

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

Streszczenie rozprawy doktorskiej
Udział czynnika genetycznego w zmienności fenotypowej
choroby Charcot-Marie-Tooth

Promotor: prof. dr hab. med. Andrzej Kochański

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

W ostatnich latach próbowano wprowadzić skale oceny fenotypu polineuropatii genetycznie uwarunkowanych, ale ich użyteczność jest przedmiotem dyskusji. Oznacza to,

że obiektywna ocena fenotypu CMT1A/HNPP (z wyjątkiem przypadków skrajnych) jest nadzwyczaj trudna.

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

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

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

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

W badanych grupach łącznie stwierdzono 14 wariantów sekwencyjnych. W genie *PMP22* 7 wariantów – 1 mutację, 4 warianty potencjalnie patogenne, 2 warianty polimorficzne. W genie *LITAF* zidentyfikowano 6 wariantów - 1 mutację, 1 wariant patogeny oraz 3 rzadkie warianty sekwencyjne. W promotorze genu *TNF alfa*

zidentyfikowano 1 polimorficzny wariant sekwencyjny. Zidentyfikowane zmiany w genach *PMP22*, *LITAF*, *TNF alfa* zostały poddane analizie statystycznej oraz bioinformatycznej.

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