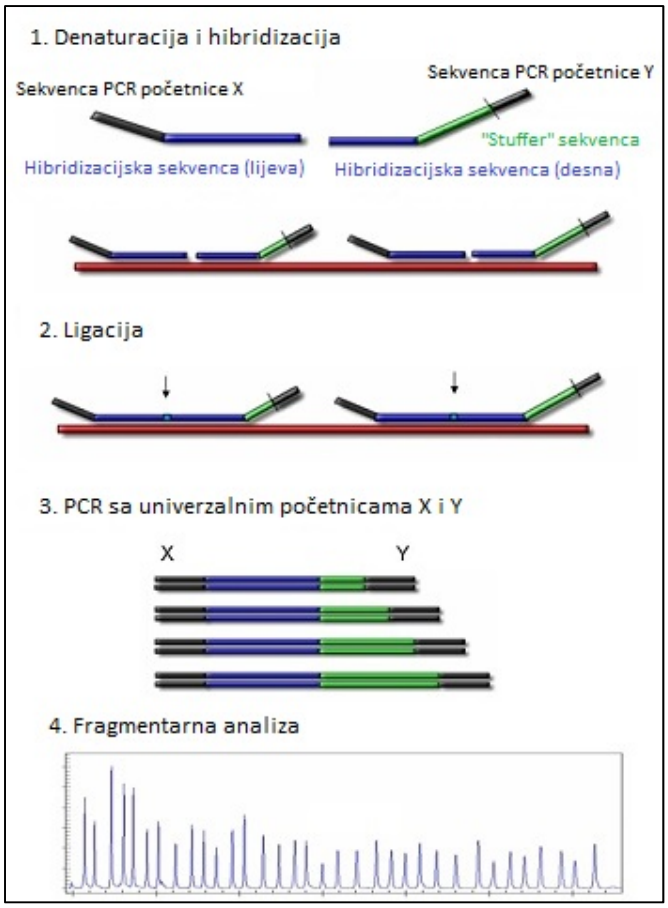
Prije mjerenja optičke gustoće DNA, potrebno je izmjeriti i optičku gustoću čistog pufera TE koji se koristi kao referentni uzorak odnosno slijepa proba, jer se po njemu analiziraju svi drugi ispitivani uzorci.

Također se mjeri optička gustoća pri valnoj duljini 280 nm. Omjer očitanja na 260 nm i 280 nm daje informaciju o čistoći DNA, a omjeri 1,8 do 2,0 ukazuju na vrlo visoku čistoću izdvojene DNA.

3.3.3. Utvrđivanje duplikacija ili delecija u genu *PMP22* metodom MLPA

MLPA je semikvantitativna metoda višestrukog umnažanja vezanih sondi koja se koristi za utvrđivanje broja kopija do 60 različitih odsječaka DNA u jednoj reakciji PCR koristeći samo jedan par obilježenih početnica. Princip metode temelji se na tome da se ne umnožavaju ciljani odsječci DNA nego sonde MLPA koje hibridiziraju na željeni odsječak. Svaka sonda MLPA se sastoji od 2 zasebna oligonukleotida (kraćeg i dužeg), koji sadrže sekvencu ciljanog odsječka DNA na 3'-kraju i sekvencu početnice PCR koja je zajednička svim sondama na 5'-kraju. Duži dio sonde MLPA, koji je produkt kloniranja u jedan od specifičnih vektora (M13-derived SALSA vektor), sadrži još i „*stuffer*“ sekvencu koja je u svakoj sondi različite duljine (19 do 370 nukleotida) što omogućava razlikovanje pojedinih sondi MLPA te istovremenu hibridizaciju više sondi MLPA. Samo u slučaju kada su oba dijela sonde MLPA hibridizirala na komplementarnu DNA moguća je ligacija lijeve i desne strane sonde MLPA termostabilnim enzimom (Ligaze-65), nakon čega slijedi umnažanje sondi u reakciji PCR i njihova kvantifikacija kapilarnom elektroforezom.

Reakcija MLPA sastoji se od 5 glavnih koraka: 1) denaturacija DNA i hibridizacija sondi MLPA; 2) reakcija ligacije; 3) reakcija PCR; 4) detekcija umnoženih sondi MLPA; 5) analiza rezultata (Slika 14).



Slika 14. Princip metode MLPA (preuzeto iz http://mlpa.com/, uz izmjene)

3.3.3.1. Denaturacija DNA i hibridizacija sondi MLPA

Za svaku je pojedinu reakciju MLPA potrebno 5 µL uzorka DNA koncentracije 50 do 100 ng/µL. Prema preporuci proizvođača MRC-Holland (Nizozemska), sve uzorke veće koncentracije potrebno je razrijediti 0,1 mM puferom TE. Za analizu se koriste tubice volumena 0,2 mL. Uzorci DNA se prvo denaturiraju pri temperaturi od 98 °C kroz 5 minuta u uređaju za PCR (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, SAD) te se ohlade na 25 °C. U ohlađene uzorke dodaje se po 3 µL hibridizacijske smjese koja se sastoji od 1,5 µL pufera SALSA MLPA i 1,5 µL smjese sondi MLPA. Nakon toga slijedi kratka denaturacija pri 95 °C jednu minutu, a potom hibridizacija uzoraka i sondi pri temperaturi od 60 °C kroz 16 do 20 sati u uređaju za PCR.

3.3.3.2. Reakcija ligacije

Nakon hibridizacije, uzorci se ohlade na 54 °C te se u svaku tubicu dodaje po 32 µL ligacijske smjese koja se sastoji od 25 µL sterilne destilirane vode, 3 µL pufera Ligase A, 3 µL pufera Ligase B i 1 µl enzima SALSA Ligase-65. Reakcija se odvija pri temperaturi od 54

°C kroz 15 minuta, nakon čega slijedi reakcija inaktivacije enzima zagrijavanjem na 98 °C kroz 5 minuta. Uzorci se zatim ohlade na 20 °C.

3.3.3.3. Reakcija PCR

Za reakciju PCR potrebno je pripremiti smjesu koja se sastoji od 7,5 μL sterilne destilirane vode, 2 μL početnica SALSA PCR Primer FAM i 0,5 μL enzima SALSA Polymerase. Na sobnoj temperaturi se u svaku tubicu dodaje po 10 μL pripremljene smjese i promiješa pipetom. Tubice se vraćaju u uređaj za PCR u kojemu se odvija reakcija PCR pri uvjetima navedenim u tablici 8.

Tablica 8. Uvjeti reakcije PCR za metodu MLPA

	Temperatura	**Trajanje**	**Broj ciklusa**
Denaturacija	95 ˚C	30 sekundi	35
Sparivanje	60 ˚C	30 sekundi	
Produljivanje	72 ˚C	60 sekundi	
Završno produljivanje	72 ˚C	20 minuta	1
Hlađenje	15 ˚C	Neograničeno	-

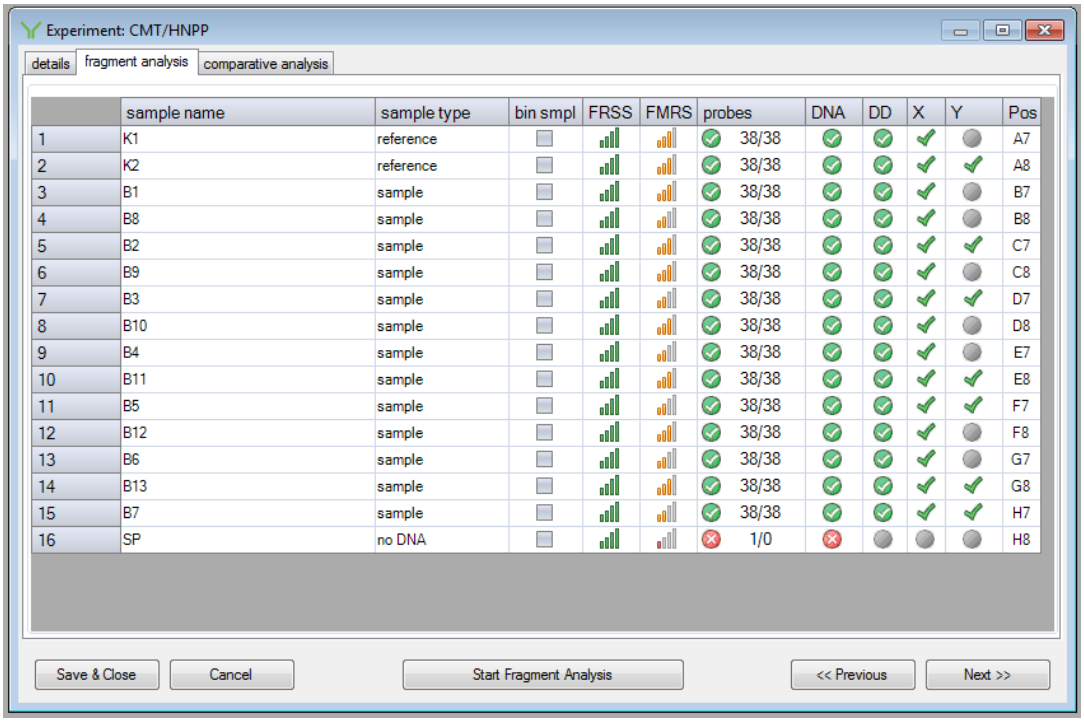
3.3.3.4. Detekcija umnoženih sondi MLPA

Sve sonde MLPA razdvajaju se i detektiraju kapilarnom elektroforezom. Uzorci za kapilarnu elektroforezu pripremaju se na sljedeći način: u 9 μL formamida HiDi (Hi-Di Formamide, Applied Biosystems) doda se 0,3 μL molekularnog standarda ROX-500 (GeneScan 500 ROX Size Standard, Applied Biosystems) i 0,7 μL produkta PCR. Uzorci se denaturiraju pri temperaturi od 80 °C kroz 2 minute nakon čega se 2 minute ohlade na ledu te su spremni za analizu na genetičkom analizatoru.

3.3.3.5. Analiza rezultata

Za analizu rezultata reakcije MLPA koristi se računalni program Coffalyser.Net koji je dostupan za slobodno korištenje na web-stranici (www.mlpa.com) proizvođača MRC-Holland (Nizozemska). Svaki uzorak se analizira u usporedbi s dva kontrolna uzorka normalnog genotipa (muškog i ženskog spola) i slijepom probom, odnosno 0,1 mM puferom TE.

Analiza započinje vizualnim pregledom kvalitete reakcije MLPA, provjerava se količina uzorka DNA, kvaliteta reakcije MLPA, odvajanje kapilarnom elektroforezom i normalizacija (Slika 15). Kvaliteta svakog navedenog dijela analize označena je bojom: 1) zelena - rezultati visoke kvalitete koji mogu biti prihvaćeni bez dodatnog pregleda, 2) crvena - neprihvatljivi rezultati reakcije MLPA za koje se preporučuje ponoviti analizu, 3) žuta - rezultati koji se nalaze između visoko kvalitetnih i neprihvatljivih rezultata, za koje je preporučeno napraviti dodatan pregled pomoću programa Coffalyser.Net te samostalno odlučiti o prihvaćanju rezultata analize.



	sample name	sample type	bin smpl	FRSS	FMRS	probes	DNA	DD	X	Y	Pos
1	K1	reference				38/38					A7
2	K2	reference				38/38					A8
3	B1	sample				38/38					B7
4	B8	sample				38/38					B8
5	B2	sample				38/38					C7
6	B9	sample				38/38					C8
7	B3	sample				38/38					D7
8	B10	sample				38/38					D8
9	B4	sample				38/38					E7
10	B11	sample				38/38					E8
11	B5	sample				38/38					F7
12	B12	sample				38/38					F8
13	B6	sample				38/38					G7
14	B13	sample				38/38					G8
15	B7	sample				38/38					H7
16	SP	no DNA				1/0					H8

Slika 15. Početna analiza produkata kapilarne elektroforeze računalnim programom Coffalyser.Net. [FRSS (engl. *fragment run separation score*) - kvaliteta razdvajanja fragmenata i određivanja veličine pika u usporedbi s korištenim molekularnim standardom; FMRS (engl. *fragment MLPA reaction score*) - kvaliteta izvedene reakcije MLPA; Probes - broj sondi identificiran u uzorku u odnosu na očekivani broj sondi; DNA - količina uzorka DNA; DD - kvaliteta denaturacije uzorka DNA; X - kontrolni fragment za kromosom X; Y - kontrolni fragment za kromosom Y]

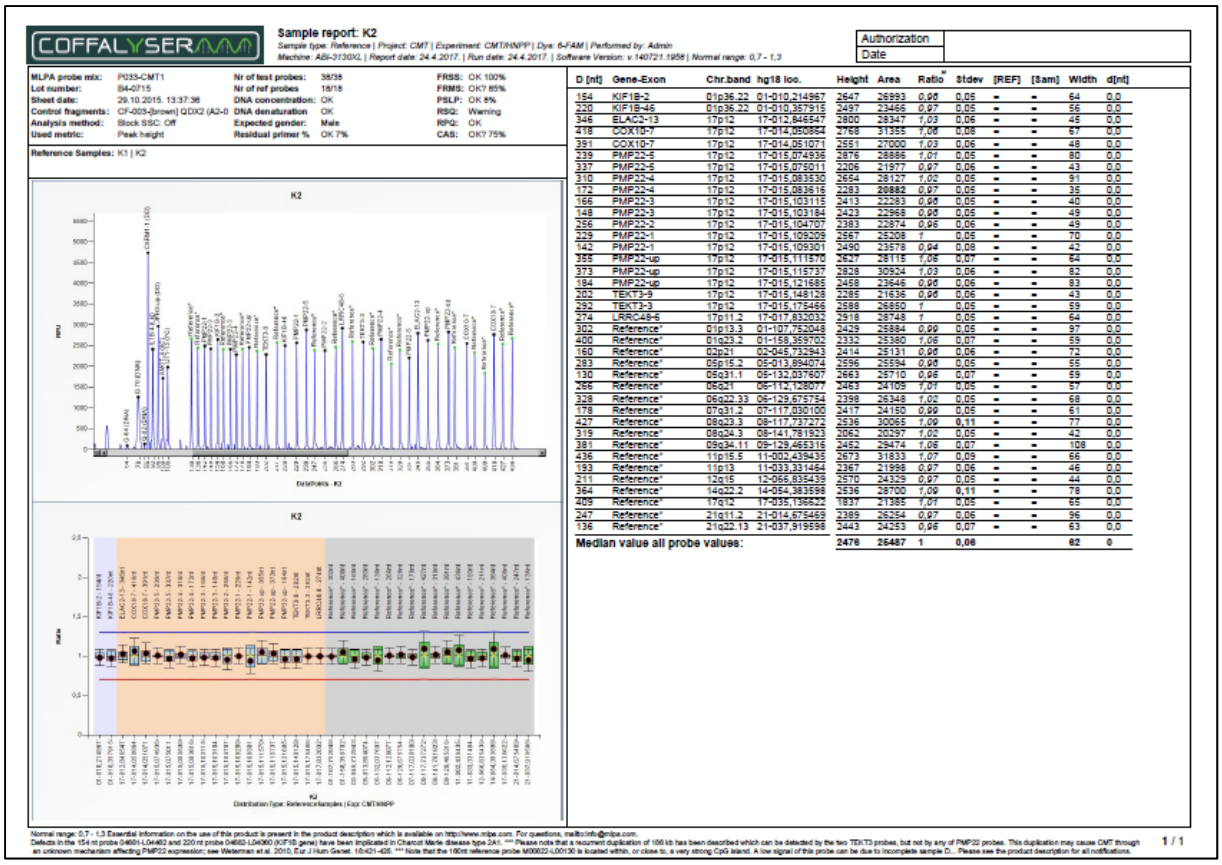
Nakon početne analize slijedi usporedna analiza produkata kapilarne elektroforeze (engl. *comparative analysis*). Kako su produkti reakcije MLPA različite duljine (64 do 500 nukleotida), moguće je na temelju duljine produkta PCR razlikovati pojedine MLPA sonde, a

na temelju intenziteta fluorescencijskog signala svake sonde tj. visine pika utvrditi količinu svake pojedine sonde. Visina pika sonde u elektroferogramu ovisna je o broju kopija određene sekvence DNA koja je prisutna u reakciji. Računalni program uspoređuje kontrolne uzorke s testiranim uzorcima stavljajući u omjer visine pikova testiranih sondi. U slučaju kada je dobiveni omjer manji od 0,65 tada je riječ o heterozigotnoj deleciji, dok omjer viši od 1,30 odgovara heterozigotnoj duplikaciji (Tablica 9). Kontrolni uzorci se također međusobno uspoređuju te će analiza biti pouzdanija što je manja razlika u visini pikova između kontrolnih uzoraka.

Tablica 9. Prikaz omjera visina pikova sondi MLPA u odnosu na broj kopija sekvence DNA

Omjer visine pikova sondi MLPA	**Broj kopija sekvence DNA**
0	Homozigotna delecija
0,40 – 0,65	Heterozigotna delecija
0,80 – 1,20	Normalan broj kopija
1,30 – 1,65	Heterozigotna duplikacija
1,75 – 2,15	Homozigotna duplikacija

Rezultati analize programa Coffalyser.Net prikazuju se u obliku izvještaja koji zadrži graf (engl. *ratio chart*), elektroferogram (engl. *electropherogram*) i tablicu s brojčanim rezultatima (engl. *sample report chart*) (Slika 16).



Slika 16. Izvještaj o rezultatima iz računalnog programa Coffalyser.Net

3.3.4. Sekvenciranje kodirajuće regije gena *GJB1*, *MPZ* i *PMP22*

3.3.4.1. Reakcija PCR

Odsječci DNA od interesa umnožavaju se u PCR uređaju lančanom reakcijom polimerazom. Reakcijska smjesa volumena 25 µL sadrži genomsku DNA, jedan par jednolančanih oligonukleotidnih početnica komplementarnih sa sekvencom DNA koja okružuje pojedini ekson, JumpStart REDTaq ReadyMix Reaction Mix i sterilnu destiliranu vodu (Tablica 10).

Program za reakciju PCR sastoji se od početne denaturacije, gdje se pri temperaturi od 95 °C u trajanju od tri minute razdvajaju komplementarni lanci DNA. Iza nje slijedi niz od 35 ciklusa, koji se sastoje od tri naizmjenično ponavljajuća koraka. Prvi je korak denaturacija pri temperaturi od 95 °C kroz 30 sekundi. Iza nje slijedi sparivanje početnica s kalupom DNA u trajanju od 30 sekundi, čija temperatura ovisi o samim početnicama (Tablica 11). Nakon toga slijedi produljivanje gdje pri temperaturi od 72 °C kroz 45 sekundi započinje sinteza novih lanaca DNA u smjeru 5'-3'. Završni korak reakcije PCR je konačno produljivanje svih preostalih jednolančanih DNA koje se odvija pri temperaturi od 72 °C kroz četiri minute.

Reakcija završava spuštanjem temperature na 4 °C, pri kojoj je produkt reakcije PCR stabilan određeno vrijeme.

Tablica 10. Reakcijska smjesa za PCR volumena 25 µL

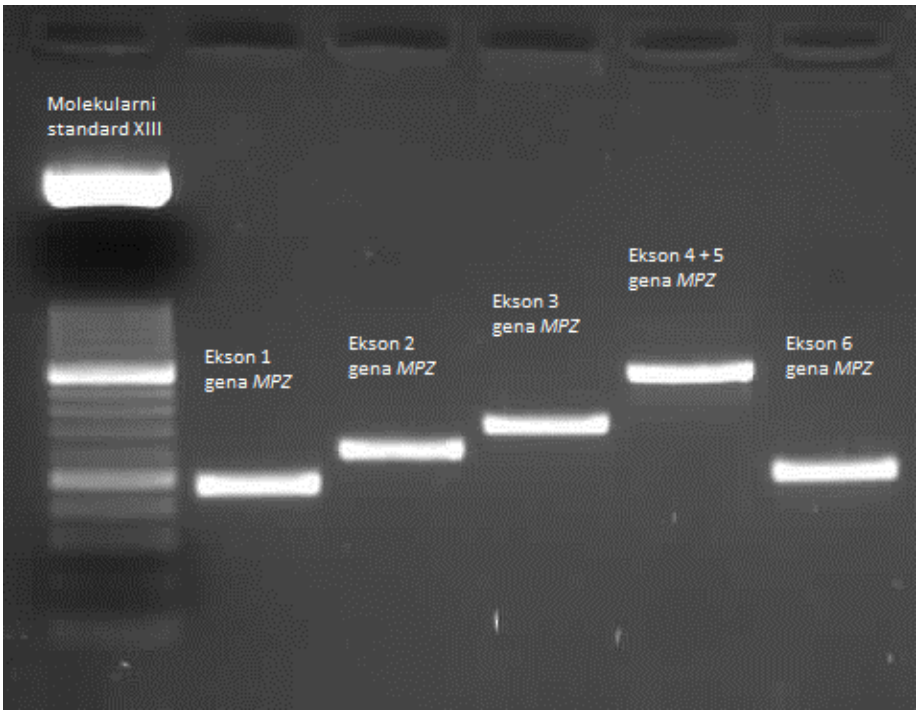
	Volumen [µL]	**Količina u reakciji**
sterilna destilirana voda	10,5	
JumpStart REDTaq ReadyMix Reaction Mix	12,5	1x
Početnica F (10 µM)	0,5	0,2 µM
Početnica R (10 µM)	0,5	0,2 µM
DNA	1	100 ng

Tablica 11. Eksperimentalno određene temperature sparivanja početnica i veličine produkata reakcije PCR

Gen	**Odsječak**	**Temperatura sparivanja početnica (°C)**	**Veličina produkta reakcije PCR (pb)**
GJB1	Ekson 2a	59 °C	539 pb
	Ekson 2b	59 °C	640 pb
MPZ	Ekson 1	59 °C	234 pb
	Ekson 2	59 °C	297 pb
	Ekson 3	59 °C	350 pb
	Ekson 4 + 5	59 °C	485 pb
	Ekson 6	61 °C	242 pb
PMP22	Ekson 2	57 °C	339 pb
	Ekson 3	57 °C	244 pb
	Ekson 4	57 °C	358 pb
	Ekson 5	57 °C	393 pb

3.3.4.2. Provjera uspješnosti reakcije PCR

Uspješnost reakcije PCR provjerava se pomoću elektroforeze u agaroznom gelu. Agarozni gel koncentracije 2 % priprema se u Erlenmeyerovoj tikvici otapanjem 1 g agaroze (Agaroza DNA Grade, Invitrogen, SAD) u 50 mL pufera TBE 1X. U tikvicu se doda magnet te stavi na zagrijanu magnetsku miješalicu (TK22 TechnoKartell, Kartell Labware, Italija). Nakon što smjesa zavrije tikvica se ohladi pod mlazom hladne vode te se doda jedna kap fluorescentne boje GelRed (Olerup SSP AB, Švedska) pomoću koje je DNA vidljiva pod UV svjetlošću i lagano se promiješa. Smjesa se izlije u kalup za gel s prethodno umetnutim češljićem za jažice i pričeka se oko pola sata da se gel polimerizira. Polimerizirani gel uroni se u kadicu prethodno ispunjenu puferom TBE 1X i pažljivo se izvadi češljić. U jažice gela nanese se 5 µL produkta PCR koji u sebi sadrži pufer s bojom. Elektroforeza se odvija 30 minuta u puferu TBE pri naponu 110 V i jakosti struje 400 mA. Odsječci DNA vizualiziraju se u uređaju za snimanje gelova i analizu G-box (SynGene, Velika Britanija) (Slika 17).



Slika 17. Prikaz odječaka DNA u agaroznom gelu

3.3.4.3. Pročišćavanje produkata reakcije PCR

Prije reakcije sekvenciranja, produkte reakcije PCR potrebno je pročistiti od suviška početnica i drugih sastojaka reakcijske smjese. Komplet reagensa za pročišćavanje produkata reakcije PCR QIAquick PCR Purification kit (Qiagen, Njemačka) sastoji se od kolonica sa

silika-filterom i otopina za pročišćavanje, a koristi se uz pomoć mikrocentrifuge (Biofuge Pico Thermo Scientific, Heraeus, Njemačka). Svi koraci pročišćavanja provode se pri relativnoj centrifugalnoj sili od 17 900 x g i sobnoj temperaturi. Pet volumena pufera PBI doda se u jedan volumen uzorka reakcije PCR i promiješa na vrtložnoj miješalici (TK3S TechnoKartell, Kartell Labware, Italija). Kolonica QIAquick stavi se u kolekcijsku tubicu volumena 2 mL. Da bi se DNA vezala na silika-filter, uzorak se nanese na kolonicu i centrifugira jednu minutu. Ono što je oteklo u tubicu se baci, a kolonica se vrati nazad u istu tubicu. Da bi se DNA isprala, u kolonicu se doda 0,7 mL pufera PE i centrifugira jednu minutu. Ono što je oteklo u tubicu se baci, a kolonica se vrati nazad u istu tubicu. Kolonica se centrifugira jednu minutu još jednom kako bi se svi tragovi pufera za ispiranje uklonili, a zatim se stavi u čistu epruvetu volumena 2 mL. Da bi se DNA eluirala sa silika-filtera, u središte kolonice doda se 40 μL pufera EB, ostavi da odstoji jednu minutu, a zatim se jednu minutu centrifugira. Eluat s pročišćenim produktom reakcije PCR prebaci se u novu čistu epruvetu volumena 0,5 mL.

3.3.4.4. Reakcija sekvenciranja

U reakciji sekvenciranja pročišćeni produkti reakcije PCR obilježavaju se reagensom AB BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems, SAD) koji uz obične deoksinukleotid trifosfate (dNTP) sadrži i fluorescentno obilježene dideoksinukleotid trifosfate (ddNTP). Svaki ddNTP je obilježen drugom fluorescentnom bojom (crvenom, zelenom, plavom i žutom). Tijekom reakcije sekvenciranja DNA polimeraza nasumično veže dNTP i fluorescentno obilježene ddNTP u lanac koji se sintetizira. Prilikom vezanja fluorescentno obilježenih ddNTP na kalup DNA, prekida se sinteza komplementarnog lanca DNA. Nakon završetka programa, u reakciji sekvenciranja nalaze se lanci različitih duljina koji na svojem 3'-kraju sadrže fluorescentno obilježeni ddNTP. Za svaki uzorak rade se po dvije reakcije, a u svakoj se koristi samo jedna početnica, F (engl. *forward*) ili R (engl. *reverse*), od para korištenog za reakciju PCR.

Volumen smjese za reakciju sekvenciranja je 10 μL, a sastoji se od pročišćenog produkta reakcije PCR, pufera za reakciju sekvenciranja, F ili R početnice, gotove smjese AB BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit i sterilne destilirane vode (Tablica 12). Program za reakciju sekvenciranja na uređaju za PCR naveden je u tablici 13.

Tablica 12. Reakcijska smjesa za reakciju sekvenciranja volumena 10 µL

	Volumen [µL]	**Količina u reakciji**
sterilna destilirana voda	6,2	
AB BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit	1	1x
početnica F ili R (3,3 µM)	0,8	0,26 µM
pročišćeni produkt reakcije PCR	1	3-10 ng
pufer za reakciju sekvenciranja	1	0,5x

Tablica 13. Uvjeti reakcije sekvenciranja

	Temperatura	**Trajanje**	**Broj ciklusa**
Početna denaturacija	96 ˚C	2 minute	1
Denaturacija	96 ˚C	10 sekundi	25
Sparivanje	50 ˚C	5 sekundi	
Produljivanje	60 ˚C	4 minute	
Hlađenje	4 ˚C	Neograničeno	-

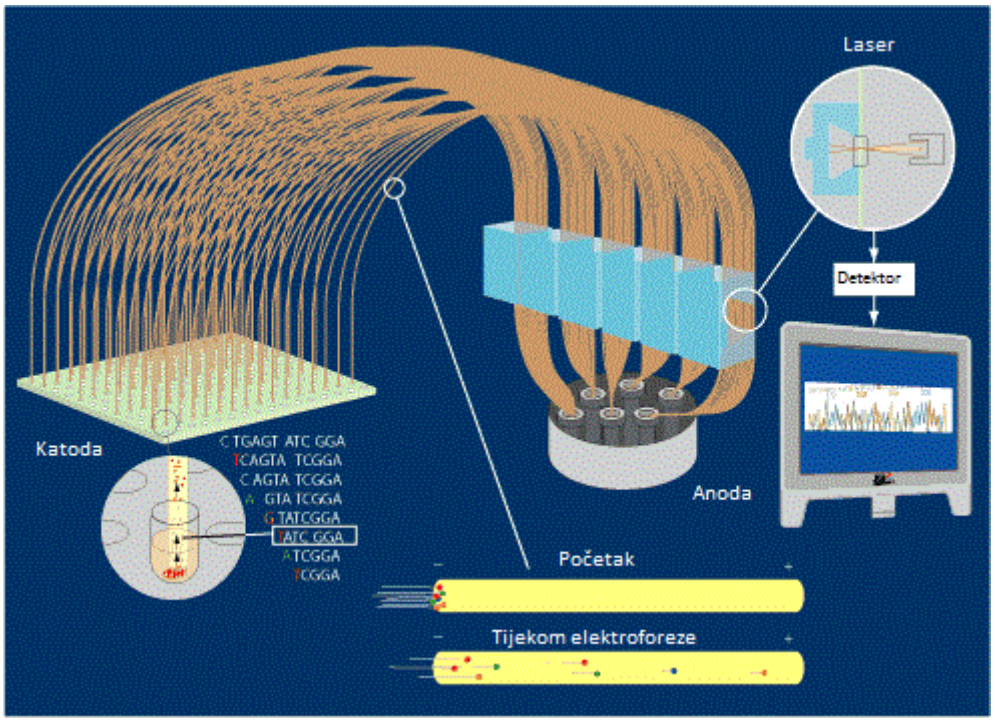
3.3.4.5. Pročišćavanje produkata reakcije sekvenciranja

Pročišćavanje produkata reakcije sekvenciranja provodi se pomoću kompleta reagenasa DyeEx 2.0 (Qiagen, Njemačka) koji sadrži kolonice s prehidriranim gelom koje se koriste uz pomoć mikrocentrifuge (Biofuge Pico Thermo Scientific, Heraeus, Njemačka). Pročišćavanjem se iz uzorka izvlači suvišak dideoksinukleotida obilježenih fluorescentnim bojama kojima se produkt reakcije PCR obilježava u reakciji sekvenciranja. Svi koraci pročišćavanja provode se pri relativnoj centrifugalnoj sili od 750 x g i sobnoj temperaturi. Prvo se gel unutar kolonice resuspendira na vrtložnoj miješalici (TK3S TechnoKartell, Kartell Labware, Italija). Čep kolonice zatim se otvori za četvrtinu okretaja da bi se izbjeglo stvaranje vakuuma u kolonici. Odlomi se zatvarač na dnu kolonice, a kolonica se stavi u kolekcijsku tubicu volumena 2 mL. Centrifugira se tri minute pri čemu se suvišak tekućine iz gela sakuplja na dnu tubice. Nakon toga kolonica se prenese u čistu epruvetu volumena 2 mL, a uzorak reakcije sekvenciranja pažljivo se nanese na sredinu površine gela unutar kolonice.

Ponovno se centrifugira tri minute. Eluat s pročišćenom DNA koristi se dalje za analizu na kapilarnoj elektroforezi.

3.3.4.6. Kapilarna elektroforeza produkata reakcije sekvenciranja

Kapilarna elektroforeza, kojom se umnoženi odsječci DNA razdvajaju na temelju njihove elektroforetske pokretljivosti u električnom polju, odvija se na uređaju AB Genetic Analyzer 3130xl (Applied Biosystems, SAD). Po 10 µL pročišćenog produkta reakcije sekvenciranja prenese se u pločicu s bunarićima u kojima se nalazi po 10 µL formamida (Hi-Di Formamide, Applied Biosystems, SAD) te se poklope gumenim septama s prorezom na čepu. Pločice se kratko centrifugiraju i zatim stavljaju u uređaj za kapilarnu elektroforezu. Fluorescentno obilježeni negativno nabijeni produkti reakcije sekvenciranja uvlače se u kapilaru ispunjenu tekućim polimerom, kao posljedica elektrokinetičke injekcije (Slika 18). Putujući kroz kapilaru produkti se razdvajaju na temelju svoje molekularne mase. Prije nego stignu do pozitivno nabijene elektrode (anode), produkti prolaze kroz dio kapilare koji je prislonjen uz optički čitač, gdje ih obasjava laserska zraka koja uzrokuje fluorescenciju krajnjih nukleotida u lancu. Ta fluorescencija se bilježi u računalnom programu Data Collection Software (Applied Biosystems, SAD) gdje se prevodi u elektroferogram, što je prikaz slijeda nukleotida u obliku pikova četiri različite boje koji označavaju četiri različita nukleotida. Za pregled rezultata i automatsku analizu podataka koriste se programi Sequencing Analysis v2.5 (Applied Biosystems, SAD) i SeqScape v2.5 (Applied Biosystems, SAD). U slučaju pronalaska promjene u sekvenci DNA u jednoj reakciji, ona za isti uzorak mora biti potvrđena i u drugoj. Patogenost utvrđenih promjena provjerava se u referentnim bazama podataka za mutacije povezane s CMT: The Human Gene Mutation Database (http://www.hgmd.org) i Inherited Peripheral Neuropathies Mutation Database (http://www.molgen.ua.ac.be/cmtmutations/Home/Default.cfm). Patogene i benigne varijante u genima *GJB1*, *MPZ* i *PMP22* imenovane su prema pravilima Društva za varijacije u humanom genomu, HGVS (engl. Human Genome Variation Society). Patogenost varijanti u DNA koje do sada nisu bile prijavljene u bazama procjenjuje se pomoću računalnih programa PolyPhen2 verzija 2.2.2 (Adzhubei i sur., 2010.), SIFT (Kumar i sur., 2009.) i PredictSNP (Bendl i sur., 2014.).



Slika 18. Kapilarna elektroforeza (preuzeto iz http://jgi.doe.gov/archived-educator-resources/sanger-sequencing-archive/how-sanger-sequencing-is-done/step-10-capillary-sequencing/, uz izmjene)

3.3.5. Statističke metode

Rezultati su prikazani tablično i grafički. U analizi je korištena deskriptivna statistika s odgovarajućim prikazom raspodjele po skupinama za kvantitativne i kvalitativne varijable. Razlike u varijablama po skupinama, nakon provjere normalnosti distribucije, analizirane su parametrijskim testom ANOVA s post-hoc analizom po Bonferroniju. Sve P vrijednosti manje od 0,05 smatrane su statistički značajnima. U analizi je korišten računalni program IBM SPSS Statistics 20.0.0.0 (IBM, SAD).

3.3.6. Procjena kvalitete molekularno-genetičkih analiza

S obzirom na to da se molekularno-genetičke analize rutinski provode u medicinskim laboratorijima više od 20 godina, a njihovi su rezultati neophodni za postavljanje točne dijagnoze u bolesnika, bitna je pouzdanost rezultata analiza. Kvaliteta rada medicinskog laboratorija kontrolira se vanjskom procjenom kvalitete (VPK). Uspješno sudjelovanje u VPK

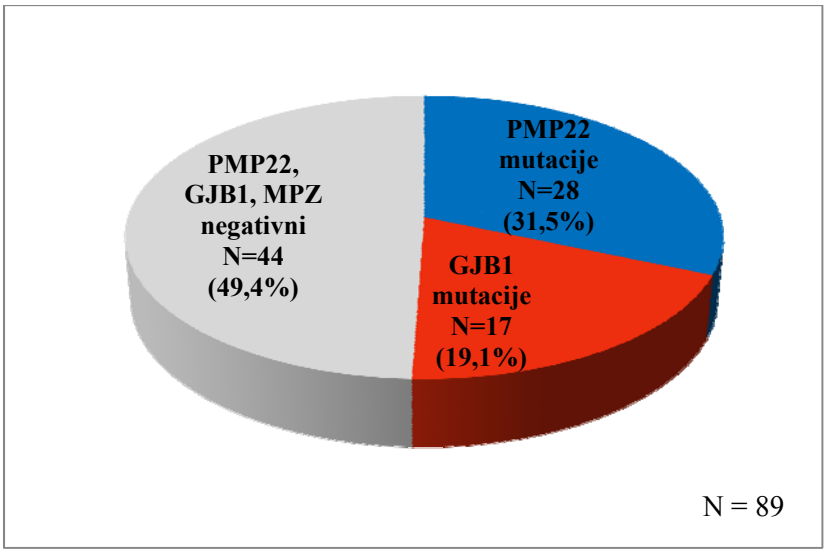
jedan je od osnovnih zahtjeva norme HRN EN ISO 15189 prema kojoj se provodi postupak akreditacije medicinsko-biokemijskih laboratorija.

Kontrola kvalitete za molekularno-genetičku analizu na Charcot-Marie-Tooth provodi se u organizaciji Europske mreže za molekularnu kvalitetu (engl. *European Molecular Quality Network,* EMQN). Organizator šalje uzorke DNA nepoznatog genotipa s pripadajućim kliničkim opisima svakog pojedinog slučaja. Uzorke VPK je potrebno obrađivati jednako kao i uzorke bolesnika. Za uspješno sudjelovanje u VPK potrebno je zadovoljiti više uvjeta. Prvi uvjet je točnost genotipizacije uzorka DNA koja mora biti izražena prema pravilima Društva za varijacije u humanom genomu (engl. *Human Genome Variation Society,* HGVS). Sljedeći uvjet je točnost interpretacije rezultata analize, gdje se navodi potvrda ili isključivanje dijagnoze bolesti, preporuka za dodatne analize, genetsko savjetovanje, dodatno testiranje bližih članova obitelji i slično. Posljednji dio koji se ocjenjuje je izgled samog nalaza i točnost podataka o bolesniku (ime, prezime, spol, datum rođenja, klinički podaci). Nalaz mora biti sažet i jasan, bez suvišnih podataka koji mogu uzrokovati nerazumijevanje. Također je potrebno navesti i metodu kojom se uzorak DNA analizirao, datum uzimanja uzorka kao i datum izdavanja nalaza. Zadovoljavanjem svih navedenih uvjeta medicinski laboratorij dobiva certifikat VPK za određenu molekularno-genetičku analizu. Vanjska procjena kvalitete potiče laboratorij da održava kvalitetu svog rada te slijedi nove trendove u molekularnoj dijagnostici (Hastings i Howell, 2010.)

4. REZULTATI

4.1. Podjela bolesnika prema rezultatima analize DNA

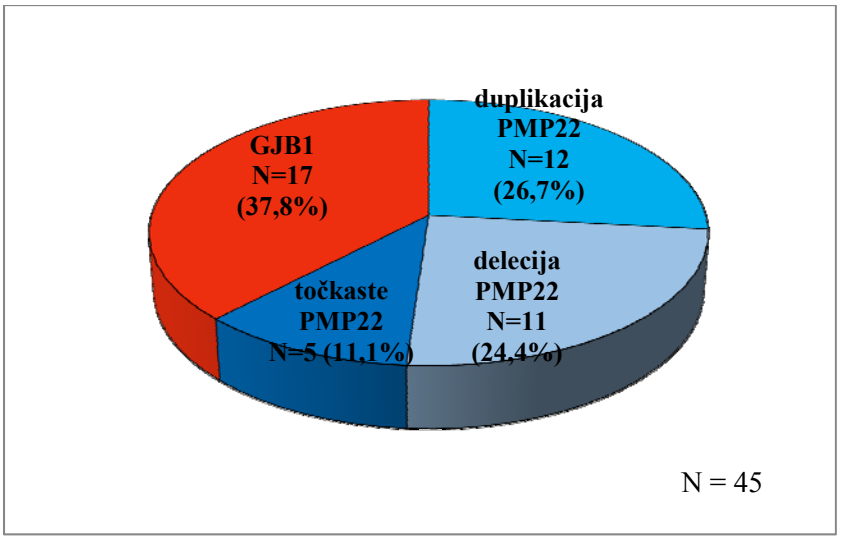
Od 89 bolesnika s CMT utvrđen je pozitivan nalaz analize DNA tj. uzročne mutacije kod njih 45 (50,6 %). Od toga su u 28 bolesnika iz 24 obitelji utvrđene mutacije u genu *PMP22*, a kod 17 bolesnika iz 11 obitelji, u genu *GJB1*. Kod 44 (49,4 %) bolesnika s kliničkom dijagnozom CMT, nisu utvrđene mutacije u genu *PMP22*, *GJB1* ili *MPZ* (Slika 19).



Slika 19. Izjednačen omjer pozitivnih i negativnih nalaza analize DNA u skupini bolesnika

4.2. CMT mutacije u Republici Hrvatskoj

Ukupno je utvrđeno 13 različitih mutacija u genima *PMP22* i *GJB1* (Tablica 14). Duplikacija *PMP22* utvrđena je u 12 bolesnika iz 11 obitelji (Slika 21), delecija *PMP22* u 11 bolesnika iz 10 obitelji (Slika 22), točkaste *PMP22* mutacije u 5 bolesnika iz 3 obitelji i točkaste *GJB1* mutacije u 17 bolesnika iz 11 obitelji. Relativan omjer ove četiri vrste mutacija kod 45 bolesnika s pozitivnim nalazom analize DNA prikazan je na slici 20.



Slika 20. Omjer gena i vrste mutacije u bolesnika s pozitivnim nalazom analize DNA

Od točkastih mutacija u genu *PMP22* pronađene su c.2T>C, p.Met1Thr (u dva ispitanika iz jedne obitelji, slika 23), c.59_64delTCGTCT, p.Phe20_Val21del (u dva ispitanika iz jedne obitelji, slika 24) i c.353C>T, p.Thr118Met (u jednog ispitanika, slika 29).

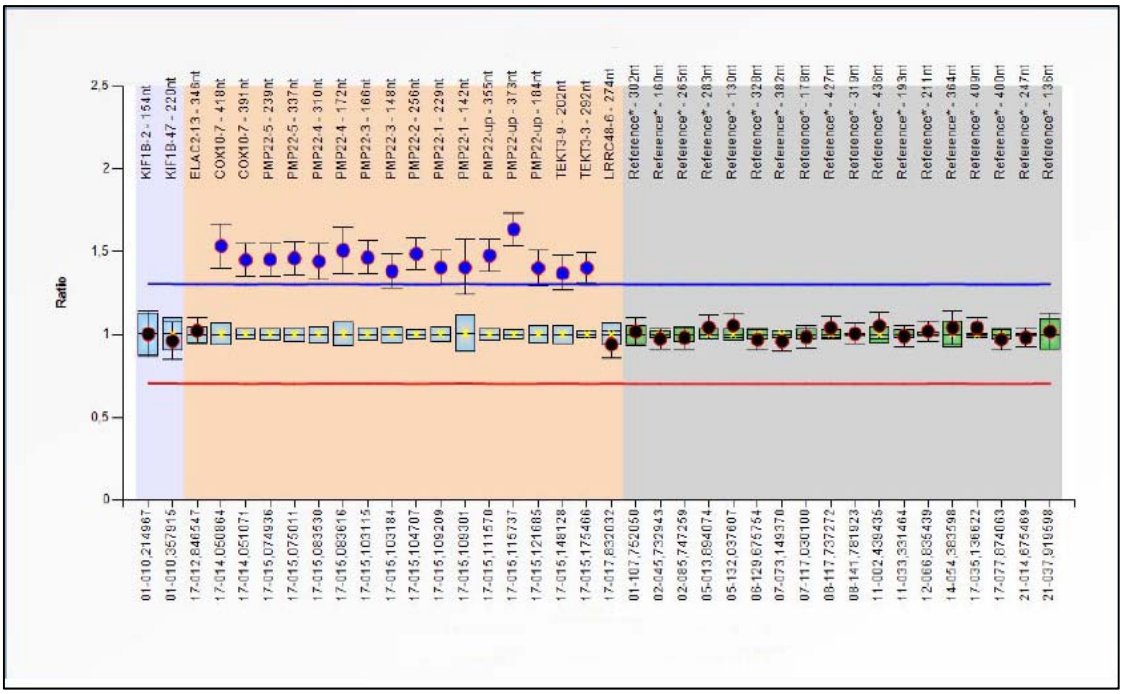
Od mutacija u genu *GJB1*, najčešća je c.509T>A, p.Val170Asp koja je utvrđena u četiri ispitanika (iz tri različite obitelji), te c.37G>A, p.Val13Met utvrđena u tri ispitanika (iz dvije različite obitelji). Ostale utvrđene mutacije u GJB1 su c.323T>C, p.Leu108Pro (u tri ispitanika iz jedne obitelji), c.548G>A, p.Arg183His (u dva ispitanika iz jedne obitelji), c.422T>C, p.Phe141Ser (u dva ispitanika iz jedne obitelji, slike 26 i 27), c.145T>C, p.Ser49Pro (u jednog ispitanika), c.86T>C, p.Phe29Ser (u jednog ispitanika, slika 25), i c.529G>A, p.Val177Met (u jednog ispitanika, slika 28).

Mutacije c.2T>C, (p.Met1Thr) i c.59_64delTCGTCT (p.Phe20_Val21del) u genu *PMP22* te c.86T>C (p.Phe29Ser), c.422T>C (p.Phe141Ser), i c.529G>A (p.Val177Met) u genu *GJB1* nisu dosad opisane u literaturi, te ih smatramo novo otkrivenim mutacijama.

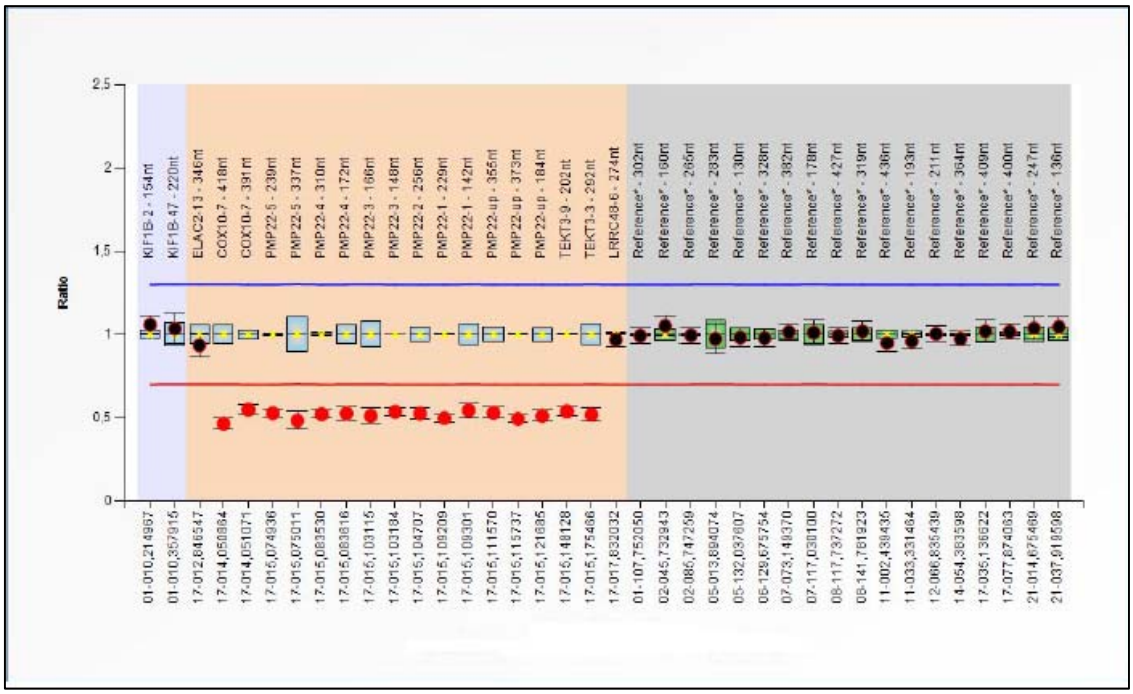
U devet od ukupno 35 obitelji mutacije su utvrđene kod dva člana obitelji. Duplikacija, odnosno delecija *PMP22* utvrđene su svaka kod jedne obitelji, *PMP22* točkaste mutacije u dvije obitelji, a *GJB1* mutacije u pet obitelji. U našem uzorku od 89 CMT bolesnika nije utvrđena niti jedna patogena mutacija u *MPZ* genu.

Tablica 14. Mutacije utvrđene u skupini bolesnika s CMT

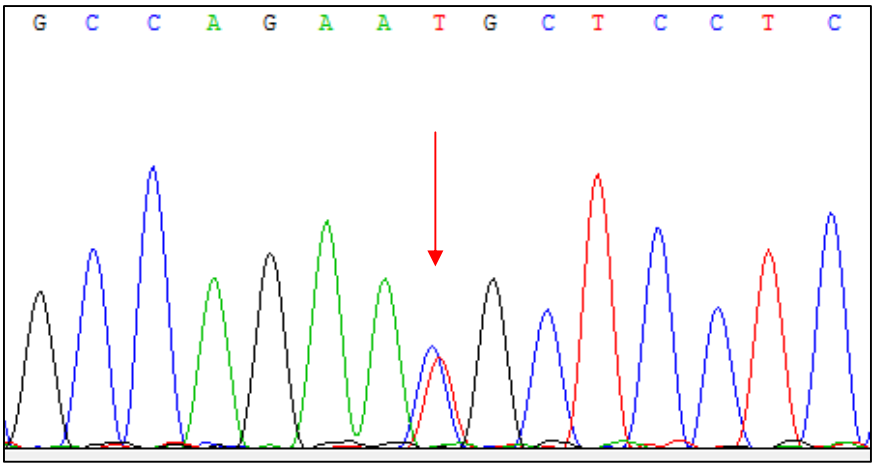
	Gen	Ekson	Mutacija	Učinak mutacije	Domena proteina	Literatura
1.	PMP22	-	Heterozigotna duplikacija	Duplikacija gena	-	Lupski i sur., 1991
2.	PMP22	-	Heterozigotna delecija	Delecija gena	-	Chance i sur., 1993
3.	PMP22	2	**c.2T>C, p.Met1Thr ***	Promjena smisla	Transmembranska domena 1	-
4.	PMP22	2	**c.59_64delTCGTCT, p.Phe20_Val21del ***	Delecija	Transmembranska domena 1	-
5.	PMP22	5	c.353C>T, p.Thr118Met	Promjena smisla	Transmembranska domena 3	Roa i sur., 1993
6.	GJB1	2	c.37G>A, p.Val13Met	Promjena smisla	N-terminalni kraj	Bone i sur., 1997
7.	GJB1	2	**c.86T>C, p.Phe29Ser ***	Promjena smisla	Transmembranska domena 1	-
8.	GJB1	2	c.145T>C, p.Ser49Pro	Promjena smisla	Ekstracelularna domena 1	Street i sur., 2002
9.	GJB1	2	c.323T>C, p.Leu108Pro	Promjena smisla	Intracelularna domena	Boerkoel i sur., 2002
10.	GJB1	2	**c.422T>C, p.Phe141Ser ***	Promjena smisla	Transmembranska domena 3	-
11.	GJB1	2	c.509T>A, p.Val170Asp	Promjena smisla	Ekstracelularna domena 2	Jakubiczka i sur., 2006
12.	GJB1	2	**c.529G>A, p.Val177Met ***	Promjena smisla	Ekstracelularna domena 2	-
13.	GJB1	2	c.548G>A, p.Arg183His	Promjena smisla	Ekstracelularna domena 2	Bort i sur., 1997
***novo otkrivene mutacije**						



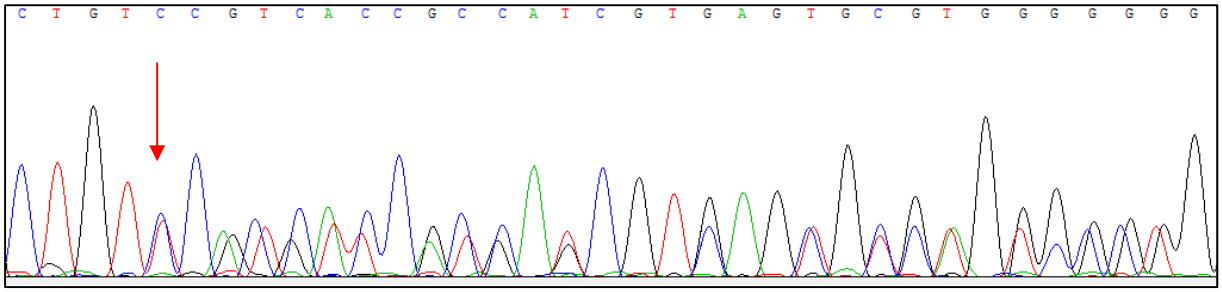
Slika 21. Heterozigotna duplikacija gena *PMP22* (ispitanik 5R1)



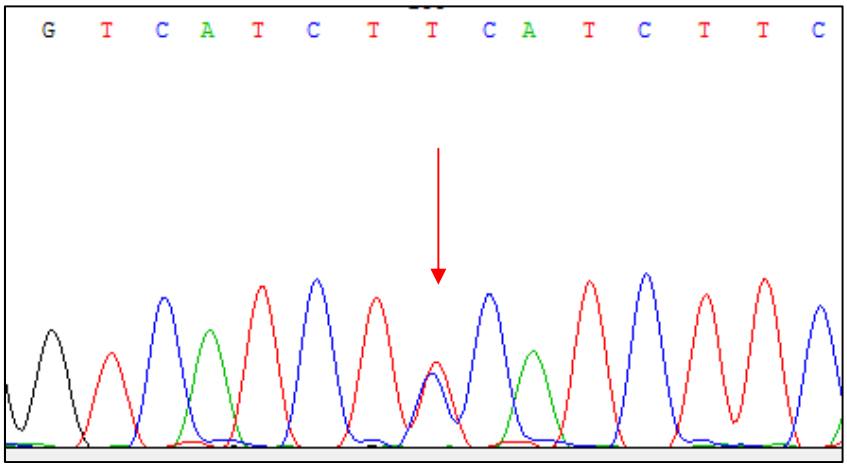
Slika 22. Heterozigotna delecija gena *PMP22* (ispitanik 13V1)



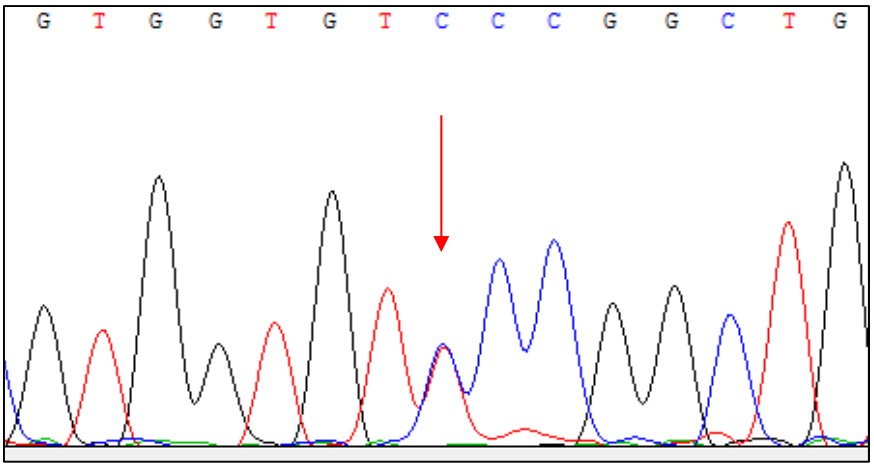
Slika 23. Heterozigotna mutacija promjene smisla c.2T>C, p.Met1Thr u eksonu 2 gena *PMP22* (ispitanik 23H1)



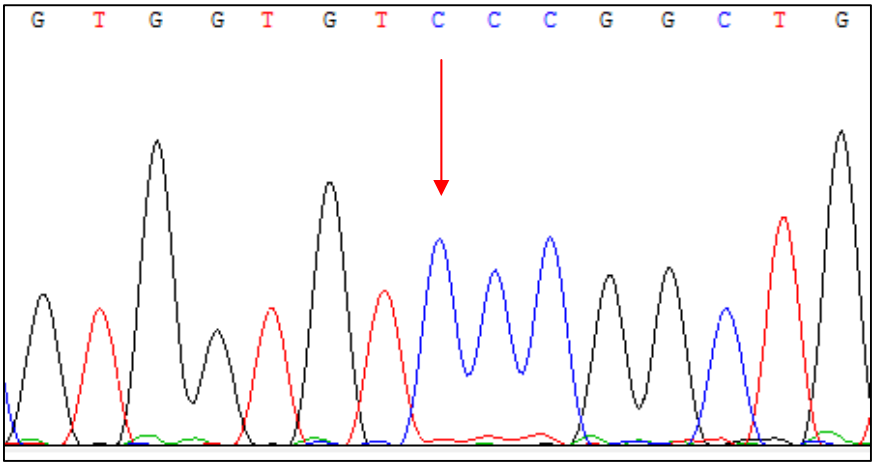
Slika 24. Heterozigotna delecija c.59_64delTCGTCT, Phe20_Val21del u eksonu 2 gena *PMP22* (ispitanik 22V2)



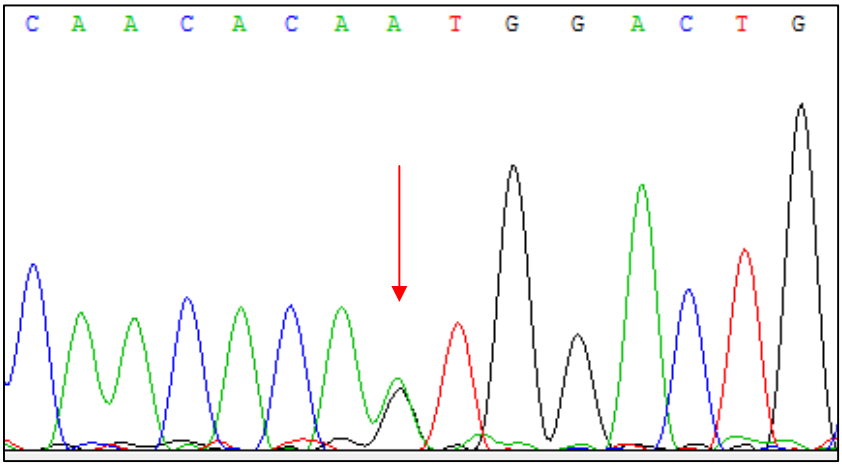
Slika 25. Heterozigotna mutacija promjene smisla c.86T>C, p.Phe29Ser u eksonu 2 gena *GJB1* (ispitanik 33Ž1)



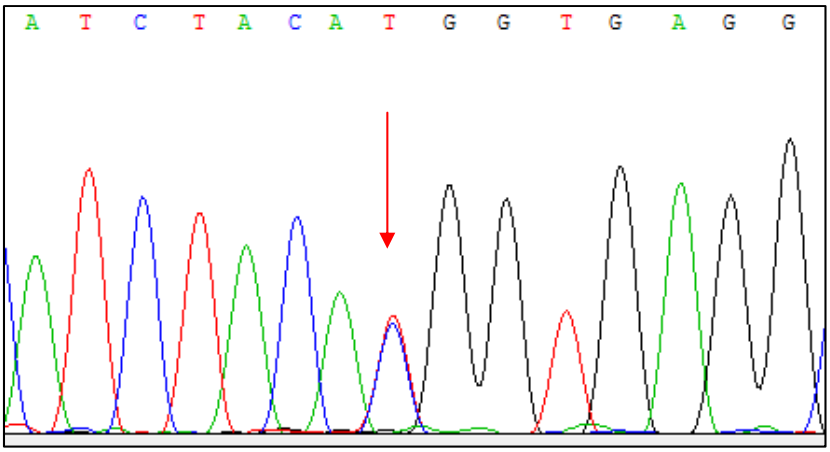
Slika 26. Heterozigotna mutacija promjene smisla c.422T>C, p.Phe141Ser u eksonu 2 gena *GJB1* (ispitanik 32Š1)



Slika 27. Hemizigotna mutacija promjene smisla c.422T>C, p.Phe141Ser eksonu 2 u gena *GJB1* (ispitanik 32Š2)



Slika 28. Heterozigotna mutacija promjene smisla c.529G>A, p.Val177Met u eksonu 2 gena *GJB1* (ispitanik 29K1)



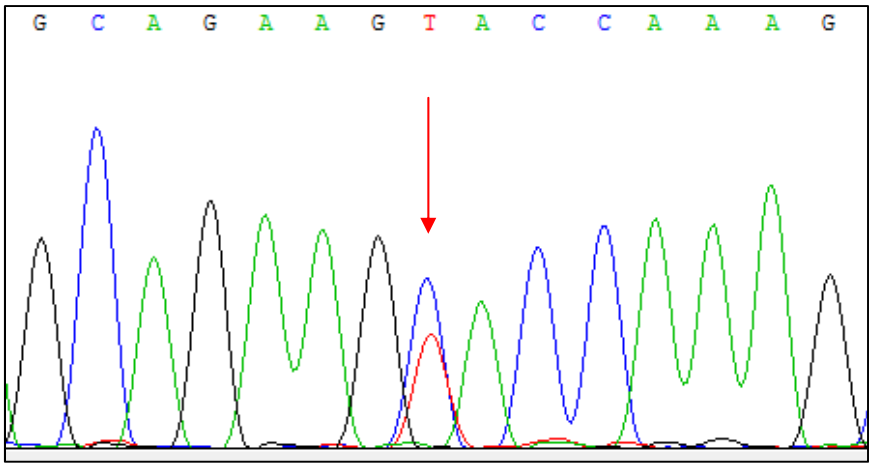
Slika 29. Heterozigotna mutacija promjene smisla c.353C>T, p.Thr118Met u eksonu 5 gena *PMP22* (ispitanik 24I1)

4.3. Polimorfizmi u bolesnika s CMT u Republici Hrvatskoj

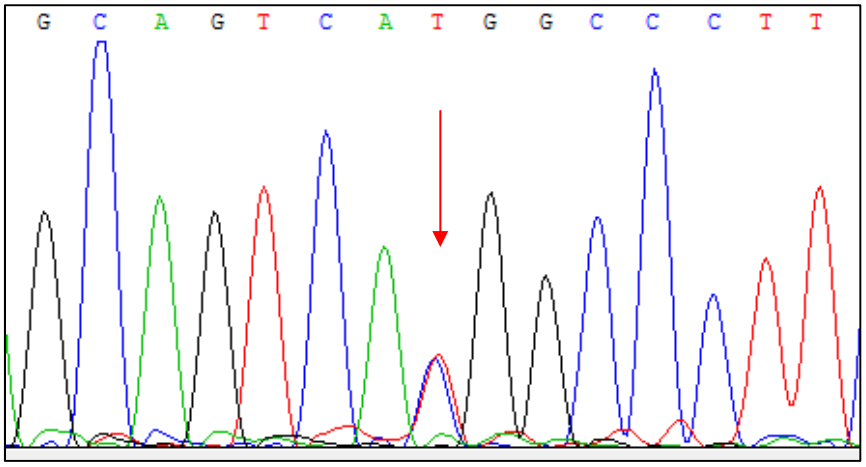
Polimorfizmi DNA u bolesnika s CMT utvrđeni su u sva tri gena, *GJB1*, *MPZ* i *PMP22* (Tablica 15). Polimorfizmi s najvećom učestalošću su c.178+22A>G (kod 35 ispitanika) i c*59A>C (kod 31 ispitanika) u genu *PMP22*. Ostali utvrđeni polimorfizmi su c.179-83T>C (kod 13 ispitanika, slika 31), c.319+33C>T (kod tri ispitanika) i c.327C>T, p.Cys109Cys (kod jednog ispitanika) u genu *PMP22*, zatim c.235C>T, p.Leu79Leu (kod jednog ispitanika) u genu *GJB1* te c.24C>T, p.Ser8Ser (kod jednog ispitanika) i c.684C>T, p.Ser228Ser (kod jednog ispitanika) u genu *MPZ* (Slika 30).

Tablica 15. Popis polimorfizama utvrđenih u bolesnika s CMT

Polimorfizam	Gen	Ekson/intron	Domena	Referenca
c.178+22A>G	PMP22	Intron 3	-	-
c.179-83T>C	PMP22	Intron 3	-	-
c.319+33C>T	PMP22	Intron 4	-	-
c.327C>T, p.Cys109Cys	PMP22	Ekson 5	Transmembranska domena 3	Bort i sur., 1997
c*59A>C	PMP22	3' UTR	3' UTR	-
c.235C>T, p.Leu79Leu	GJB1	Ekson 2	Transmembranska domena 2	Mersiyanova i sur., 2000
c.24C>T, p.Ser8Ser	MPZ	Ekson 1	N-terminalni kraj	Grskovic i sur., 2002
c.684C>T, p.Ser228Ser	MPZ	Ekson 6	Intracelularna domena	Nelis i sur., 1994



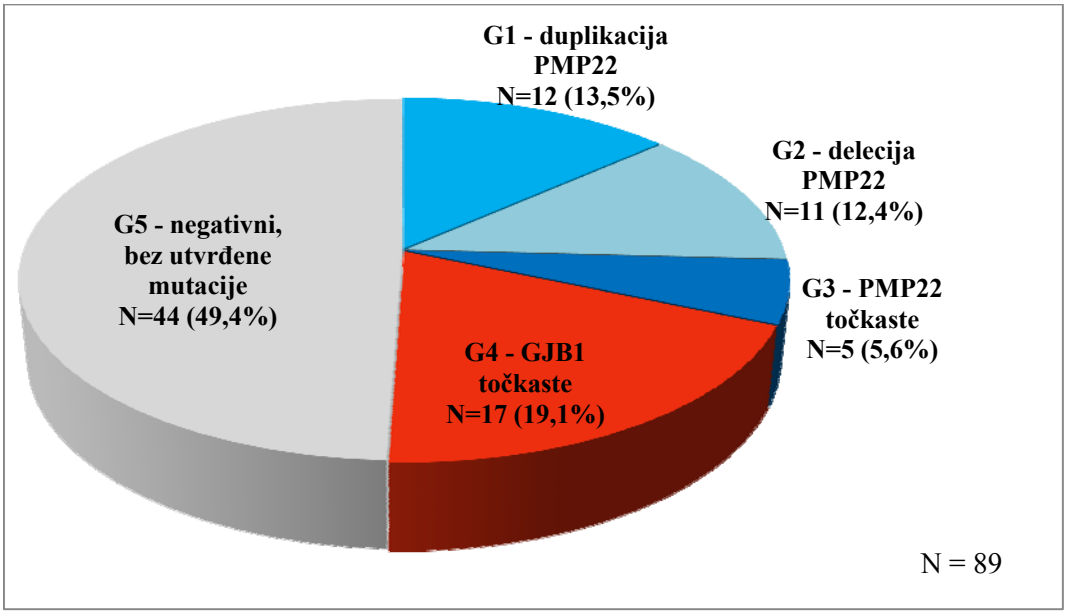
Slika 30. Polimorfizam c.684C>T, p.Ser228Ser u heterozigotnom statusu u eksonu 6 gena *MPZ* (ispitanik 50M1)



Slika 31. Polimorfizam c.179-83T>C u heterozigotnom statusu u intronu 3 gena *PMP22* (ispitanik 47K1)

4.4. Povezanost genotipa i fenotipa u bolesnika s CMT

Nakon molekularno-genetičke analize bolesnici su prema genotipu podijeljeni u 5 skupina: G1, bolesnici kojima je utvrđena duplikacija gena *PMP22*, 12 ispitanika iz 11 obitelji (13,5 %); G2, bolesnici kojima je utvrđena delecija gena *PMP22*, 11 ispitanika iz 10 obitelji (12,4 %); G3, bolesnici s točkastom mutacijom u genu *PMP22*, 5 ispitanika iz tri obitelji (5,6 %); G4, bolesnici s mutacijom u genu *GJB1*, 17 ispitanika iz 11 obitelji (19,1 %) i G5, bolesnici bez utvrđene mutacije, 44 ispitanika iz 41 obitelji (49,4 %). Na slici 32 prikazana je podjela bolesnika po skupinama G1 do G5.



Slika 32. Podjela bolesnika s CMT prema genotipu u skupine G1 do G5

4.4.1. Ocjena kliničkog fenotipa u bolesnika s CMT s utvrđenim mutacijama

U ocjeni fenotipa korištena je semikvantitativna skala težine ispada temeljena na ključnim elementima kliničkog neurološkog statusa tj. mogućnosti samostalnog hoda, hoda po peti i prstima, atrofiji mišića te prisutnosti tetivnih refleksa i osjeta. Bolesnici su ocijenjeni kao asimptomatski (+), s blažim, ali jasnim neurološkim deficitom (++) i teškim funkcionalnim ispadima uz karakterističnо padanje stopala pri hodu (+++).

Tablice 16 do 19 prema skupinama G1 do G5 prikazuju osnovne podatke o bolesnicima (dob, spol, dob početka bolesti), vrstu mutacije, prisutnost bolesti u obitelji i ocjenu fenotipa. Udio sporadičnih, te asimptomatskih slučajeva prema genotipu prikazan je dijagramima na slikama 33 do 36. Na slici 33 može se uočiti da je udio sporadičnih slučajeva CMT trostruko veći u skupini DNA negativnih bolesnika. Trećina slučajeva kod duplikacije *PMP22* (Slika 34A) i delecije *PMP22* (Slika 34B) je sporadično, dok je kod mutacija u *GJB1* uočljivo prevladavanje obiteljskih slučajeva (Slika 34C). Udio asimptomatskih oblika bolesti veći je kod delecije *PMP22* nego kod duplikacije *PMP22* (Slika 35). Kod mutacija u *GJB1* razlika u zastupljenosti asimptomatskih slučajeva je spolno vezana, s većim udjelom ženskog spola (Slika 36).

Tablica 16. Ocjena fenotipa bolesnika s duplikacijom *PMP22* (skupina G1)

Oznaka obitelji	Oznaka ispitanika	Spol	Dob	Bolest u obitelji	Dob početka bolesti	Fenotip
1G	1G1	Ž	39	+	4-12	++
2J	2J1	M	70	-	4-12	+++
3K	3K1	M	45	+	20-55	++
4L	4L1	Ž	36	+	4-12	++
4L	4L2	M	60	+	12-19	+++
5R	5R1	Ž	51	-	4-12	++
6R	6R1	Ž	47	+	20-55	++
7Š	7Š1	M	19	+	0-4	++
8Š	8Š1	M	51	+	12-19	++
9R	9R1	M	54	-	20-55	+
10D	10D1	M	14	-	12-19	++
11H	11H1	M	33	+	20-55	++

Tablica 17. Ocjena fenotipa bolesnika s delecijom *PMP22* (skupina G2)

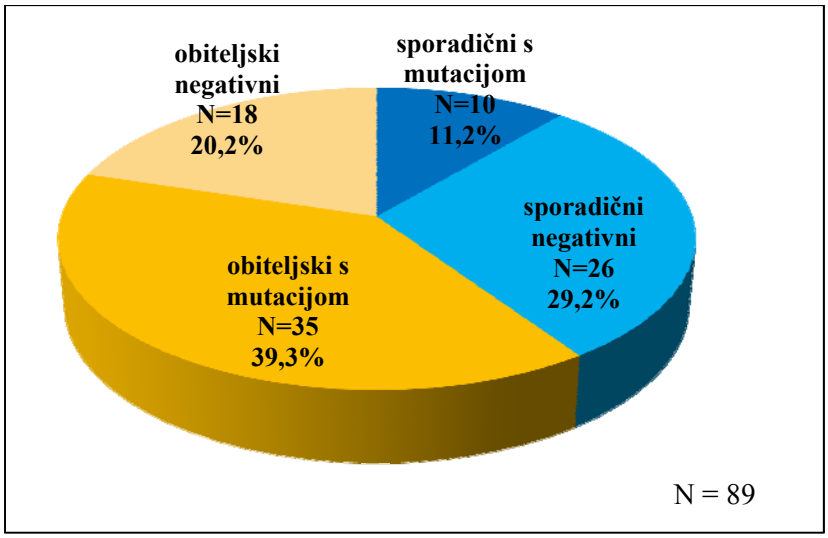
Oznaka obitelji	Oznaka ispitanika	Spol	Dob	Bolest u obitelji	Dob početka bolesti	Fenotip
12K	12K1	Ž	29	-	20-55	++
13V	13V1	M	16	+	12-19	++
13V	13V2	Ž	42	+	20-55	+
14Č	14Č1	Ž	41	+	20-55	+
15H	15H1	Ž	42	+	20-55	++
16B	16B1	M	51	+	4-12	+++
17H	17H1	Ž	61	+	12-19	++
18H	18H1	M	18	-	12-19	++
19K	19K1	M	40	-	20-55	++
20M	20M1	Ž	32	-	20-55	+
21Š	21Š1	M	35	+	20-55	+

Tablica 18. Genotip i ocjena fenotipa bolesnika s točkastom mutacijom u *PMP22* (skupina G3)

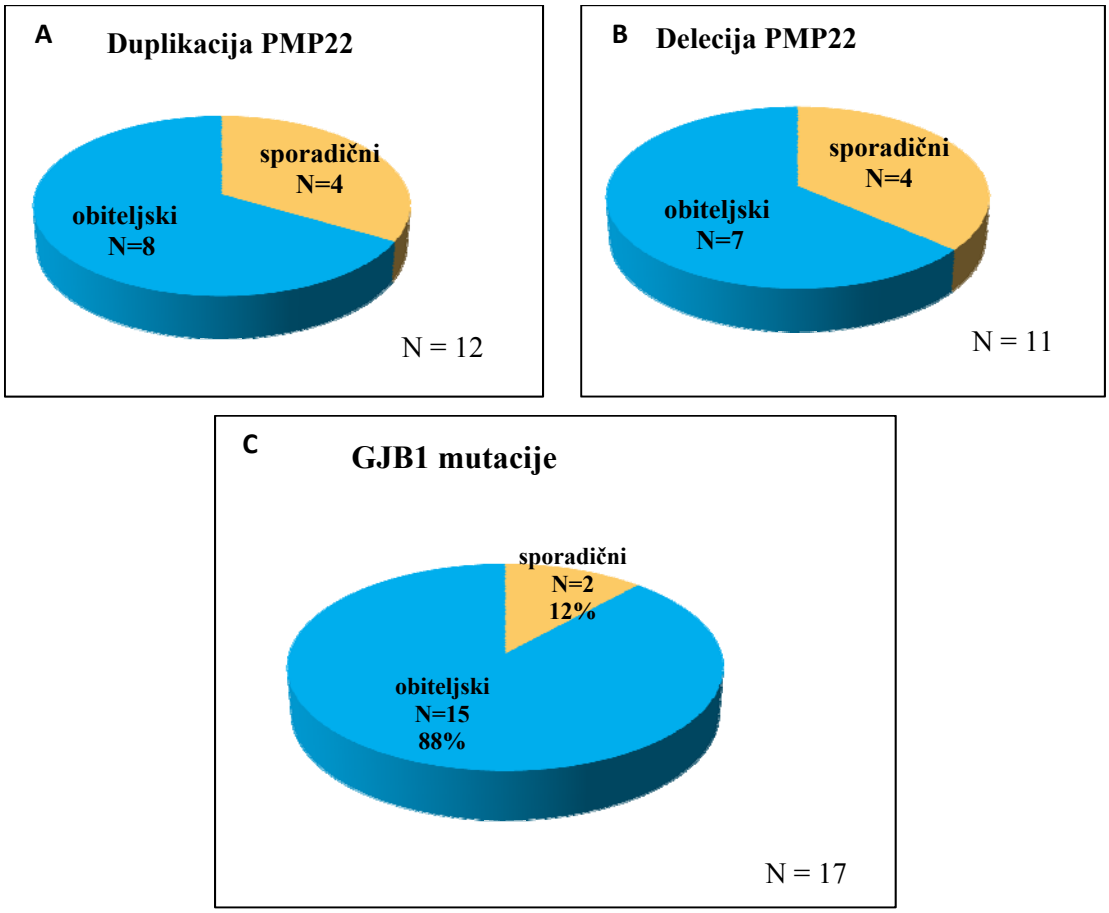
Mutacija na razini DNA	Mutacija na razini proteina	Oznaka obitelji	Oznaka ispitanika	Spol	Dob	Bolest u obitelji	Dob početka bolesti	Fenotip
c.2T>C	p.Met1Thr	23H	23H1	Ž	49	+	20-55	+
c.2T>C	p.Met1Thr	23H	23H2	M	20	+	12-19	+
c.59_64delTCGTCT	p.Phe20_Val21del	22V	22V1	M	16	+	4-12	++
c.59_64delTCGTCT	p.Phe20_Val21del	22V	22V2	M	15	+	4-12	++
c.353C>T	p.Thr118Met	24I	24I1	M	59	+	20-55	+++

Tablica 19. Genotip i ocjena fenotipa bolesnika s točkastom mutacijom u *GJB1* (skupina G4)

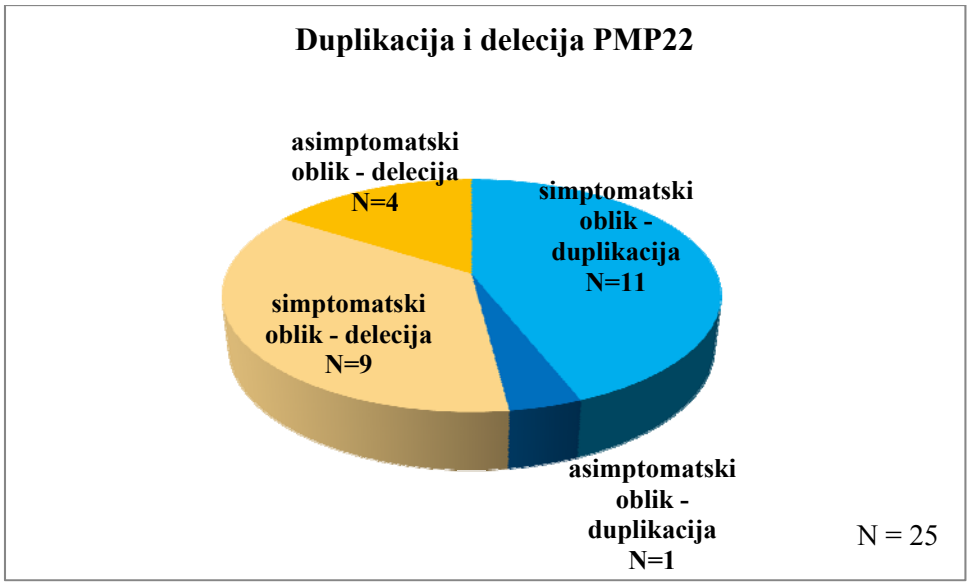
Mutacija na razini DNA	Mutacija na razini proteina	Oznaka obitelji	Oznaka ispitanika	Spol	Dob	Bolest u obitelji	Dob početka bolesti	Fenotip
c.37G>A	p.Val13Met	27B	27B1	M	40	+	20-55	+
c.37G>A	p.Val13Met	27B	27B2	Ž	69	+	20-55	+++
c.37G>A	p.Val13Met	35V	35V1	Ž	53	+	20-55	+
c.86T>C	p.Phe29Ser	34Ž	34Ž1	Ž	57	+	4-12	++
c.145T>C	p.Ser49Pro	28S	28S1	Ž	65	+	55-75	++
c.323T>C	p.Leu108Pro	29N	29N1	Ž	54	+	20-55	+
c.323T>C	p.Leu108Pro	29N	29N2	M	28	+	4-12	++
c.323T>C	p.Leu108Pro	29N	29N3	Ž	26	+	12-19	+
c.422T>C	p.Phe141Ser	33Š	33Š1	Ž	45	+	4-12	++
c.422T>C	p.Phe141Ser	33Š	33Š2	M	51	+	12-19	+++
c.509T>A	p.Val170Asp	25V	25V1	M	43	-	4-12	+++
c.509T>A	p.Val170Asp	26B	26B1	M	61	+	20-55	+++
c.509T>A	p.Val170Asp	31Ž	31Ž1	Ž	23	+	4-12	++
c.509T>A	p.Val170Asp	31Ž	31Ž2	M	49	+	20-55	+++
c.529G>A	p.Val177Met	30K	30K1	Ž	17	-	12-19	++
c.548G>A	p.Arg183His	32J	32J1	M	13	+	0-4	++
c.548G>A	p.Arg183His	32J	32J2	Ž	35	+	20-55	+



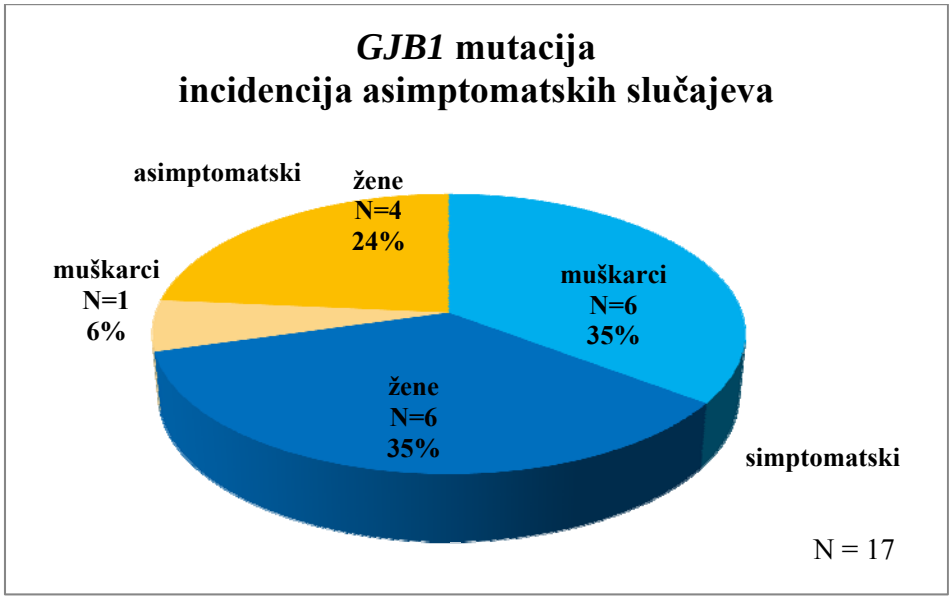
Slika 33. Ukupni udio sporadičnih slučajeva CMT



Slika 34. Udio sporadičnih slučajeva kod duplikacije *PMP22* (A), delecije *PMP22* (B) i mutacija u *GJB1* (C)



Slika 35. Udio asimptomatskih oblika bolesti kod duplikacije *PMP22* i delecije *PMP22*



Slika 36. Razlika u zastupljenosti asimptomatskih slučajeva kod muškaraca i žena sa mutacijom u *GJB1*

4.4.2. CMT karakteristike elektroneurografskog nalaza

Elektroneurografski su ispitani živci na rukama (*n.medianus*, *n.ulnaris*) i nogama (*n.peroneus*, *n.tibialis*). Za prikaz je odabran *n.medianus*, jer predstavlja standard u dijagnostici i ujedno živac prema čijim su brzinama provodljivosti polineuropatije CMT podijeljene na tipove.

Svi bolesnici iz skupina G1, G2, G3, G4 i G5 imali su smanjene brzine provodljivosti i smanjene amplitude potencijala jednog ili više ispitivanih živaca. U tablicama 20 do 23 popisane su vrijednosti elektroneurografskih parametara kod svih bolesnika iz skupina G1 do G4, a grafički su prikazane na slikama 37 do 40.

Tablica 20. Elektroneurografske karakteristike bolesnika s duplikacijom *PMP22* (skupina G1) (Tumačenje: MNCV - brzina provodljivosti motoričkog živca, CMAP - amplituda mišićnog potencijala, SNCV - brzina provodljivosti senzoričkog živca, SNAP - amplituda senzoričkog potencijala)

Oznaka obitelji	**Oznaka ispitanika**	**Spol**	**Dob**	***N.medianus***			
				MNCV (m/s)	CMAP (mV)	SNCV (m/s)	SNAP (μV)
1G	1G1	Ž	39	23,6	4,5	21,5	2,6
2J	2J1	M	70	19,8	1,9	0	0
3K	3K1	M	45	27,2	3,9	0	0
4L	4L1	Ž	36	35,2	13,5	0	0
4L	4L2	M	60	23,2	4,6	0	0
5R	5R1	Ž	51	23,1	1,8	18,6	0,7
6R	6R1	Ž	47	26,3	6,0	0	0
7Š	7Š1	M	19	/	5,5	21	1,4
8Š	8Š1	M	51	20,9	1,3	0	0
9R	9R1	M	54	35,5	6,1	24,4	2,4
10D	10D1	M	14	18,5	1,3	0	0
11H	11H1	M	33	24,0	9,1	0	0

Tablica 21. Elektroneurografske karakteristike bolesnika s delecijom *PMP22* (skupina G2)

Oznaka obitelji	**Oznaka ispitanika**	**Spol**	**Dob**	***N.medianus***			
				MNCV (m/s)	CMAP (mV)	SNCV (m/s)	SNAP (μV)
12K	12K1	Ž	29	39,7	13	17,9	1,3
13V	13V1	M	16	47,6	11,3	/	0
13V	13V2	Ž	42	41,8	10,5	24,1	4,5
14Č	14Č1	Ž	41	43	6,7	0	0
15H	15H1	Ž	42	50,0	5,1	0	0
16B	16B1	M	51	/	/	0	/
17H	17H1	Ž	61	47,1	8,5	30,0	1,4
18H	18H1	M	18	53,3	8	41,8	2,0
19K	19K1	M	40	56,0	9,5	38,7	2,4
20M	20M1	Ž	32	47,4	12,5	40	8,6
21Š	21Š1	M	35	58,4	12,6	35,6	4,5

Tablica 22. Elektroneurografske karakteristike bolesnika s točkastom mutacijom u *PMP22* (skupina G3)

Mutacija na razini DNA	**Mutacija na razini proteina**	**Oznaka obitelji**	**Oznaka ispitanika**	**Spol**	**Dob**	***N.medianus***			
						MNCV (m/s)	CMAP (mV)	SNCV (m/s)	SNAP (μV)
c.2T>C	p.Met1Thr	23H	23H1	Ž	49	50,5	11,8	45,3	5,7
c.2T>C	p.Met1Thr	23H	23H2	M	20	59,6	14,5	44,4	9,8
c.59_64delTCGTCT	p.Phe20_Val21del	22V	22V1	M	16	17,9	4,2	/	0
c.59_64delTCGTCT	p.Phe20_Val21del	22V	22V2	M	15	15,4	1,8	0	0
c.353C>T	p.Thr118Met	24I	24I1	M	59	50,4	12,3	48,4	0,76

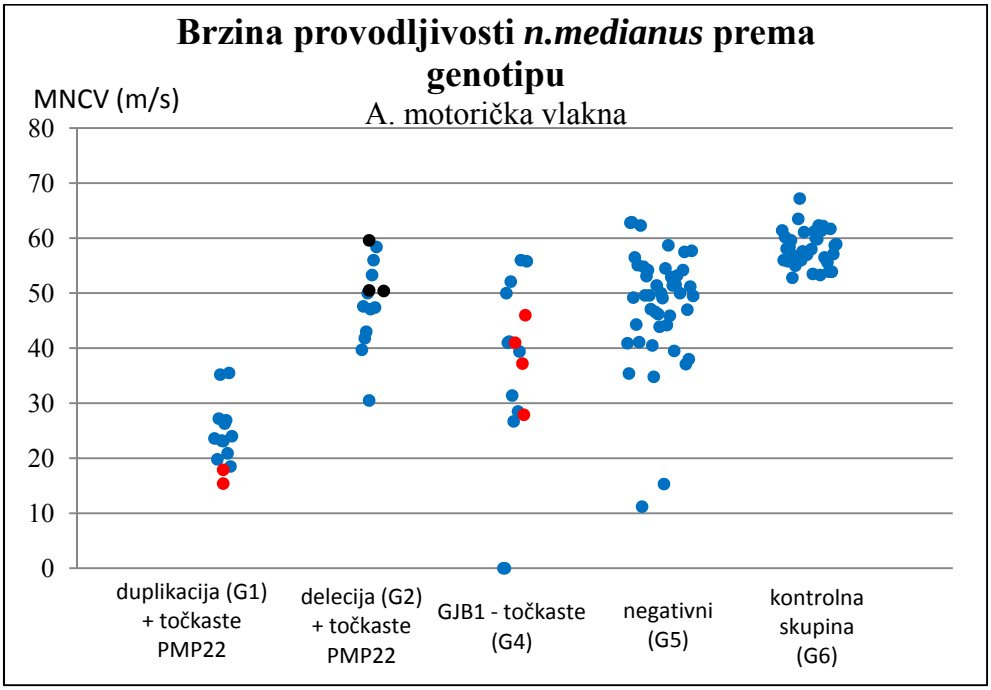
Tablica 23. Elektroneurografske karakteristike bolesnika s točkastom mutacijom u *GJB1* (skupina G4)

Mutacija na razini DNA	**Mutacija na razini proteina**	**Oznaka obitelji**	**Oznaka ispitanika**	**Spol**	**Dob**	**N.medianus**			
						MNCV (m/s)	CMAP (mV)	SNCV (m/s)	SNAP (μV)
c.37G>A	p.Val13Met	27B	27B1	M	40	50,0	7,3	51,9	6,7
c.37G>A	p.Val13Met	27B	27B2	Ž	69	41,0	0,4	31,2	1,8
c.37G>A	p.Val13Met	35V	35V1	Ž	53	55,8	5,5	51,5	4,7
c.86T>C	p.Phe29Ser	34Ž	34Ž1	Ž	57	46,0	10,8	31	1,2
c.145T>C	p.Ser49Pro	28S	28S1	Ž	65	41,2	7,8	31,8	0,93
c.323T>C	p.Leu108Pro	29N	29N1	Ž	54	52,1	11,9	40,6	1,7
c.323T>C	p.Leu108Pro	29N	29N2	M	28	31,4	0,9	0	0
c.323T>C	p.Leu108Pro	29N	29N3	Ž	26	26,7	5,4	0	0
c.422T>C	p.Phe141Ser	33Š	33Š1	Ž	45	37,2	7,8	37,7	1,4
c.422T>C	p.Phe141Ser	33Š	33Š2	M	51	27,9	0,1	0	0
c.509T>A	p.Val170Asp	25V	25V1	M	43	0	0	0	0
c.509T>A	p.Val170Asp	26B	26B1	M	61	0	0	0	0
c.509T>A	p.Val170Asp	31Ž	31Ž1	Ž	23	/	1,3	33,1	1,9
c.509T>A	p.Val170Asp	31Ž	31Ž2	M	49	28,5	0,2	39,8	2,4
c.529G>A	p.Val177Met	30K	30K1	Ž	17	41,0	5,0	41,3	1,6
c.548G>A	p.Arg183His	32J	32J1	M	13	39,4	2,6	41,2	1,7
c.548G>A	p.Arg183His	32J	32J2	Ž	35	56,0	7,2	42,9	0,9

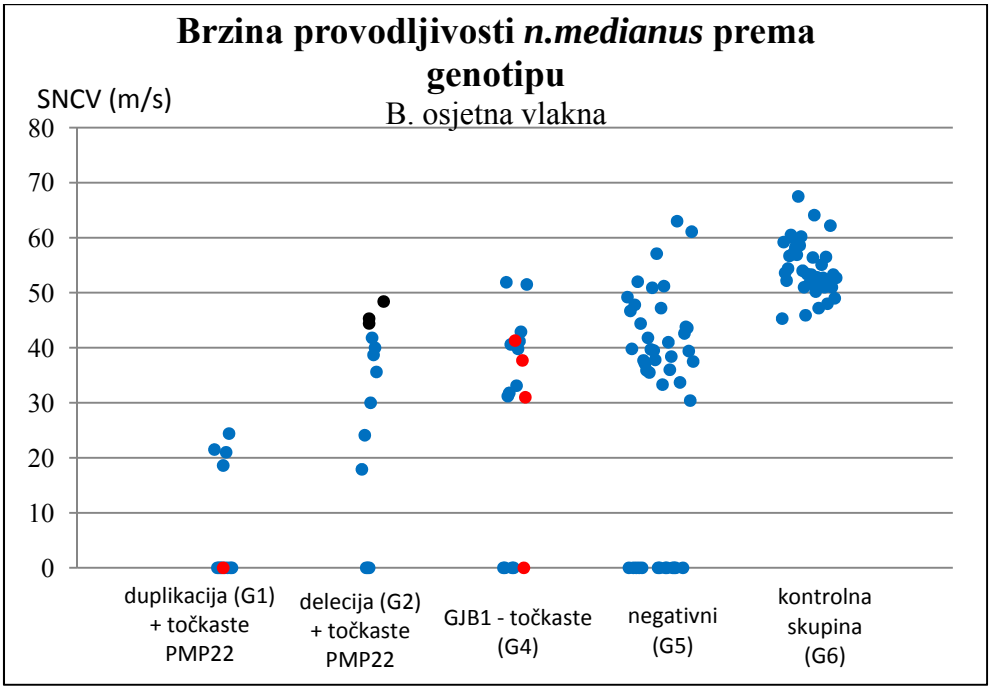
S obzirom na to da je u skupini G3 bilo samo pet ispitanika, ista nije uvrštena u daljnju statističku analizu, ali su vrijednosti njihovih elektroneurografskih parametara grafički prikazani na slikama 37 do 40. Dva srodnika iz skupine G3 pokazivali su fenotip CMT1, odgovarajući skupini G1, druga dva srodnika pokazivala su fenotip HNPP, odgovarajući skupini G2, dok je kod jednog bolesnika s kliničkom slikom vrlo teškog fenotipa HNPP utvrđena heterozigotna mutacija u *PMP22*, p.Thr118Met, koja prema dostupnoj literaturi ima dvojbeno značenje.

Slika 37 prikazuje uočljivu razliku u MNCV kod svih skupina (G1, G2, G4, G5) prema kontrolnoj skupini (G6) te razliku skupine G1 prema G2, G4 i G5. Na slici 38 su uočljive razlike u SNCV među skupinama, izuzev skupine G4 prema G5. Slika 39 prikazuje uočljivu razliku u CMAP kod bolesnika (G1 do G5) prema kontrolnoj skupini (G6) te skupina

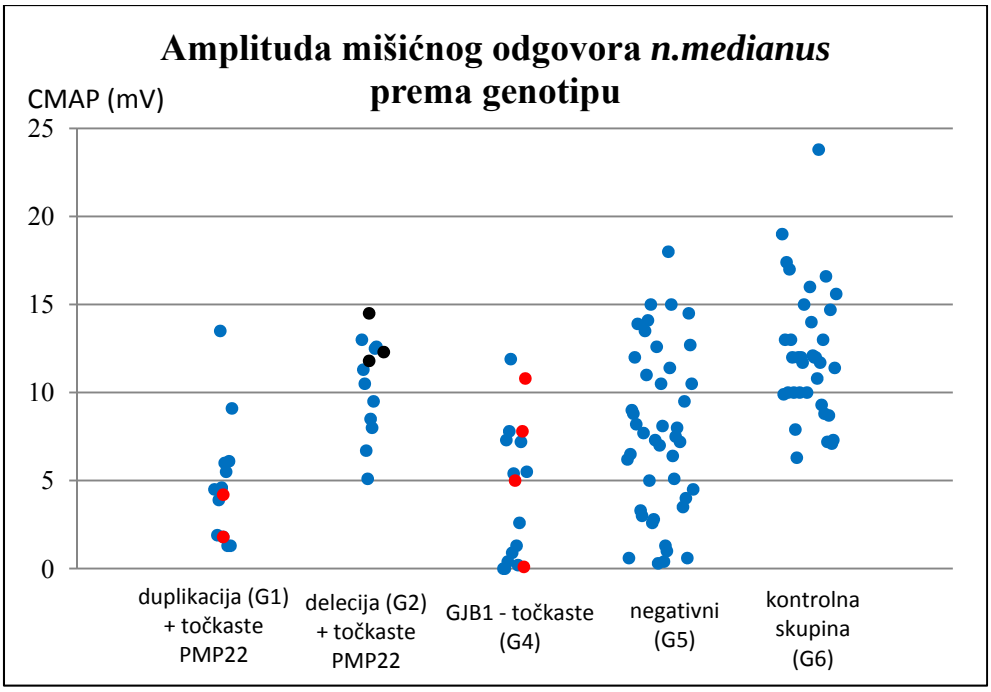
G1 i G4 prema G2 i G5. Na slici 40 može se uočiti veći broj odsutnih potencijala SNAP u skupinama G1, G4 i G5 prema G2 i kontrolnoj skupini G6.



Slika 37. Razlike brzine provodljivosti motoričkih vlakana (MNCV) *n.medianus* po skupinama G1 do G6. Crveno - nove mutacije; crno - mutacije upitnog značenja

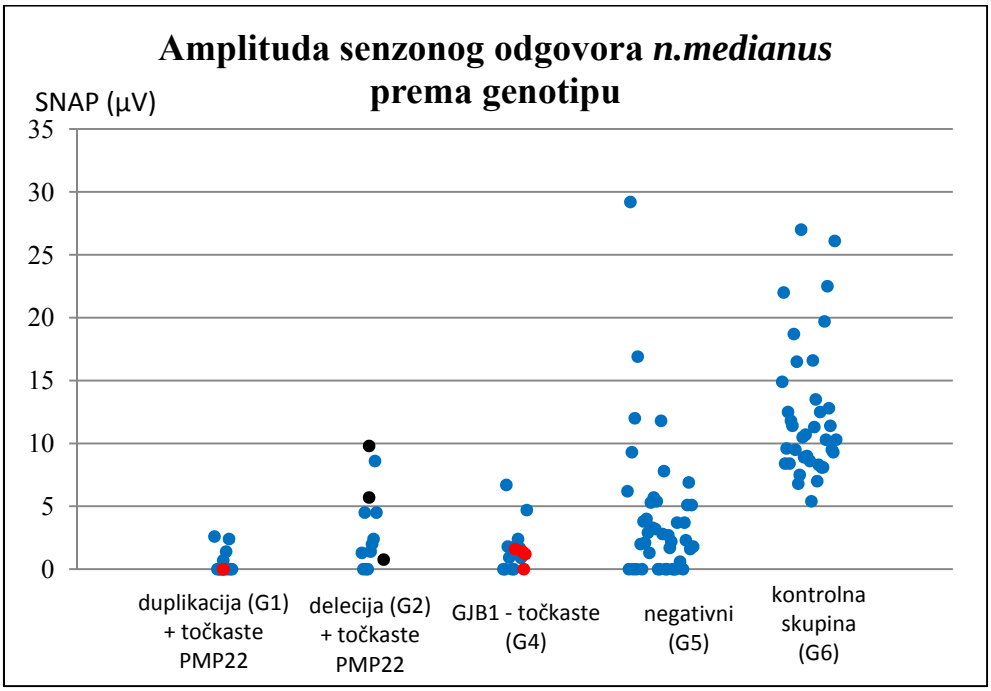


Slika 38. Razlike brzine provodljivosti osjetnih vlakana (SNCV) *n.medianus* po skupinama G1 do G6. Crveno - nove mutacije; crno - mutacije upitnog značenja



Slika 39. Razlike amplitude mišićnog potencijala (CMAP) *n.medianus* ovisne o mutaciji.

Crveno - nove mutacije; crno - mutacije upitnog značenja



Slika 40. Razlike amplitude senzoričkog potencijala (SNAP) *n.medianus* ovisne o mutaciji.

Crveno - nove mutacije; crno - mutacije upitnog značenja

4.4.3. Statistička analiza značajnosti razlika između skupina

Slijedi tablični prikaz deskriptivnih parametara statističke obrade neurografskih rezultata i nakon toga ANOVA tablice ocjene značajnosti razlike tih rezultata između skupina G1, G2, G4, G5 i G6.

Statistička analiza ANOVA s post hoc analizom međusobnih razlika rađena je da bi se utvrdile značajnosti razlike između pojedinih skupina bolesnika s CMT i kontrolnih ispitanika po spolu (Tablica 24), dobi (Tablica 25), ocjeni težine fenotipa (Tablica 26) i parametrima neurografske obrade (MNCV, SNCV, CMAP, SNAP) za *n.medianus* (Tablice 27 do 32). Sve vrijednosti $P < 0,05$ smatrane su statistički značajnima.

Razlike između ispitivanih skupina po spolu nisu se pokazale statistički značajnima (Tablica 24). Utvrđene su značajne dobne razlike skupine G4 i G5 prema kontrolnoj skupini G6, no s obzirom na gornju granicu od 75 godina isto nema značajniji utjecaj na grupne razlike elektroneurografskih parametara (Tablica 25). Usporedba genotipskih skupina prema fenotipu pokazala je očekivano visoku značajnost razlike prema kontrolnoj skupini G6, dok razlike između skupina nisu bile značajne, obzirom da su u svakoj skupini bili zastupljeni blagi i teški slučajevi (Tablica 26).

MNCV *n.medianus* svih patogenetskih skupina značajno je različita prema kontrolnoj skupini G6, ali i među samim skupinama genotipa i to skupina G1 prema G2, G4 i G5 te skupina G4 prema G5. Izuzetak je G2 prema G4, budući da se u obje skupine MNCV kreće u intermedijarnom rasponu (Tablica 29). SNCV *n.medianus* pokazuje vrlo značajne razlike svih skupina bolesnika u odnosu na kontrolnu skupinu G6, kao i skupine G1 prema G4 i G5 (Tablica 30). CMAP *n.medianus* ima bolji diskriminativni potencijal od motoričke brzine provodljivosti MNCV, za razlikovanje G2 prema G4, no s obzirom na vrijednosti u normalnom rasponu ne pokazuje značajnu razliku prema kontroli G6 (Tablica 31). SNAP *n.medianus* pokazuje vrlo značajne razlike svih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu G6, ali ne i razlike između skupina bolesnika, što ukazuje na njegovu visoku osjetljivost na ispitivana genotipska oštećenja, ali i oštećenja unutar negativne skupine G5 (Tablica 32).

Tablica 24. Usporedba ispitivanih skupina parametrijskim testom značajnosti razlika ANOVA, post-hoc analizom (Bonferroni) za spol

(Tumačenje: G1 - bolesnici sa duplikacijom gena *PMP22*, G2 - bolesnici sa delecijom gena *PMP22*, G4 - bolesnici s mutacijom u genu *GJB1*, G5 - bolesnici bez utvrđene mutacije, G6 - kontrolna skupina ispitanika)

	N = 122	**Zavisne varijable**		**Standardna pogreška**	**P**
SPOL	12	G1	G2	0,211	1,000
			G4	0,191	1,000
			G5	0,165	1,000
			G6	0,167	1,000
	11	G2	G1	0,211	1,000
			G4	0,196	1,000
			G5	0,17	1,000
			G6	0,173	1,000
	17	G4	G1	0,191	1,000
			G2	0,196	1,000
			G5	0,144	1,000
			G6	0,147	1,000
	44	G5	G1	0,165	1,000
			G2	0,17	1,000
			G4	0,144	1,000
			G6	0,112	1,000
	38	G6	G1	0,167	1,000
			G2	0,173	1,000
			G4	0,147	1,000
			G5	0,112	1,000

Nema statistički značajnih razlika između ispitivanih skupina s obzirom na spol ($P \geq 0,05$).

Tablica 25. Usporedba ispitivanih skupina parametrijskim testom značajnosti razlika ANOVA, post-hoc analizom (Bonferroni) za dob (*P < 0,05; **P < 0,01)

	N = 122	**Zavisne varijable**		**Standardna pogreška**	**P**
DOB	12	G1	G2	5,979	1,000
			G4	5,400	1,000
			G5	4,665	1,000
			G6	4,743	0,080
	11	G2	G1	5,979	1,000
			G4	5,542	1,000
			G5	4,828	1,000
			G6	4,904	1,000
	17	G4	G1	5,400	1,000
			G2	5,542	1,000
			G5	4,090	1,000
			G6	4,179	***0,036**
	44	G5	G1	4,665	1,000
			G2	4,828	1,000
			G4	4,090	1,000
			G6	3,172	****0,002**
	38	G6	G1	4,743	0,080
			G2	4,904	1,000
			G4	4,179	***0,036**
			G5	3,172	****0,002**

Utvrđene su značajne dobne razlike skupina G4 (*P < 0,05) i G5 (**P < 0,01) u odnosu na kontrolnu skupinu G6.

Tablica 26. Usporedba ispitivanih skupina parametrijskim testom značajnosti razlika ANOVA, post-hoc analizom (Bonferroni) za fenotip (**P < 0,01)

	N = 120	**Zavisne varijable**		**Standardna pogreška**	**P**
FENOTIP	12	G1	G2	0,232	1,000
			G4	0,210	1,000
			G5	0,182	1,000
			G6	0,185	****0,000**
	11	G2	G1	0,232	1,000
			G4	0,215	1,000
			G5	0,188	0,162
			G6	0,191	****0,000**
	17	G4	G1	0,210	1,000
			G2	0,215	1,000
			G5	0,159	1,000
			G6	0,163	****0,000**
	43	G5	G1	0,182	1,000
			G2	0,188	0,162
			G4	0,159	1,000
			G6	0,125	****0,000**
	37	G6	**G1**	0,185	****0,000**
			G2	0,191	****0,000**
			G4	0,163	****0,000**
			G5	0,125	****0,000**

Utvrđene su značajne razlike fenotipa skupina G1 (**P < 0,01), G2 (**P < 0,01), G4 (**P < 0,01) i G5 (**P < 0,01) u odnosu na kontrolnu skupinu G6.

Tablica 27. Statističke varijable brzina provodljivosti motoričke grane (MNCV) i senzoričke grane (SNCV) *n.medianus* prema skupinama genotipa - deskriptivni parametri

	Skupina	N	Srednja vrijednost	Standardna devijacija (SD)	Standardna pogreška	95 % interval pouzdanosti		Min	Max
						Donja granica	Gornja granica		
MNCV *n.medianus*	G1	12	25,350	5,384	1,554	21,929	28,771	18,5	35,5
	G2	11	46,800	7,927	2,390	41,475	52,125	30,5	58,4
	G4	15	39,793	10,783	2,784	33,822	45,765	22,7	56,0
	G5	44	47,770	10,375	1,564	44,616	50,925	11,2	62,9
	G6	35	58,211	3,269	0,553	57,088	59,334	52,8	67,2
	Ukupno	117	47,480	12,584	1,163	45,176	49,785	11,2	67,2
SNCV *n.medianus*	G1	4	21,375	2,381	1,191	17,586	25,164	18,6	24,4
	G2	7	32,586	8,951	3,383	24,308	40,864	17,9	41,8
	G4	12	39,500	7,144	2,062	34,961	44,039	31,0	51,9
	G5	34	41,379	10,767	1,847	37,623	45,136	0,0	63,0
	G6	37	54,486	4,940	0,812	52,839	56,133	45,3	67,5
	Ukupno	94	44,793	11,918	1,229	42,352	47,234	0,0	67,5

Tablica 28. Statističke varijable amplitude mišićnog (CMAP) i senzoričkog potencijala (SNAP) *n.medianus* prema skupinama genotipa - deskriptivni parametri

	Skupina	N	Srednja vrijednost	Standardna devijacija (SD)	Standardna pogreška	95 % interval pouzdanosti		Min	Max
						Donja granica	Gornja granica		
CMAP *n.medianus*	G1	12	4,958	3,572	1,031	2,689	7,228	1,3	13,5
	G2	10	9,770	2,684	0,849	7,850	11,690	5,1	13,0
	G4	17	4,365	3,993	0,968	2,312	6,418	0,0	11,9
	G5	43	7,677	4,717	0,719	6,225	9,128	0,3	18,0
	G6	36	12,175	3,719	0,620	10,917	13,433	6,3	23,8
	Ukupno	118	8,473	4,937	0,454	7,573	9,373	0,0	23,8
SNAP *n.medianus*	G1	12	0,592	0,989	0,286	-0,037	1,220	0,0	2,6
	G2	10	2,470	2,726	0,862	0,520	4,420	0,0	8,6
	G4	17	1,584	1,774	0,430	0,672	2,496	0,0	6,7
	G5	43	4,009	5,427	0,828	2,339	5,680	0,0	29,2
	G6	37	12,308	5,376	0,884	10,516	14,101	5,4	27,0
	Ukupno	119	5,769	6,410	0,588	4,605	6,933	0,0	29,2

Tablica 29. Usporedba ispitivanih skupina parametrijskim testom značajnosti razlika ANOVA, post-hoc analizom (Bonferroni) za brzinu provodljivosti motoričkog vlakna (MNCV) *n.medianus* (*P < 0,05; **P < 0,01)

	N = 117	**Zavisne varijable**		**Standardna pogreška**	**P**
MNCV *N.MEDIANUS*	12	G1	**G2**	3,431	****0,000**
			G4	3,184	****0,000**
			G5	2,677	****0,000**
			G6	2,750	****0,000**
	11	G2	**G1**	3,431	****0,000**
			G4	3,263	0,339
			G5	2,771	1,000
			G6	2,841	****0,001**
	15	G4	**G1**	3,184	****0,000**
			G2	3,263	0,339
			G5	2,458	***0,015**
			G6	2,537	****0,000**
	44	G5	**G1**	2,677	****0,000**
			G2	2,771	1,000
			G4	2,458	***0,015**
			G6	1,862	****0,000**
	35	G6	**G1**	2,750	****0,000**
			G2	2,841	****0,001**
			G4	2,537	****0,000**
			G5	1,862	****0,000**

Utvrđene su značajne razlike MNCV *n.medianus* između skupina bolesnika G1 (**P < 0,01), G2 (**P < 0,01), G4 (**P < 0,01) i G5 (**P < 0,01) i kontrolne skupine G6, ali i između samih skupina bolesnika: G1 u odnosu na G2 (**P < 0,01), G4 (**P < 0,01) i G5 (**P < 0,01) te G4 u odnosu na G5 (*P < 0,05).

Tablica 30. Usporedba ispitivanih skupina parametrijskim testom značajnosti razlika ANOVA, post-hoc analizom (Bonferroni) za brzinu provodljivosti osjetnog vlakna (SNCV) *n. medianus* (**P < 0,01)

	N = 118	**Zavisne varijable**		**Standardna pogreška**	**P**
SNCV *N.MEDIANUS*	12	G1	G2	5,044	0,288
			G4	4,646	****0,002**
			G5	4,254	****0,000**
			G6	4,235	****0,000**
	10	G2	G1	5,044	0,288
			G4	3,827	0,742
			G5	3,340	0,100
			G6	3,317	****0,000**
	17	G4	**G1**	4,646	****0,002**
			G2	3,827	0,742
			G5	2,702	1,000
			G6	2,673	****0,000**
	43	G5	**G1**	4,254	****0,000**
			G2	3,340	0,100
			G4	2,702	1,000
			G6	1,912	****0,000**
	36	G6	**G1**	4,235	****0,000**
			G2	3,317	****0,000**
			G4	2,673	****0,000**
			G5	1,912	****0,000**

Utvrđene su značajne razlike SNCV *n.medianus* između skupina bolesnika G1 (**P < 0,01), G2 (**P < 0,01), G4 (**P < 0,01) i G5 (**P < 0,01) i kontrolne skupine G6, kao i skupine G1 u odnosu na skupinu G4 (**P < 0,01) i G5 (**P < 0,01).

Tablica 31. Usporedba ispitivanih skupina parametrijskim testom značajnosti razlika ANOVA, post-hoc analizom (Bonferroni) za amplitudu mišićnog potencijala (CMAP) *n.medianus* (*P < 0,05; **P < 0,01)

	N = 118	**Zavisne varijable**		**Standardna pogreška**	**P**
CMAP *N.MEDIANUS*	12	G1	G2	1,746	0,068
			G4	1,537	1,000
			G5	1,331	0,435
			G6	1,359	****0,000**
	10	G2	G1	1,746	0,068
			G4	1,625	***0,012**
			G5	1,431	1,000
			G6	1,458	1,000
	17	G4	G1	1,537	1,000
			G2	1,625	***0,012**
			G5	1,168	0,054
			G6	1,200	****0,000**
	43	G5	G1	1,331	0,435
			G2	1,431	1,000
			G4	1,168	0,054
			G6	0,921	****0,000**
	36	G6	**G1**	1,359	****0,000**
			G2	1,458	1,000
			G4	1,200	****0,000**
			G5	0,921	****0,000**

Utvrđene su značajne razlike CMAP *n.medianus* između skupina G2 i G4 (*P < 0,05), skupina G2 ne pokazuje značajnu razliku prema kontrolnoj skupini G6 (P ≥ 0,05), dok za skupine G1 (**P < 0,01), G4 (**P < 0,01) i G5 (**P < 0,01) postoji statistički značajna razlika.

Tablica 32. Usporedba ispitivanih skupina parametrijskim testom značajnosti razlika ANOVA, post-hoc analizom (Bonferroni) za amplitudu senzoričkog potencijala (SNAP) *n.medianus* (**P < 0,01)

	N = 118	**Zavisne varijable**		**Standardna pogreška**	**P**
SNAP *N.MEDIANUS*	12	G1	G2	1,967	1,000
			G4	1,732	1,000
			G5	1,500	0,245
			G6	1,526	****0,000**
	10	G2	G1	1,967	1,000
			G4	1,831	1,000
			G5	1,613	1,000
			G6	1,637	****0,000**
	17	G4	G1	1,732	1,000
			G2	1,831	1,000
			G5	1,316	0,680
			G6	1,346	****0,000**
	43	G5	G1	1,500	0,245
			G2	1,613	1,000
			G4	1,316	0,680
			G6	1,030	****0,000**
	36	G6	G1	1,526	****0,000**
			G2	1,637	****0,000**
			G4	1,346	****0,000**
			G5	1,030	****0,000**

Utvrđene su značajne razlike SNAP *n.medianus* između skupina bolesnika G1 (**P < 0,01), G2 (**P < 0,01), G4 (**P < 0,01) i G5 (**P < 0,01) i kontrolne skupine G6.

5. RASPRAVA

5.1. Procjena osjetljivosti metode MLPA u odnosu na metodu PCR-RFLP

Hrvatska populacija je s obzirom na gensku podlogu nasljednih demijelinizirajućih polineuropatija Charcot-Marie-Tooth tipa 1 do sada bila relativno neistražena. Sustavna molekularno-genetička analiza gena *PMP22* započela je u Republici Hrvatskoj 2003. godine u Odjelu za molekularnu laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku u Kliničkom bolničkom centru Zagreb, testiranjem na CMT1A (duplikacija gena *PMP22*) i HNPP (delecija gena *PMP22*) metodom PCR-RFLP (engl. *polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism*) s restrikcijskim enzimom EcoRi koji cijepa DNA unutar „hotspot" mjesta regije CMT1A-REP (Stronach i sur., 1999.). Međutim, dokazano je da metoda PCR-RFLP može pokazati lažno negativne rezultate, što ju čini nisko osjetljivom (oko 80 %). Razlog tome je što je u oko 20 % slučajeva mjesto pucanja kromosoma tijekom rekombinacije izvan uobičajenog „hotspot" mjesta (Stangler Herodež i sur., 2009.). Još jedan od uzroka lažno negativnih rezultata može biti i nepotpuna digestija DNA, kao i pojava polimorfizama na restrikcijskom mjestu u regiji CMT1A-REP (Hung i sur., 2008.; Fuchs i sur., 1998.).

Zbog tog razloga nametnula se potreba za uvođenjem metode MLPA kao rutinske molekularno-genetičke analize CMT1A i HNPP što je i učinjeno 2013. godine. Pokazano je da od ukupno 72 genetički potvrđena bolesnika s duplikacijom *PMP22* i 51 genetički potvrđenog bolesnika s delecijom *PMP22* upućenih iz Kabineta za elektrofiziologiju i praćenje nasljednih neuromuskularnih bolesti, Klinike za neurologiju, KBC Zagreb, u devet (12,5 %) bolesnika rezultat je bio lažno negativan metodom PCR-RFLP u slučaju duplikacije, a u četiri (7,8 %) bolesnika u slučaju delecije. Time je dokazano da je osjetljivost metode PCR-RFLP u odnosu na metodu MLPA 89,4 % što približno odgovara literaturnim podacima.

S obzirom na to da je većina laboratorija (66 %) koji su 2013. godine sudjelovali u međunarodnoj shemi vanjske procjene kvalitete organizacije EMQN koristilo metodu MLPA za analizu CMT1A i HNPP, pokazalo se da je ta metoda „zlatni standard" u dijagnostici ovih podtipova CMT (Stuppia i sur., 2012.).

S vremenom se pokazala potreba i za analizom drugih gena uzročnika CMT, kao što su *GJB1* i *MPZ*, budući da je određeni broj pacijenata s uputnom dijagnozom polineuropatije CMT i nakon analize MLPA ostao bez utvrđene mutacije. Ovim istraživanjem, uz metodu

MLPA, analizirani su i geni *GJB1*, *MPZ* i *PMP22* metodom sekvenciranja, što značajno pridonosi proširenju molekularne dijagnostike CMT.

5.2. Učestalost mutacija u bolesnika s CMT u Republici Hrvatskoj

Ovim istraživanjem kojim je bilo obuhvaćeno 89 ispitanika s kliničkim simptomima i nalazom EMNG koji su upućivali na CMT, u njih 45 (50,6 %) klinička dijagnoza dobila je potvrdu na molekularno-genetičkoj razini. Od pojedinačnih mutacija najzastupljenija je bila duplikacija *PMP22* (26,7 %) te delecija *PMP22* (24,4 %), dok je u genu *GJB1* to bila p.Val170Asp (8,9 %).

S obzirom na to da su u istraživanje bili uključeni ispitanici koji su analizirani samo metodom MLPA i sekvenciranjem gena, a ne i oni analizirani metodom PCR-RFLP, na temelju ovih podataka ne može se odrediti učestalost CMT u našoj populaciji, jer spomenuti broj duplikacija i delecija ne odgovara stvarnom broju od početka testiranja. Međutim, kad se pribroje i duplikacije i delecije utvrđene metodom PCR-RFLP, kod svih bolesnika upućenih iz Kabineta za elektrofiziologiju i praćenje nasljednih neuromuskularnih bolesti u KBC Zagreb ukupno je zabilježen 131 (63,0 %) slučaj duplikacije *PMP22* (71 obitelj) te 60 (28,8 %) delecija *PMP22* (42 obitelji), što uz 17 (8,2 %) mutacija (11 obitelji) u *GJB1* čini ukupno 208 molekularno-genetički potvrđenih slučajeva CMT iz 124 obitelji. Iz tih podataka može se zaključiti da je omjer zastupljenosti podtipova CMT sličan kao i u ostalim europskim zemljama. U Finskoj (Silander i sur.,1998.) je utvrđeno 46,4 % duplikacija, 29,7 % delecija i 8,7 % mutacija u *GJB1*; u Velikoj Britaniji (Foley i sur., 2012.) 56,9 % duplikacija, 13,2 % delecija i 11,4 % mutacija u *GJB1*; u Njemačkoj (Gess i sur., 2013.) 41,0 % duplikacija, 12,1 % delecija i 7,1 % mutacija u *GJB1*; u Španjolskoj (Bort i sur., 1997.) 56,2 % duplikacija, 9,8 % delecija i 6,5 % mutacija u *GJB1*.

Patogene mutacije u genu *MPZ* nisu utvrđene u ovom istraživanju. Premda se njihova pojavnost u europskim populacijama kreće od 2,2 % do 4,3 % (Silander i sur.,1998.; Foley i sur., 2012.; Gess i sur., 2013.; Bort i sur., 1997.) u uzorku ispitivanih bolesnika nisu bile prisutne.

5.3. Glavne grupne karakteristike bolesnika prema utvrđenom genotipu

5.3.1. Zastupljenost prema spolu i dobi

Statistička analiza bolesnika s CMT potvrdila je i na ovom relativno ograničenom uzorku bolesnika, da nema razlika u zastupljenosti bolesti po spolu, kako kod autosomno dominantnih tako i kod X-vezanih mutacija, što je u skladu s literaturom (Parsons, 2015.).

Bolesnici u skupini CMTX1 i neklasificirani DNA negativni ispitanici pokazuju lagani pomak prema starijoj dobi samo u odnosu na kontrolnu skupinu. S obzirom na gornju granicu dobi od 75 godina kod svih bolesnika, ne očekuje se da ova razlika značajnije utječe na rezultate kliničkog i EMNG ispitivanja.

5.3.2. Zastupljenost sporadičnih slučajeva

Svi bolesnici s CMT podijeljeni su na sporadične i obiteljske slučajeve, obzirom na pozitivnu obiteljsku anamnezu te moguću kliničku i/ili genetsku potvrdu iste bolesti kod jednog ili više članova obitelji. Iako se radi o malim uzorcima bolesnika oni pokazuju trendove već zabilježene u literaturi.

U skupini CMT1A bilo je osam (67 %) obiteljskih i četiri (33 %) sporadična slučaja što odgovara literaturnim podacima o pojavnosti *de novo* duplikacija *PMP22* u jednoj trećini ispitanika (Slika 34A). Kod HNPP (36 %) i CMTX1 (12 %) pojavnost sporadičnih slučajeva je bila malo veća od opisane (Slika 34B i 34C). U literaturi se spominje pojavnost *de novo* mutacija kod HNPP u 20 % slučajeva, dok kod CMTX1 u 5 % slučajeva (Dubourg i sur., 2001.). Veći postotak je vjerojatno posljedica malog broja ispitanika u skupinama, ali i mogućnosti asimptomatske ili oligosimptomatske bolesti kod članova obitelji, koji su nerijetko neskloni pregledima ukoliko se ne radi o uznemirujućim simptomima. Također, često ne žele dijeliti stigmu nositelja nasljedne bolesti. U skupini CMTX1 primijećena je značajnija prisutnost bolesti kod drugih članova obitelji, vjerojatno zbog generalno težeg fenotipa, osobito kod muških članova. Incidencija sporadičnih slučajeva trostruko je veća kod DNA negativnih u odnosu na DNA pozitivne bolesnike s CMT. Uzrok tome može biti slabija ekspresija mutacija kod različitih podtipova CMT na koju mogu utjecati kako genetski, tako i epigenetski i okolišni čimbenici. No ne smije se zanemariti mogućnost da dio njih boluje od rijetkih oblika nenasljedne polineuropatije koju nije bilo moguće potvrditi raspoloživim dijagnostičkim testovima.

5.3.3. Zastupljenost asimptomatskih slučajeva

Za procjenu omjera asimptomatskih tj. subkliničkih oblika bolesti, bolesnici su podijeljeni prema skali fenotipa na skupinu s odsutnim ili nespecifičnim simptomima, ali pozitivnim nalazom EMNG i skupinu sa simptomima i znakovima bolesti blažeg do teškog stupnja.

Kod duplikacija i delecija *PMP22*, pet od 23 ispitanika svrstano je u skupinu asimptomatskih, od toga jedan s duplikacijom (4 %) i četiri s delecijom (16 %). To odgovara podacima iz literature gdje se asimptomatski bolesnici s duplikacijom javljaju u 1,6 % do 17 %, a s delecijom u 6 % do 23 % slučajeva (van Paassen i sur., 2014.). Razlika u pojavnosti kod duplikacije i delecije može se protumačiti blažim i kasnijim simptomima kod delecije. Teži simptomi kod duplikacija vjerojatno su povezani s prekomjernom ekspresijom proteina PMP22 i njegovim nakupljanjem u Schwannovim stanicama, što ranije rezultira apoptozom stanice te u konačnici brže vodi do apoptoze neurona i gubitka aksona, kao glavnog razloga progresije ispada. No veza između apoptoze Schwannovih stanicama i apoptoze neurona još uvijek nije razjašnjena.

Kod bolesnika s mutacijom u genu *GJB1*, bilo je pet od 17 bolesnika uvrštenih u skupinu asimptomatskih, i to jedan muškarac i četiri žene. S obzirom na to da je CMTX1 spolno vezana bolest, nije neuobičajeno da žene pokazuju blaže ili uopće ne pokazuju kliničke simptome ili znakove bolesti. Kod žena prenositeljica mutacija *GJB1* je uobičajeno u heterozigotnom obliku te jedan alel gena kodira normalni funkcionalni protein. Ekspresija bolesti prvenstveno ovisi o inaktivaciji kromosoma X u mijelinizirajućim Schwannovim stanicama.

5.4. Zajedničke karakteristike neurografskog nalaza prema genotipu

Slike 37 i 38 pokazuju da ispitivani kvantitativni parametri motoričkih i senzoričkih aksona *n.medianus* pokazuju karakteristične i relativno homogene genotipske skupine G1, G2 i G4 s visoko značajnim razlikama prema kontrolnoj skupini G6 i manjim stupnjem raspršenosti vrijednosti brzina provodljivosti u odnosu na DNA negativnu skupinu G5. Relativna raspršenost brzina provodljivosti u skupini G4 je uobičajena pojava (Kleopa i sur., 2012). Razlika u brzinama provodljivosti u skupini s duplikacijom (G1) i mutacijama u *GJB1* (G4) mogla bi biti posljedica različite distribucije i dužine zona demijelinizacije. Skupina G5 (negativni) ima najširi raspon brzina provodljivosti i amplituda čemu su uzrok vjerojatno

mutacije u rjeđim genima uzročnicima CMT. Daljnja segregacija skupine DNA negativnih bolesnika bit će moguća proširivanjem broja analiziranih gena.

Na slikama 37 i 38 nadalje je uočljiva sukladnost brzina provodljivosti kod novoutvrđenih točkastih mutacija u skupini duplikacija (G1) i delecija (G2), dok su u skupini G4 (GJB1) te vrijednosti raspršenije. Mutacija u G1 rezultira delecijom dvije aminokiseline u proteinskom lancu *PMP22*, dok kod mutacija u G2 (koje su upitnog značenja) dolazi do zamjene aminokiselina.

EMNG *n.medianus* pokazuje visoku osjetljivost na detekciju oštećenja perifernog živca kod neuropatija CMT, pri čemu brzine provodljivosti pokazuju veću osjetljivost na razlikovanje genotipa od amplitude mišićnih i senzoričkih potencijala. Nasuprot relativnoj homogenosti vrijednosti brzina provodljivosti, amplitude motoričkih i senzoričkih potencijala pokazuju veću raspršenost i sve gradacije prema nuli, tj. nemogućnosti njihova evociranja. To ukazuje na proces gubitka aksona, koji je neovisno o brzinama provodljivosti karakterističnima za određene mutacije, u različitoj mjeri prisutan kod različitih bolesnika unutar iste skupine, osobito kod duplikacija *PMP22* (G1), mutacija *GJB1* (G4), kao i kod negativnih (G5). Najmanje je izražen kod bolesnika s delecijom *PMP22* (G2). Gubitak aksona vjerojatno je najvećim dijelom posljedica apoptoze neurona, a tek manjim dijelom demijelinizacije aksona. Kod duplikacija *PMP22* i mutacija u *GJB1* nakupljanje proteina PMP22 odnosno oštećenje radijalnog transporta štetnije je za aksone i neurone od smanjene količine proteina PMP22 koju uzrokuje delecija. Razlikovanje procesa aksonalne degeneracije i demijelinizacije čini se ključnim za razumijevanje patofiziologije i progresije CMT na što su prvi put ukazali Mitrović i suradnici na primjeru CMT1A (Mitrović i sur., 1998.). To otvara mogućnost preciznijeg individualnog razlikovanja utjecaja na fenotip, što bi moglo doprinijeti razumijevanju progresije bolesti i planiranju personaliziranih terapijskih postupaka.

5.5. Povezivanje genotipa i fenotipa prema poznatim mutacijama

5.5.1. Duplikacija gena *PMP22* (Skupina G1)

Ispitanici s utvrđenom duplikacijom *PMP22* u većini slučajeva prezentirali su se fenotipovima bolesti od blažih do težih, dok je manji dio bio asimptomatski. MNCV, SNCV, CMAP i SNAP *n.medianus* bili su značajno sniženi u odnosu na kontrolnu skupinu.

5.5.2. Delecija gena *PMP22* (Skupina G2)

Ispitanici s utvrđenom delecijom *PMP22* u većini slučajeva pokazivali su blaži fenotip bolesti ili su svrstani u skupinu asimptomatskih. Međutim, MNCV, SNCV i SNAP *n.medianus* bili su značajno sniženi u odnosu na kontrolnu skupinu, što ne vrijedi za CMAP koji je najčešće bio održan.

5.5.3. Mutacije u genu *GJB1* (Skupina G4)

Ionasescu i suradnici (Ionasescu i sur., 1996.) su zaključili da većina mutacija promjene smisla u genu *GJB1* uzrokuje blaži fenotip CMT iz čega se može zaključiti da protein tolerira promjenu aminokiselina na određenim mjestima. Međutim, u ovom istraživanju statističkom analizom je utvrđeno da prosječna težina fenotipa ne pokazuje značajne razlike između ispitivanih skupina CMT.

5.5.3.1. Mutacija p.Val13Met

Mutacija c.37G>A, p.Val13Met utvrđena je kod muškarca i žene iz asimptomatske skupine, a smještena je na N-terminalnom kraju proteina Cx32. N-terminalni kraj uključen je u inserciju početnog polipeptidnog lanca u endoplazmatski retikulum i regulira razinu napona u stanici. Nema literaturnih podataka da mutacije u tom dijelu proteina mogu uzrokovati blaži fenotip. Naprotiv, muškarac je mutaciju naslijedio od svoje majke, koja je pokazivala teži klinički fenotip što je u skladu s podatkom da mutacija u tom dijelu proteina uzrokuje poremećaj razine napona u stanici te smanjenu propusnost kanala (Kleopa i sur., 2012.). No mogući razlog težeg oblika bolesti kod majke jest činjenica da je bila zračena i pod terapijom maligne bolesti što je zasigurno doprinijelo težini polineuropatije. To je naš jedini slučaj mutacije u *GJB1* s težim oblikom bolesti kod ženskog člana obitelji, no u skladu s dodatnim okolišnim čimbenikom ili teoretski drugim modificirajućim genetskim ili epigenetskim čimbenikom.

5.5.3.2. Mutacija p.Ser49Pro

Mutacija c.145T>C, p.Ser49Pro utvrđena kod jednog ženskog ispitanika smještena je u prvoj ekstracelularnoj domeni koja ima ulogu u spajanju hemikanala Cx32 te uzrokuje teži fenotip kod muškaraca (Street i sur., 2002.). Ona je pokazivala blaži fenotip, što je za očekivati s obzirom na heterozigotnost mutacije tj. prisutnost jednog normalnog alela.

5.5.3.3. Mutacija p.Leu108Pro

Mutacija c.323T>C, p.Leu108Pro je utvrđena kod tri ispitanika u jednoj obitelji (majka, sin i kćer), a nalazi se u intracelularnoj domeni koja zajedno s C-terminalnim krajem regulira razinu pH. Majka i kćer su bile asimptomatske, dok je sin pokazivao blaže simptome bolesti, što je u skladu s istraživanjem Hahn i suradnika (Hahn i sur., 1999.) koji navode da mutacije u intracelularnoj domeni uzrokuju blaže kliničke fenotipove.

5.5.3.4. Mutacija p.Val170Asp

Najčešća mutacija u genu *GJB1* c.509T>A, p.Val170Asp utvrđena u četiri ispitanika (tri muškarca i jedna žena) nalazi se u drugoj ekstracelularnoj domeni koja ima važnu strukturnu ulogu u proteinu. Očekivano, muški hemizigoti s ovom mutacijom su imali teži oblik bolesti u odnosu na heterozigotnu ženu koja posjeduje jednu funkcionalnu kopiju gena koji proizvodi normalan protein.

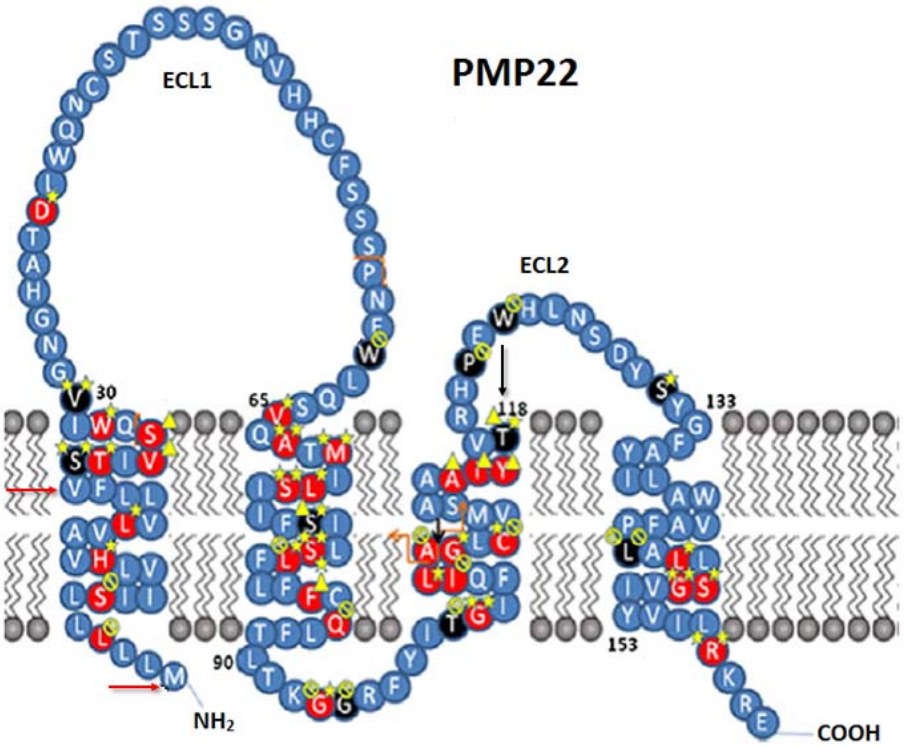
5.5.3.5. Mutacija p.Arg183His

Mutacija c.548G>A, p.Arg183His u drugoj ekstracelularnoj domeni utvrđena je u dva ispitanika iz iste obitelji (majka i sin). Majka je pripadala asimptomatskoj skupini, a sin je pokazivao blaži fenotip.

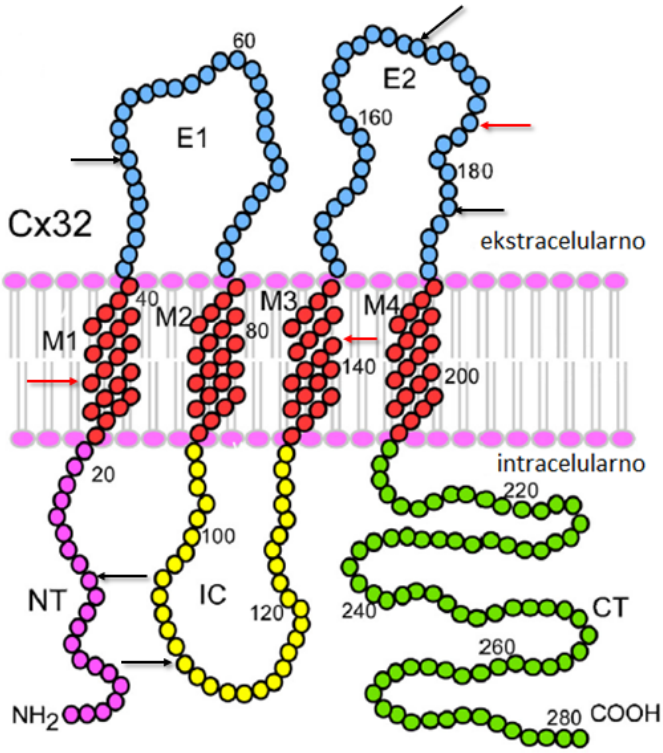
5.6. Nove mutacije u genima *PMP22* i *GJB1*

Osim velikog broja mutacija koje su već objavljene, ovim istraživanjem utvrđeno je i pet novih, dosad neobjavljenih mutacija, dvije u genu *PMP22* (Slika 41) i tri u genu *GJB1* (Slika 42). Četiri nove mutacije (jedna u genu *PMP22* i tri u genu *GJB1*) pripadaju skupini mutacija promjene smisla, koje za posljedicu imaju zamjenu jedne aminokiseline drugom u polipeptidnom lancu. Jedna nova utvrđena mutacija u genu *PMP22* je heterozigotna „*in-frame*“ delecija šest nukleotida što rezultira delecijom dvije aminokiseline u polipeptidnom lancu. Sve mutacije promjene smisla su provjerene računalnim programima za procjenu patogenosti (PolyPhen2, SIFT i PredictSNP) te su klasificirane kao patogene.

Aminokiselinski slijed je dobro konzerviran u raznim vrstama kralješnjaka, posebno u ekstracelularnim i transmembranskim domenama. Aminokiselinski ostaci u kojima se pojavljuju CMTX1 točkaste mutacije nalaze se u dijelu proteina koji je funkcionalno vrlo bitan (Bergoffen i sur., 1993.).



Slika 41. Nove i objavljene mutacije u genu *PMP22* (crvena strelica - nove, crna strelica - objavljene)



Slika 42. Nove i objavljene mutacije u genu *GJB1* (crvena strelica - nove, crna strelica - objavljene)

5.6.1. Mutacija p.Met1Thr u genu *PMP22*

Mutacija c.2T>C, p.Met1Thr smještena je u eksonu 2 gena *PMP22* u prvoj transmembranskoj domeni (Slika 23). Utvrđena je u dva srodna ispitanika (majka i sin), s fenotipom koji odgovara blažem obliku HNPP. S obzirom na to da u obitelji nije provedena proširena studija segregacije kojom bi se potvrdila povezanost varijante i fenotipa HNPP, ovu mutaciju za sada smatramo upitnog značenja. U računalnim programima za ocjenu patogenosti varijanta je označena kao patogena, s iznimkom programa PolyPhen2 koji ju je procijenio benignom. Mutacije u transmembranskoj domeni proteina PMP22 mogu blokirati transport i ugradnju proteina u plazmatsku membranu (Mersiyanova i sur., 2000.).

5.6.2. Mutacija p.Phe20_Val21del u genu *PMP22*

Mutacija c.59_64delTCGTCT, p.Phe20_Val21del je također smještena u eksonu 2 gena *PMP22* u prvoj transmembranskoj domeni. Utvrđena je u dva srodna ispitanika (dva brata) koji su pokazivali blaži fenotip bolesti (Slika 24). S obzirom na to da računalni programi za procjenu patogenosti mogu samo procijeniti patogenost zamjene aminokiselina u proteinskom lancu, nije bilo moguće provjeriti ovu mutaciju. U osnovi, mikrodelecije u konzerviranim regijama eksona najčešće se smatraju patogenim. Po istraživanju Mersiyanove i suradnika (Mersiyanova i sur., 2000.) delecija dvije aminokiseline (valin i serin) na kodonu 25 i 26 (c.73_78delGTCAGC, Val25_Ser26del), također u prvoj transmembranskoj domeni, uzrok su fenotipa CMT1 kakav je opisan i u naših bolesnika, pa se može pretpostaviti da i ova delecija ima isti učinak. Sigurnu potvrdu dobili bi, kao i u prethodnom slučaju, studijom segregacije u obitelji.

5.6.3. Mutacija Phe29Ser u genu *GJB1*

Mutacija c.86T>C, p.Phe29Ser utvrđena je kod bolesnice sa znakovima blažeg kliničkog fenotipa (Slika 25). Mutacija je smještena u eksonu 2 u prvoj transmembranskoj domeni koja je uključena u formaciju pore kanala. Kanali se sastoje od dva nasuprotna hemikanala (koneksona) koji formiraju put između susjednih stanica. Svaki konekson se sastoji od šest koneksinskih molekula smještenih oko centralne pore (Slika 3) (Bone i sur., 1997.). Pretpostavlja se da mutacije u prvoj transmembranskoj domeni mogu narušiti ili blokirati formaciju kanala (Ionasescu i sur., 1996.). Uz to, na kodonu 29 od ranije je poznata mutacija koja dovodi do promjene aminokiseline fenilalanin u leucin (c.85T>C, p.Phe29Leu) (Bone i sur., 1997), koja je u bazama mutacija (Inherited Peripheral Neuropathies Mutation Database; The Human Gene Mutation Database) klasificirana kao patogena.

5.6.4. Mutacija p.Phe141Ser u genu *GJB1*

Mutacija c.422T>C, p.Phe141Ser je utvrđena u dva ispitanika iz iste obitelji (sestra i brat) (Slika 26 i 27). Muškarac je pokazivao teški fenotip, a žena malo blaži. Mutacija je smještena u eksonu 2 gena *GJB1* u trećoj transmembranskoj domeni. α-heliks treće transmembranske domene formira centralnu poru i sadrži polarne aminokiseline koje izgrađuju zid pore (Bone i sur., 1997.). Pretpostavlja se da mutacije u trećoj transmembranskoj domeni, kao i u prvoj transmembranskoj domeni, mogu uzrokovati pojavu nefunkcionalnih kanala (Ionasescu i sur., 1996.). Na tom kodonu je ranije utvrđena mutacija, promjena aminokiseline fenilalanin u leucin (c.423C>G, p.Phe141Leu) (Rouger i sur., 1997.).

5.6.5. Mutacija p.Val177Met u genu *GJB1*

Mutacija c.529G>A, p.Val177Met je utvrđena kod ženskog ispitanika s blažim kliničkim fenotipom bolesti (Slika 28). Smještena je u eksonu 2 gena *GJB1* u drugoj ekstracelularnoj domeni. Ekstracelularne domene koneksina svih kralježnjaka sadrže šest cisteinskih ostataka smještenih na točno određenim mjestima, tri u prvoj ekstracelularnoj domeni i tri u drugoj. Ti visoko konzervirani cisteini imaju važnu strukturnu ulogu formirajući disulfidne veze između molekula i promjena bilo kojeg od njih rezultira potpunim gubitkom funkcije proteina. S obzirom na to da promjena aminokiselina smještenih u blizini spomenutih cisteinskih ostataka utječe na sposobnost formacije kanala, ali ne rezultira potpunim gubitkom funkcije (Dahl i sur., 1992.), pretpostavlja se da i mutacija p.Val177Met ima takav učinak. Uz to, na kodonu 177 su od ranije poznate dvije mutacije, promjena aminokiseline valin u alanin (c.530T>C, p.Val177Ala) (Ikegami i sur., 1998.) i promjena valina u glutaminsku kiselinu (c.530T>A, p.Val177Glu) (Williams i sur., 1999.).

5.6.6. Daljnji koraci analize patogenosti novih mutacija

Nakon provjere segregacije nove varijante u obitelji dodatnom analizom DNA zdravih i moguće subklinički zahvaćenih bolesnih članova, patogenost novoutvrđenih mutacija trebalo bi provjeriti funkcijskim testovima kao što su komplementacijski test u kvascu (engl. *yeast complementation assay*) ili ekspresija proteina s mutacijom obilježenog zelenim fluorescentnim proteinom, GFP (engl. *green fluorescent protein*) u stanicama sisavca.

5.7. Mutacija p.Thr118Met – mutacija upitnog značenja

U jednog ispitanika utvrđena je heterozigotna mutacija promjene smisla c.353C>T, p.Thr118Met u genu *PMP22* koja je prema literaturi upitnog značaja (Slika 29). Mutaciju su prvi puta opisali Roa i suradnici (Roa i sur., 1993.) kod bolesnice s uznapredovalim kliničkim znakovima CMT1, a koja je imala heterozigotnu HNPP deleciju na jednom alelu i hemizigotnu točkastu mutaciju p.Thr118Met na drugom alelu. Mutacija je nađena i kod njenog sina u heterozigotnom statusu, s tim da je drugi alel bio divljeg tipa (nije bilo prisutnosti HNPP delecije), ali kod njega klinički znakovi bolesti nisu bili prisutni. Druga dva sina su naslijedili heterozigotnu deleciju te su imali puno blaže simptome bolesti. Pretpostavljeno je da mutacija p.Thr118Met uzrokuje dobitak funkcije proteina u kombinaciji s HNPP delecijom te je zaključeno da se radi o recesivnoj mutaciji, premda se mutacije dobitka funkcije uglavnom nasljeđuju na dominantan način.

Kasnije su Nelis i suradnici (Nelis i sur., 1997.) te Young i suradnici (Young i sur., 2000.) pretpostavili da je navedena mutacija ustvari polimorfizam jer u njihovim istraživanjima nije utjecala na kliničku težinu bolesti, a pokazivala je prilično veliku pojavnost u švedskoj (frekvencija alela od 0,019 u 262 zdrave kontrole) i u njemačkoj populaciji (frekvencija alela od 0.007 u 1018 zdravih kontrola).

Naef i Suter (Naef i Suter, 1999.) su demonstrirali nenormalno unutarstanično premještanje PMP22 s točkastim mutacijama, uključujući i mutaciju p.Thr118Met, te zaključili da je poremećaj premještanja proteina s p.Thr118Met manje izražen nego kod drugih mutacija, što sugerira da je protein djelomično aktivan te da je to svojstvo tipično za recesivnu mutaciju, a ne polimorfizam. Tvrdnji da je to recesivna mutacija pridonosi i činjenica da je treonin na kodonu 118 konzerviran tijekom evolucije.

Shy i suradnici (Shy i sur., 2006.) su izvijestili o pronalasku homozigotne mutacije p.Thr118Met koja je uzrokovala teške kliničke simptome bolesti. Također su zaključili da mutacija p.Thr118Met u kombinaciji s CMT1A duplikacijom uzrokuje blaži fenotip nego u kombinaciji s HNPP delecijom, s obzirom na to da je posljedica mutacije p.Thr118Met djelomičan gubitak funkcije proteina, što ublažava dobitak funkcije proteina uzrokovan duplikacijom.

Klinička interpretacija mutacije p.Thr118Met u svrhu genetičkog savjetovanja do danas se pokazala prilično problematičnom, jer se s obzirom na manifestaciju bolesti kod pojedinaca može svrstati u recesivnu mutaciju, dominantni alel sa smanjenom penetrantnošću ili polimorfizam.

Fenotip ispitanika kojemu je utvrđena mutacija u ovom istraživanju ukazivao je na teži klinički oblik bolesti sa sporijim brzinama provodljivosti motoričkih i senzoričkih živaca i smanjenom amplitudom mišićnog i senzoričkog potencijala. S obzirom na to da se prema literaturi mutacija smatra recesivnom, u heterozigotnom obliku ne bi trebala uzrokovati ovakve simptome, te u ovom slučaju postoji mogućnost prisutnosti mutacije i u drugom genu koji uzrokuje rjeđi tip CMT.

6. ZAKLJUČCI

1. Utvrđena je slična zastupljenost različitih mutacija u genima *PMP22* i *GJB1* u Republici Hrvatskoj kao u drugim europskim zemljama, s izuzetkom izostanka mutacija u genu *MPZ*.

2. Pronađeno je pet novih mutacija, dvije u genu *PMP22* i tri u genu *GJB1*.

3. MLPA se pokazala „zlatnim standardom“ za molekularnu potvrdu fenotipa CMT1A/HNPP, no otkriće točkastih mutacija opravdava sekvenciranje gena *PMP22* u svim MLPA negativnim slučajevima s fenotipom.

4. Visoka zastupljenost pozitivnih nalaza testiranja DNA u uzorku bolesnika s CMT potvrđuje dijagnostičku vrijednost precizne kliničke i elektromioneurografske obrade.

5. Molekularna potvrda bolesti CMT kod zamjetnog broja sporadičnih i asimptomatskih slučajeva može značajno olakšati i skratiti dijagnostički postupak za bolesnike s nejasnom ili atipičnom polineuropatijom i odgovarajućim fenotipom.

6. Rezultati analize elektroneurografskih parametara ukazuju na razlikovanje demijelinizirajućeg procesa i propadanja aksona kao dva temeljna, no različita patofiziološka mehanizma u nastanku fenotipa CMT1.

7. LITERATURA

Abe A, Nakamura K, Kato M, Numakura C, Honma T, Seiwa C i sur. (2010) Compound heterozygous PMP22 deletion mutations causing severe Charcot-Marie-Tooth disease type 1. J Hum Genet 55:771-773.

Abrams CK, Freidin M (2015) GJB1-associated X-linked Charcot–Marie–Tooth disease, a disorder affecting the central and peripheral nervous systems. Cell Tissue Res 360(3):659-673.

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L i sur. (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. Nat Methods 7:248–249.

Al-Thihli K, Rudkin T, Carson N, Poulin C, Melancon S, Der Kaloustian VM (2008) Compound heterozygous deletions of PMP22 causing severe Charcot–Marie–Tooth disease of the Dejerine–Sottas disease phenotype. Am J Med Genet A 146A:2412-2416.

Amato AA, Gronseth GS, Callerame KJ, Kagan-Hallet KS, Bryan WW, Barohn RJ (1996) Tomaculous neuropathy: a clinical and electrophysiological study in patients with and without 1.5- Mb deletions in chromosome 17p11.2. Muscle Nerve 19:16-22.

Andersson PB, Yuen E, Parko K, So YT (2000) Electrodiagnostic features of hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. Neurology 54:40-44.

Banchs I, Casasnovas C, Albertí A, De Jorge L, Povedano M, Montero J i sur. (2009) Diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease. J Biomed Biotechnol 2009:985415.

Barreto LC, Oliveira FS, Nunes PS, de França Costa IM, Garcez CA, Goes GM i sur. (2016) Epidemiologic Study of Charcot-Marie-Tooth Disease: A Systematic Review. Neuroepidemiology 46(3):157-165.

Bassam BA (2014) Charcot-Marie-Tooth disease variants-classification, clinical, and genetic features and rational diagnostic evaluation. J Clin Neuromuscul Dis 15(3):117-128.

Bendl J, Stourac J, Salanda O, Pavelka A, Wieben ED, Zendulka J i sur. (2014) PredictSNP: robust and accurate consensus classifier for prediction of disease-related mutations. PLoS Comput Biol 10(1):e1003440.

Berciano J, Sevilla T, Casasnovas C, Sivera R, Vílchez JJ, Infante J i sur. (2012) Guidelines for molecular diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease. Neurologia 27(3):169-178.

Bergoffen J, Scherer SS, Wang S, Scott MO, Bone LJ, Paul DL i sur. (1993) Connexin Mutations in X-Linked Charcot-Marie-Tooth Disease. Science 262(5142):2039-2042.

Bird, TD (1998.a) Charcot-Marie-Tooth Hereditary Neuropathy Overview. U: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH i sur. (ured.) GeneReviews. Seattle, University of Washington.

Bird, TD (1998.b) Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 1. U: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH i sur. (ured.) GeneReviews. Seattle, University of Washington.

Bird, TD (1998.c) Hereditary Neuropathy with Liability to Pressure Palsies. U: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH i sur. (ured.) GeneReviews. Seattle, University of Washington.

Bird TD (1998.d) Charcot-Marie-Tooth Neuropathy X Type 1. U: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH i sur. (ured.) GeneReviews. Seattle, University of Washington.

Boerkoel CF, Takashima H, Garcia CA, Olney RK, Johnson J, Berry K i sur. (2002) Charcot Marie Tooth disease and related neuropathies: mutation distribution and genotype-phenotype correlation. Ann Neurol 51(2):190-201.

Bone LJ, Deschênes SM, Balice-Gordon RJ, Fischbeck KH, Scherer SS (1997) Connexin32 and X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. Neurobiol Dis 4(3-4):221-230.

Bort S, Nelis E, Timmerman V, Sevilla T, Cruz-Martinez A, Martinez F i sur. (1997) Mutational analysis of the MPZ, PMP22 and Cx32 genes in patients of Spanish ancestry with Charcot–Marie–Tooth disease and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. Hum Genet 99:746-754.

Braathen GJ, Sand JC, Lobato A, Høyer H, Russell MB (2011) Genetic epidemiology of Charcot-Marie-Tooth in the general population. Eur J Neurol 18(1):39-48.

Brennan KM, Bai Y, Shy ME (2015) Demyelinating CMT–what's known, what's new and what's in store? Neurosci Lett 596:14-26.

Chance PF, Alderson MK, Leppig KA, Lensch MW, Matsunami N, Smith B i sur. (1993) DNA deletion associated with hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. Cell 72:143–151.

Chance PF (2006) Inherited focal, episodic neuropathies: hereditary neuropathy with liability to pressure palsies and hereditary neuralgic amyotrophy. Neuromolecular Med 8(1-2):159-174.

Charcot JM, Marie P (1886) Su rune forme particulière d'atrophie musculaire progressive, souvent familiale debutant par les pieds et les jambs et atteignant plus tard les mains. Rev Med 6:97-138.

Choi BO, Kim NK, Park SW, Hyun YS, Jeon HJ, Hwang JH, Chung KW (2011) Inheritance of Charcot-Marie-Tooth disease 1A with rare nonrecurrent genomic rearrangement. Neurogenetics 12(1):51-58.

Dahl G, Werner R, Levine E, Rabadan-Diehl C (1992) Mutational analysis of gap junction formation. Biophys J 62(1):172-180.

Daube JR, Rubin DI (2012) Nerve Conduction Studies U: Aminoff MJ (ured.) Aminoff's Electrodiagnosis in Clinical Neurology, 6. Izd. Elsevier Saunders, 289-325.

De Jong JGY (1947) Over families met hereditaire dispositie tot het optreden van neuritiden gecorreleered met migraine. Psychiatr Neurol Bull 50:60-76.

Dubourg O, Tardieu S, Birouk N, Gouider R, Léger JM, Maisonobe T i sur. (2001) The frequency of 17p11.2 duplication and Connexin 32 mutations in 282 Charcot-Marie-Tooth families in relation to the mode of inheritance and motor nerve conduction velocity. Neuromuscul Disord 11(5):458–463.

D'Urso D, Müller HW (1997) Ins and outs of peripheral myelin protein-22: mapping transmembrane topology and intracellular sorting. J Neurosci Res 49:551-562.

Dyck PJ, Lambert EH (1968) Lower motor and primary sensory neuron diseases with peroneal muscular atrophy I. Neurologic, genetic, and electrophysiologic findings in hereditary polyneuropathies. Arch Neurol 18(6):603-618.

El-Abassi R, England JD, Carter GT (2014) Charcot-Marie-Tooth Disease: An Overview of Genotypes, Phenotypes, and Clinical Management Strategies. PM R 6(4):342-355.

Emery AE (1991) Population frequencies of inherited neuromuscular diseases-a world survey. Neuromuscul Disord 1(1):19-29.

Foley C, Schofield I, Eglon G, Bailey G, Chinnery PF, Horvath R (2012) Charcot-Marie-Tooth disease in Northern England. J Neurol Neurosurg Psychiatry 83(5):572-573.

Fuchs C, Liehr T, Ozbey S, Ekici A, Grehl H, Rautenstrauss B (1998) Charcot-Marie-Tooth disease type 1A and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies: a SacI polymorphism in the proximal CMT1A-REP elements may lead to genetic misdiagnosis. Neurogenetics 2(1):43-46.

Gabreels-Festen AA, Bolhuis PA, Hoogendijk JE, Valentijn LJ, Eshuis EJ, Gabreels FJ (1995) Charcot–Marie–Tooth disease type 1A: morphological phenotype of the 17p duplication versus PMP22 point mutations. Acta Neuropathol 90:645-649.

Gess B, Schirmacher A, Boentert M, Young P (2013) Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes in a German neuromuscular center population. Neuromuscul Disord 23(8):647-651.

Gouvea SP, S Borghetti VH, Bueno KC, Genari AB, Lourenço CM, Sobreira C i sur. (2009) Compound Charcot-Marie-Tooth disease may determine unusual and milder phenotypes. Neurogenetics 11(1):135-138.

Grandis M, Vigo T, Passalacqua M, Jain M, Scazzola S, La Padula V i sur. (2008) Different cellular and molecular mechanisms for early and late-onset myelin protein zero mutations. Hum Mol Genet 17(13):1877-1889.

Grskovic B, Ferencak G, Rukavina AS, Karija M, Furac I, Kubat M (2002) Mutation analysis of the MPZ and PMP22 genes in Croatian patients. Clin Chem Lab Med 40(6):559-562.

Hahn AF, Bolton CF, White CM, Brown WF, Tuuha SE, Tan CC i sur. (1999) Genotype/phenotype correlations in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease. Ann N Y Acad Sci 883:366-382.

Harding AE, Thomas PK (1980) The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. Brain 103(2): 259-280.

Hastings RJ, Howell RT (2010) The importance and value of EQA for diagnostic genetic laboratories. J Community Genet 1:11-17.

Hayasaka K, Himoro M, Sato W, Takada G, Uyemura K, Shimizu N i sur. (1993) Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1B is associated with mutations of the myelin P0 gene. Nat Genet 5(1):31-34.

Horowitz SH, Spollen LE, Yu W (2004) Hereditary neuropathy with liability to pressure palsy: fulminant development with axonal loss during military training. J Neurol Neurosurg Psychiatry 75:1629-1631.

Høyer H, Braathen GJ, Eek AK, Skjelbred CF, Russell MB (2011) Charcot-Marie-Tooth caused by a copy number variation in myelin protein zero. Eur J Med Genet 54(6):e580-583.

Hung CC, Lee CN, Lin CY, Cheng WF, Chen CA, Hsieh ST i sur. (2008) Identification of deletion and duplication genotypes of the PMP22 gene using PCR-RFLP, competitive multiplex PCR, and multiplex ligation-dependent probe amplification: A comparison. Electrophoresis 29(3):618-625.

Huxley C, Passage E, Manson A, Putzu G, Figarella-Branger D, Pellissier JF i sur. (1996) Construction of a mouse model of Charcot-Marie- Tooth disease type 1A by pronuclear injection of human YAC DNA. Hum Mol Genet 5(5):563–569.

Ikegami T, Lin C, Kato M, Itoh A, Nonaka I, Kurimura M i sur. (1998) Four novel mutations of the connexin 32 gene in four Japanese families with Charcot-Marie-Tooth disease type 1. Am J Med Genet 80(4):352-355.

Inoue K, Dewar K, Katsanis N, Reiter LT, Lander ES, Devon KL i sur. (2001) The 1.4-Mb CMT1A Duplication/HNPP deletion genomic region reveals unique genome architectural features and provides insights into the recent evolution of new genes. Genome Res 11(6):1018–1033.

Ionasescu V, Ionasescu R, Searby C (1996) Correlation Between Connexin 32 Gene Mutations and Clinical Phenotype in X-Linked Dominant Charcot-Marie-Tooth Neuropathy. Am J Med Genet 63(3):486-491.

Jakubiczka S, Wieland I, Grieger M, Wieacker P (2006) Gene symbol: GJB1. Disease: Charcot-Marie-Tooth disease. Accession #Hm0550. Hum Genet 118(6):781.

Jerath NU, Shy ME (2015) Hereditary motor and sensory neuropathies: Understanding molecular pathogenesis could lead to future treatment strategies. Biochim Biophys Acta 1852(4):667-678.

Jessen KR, Mirsky R (2005) The origin and development of glial cells in peripheral nerves. Nat Rev Neurosci 6(9):671-682.

Jetten AM, Suter U (2000) The peripheral myelin protein 22 and epithelial membrane protein family. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 64:97-129.

Kleopa KA, Abrams CK, Scherer SS (2012) How do Mutations in GJB1 Cause X-linked Charcot-Marie-Tooth Disease? Brain Res 1487:198–205.

Kleopa KA, Sargiannidou I (2015) Connexins, gap junctions and peripheral neuropathy. Neurosci Lett 596:27-32.

Kovach MJ, Lin JP, Boyadjiev S, Campbell K, Mazzeo L, Herman K i sur. (1999) A unique point mutation in the PMP22 gene is associated with Charcot–Marie–Tooth disease and deafness. Am J Hum Genet 64:1580-1593.

Kumar P, Henikoff S, Ng PC (2009) Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. Nat Protoc 4:1073–1081.

Kurihara S, Adachi Y, Wada K, Awaki E, Harada H, Nakashima K (2002) An epidemiological genetic study of Charcot-Marie-Tooth disease in Western Japan. Neuroepidemiology 21(5):246-250.

LeGuern E, Gouider R, Mabin D, Tardieu S, Birouk N, Parent P i sur. (1997) Patients homozygous for the 17pl1.2 duplication in Charcot-Marie-Tooth type 1A disease. Ann Neurol 41:104-108.

Lenssen PP, Gabreels-Festen AA, Valentijn LJ, Jongen PJ, van Beersum SE, van Engelen BG i sur. (1998) Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. Phenotypic differences between patients with the common deletion and a PMP22 frame shift mutation. Brain 121(Pt 8):1451-1458.

Lewis RA, Sumner AJ, Shy ME (2000) Electrophysiological features of inherited demyelinating neuropathies: a reappraisal in the era of molecular diagnosis. Muscle Nerve 23:1472-1487.

Li J, Krajewski K, Shy ME, Lewis RA (2002) Hereditary neuropathy with liability to pressure palsy: the electrophysiology fits the name. Neurology 58:1769–1773.

Li J, Krajewski K, Lewis RA, Shy ME (2004) Loss-of-function phenotype of hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. Muscle Nerve 29:205-210.

Li J, Parker B, Martyn C, Natarajan C, Guo J (2013) The PMP22 Gene and Its Related Diseases. Mol Neurobiol 47:673-698.

Lidge RT, Chandler FA (1953) Charcot-Marie-Tooth disease. J Pediatr 43(2):152-163.

Liu N, Yamauchi J, Shooter EM (2004) Recessive, but not dominant, mutations in peripheral myelin protein 22 gene show unique patterns of aggregation and intracellular trafficking. Neurobiol Dis 17:300-309.

Lupski JR, de Oca-Luna RM, Slaugenhaupt S, Pentao L, Guzzetta V, Trask BJ i sur. (1991) DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. Cell 66:219–232.

Madrid R, Bradley G (1975) The pathology of neuropathies with focal thickening of the myelin sheath (tomaculous neuropathy): studies on the formation of the abnormal myelin sheath. J Neurol Sci 25:415-448.

Magyar JP, Martini R, Ruelicke T, Aguzzi A, Adlkofer K, Dembic Z i sur. (1996) Impaired differentiation of Schwann cells in transgenic mice with increased PMP22 gene dosage. J Neurosci 16(17):5351–5360.

Mandich P, James R, Nassani S, Defferrari R, Bellone E, Mancardi G i sur. (1995) Molecular diagnosis of hereditary neuropathy with liability to pressure palsies (HNPP) by detection of 17p11.2 deletion in Italian patients. J Neurol 242:295-298.

Marques W Jr, Thomas PK, Sweeney MG, Carr L, Wood NW (1998) Dejerine–Sottas neuropathy and PMP22 point mutations: a new base pair substitution and a possible "hot spot" on Ser72. Ann Neurol 43:680-683.

Mathis S, Magy L, Vallat JM (2015) Therapeutic options in Charcot–Marie–Tooth diseases. Expert Rev Neurother 15(4):355-366.

Matsunami N, Smith B, Ballard L, Lensch MW, Robertson M, Albertsen H i sur. (1992) Peripheral myelin protein-22 gene maps in the duplication in chromosome 17p11.2 associated with Charcot-Marie-Tooth 1A. Nat Genet 1:176–179.

Mersiyanova IV, Ismailov SM, Polyakov AV, Dadali EL, Fedotov VP, Nelis E i sur. (2000) Screening for mutations in the peripheral myelin genes PMP22, MPZ and Cx32 (GJB1) in Russian Charcot-Marie-Tooth neuropathy patients. Hum Mutat 15(4):340-347.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 16(3):1215.

Mitrović Z, Canki N, Jurenić D, Žagar M, Šoštarko M (1998) HMSN-1a in Croatia: Clinical and electrophysiological study of seven families with 17p11.2 duplication. Muscle&Nerve Suppl.7:S181.

Mitrović Z, Juričić Lj, Merkler A, Sertić J (2015) Nasljedne polineuropatije Charcot-Marie-Tooth. U: Sertić J (ured.) Klinička kemija i molekularna dijagnostika u kliničkoj praksi. Zagreb, Medicinska naklada, 165-170.

Murphy SM, Laura M, Fawcett K, Pandraud A, Liu YT, Davidson GL i sur. (2012) Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes and guidelines for genetic testing. J Neurol Neurosurg Psychiatry 83(7):706-710.

Murphy SM, Ovens R, Polke J, Siskind CE, Laurà M, Bull K i sur. (2012) X inactivation in females with X-linked Charcot–Marie–Tooth disease. Neuromuscul Disord 22(7):617–621.

Naef R, Suter U (1998) Many Facets of the Peripheral Myelin Protein PMP22 in Myelination and Disease. Microsc Res Tech 41(5):359-371.

Naef R, Suter U (1999) Impaired intracellular trafficking is a common disease mechanism of PMP22 point mutations in peripheral neuropathies. Neurobiol Dis 6(1):1-14.

Narodne novine (2004) Zakon o zaštiti prava pacijenata. Zagreb: Narodne novine d.d. 169:2953.

Narodne novine (2008) Zakon o zdravstvenoj zaštiti. Zagreb: Narodne novine d.d. 150:4097.

Nelis E, Timmerman V, De Jonghe P, Vandenberghe A, Pham-Dinh D, Dautigny A i sur. (1994) Rapid screening of myelin genes in CMT1 patients by SSCP analysis: identification of new mutations and polymorphisms in the P0 gene. Hum Genet 94(6):653-657.

Nelis E, Holmberg B, Adolfsson R, Holmgren G, van Broeckhoven C (1997) PMP22 Thr(118)Met: recessive CMT1 mutation or polymorphism? Nat Genet 15(1):13-14.

Niemann A, Berger P, Suter U (2006) Pathomechanisms of Mutant Proteins in Charcot-Marie-Tooth Disease. Neuromolecular Med 8(1-2):217-242.

Nodera H, Nishimura M, Logigian EL, Herrmann DN, Kaji R (2003) HNPP due to a novel missense mutation of the PMP22 gene. Neurology 60:1863-1864.

Notterpek L, Roux KJ, Amici SA, Yazdanpour A, Rahner C, Fletcher BS (2001) Peripheral myelin protein 22 is a constituent of intercellular junctions in epithelia. PNAS 98(25):14404-14409.

Østern R, Fagerheim T, Hjellnes H, Nygård B, Mellgren SI, Nilssen Ø (2013) Diagnostic laboratory testing for Charcot Marie Tooth disease (CMT): the spectrum of gene defects in Norwegian patients with CMT and its implications for future genetic test strategies. BMC Med Genet 14:94-104.

Pareyson D, Scaioli V, Taroni F, Botti S, Lorenzetti D, Solari A i sur. (1996) Phenotypic heterogeneity in hereditary neuropathy with liability to pressure palsies associated with chromosome 17p11.2-12 deletion. Neurology 46:1133–1137.

Parman Y, Planté-Bordeneuve V, Guiochon-Mantel A, Eraksoy M, Said G (1999) Recessive Inheritance of a New Point Mutation of the PMP22 Gene in Dejerine- Sottas Disease. Ann Neurol 45(4):518-522.

Patel PI, Roa BB, Welcher AA, Schoener-Scott R, Trask BJ, Pentao L i sur. (1992) The gene for the peripheral myelin protein PMP-22 is a candidate for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. Nat Genet 1:159–165.

Pearce JM (2000) Howard Henry Tooth (1856-1925). J Neurol 247(1):3-4.

Raeymaekers P, Timmerman V, Nelis E, De Jonghe P, Hoogendijk JE, Baas F i sur. (1991) Duplication in chromosome 17p11.2 in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a (CMT 1a). The HMSN Collaborative Research Group. Neuromuscul Disord 1:93–97.

Reiter LT, Murakami T, Koeuth T, Pentao L, Muzny DM, Gibbs RA, Lupski JR (1996) A recombination hotspot responsible for two inherited peripheral neuropathies is located near a mariner transposon-like element. Nat Genet 12:288–297.

Roa BB, Garcia CA, Pentao L, Killian JM, Trask BJ, Suter U i sur. (1993) Evidence for a recessive PMP22 point mutation in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. Nat Genet 5:189 –194.

Robertson AM, Perea J, McGuigan A, King RH, Muddle JR, Gabreëls-Festen AA i sur. (2002) Comparison of a new pmp22 transgenic mouse line with other mouse models and human patients with CMT1A. J Anat 200(4):377–390.

Rouger H, LeGuern E, Birouk N, Gouider R, Tardieu S, Plassart E i sur. (1997) Charcot-Marie-Tooth disease with intermediate motor nerve conduction velocities: characterization of 14 Cx32 mutations in 35 families. Hum Mutat 10(6):443-452.

Russo M, Laura M, Polke JM, Davis MB, Blake J, Brandner S i sur. (2011) Variable phenotypes are associated with PMP22 missense mutations. Neuromuscul Disord 21:106-114.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A 74(12):5463-5467.

Saporta MA, Katona I, Zhang X, Roper HP, McClelland L, Macdonald F i sur. (2011) Neuropathy in a human without the PMP22 gene. Arch Neurol 68:814-821.

Scherer SS, Kleopa KA (2012) X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. J Peripher Nerv Syst 17 Suppl 3:9-13.

Schneider C, King RM, Philipson L (1988) Genes Specifically Expressed at Growth Arrest of Mammalian Cells. Cell 54:787-793.

Sereda MW, Griffiths I, Puhlhofer A, Stewart H, Rossner MJ, Zimmerman F i sur. (1996) A transgenic rat model of Charcot-Marie-Tooth disease. Neuron 16(5):1049–1060.

Shames I, Fraser A, Colby J, OrfaliW, Snipes GJ (2003) 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 62:751-764.

Shy ME, Garbern JY, Kamholz J (2002) Hereditary motor and sensory neuropathies: a biological perspective. Lancet Neurol 1(2):110-118.

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

Shy ME, Scavina MT, Clark A, Krajewski KM, Li J, Kamholz J i sur. (2006) T118M PMP22 Mutation Causes Partial Loss of Function and HNPP-like Neuropathy. Ann Neurol 59(2):358-364.

Shy ME, Siskind C, Swan ER, Krajewski KM, Doherty T, Fuerst DR i sur. (2007) CMT1X phenotypes represent loss of GJB1 gene function. Neurology 68:849–855.

Silander K, Meretoja P, Juvonen V, Ignatius J, Pihko H, Saarinen A i sur. (1998) Spectrum of mutations in Finnish patients with Charcot Marie Tooth disease and related neuropathies. Hum Mutat 12(1):59-68.

Sivera R, Sevilla T, Vílchez JJ, Martínez-Rubio D, Chumillas MJ, Vázquez JF i sur. (2013) Charcot Marie Tooth disease: genetic and clinical spectrum in a Spanish clinical series. Neurology 81(18):1617-1625.

Skre H (1974) Genetic and clinical aspects of Charcot- Marie-Tooth's disease. Clin Genet 6(2):98-118.

Snipes GJ, Suter U, Welcher AA, Shooter EM (1992) Characterization of a novel peripheral nervous system myelin protein (PMP-22/SR13). J Cell Biol 117(1):225-238.

Stangler Herodež Š, Zagradišnik B, Kokalj Vokač N (2005) MLPA Method for PMP22 Gene Analysis. Acta Chim Slov 52:105–110.

Street VA, Meekins G, Lipe HP, Seltzer WK, Carter GT, Kraft GH i sur. (2002) Charcot-Marie-Tooth neuropathy: clinical phenotypes of four novel mutations in the MPZ and Cx 32 genes. Neuromuscul Disord 12(7-8):643-650.

Stronach EA, Clark C, Bell C, Löfgren A, McKay NG, Timmerman V i sur. (1999) Novel PCR-based diagnostic tools for Charcot-Marie-Tooth type 1A and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. J Peripher Nerv Syst 4(2):117-122.

Stuppia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V (2012) Use of the MLPA Assay in the Molecular Diagnosis of Gene Copy Number Alterations in Human Genetic Diseases. Int J Mol Sci 13:3245-3276.

Sturtz FG, Latour P, Mocquard Y, Cruz S, Fenoll B, LeFur JM i sur. (1997) Clinical and electrophysiological phenotype of a homozygously duplicated Charcot-Marie-Tooth (type 1A) disease. Eur Neurol 38(1):26-30.

Suter U, Welcher AA, Ozcelik T, Snipes GJ, Kosaras B, Francke U i sur. (1992a) Trembler mouse carries a point mutation in a myelin gene. Nature 356(6366):241–244.

Suter U, Moskow JJ, Welcher AA, Snipes GJ, Kosaras B, Sidman RL i sur. (1992b) A leucine-to-proline mutation in the putative first transmembrane domain of the 22-kDa

peripheral myelin protein in the trembler-J mouse. Proc Natl Acad Sci USA 89(10):4382–4386.

Suter U, Scherer SS (2003) Disease mechanisms in inherited neuropathies. Nat Rev Neurosci 4(9):714-726.

Tazir M, Hamadouche T, Nouioua S, Mathis S, Vallat JM (2014) Hereditary motor and sensory neuropathies or Charcot–Marie–Tooth diseases: An update. J Neurol Sci 347(1-2):14-22.

Thomas PK, Marques W Jr, Davis MB, Sweeney MG, King RH, Bradley JL i sur. (1997) The phenotypic manifestations of chromosome 17p11.2 duplication. Brain 120(Pt 3):465-478.

Timmerman V, Nelis E, Van Hul W, Nieuwenhuijsen BW, Chen KL, Wang S i sur. (1992) The peripheral myelin protein gene PMP-22 is contained within the Charcot-Marie-Tooth disease type 1A duplication. Nat Genet 1:171–175.

Timmerman V, Rautenstrauss B, Reiter LT, Koeuth T, Lofgren A, Liehr T i sur. (1997) Detection of the CMTlA/HNPP recombination hotspot in unrelated patients of European descent. J Med Genet 34:43-49.

Timmerman V, Lupski J (2006) The CMT1A Duplication and HNPP Deletion. U: Lupski J, Stankiewicz P (ured.) Genomic Disorders: The Genomic Basis of Disease, 1 izd. Totowa, NJ:Humana Press, 169-178.

Valentijn LJ, Bolhuis PA, Zorn I, Hoogendijk JE, van den Bosch N, Hensels GW i sur. (1992) The peripheral myelin gene PMP-22/GAS-3 is duplicated in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. Nat Genet 1:166–170.

van Paassen BW, van der Kooi AJ, van Spaendonck-Zwarts KY, Verhamme C, Baas F, de Visser M (2014) PMP22 related neuropathies: Charcot-Marie-Tooth disease type 1A and Hereditary Neuropathy with liability to Pressure Palsies. Orphanet J Rare Dis 9:38-52.

Wang Y, Yin F (2016) A Review of X-linked Charcot-Marie-Tooth Disease. J Child Neurol 31(6):761-772.

Williams MM, Tyfield LA, Jardine P, Lunt PW, Stevens DL, Turnpenny PD (1999) HMSN and HNPP. Laboratory service provision in the south west of England-two years experience. Ann N Y Acad Sci 883:500-503.

Wise CA, Garcia CA, Davis SN, Heju Z, Pentao L, Patel PI i sur. (1993) Molecular analyses of unrelated Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease patients suggest a high frequency of the CMT1A duplication. Am J Hum Genet 53:853–863.

Young P, Stögbauer F, Eller B, de Jonghe P, Löfgren A, Timmerman V i sur. (2000) PMP22 Thr118Met is not a clinically relevant CMT1 marker. J Neurol 247(9):696-700.

Internetski izvori:

Center for Molecular Neurology VIB (2011) Inherited Peripheral Neuropathies Mutation Database, pristupljeno 18 ožujka 2017, http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/Home/Default.cfm

Genetics Home Reference (2009) GJB1, pristupljeno 18 ožujka 2017, http://ghr.nlm.nih.gov/gene/GJB1

Genetics Home Reference (2010) MPZ, pristupljeno 18 ožujka 2017, http://ghr.nlm.nih.gov/gene/MPZ

Genetics Home Reference (2016) PMP22, pristupljeno 18 ožujka 2017, http://ghr.nlm.nih.gov/gene/PMP22

Parsons TC (2015) Charcot-Marie-Tooth and Other Hereditary Motor and Sensory Neuropathies, pristupljeno 18 ožujka 2017, http://emedicine.medscape.com/article/1173104-overview

Institute of Medical Genetics in Cardiff (2007) The Human Gene Mutation Database, pristupljeno 18 ožujka 2017, http://www.hgmd.org

POPIS KRATICA

CMAP - amplituda složenog mišićnog akcijskog potencijala (engl. *compound muscle action potential*)

CMT - Charcot-Marie-Tooth

CMT1A - Charcot- Marie-Tooth tip 1A

CMT1B - Charcot- Marie-Tooth tip 1B

CMTX1 - Charcot- Marie-Tooth tip X1

Cx32 - koneksin 32 (engl. *connexin 32*)

DNA - deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

EMNG - elektromioneurografija

EMQN - Europska mreža za molekularnu kvalitetu (engl. *European Molecular Quality Network*)

GJB1 - engl. *gap junction beta-1*

HNPP - nasljedna neuropatija s kljenuti zbog pritiska (engl. *hereditary neuropathy with liability to pressure palsies*)

HSMN - nasljedna motorička i senzorička neuropatija (engl. *hereditary motor and sensory neuropathy*)

MLPA - metoda višestrukog umnažanja vezanih sondi (engl. *multiplex ligation-dependent probe amplification*)

MNCV - brzina provodljivosti motoričkih živaca (engl. *motor nerve conduction velocity*)

MPZ - mijelinski protein nula (engl. *myelin protein zero*)

NCV - brzina provodljivosti perifernih živaca (engl. *nerve conduction velocity*)

PCR - lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*)

PCR-RFLP - lančana reakcija polimeraze - polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata (engl. *polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism*)

PMP22 - periferni mijelinski protein (engl. *peripheral myelin protein 22*)

SNAP - amplituda senzoričkog živčanog akcijskog potencijala (engl. *sensory nerve action potential*)

SNCV - brzina provodljivosti senzoričkih živaca (engl. *sensory nerve conduction velocity*)

UPR - odgovor stanice na nakupljanje nesmotanih proteina (engl. *unfolded protein response*)

ŽIVOTOPIS

Ana Merkler rođena je 23. siječnja 1985. godine u Zagrebu. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Zagrebu. Godine 2010. diplomirala je na Prehrambeno biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu na smjeru biokemijsko inženjerstvo.

U prosincu 2010. godine zapošljava se u Kliničkom bolničkom centru Zagreb na radnom mjestu analitičara u Odjelu za molekularnu dijagnostiku Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku.

U listopadu 2011. godine boravila je u Zavodu za infektivnu i pedijatrijsku imunologiju, Centra za medicinu i znanost u zdravstvu, Sveučilišta u Debrecenu u Mađarskoj na stručnom usavršavanju iz područja molekularne dijagnostike primarnih imunodeficijencija metodom sekvenciranja.

U listopadu 2012. godine upisala je Poslijediplomski doktorski studij Biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Do sada je u koautorstvu objavila 3 rada u domaćim i stranim časopisima, od toga 2 rada u časopisima citiranim u bazi Current Contents. Autor je 11 kongresnih priopćenja te koautor jedne knjige i priručnika. Sudjeluje u nastavi kao stručni suradnik na Katedri za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Aktivno se služi engleskim jezikom.