
Naujos kartos genetiniai tyrimai, diagnozuojant paveldimas periferines neuropatijas

B. Burnytė
N. Kapitanova
I. Uktverytė
A. Utkus

Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Žmogaus ir medicininės genetikos katedra;
Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikos Medicininės genetikos centras

Santrauka. Charcot-Marie-Tooth neuropatijos apima monogeninių ligų, pažeidžiančių periferinę nervų sistemą, grupę. Tai klinikiškai ir genetiškai heterogeniška neuropatijų grupė, kuriai būdingi visi Mendelio paveldėjimo būdai. Pastaruoju metu nustatyta daugiau nei 1 000 skirtingų mutacijų 80 su liga susijusių genų. Genetiniai paveldimų periferinių neuropatijų tyrimai leido nustatyti genomo pakaitų, geno dozės įtaką fenotipui ir genomo persitvarkymo mechanizmus. Naujos kartos sekoskaitos metodai labai paspartino naujų genų kandidatų ir mutacijų nustatymą. Šioje apžvalgoje pristatome naujos kartos genetinių tyrimų taikymą šiuolaikinėje paveldimų periferinių neuropatijų klinikinėje diagnostikoje.

Raktažodžiai: paveldimos neuropatijos, Charcot-Marie-Tooth, naujos kartos sekoskaita. Neurologijos seminarai 2015; 19(63): 13-18

ĮVADAS

Charcot-Marie-Tooth liga (CMT) yra paveldima periferinės nervų sistemos liga, kurios paplitimo dažnis yra 1 : 2 500 gyventojų, todėl tai – labiausiai paplitęs genetinis nervų ir raumenų sutrikimas [1]. Patogeniškumas pasireiškia dėl mielinizacijos (CMT1) arba aksonų funkcijos (CMT2) sutrikimo. Genetinis CMT heterogeniškumas atspindi unikalią periferinės nervų sistemos anatomiją ir metabolismą. CMT ligos genų skaičius sparčiai išaugo nuo tada, kai 1991 m. buvo nustatytas pirmas ligą lemiantis genas [2]. Dabar žinoma per 80 genų, kurių patogeninės mutacijos yra susiję su CMT liga arba panašiu fenotipu [3]. Jie yra paveldimi visais galimais Mendelio paveldėjimo dėsniais, remiantis paveldimų periferinių neuropatijų mutacijų duomenų bazės duomenimis (IPNMD, <http://www.molgen.ua.ac.be/CMTmutations/mutations/>). Neseniai nustatyta, kad CMT gali lemti ir geno *MT-ATP6*, kurio vieta mitochondrijų DNR, mutacijos [4]. Klinikiškai požiūriu, CMT skirstoma į demielinizuojančias (CMT1), aksonines (CMT2), tarpines CMT ir distalines paveldimas motorines ir sensorines neuropatijų formas [5].

CMT1 tipą lemia genų, kurių raiška vyksta Švano ląstelėse, mutacijos, o CMT2 tipą lemiantys genai koduoja funkciškai platesnę grupę baltymų, kurie reikalingi aksonuose vykstantiems procesams [6]. Pradiniai ligos simptomai skiriasi pagal tai, ar liga prasideda vaikystėje, ar vėles-

niame amžiuje, o klinikiniai simptomai svyruoja nuo lengvų iki labai sunkių. Neurofiziologiniai ir neuropatologiniai pokyčiai motoriniuose ir (ar) sensoriniuose nervuose sukelia pėdų deformacijas, judėjimo negalią ir jutimo sutrikimus. Remiantis elektrofiziologinių tyrimų rezultatais, paveldimos neuropatijos skirstomos į demielinizuojančias (sumažėjęs nervų laidumo greitis) ir aksonines (normalus arba šiek tiek padidėjęs nervų laidumo greitis ir žema motorinių nervų impulsų amplitudė). CMT klasifikacija pagrįsta nervų laidumo tyrimų rezultatais, paveldėjimo būdu ir kiekvienam tipui žinomų genų ar genetinių sričių mutacijų tyrimų rezultatais. Molekulinės CMT1 tipo diagnostikos algoritmas dažniausiai aiškus, kadangi 70–80 % pacientų ligą lemia duplikacija arba taškinė mutacija periferinio mielino baltymo 22 (*PMP22*) gene [7]. Kiek rečiau nustatomos genų *MPZ*, *LITAF* ir *EGR2* mutacijos. Demielinizuojančio tipo CMTX tipą lemia geno *GJB1* mutacijos. Šiuo atveju, nors serga vyrai, moterims nešiotojoms taip pat beveik visada nustatomas CMT fenotipas [8]. CMT2 tipas sudaro apie 20 % visų CMT atvejų ir pasižymi sudėtinga genetinė diagnostika. Šiuo metu nustatyta tik 17 genų, kurių mutacijos lemia CMT2, tai apsunkina vieno molekulinio genetinio tyrimo algoritmo kūrimą. Autosominis recesyvinis paveldėjimas ir *de novo* mutacijos yra retos, dauguma CMT2 atvejų paveldimi autosominiu dominantiniu (AD) būdu. Genas *MFN2*, koduojančio mitofuziną 2, mutacijos nustatomos vidutiniškai 19–33 % šeimų, kuriose yra sergančių AD-CMT2 liga. Mitofuzinai reguliuoja mitochondrijų susiliejimą, todėl yra būtini mitochondrijų dinaminiam procesams aksonuose [9]. Kitų CMT2 lemiančių žinomų genų mutacijos paaiškina tik kelių procentų ligos kilmę. Iš šių genų *GDAP1* koduoja baltymą, taip pat dalyvaujantį mitochondrijų judėjime, o kiti genai koduoja aksonų citoskeleto komponentus (*NEFL*), baltym-

Adresas:

Birutė Burnytė
VU MF Žmogaus ir medicininės genetikos katedra
Santariškių g. 2, LT-08661 Vilnius
Tel. (8 5) 250 1306, el. paštas birute.burnyte@santa.lt

mus, kurie reguliuoja vezikulių ir mitochondrijų pernašą išilgai aksonų (*KIF1B*, *DNM2*, *DYNC1H1*, *RAB7A*, *LRSAM*), įvairiuose audiniuose sintetinus baltymus, dalyvaujančius genų raiškoje ir baltymų sintezėje (*MED25*, *LMNA*, *MVA*, *GARS*), kalcio kanalų baltymus (*TRPV4*) ar šaperonus (*HSPB1*, *HSPB8*). Didelis genų, kurių mutacijos gali lemti CMT2, skaičius labai riboja molekulinę genetinę diagnostiką klinikinėje praktikoje. Dėl CMT heterogeniškumo genetiniai tyrimai yra vienintelis būdas nustatyti tikslią CMT etiologiją ir tinkamai klasifikuoti ligos atvejus. Klinikinėje diagnostikoje plačiai priimami tik dažniausių genų, kurių mutacijos lemia CMT, tyrimai, todėl didžiąjai daliai pacientų tiksli ligos genetinė priežastis lieka nenustatyta, ypač tiems, kuriems nustatyta aksoninio tipo CMT. Pavienių genų tyrimai labai didina tokių pacientų tyrimų išlaidas, o didėjantis naujų CMT lemiančių genų nustatymas ir naujų technologijų prieinamumas keičia šiuolaikinę CMT genetinę diagnostiką. Daugelio CMT genų tyrimas vienu metu ekonominiu požiūriu tampa patrauklesnis, nei dabar taikoma automatizuota Sengerio sekoskaita.

Naujos kartos sekoskaitos (angl. NGS, *Next-generation Sequencing*) metodai leidžia vienu metu tirti didelį skaičių genų. NGS puikiai tinka paviniams nukleotidams, mažiems intarpams ir delecijoms nustatyti [10, 11]. NGS, nors ir neseniai, pradėtas taikyti genomo kopijų skaičiaus kitimui (angl. CNV, *Copy Number Variation*) nustatyti, sukūrus bioinformacinius įrankius, sparčiai plečiasi [12, 13]. Skirtingai nuo CMT1, kur duplikacija, apimanti *PMP22* geną, lemia didžiąją dalį atvejų, žinomos CMT2 ligų genetinės priežastys yra taškinės mutacijos arba nedidelės intarpai ar delecijos (IPNMD). Nors nustatyta jau daug genų, kurių mutacijos lemia CMT2, tačiau apskaičiuota, kad 50 % pacientų būdingos dar nežinomos genų pakaitos [14].

NAUJOS KARTOS GENETINIAI TYRIMAI

NGS arba didelio našumo DNR sekvenavimo metodas iki šiol buvo naudojamas tiriant dideles šeimas moksliniuose tyrimuose, norint nustatyti naujus genus, lemiančius paveldimas periferines neuropatijas. Pagrindiniai NGS genominės bibliotekos rengimo etapai yra genomo skaidymas į trumpus fragmentus, tikslinių sekų „išgaudymas“ (šis etapas taikomas norint tirti, pavyzdžiui, tik koduojančią genomo dalį – egzomą), DNR fragmentų gausinimas. Kiekvienam tiriamajam (pacientui) nustatoma trumpų (~ 75 nukleotidų ilgio) DNR fragmentų nukleotidų seka. Tyrimo metu gautos sekos palyginamos su referentiniu žmogaus genomu (hg19). Šiam tyrimui, be daugelio kitų svarbių kokybės įverčių, svarbus parametras – „skaitymo gylis“ (angl. *Sequence Coverage Depth*). „Skaitymo gylio“ įvertis nurodo, kiek kartų konkretus nukleotidas buvo nustatytas. „Skaitymo gylio“ įvertis, lygus 0, rodytų, kad nėra padengimo, o „skaitymo gylio“ 40 būtų laikomas tinkamu analizei. Dabartinėms NGS technologijoms dalis

genomo, CG gausios sritys ar kartotinės sekos vis dar yra neprieinamos. Viso egzomo (angl. WES, *Whole Exome Sequencing*) ir viso genomo (angl. WGS, *Whole Genome Sequencing*) sekvenavimo metodai taip pat diegiami klinikinėje praktikoje, tačiau šių tyrimų metodų mastas, taikant šiuo metu prieinamas technologijas, nepakankamas jiems panaudoti kasdienėje diagnostikoje [15]. Įdomu tai, kad CMT pacientams WES metodu dažniausiai buvo nustatytos jau žinomų genų, lemiančių CMT, mutacijos [16]. NGS įdiegimo į molekulinę genetinę laboratorinę diagnostiką tikslas – turėti patį našiausią, ekonominiu ir laiko požiūriu efektyviausią tyrimo metodą. Šiuo metodu taip pat galima tirti jau žinomus genus ir atlikti naujų genų paiešką. Norint pagreitinti žinomų genų tyrimą, kuriamos individualios diagnostinės genų panelės, apimančios tik koduojančias jau žinomų genų, kurių mutacijos lemia CMT, sritis, o WES ir WGS metodai išsprendžia mažos apimties tyrimų problemą [17]. Pastarųjų technologijų taikymas pradeda keisti sergančių CMT pacientų diagnostikos algoritmą.

LIGAI SPECIFINĖS NGS PANELĖS

Ligai specifinės diagnostinės genų NGS panelės leidžia sekvenuoti tas egzomo sritis, kurios apima žinomus genus, kurių mutacijos lemia CMT. Kitaip, nei taikant WES ir WGS, NGS panelės kuriamos taip, kad tyrimo ir sekvenavimo mastas būtų pakankamas naudoti klinikinėje praktikoje. Diagnostinės panelės kaina priklauso nuo genų skaičiaus, taip pat nuo panelės galiojimo laiko, t. y. laiko, kol naujų ligą lemiančių genų atradimas sumažins diagnostinės panelės klinikinę vertę. Kadangi panelės gamybos procesas taip pat įskaičiuojamas, poreikis nuolat ją atnaujinti ir įtraukti kelis naujus genus gali labai padidinti galutinę tyrimo kainą. Nepaisant šio trūkumo, ligai specifinės diagnostinės genų panelės yra geriausias tyrimo metodas, leidžiantis vienu metu ištirti žinomus genus, kurių mutacijos lemia CMT [18, 19]. Šiuo metu tai yra pati efektyviausia sergančių CMT pacientų genetinės diagnostikos priemonė.

Pastaruoju metu paplitę du CMT panelių kūrimo principai [20]. Pirmasis principas – sukurti tokią panelę, kuri turės didžiausią žinomų genų, kurių mutacijos lemia daugelio fenotipų CMT, skaičių. Šios panelės apima visus žinomus CMT ir susijusias ligas lemiančius genus (~ 70 genų) ir yra labai patrauklios gydytojams, kurie nėra CMT ligų grupės fenotipinės diferencinės diagnostikos specialistai. Tokių panelių naudojimo pranašumas tas, kad visi pacientai, sergantys CMT ar susijusiomis ligomis, gali būti tiriami naudojant tą pačią diagnostinę panelę, o tai labai padidina tyrimo našumą. Nuolatinis diagnostinės panelės gamybos atnaujinimas, kai įtraukiami nauji genai, kurių mutacijos lemia CMT, leis tirti pacientus pagal naujausias rekomendacijas ir mokslo atradimus. Pagrindinis šio metodo trūkumas – tyrimo rezultatų interpretacija. Yra žinoma, kad genai, kurių mutacijos lemia CMT, pasižymi dideliu

skaičiumi polimorfinių pakaitų (pvz., genas *MFN2*). Ištyrus 70 vieno paciento genų, nustatomas didelis kiekis sekos pakaitų, kurių dalis neaprašyta duomenų bazėse. Nenustačius žinomų mutacijų, sudėtinga spręsti, kuri iš neaprašytų geno pakaitų yra lemianti ligą (patogeninė), kadangi genų raiškos tyrimai modeliniuose organizmuose dar neatlikti [21]. Šių funkcinių tyrimų trūkumas neleidžia įrodyti neuropatiją lemiančios mutacijos patogeniškumo. Tiek NGS, tiek Sengerio sekvenavimo metodu negalima tiksliai nustatyti, ar mutacija yra patogeninė, net taikant tokius įprastinius metodus kaip šeimų sankibos analizė, mutacijos nebuvimas kontrolinėje grupėje, aukšti *in silico* prognozės balai, paveiktos bazės ir aminorūgšties išsaugojimas dėl evoliucijos. Pavyzdžiui, geno *MFN2* naujos sekos pakaitos nustatymas, naudojant „pilną“ CMT panelę, nebūtų interpretuojamas kaip CMT lemianti pakaita, sergant aiškia demielinizuojančia neuropatija.

Siekiant įveikti šias kliūtis, logiška kurti mažesnes paneles, pritaikytas tam tikram fenotipui, pvz., 1 tipo demielinizuojančiai CMT. Dabar sukaupta didelė CMT diferencinės diagnostikos patirtis, remiantis fenotipu ir fenotipo bei genotipo priklausomybės tyrimais. Būtų neišmintinga, kuriant NGS paneles, nepasinaudoti šiomis žiniomis. Šių „fenotipui specifinių“ panelių naudojimas yra panašus į mums įprastą vieno geno tyrimą ir yra pirmo pasirinkimo tyrimas, diagnozuojant CMT. Dėl plačios CMT fenotipo įvairovės kuriamos panelės, apimančios kiek platesnę, nei yra klasifikacijoje, fenotipų grupę. (Pvz., sukurtos panelės CMT1 plus tarpinė CMT panelė, CMT2 plus tarpinė CMT panelė, distalinės paveldimos motorinės neuropatijos ir paveldimos sensorinės neuropatijos panelė (lentelė)). Jeigu pokytis nustatomas, taikant šį diagnostikos metodą, būtina tirti toliau ir išsiaiškinti, ar nustatyta mutacija yra patogeninė. Tokiems tyrimams siūlomos skirtingos strategijos. Jei šeimoje serga tik vienas asmuo, labiausiai tikėtina *de novo* mutacija, todėl būtina ištirti abu paciento tėvus. Kitas būdas – nustatyti to paties geno mutacijas atskirose šeimose. Tai įrodytų, kad konkretaus geno mutacijos lemia CMT. Jeigu mutacija nėra nustatoma, taikant pagal fenotipą parinktą NGS panelę, rekomenduojama atlikti WES. „Fenotipui specifinių“ panelių kaina yra mažesnė, palyginti su „pilnomis“ CMT panelėmis, taip pat svarbu, kad, ribojant tiriamų genų skaičių, mažinamas nereikšmingų polimorfinių DNR sekos pakaitų skaičius. „Fenotipui specifinės“ panelės atnaujinamos daug rečiau nei panelės, kuriose įtraukti visi žinomi genai, kurių mutacijos lemia CMT [22].

Pagrindiniai metodai, šiuo metu taikomi nustatyti didelėms genominiams struktūriniais persitvarkymams (delecijoms, insercijoms ir duplikacijoms), yra dauginės ligočių žymenų amplifikacijos metodas (angl. MLPA, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), vektorinė lyginamoji genomine hibridizacija (angl. aCGH, *Array Comparative Genomic Hybridization*), vieno nukleotido polimorfizmo vektorinė lyginamoji hibridizacija (angl. SNP-array, *Single Nucleotide Polymorphism Array*) ir fluorescencinė *in situ* hibridizacija. MLPA metodą rekomenduojama taikyti, norint nustatyti egzonui ar kitai gene-

Lentelė. Genų panelės CMT ir susijusių ligų diagnostikoje

CMT1 panelė	Demielinizuojančio ir tarpinio tipo CMT Paveldėjimo būdas – AD, su X chromosoma ir AR
CMT2 panelė	Aksoninio ir tarpinio tipo CMT Paveldėjimo būdas – AD, su X chromosoma ir AR
PSN panelė	Tik PSN genai Paveldėjimo būdas – AD ir AR
PMN panelė	PMN ir CMT2 genai Paveldėjimo būdas – AD, su X chromosoma ir AR

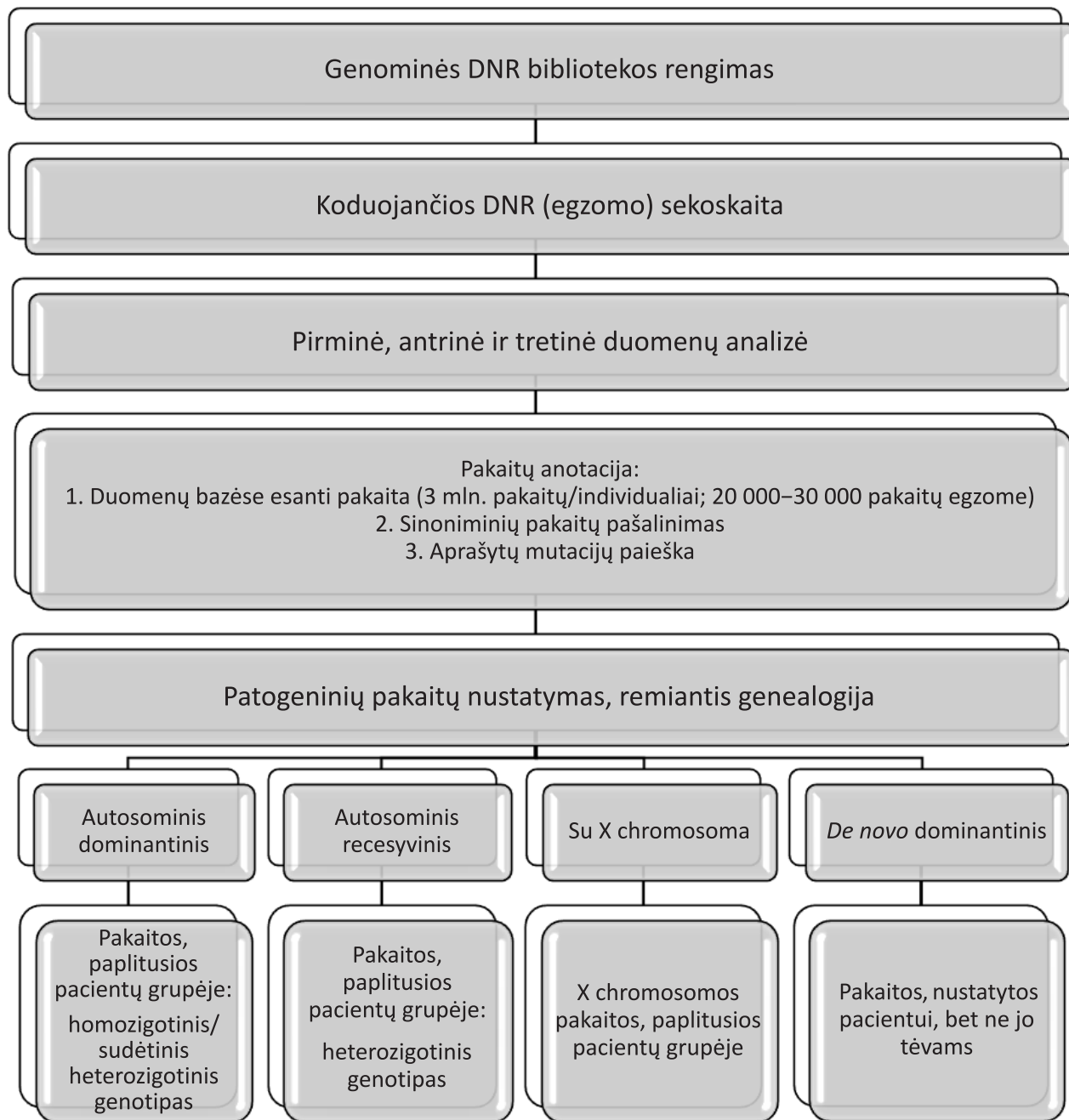
Trumpiniai: CMT – Charcot-Marie-Tooth; AD – autosominis dominantinis; AR – autosominis recesyvinis; PSN – paveldima sensorinė neuropatija; PMN – paveldima motorinė neuropatija. Adaptuota pagal *Charcot-Marie-Tooth Hereditary Neuropathy Panel Test GD Bristol (2012)*. <http://ukgtn.nhs.uk>

tinei sričiai specifines delecijas, o aCGH metodą – didelėms genomui pokyčiams nustatyti ir tuo atveju, jeigu MLPA metodas yra neprieinamas.

NGS metodai turėtų labai pagreitinti molekulinės genetikos diagnostikos taikymą CMT pacientams. WGS ir WES jau dabar sėkmingai naudojami naujiems genams, kurių mutacijos lemia CMT, nustatyti. Tačiau vienas iš šių metodų trūkumų yra nepasiekiamas pakankamas sekos padengimo įvertis, kad būtų galima patikimai nustatyti heterozigotines genų kandidatų nukleotidų sekos pakaitas. Pavyzdžiui, WES metodo sekos padengimo įverčiui būdinga didelė dispersija, todėl dalis sekų (pvz., konkretaus geno egzonas) gali būti nustatytos kelis kartus, kita dalis (pvz., kitas to paties konkretaus geno egzonas) – šimtus kartų. Toks netolygus DNR sekos nustatymas apunkina sekos pakaitų nustatymą. WES ar WGS nustatytos sekos pakaitos turi būti patvirtinamos kitu nepriklausomu molekulinium genetikiniu metodu. Taikant WES ar WGS metodus, gaunama labai daug nereikalingų duomenų, pvz., nekoduojančios sekos, esančios gretimai genų, o diagnostikos tikslas yra analizuoti žinomų genų ar genų kandidatų koduojančios sekos mutacijas [3, 23, 24].

GENETINIS KONSULTAVIMAS

Genetinis konsultavimas yra labai svarbi CMT pacientų sudėtinė daugiaprofilinė stebėsenos dalis. Priklausomai nuo ligos pradžios ir progresavimo, CMT yra labai kintanti liga. Net ir tos pačios šeimos nariams gali pasireikšti įvairaus sunkumo liga. Tai kelia tam tikrų sunkumų konsultuojant CMT šeimas. Pacientai į gydytoją genetiką dažniausiai kreipiasi, kad jis patvirtintų diagnozę ir nustatytų paveldėjimo būdą šeimoje. Genetiniai tyrimai atliekami tik, jei įtariama paveldima neuropatija. Paveldimos neuropatijos diagnozė atrodo akivaizdi, kai, išanalizavus šeimos genealogijos duomenis, gauname teigiamą rezultatą arba keli vaikai paveldi ligą iš giminingų tėvų. Šiaurės Europoje ir JAV paveldima neuropatija sergančių pacientų šeimos dažniausiai mažos ir nėra aiškios medicininės istorijos. Kai šia liga serga keli didelės šeimos asmenys, gana lengva pa-



Pav. Genomo patogeninių pakaitų, lemiančių paveldimas periferines neuropatijas, nustatymas, naudojant skirtingas tyrimo strategijas ir taikant naujos kartos sekoskaitos tyrimo metodus

Adaptuota pagal Rabbani B, Mahdieh N, Hosomichi K, Nakaoka H, Inoue I. Next-generation sequencing: impact of exome sequencing in characterizing Mendelian disorders. *Journal of Human Genetics* 2012; 57: 621–32.

tvirtinti, kad paveldėjimo būdas yra autosominis dominantinis arba susijęs su X chromosoma. Pavieniais atvejais arba mažose šeimose paveldėjimo būdą nustatyti gali būti sunkiau. Šiaurės Europos ir JAV gyventojams tikėtinas autosominis ar *de novo* dominantinis paveldėjimas, tačiau šalyse, kuriose dažnos giminių santuokos, labiau paplitęs autosominis recesyvinis paveldėjimas. Ilgai ir lėtai progresuojanti distalinė raumenų atrofija, silpnumas ir tai, kad sunku vaikščioti, taip pat pėdos deformacijos, yra svarbūs rodikliai, įtariant paveldimą neuropatiją. Daugelis pacientų teigia, kad mokykloje jiems sunkiai sekėsi sportuoti arba

ankstyvoje vaikystėje buvo operuotos pėdos. Tikėtino paveldėjimo būdo nustatymas išlieka genetinių tyrimų pagrindas net ir dabartinių technologijų amžiuje, kai atliekami NGS tyrimai, kadangi CMT lemiančių mutacijų nustatymo strategijos priklauso nuo paveldėjimo būdo (pav.). Patvirtinus CMT diagnozę, genetiniai tyrimai gali būti atliekami pacientų ir jų šeimų narių šeimos planavimo tikslais, kai atliekama prenatalinė arba preimplantacinė genetinė diagnostika. Tik labai nedidelė dalis pacientų kreipiasi dėl prenatalinės diagnostikos. Daugelyje šalių prenataliniai ir preimplantaciniai tyrimai turi būti patvirtinti specia-

laus komiteto. Šis požiūris reiškia, kad labai svarbu patvirtinti nustatytos mutacijos patogeniškumą konkrečiam asmeniui, tačiau dėl naujų genetinių tyrimų metu atrandamų naujų genų skaičiaus minėtas procesas tampa vis sudėtingesnis. Prenataliniai tyrimai kol kas gali būti rekomenduojami tik tuo atveju, kai žinomas sekos pakaitos, delecijos ar duplikacijos patogeniškumas, pvz., genetinės srities, apimančios geną *PMP22*, duplikacija [25]. Genetinio konsultavimo metu svarbu įvertinti, kokius fizinius ir emocinius padarinius patiria sergantieji. Gyvenimas su fizinę negalią lemiančia liga, socialiniai ir darbo klausimai, kaip ir reprodukciniai, turi būti aptariami per genetinę konsultaciją.

APIBENDRINIMAS

Naujos kartos genetiniai tyrimai gerokai padidino sergančių CMT pacientų diagnozės patvirtinimo galimybes. Genetinės diagnozės nustatymas leidžia tiksliai klasifikuoti ir prognozuoti ligą, konsultuoti šeimas genetiniais klausimais [26]. Nors efektyvus gydymo vis dar nėra, genetinės diagnozės nustatymas yra labai svarbus CMT fenotipo kintamumui įvertinti. Sengerio sekoskaitos metodas ir kapiliarinė elektroforezė yra gana sėkmingi ir daugiau nei 60 % sergančių CMT pacientų patvirtinama genetinė diagnozė. Tačiau tai nebėra efektyviausias, greičiausias ar ekonomiškiausias būdas diagnozei patvirtinti. Išskyrus duplikacijos, apimančios *PMP22* geną, tyrimą ir *GJB1* geno sekoskaitą, tiksliniam atskirų genų sekvenavimui Sengerio metodu reikia daug laiko, jis yra brangus ir kartais neatsiperka net tada, kai pacientai atidžiai fenotipiškai atrenkami. Tai ypač būdinga CMT2, distalinei paveldimai motorinei neuropatijai ir paveldimai sensorinei neuropatijai, kurių 40–80 % ligas lemiančių genų yra nežinomi, o iš daugelio žinomų genų, kiekvienas yra individualiai retas. Aprašyta per 80 genų, kuriuose mutacijos lemia paveldimas periferines neuropatijas, ir atrandama vis naujų, todėl išlaikyti profesines žinias apie paveldimų neuropatijų fenotipus gali būti sunku net ir labai patyrusiems CMT specialistams. Be to, kai molekuliniai genetiniai tyrimai tapo plačiai prieinami, pasidarė aišku, kad vieno geno mutacija gali sukelti kelis fenotipus ir būti paveldima skirtingais būdais. Todėl, išskyrus duplikacijos, apimančios geną *PMP22* ir geno *GJB1* tyrimą, pagal fenotipo ir elektrofiziologinių tyrimų duomenis suskirstytiems CMT pacientams tikslinga vienu metu tirti kelis genus, kurių mutacijos lemia CMT. NGS technologija suteikia tokią galimybę. Diskusijos išlieka dėl to, kaip konkrečiai ši technologija turėtų būti naudojama klinikinėje diagnostikoje. Šiuo metu įmanoma analizuoti iš karto trijų žmonių egzomus (paciento ir jo tėvų) ieškant *de novo* dominantinių mutacijų. *MARS*, *BICD2*, *PDK3*, *TUBB3* yra nauji CMT ir kitų paveldimų neuropatijų genai, nustatyti taikant WES metodą. Naujų genų nustatymo greitis turėtų padidėti iki vieno CMT lemiančio geno per mėnesį, kol bus atrasta didžioji dalis genų. Taip pat tikimasi, kad naujai nustatyti genai padės tiksliai nustatyti CMT ir kitų, aksonus pažeidžiančių, ligų pa-

togenezės kelius ir kurti gydymą priklausomai nuo tiesioginio molekulinio kelio, kuriame vyksta nustatyto geno raiška.

Literatūra

- Berger P, Young P, Suter U. Molecular cell biology of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurogenetics* 2002; 4: 1–15.
- Raeymaekers P, et al. Duplication in chromosome 17p11.2 in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a (CMT 1a). The HMSN Collaborative Research Group. *Neuromuscul Disord* 1991; 1: 93–7.
- Timmerman V, Strickland AV, Züchner S. Genetics of Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease within the frame of the Human Genome Project success. *Genes* 2014; 5: 13–32.
- Pitceathly RD, Murphy SM, Cottenie E, Chalasani A, Sweeney MG, Woodward C, Mudanohwo EE, Hargreaves I, Heales S, Land J, et al. Genetic dysfunction of MT-ATP6 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology* 2012; 79: 1145–54.
- Reilly MM. Sorting out the inherited neuropathies. *Pract Neurol* 2007; 7: 93–105.
- Shy ME, Patzko A. Axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Curr Opin Neurol* 2011; 24(5): 475–83.
- Saifi GM, Sziget K, Snipes GJ, Garcia CA, Lupski JR. Molecular mechanisms, diagnosis, and rational approaches to management of and therapy for Charcot-Marie-Tooth disease and related peripheral neuropathies. *J Investig Med* 2003; 51: 261–83.
- Siskind CE, Murphy SM, Ovens R, Polke J, Reilly MM, Shy ME. Phenotype expression in women with CMT1X. *J of Perif N System* 2011; 16(2): 102–7.
- Baloh RH, Schmidt RE, Pestronk A, Milbrandt J. Altered Axonal Mitochondrial Transport in the pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth disease from mitofusin 2 mutations. *J Neurosci* 2007; 27(2): 422–30.
- Choi BO, Koo SK, Park MH, et al. Exome sequencing is an efficient tool for genetic screening of Charcot-Marie-Tooth disease. *Hum Mutat* 2012; 33: 1610–5.
- Lupski JR, Reid JG, Gonzaga-Jauregui C, et al. Whole-genome sequencing in a patient with Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *N Engl J Med* 2010; 362: 1181–91.
- Sathirapongsasuti JF, Lee H, Horst BA, et al. Exome sequencing-based copy-number variation and loss of heterozygosity detection: ExomeCNV. *Bioinformatics* 2011; 27: 2648–54.
- Parker B, Alexander R, Wu X, Feely S, Shy M, Schanetz-Boutaud N, Li J. Detection of copy number variation (CNV) by SNP-Allelotyping. *J Neurogenet* 2014; 15: 1–11.
- Braathen GJ, Sand JC, Lobato A, Hoyer H, Russell MB. Genetic epidemiology of Charcot-Marie-Tooth in the general population. *Eur J Neurol* 2011; 18: 39–48.
- Rabbani B, Mahdih N, Hosomishi K, Nakaoka H, Inoue I. Next generation sequencing: impact of exome sequencing in characterizing Mendelian disorders. *J Hum Gen* 2012; 57: 621–32.
- Landouere G, et al. Exome sequencing identifies a novel TRPV4 mutation in a CMT2C family. *Neurology* 2012; 79: 192–4.
- Bras J, Guerreiro R, Hardy J. Use of next-generation sequencing and other whole-genome strategies to dissect neurological disease. *Nat Rev Neurosci* 2012; 13(7): 453–64.

18. Azzedine H, Senderek J, Rivolta C, Chrast R. Molecular genetics of charcot-marie-tooth disease: from genes to genomes. *Mol Syndromol* 2012; 3: 204–14.
19. Harel T, Lupski JR. Charcot-Marie-Tooth disease and pathways to molecular based therapies. *Clin Genet* 2014; 2. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/cge.12393>.
20. Heger M. Quest's Athena Diagnostics Launches NGS Panel Test for Charcot-Marie-Tooth Disease. www.genomeweb.com
21. Bouhy D, Timmerman V. Animal models and therapeutic prospects for Charcot-Marie-Tooth disease. *Ann Neurol* 2013; 74: 391–6.
22. Chowdhury S, Mohammed S, Kroese M. Genetic testing for neurological conditions. Meeting report. London, 2013.
23. Züchner, S. Peripheral neuropathies: whole genome sequencing identifies causal variants in CMT. *Nat Rev Neurol* 2010; 6: 424–5.
24. Saporta AS, Sottile SL, Miller LJ, Feely SM, Siskind CE, Shy ME. Charcot-Marie-Tooth disease subtypes and genetic testing strategies. *Ann Neurol* 2011; 69: 22–33.
25. Arnold A, McEntagart M, Younger DS. Psychosocial issues that face patients with Charcot-Marie-Tooth disease: the role of genetic counseling. *Journal of Genetic Counseling* 2005; 14(4): 307–18.
26. Patzko A, Shy ME. Update on Charcot-Marie-Tooth disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2011; 11: 78–88.

B. Burnytė, N. Kapitanova, I. Uktverytė, A. Utkus

NEXT-GENERATION SEQUENCING IN THE DIAGNOSIS OF HEREDITARY PERIPHERAL NEUROPATHIES

Summary

Charcot-Marie-Tooth (CMT) neuropathies consist of a group of monogenic disorders affecting the peripheral nervous system. This group of disorders is heterogeneous clinically and genetically, following all types of Mendelian inheritance patterns. Lately over a 1,000 different disease causing mutations have been discovered in 80 disease related genes. Genetic trials of hereditary neuropathies have revealed the mechanism of single nucleotide polymorphism, gene dosage effect on the phenotype, and genomic rearrangements. Methods of next generation sequencing accelerated discovery of a new disease causing mutations and gene candidates. In this review we present the next generation sequencing methods and their application in clinical diagnostics of hereditary neuropathies.

Keywords: hereditary neuropathies, Charcot-Marie-Tooth, next generation sequencing.

Gauta:
2014 12 08

Priimta spaudai:
2014 12 30