

# **Mutační analýza genu SH3TC2 u českých pacientů s dědičnou neuropatií Charcot-Marie-Tooth.**

**Lašuthová P, Mazanec R, Vondráček P, Šišková D, Haberlová J, Sabová J, Seeman P.**

# Charcot-Marie-Tooth neboli dědičné periferní neuropatie

- je to **nejčastější** dědičné neuromuskulární onemocnění, s prevalencí v populaci přibližně 1:2500
- **heterogenní skupina** dědičných neuropatií, kdy neuropatie je základem obtíží
- na základě elektromyografie dělíme do dvou skupin- **CMT 1 a CMT2**

- Typické je postižení **chodidel**, protože chronické postižení nervu vede k deformitě nohou, většinou typu **pes cavus**, **kladívkovým prstům** a **vysokému nártu**.

**Dále se rozvíjejí typické distální atrofie svalstva dolních končetin. Častým problémem je i skolióza.**



**Později se většinou postupně přidává i postižení horních končetin, distální slabost rukou a neschopnost provést tzv. špetku.**

# SH3TC2 gen (CMT4C)

- Lokus 5q32
- Původní název KIAA1985
- 17 exonů, 1288 Aas
- 1SH3 doména, 8 TPR repetice
- Mutace v tomto genu způsobují demyelinizační (CMT1), autozomálně recesivně dědičnou (AR) neuropatii Charcot-Marie-Tooth. Výrazným znakem je časně nastupující a závažná skolióza.
- Frekvence mutací v tomto genu nebyla dosud v ČR zkoumána.

# Naše studie

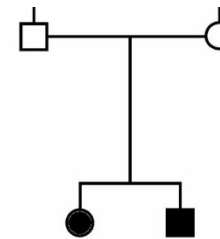
- Které mutace se vyskytují u českých pacientů s nemocí Charcot-Marie-Tooth?
- Jak časté jsou tyto mutace?
- Která mutace je prevalentní v české populaci?
- Je vhodné vyšetřovat gen *SH3TC2* rutinně?
- Jaký je fenotyp CMT4C pacientů, tedy pacientů, kteří mají mutace v genu pro *SH3TC2* ?

- Pro vyšetření genu SH3TC2 byli vybráni pacienti s demyelinizační formou CMT, kde lze předpokládat AR typ přenosu. U **60 vybraných pacientů byla provedena sekvenační analýza celého kódujícího úseku SH3TC2 genu**.

- **Kritéria** pro výběr pacientů k vyšetření genu SH3TC2:

- 1. motoricko-senzitivní neuropatie se začátkem v první nebo druhé životní dekádě;**
- 2. nepřítomnost klinických známek postižení u rodičů;**
- 3. EMG vyšetření s nálezem NCV < 38 m/s;**

Autozomálně  
recesivní dědičnost

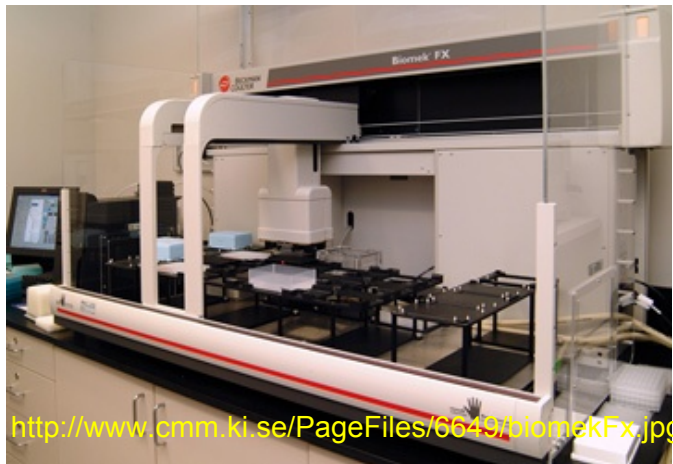
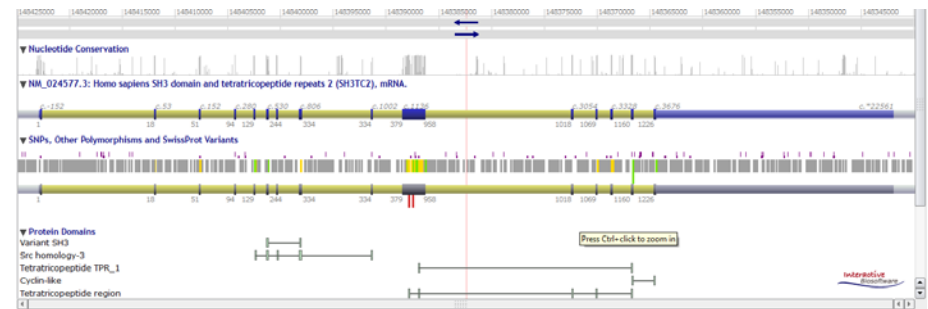


- Cíleně jsme vybírali pacienty s údajem o **skolióze** v anamnéze, ale do studie byli zařazeni i pacienti bez údajů o skolióze.
- Cíleně jsme vybírali pacienty s **alespoň jedním dalším postiženým sourozencem nebo s údajem o konsanguinitě v rodině**.
- U dalších 412 pacientů s neupřesněným fenotypem byla provedena detekce nejčastější mutace p.Arg954Stop metodou real-time PCR.

# Metody:

Celý kódující úsek genu *SH3TC2* včetně přilehlých intronových oblastí byl amplifikován v 19 PCR reakcích

*Alamut version 2.0e (Interactive Biosoftware, Rouen, France):*



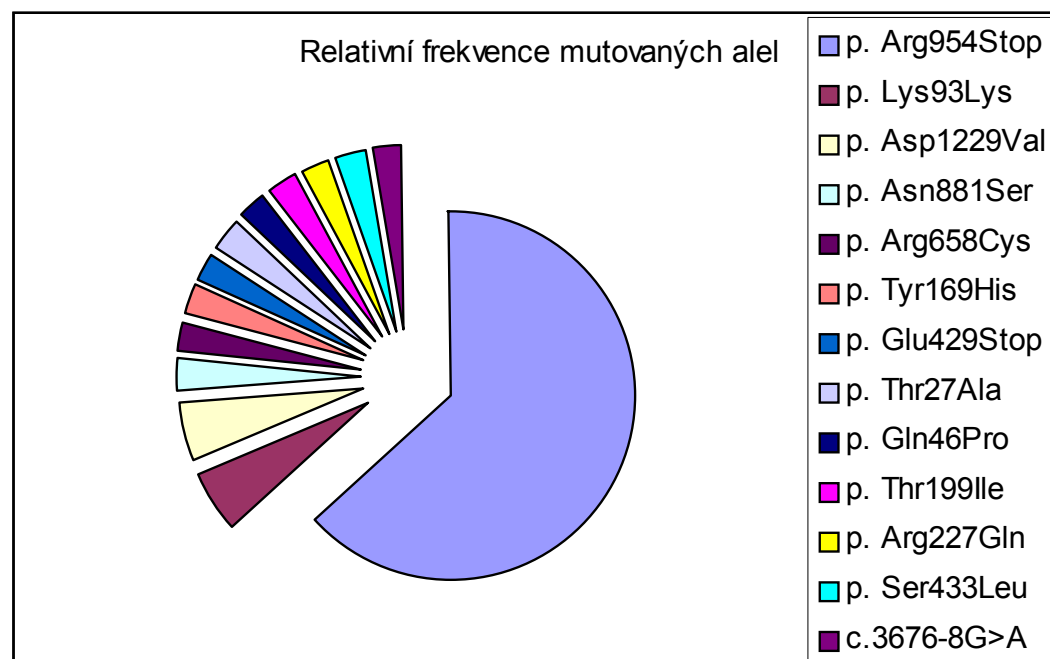
- Sekvenování s použitím BDT v.3.1
- Purifikace sekvenačních reakcí - CleanSeq – pomocí robota Biomek.

# Výsledky

Ze 60 pacientů byly mutace v genu *SH3TC2* nalezeny u 13 (21 %) pacientů, z toho u 7 pacientů (11 %) byly patogenní mutace na obou alelách genu.

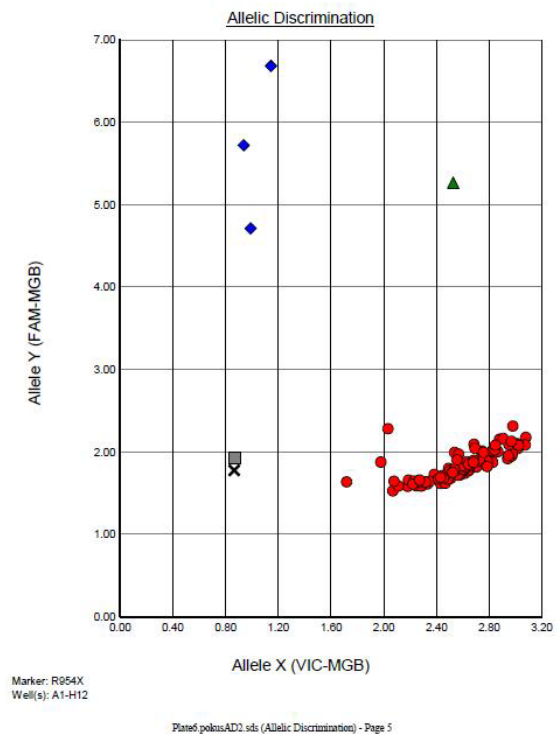
U zbylých 6 pacientů (10 %) byla nalezena jedna patogenní mutace, nebo nové dosud nepopsané mutace, jejichž význam bylo třeba ověřit.

Prevalentní mutací v tomto genu v ČR je již popsána p.Arg954Stop



# p.Arg954Stop

- Sestavili jsme **genotypizační real-time PCR assay** na principu alelické diskriminace, která by detekovala mutaci c.2860C>T (p.Arg954Stop).
- Tímto rychlým a levným vyšetřením jsme vyšetřili **412 pacientů**, kteří byli v minulosti odesláni do naší laboratoře k molekulárně-genetickému testování pro podezření na nemoc CMT.
- Ze 412 vzorků od pacientů **byla mutace p.Arg954Stop nalezena u 8 z nich**, z toho u 6 v homozygotním stavu.
- U dalších dvou byla mutace p.Arg954Stop nalezena pouze na jedné alele. U jednoho z nich jsme druhou mutaci našli sekvenováním, u druhého nikoliv.



# Rodina A

Jedná se o sporadický případ CMT v rodině. Pacient byl sledován od útlého dětství pro poruchu chůze (chodil po špičkách). V 7 letech prodělal první ortopedickou korekční operaci (prodloužení Achillovy šlachy), další korekční operaci prodělal v 18 letech věku. U pacienta byla nalezena mutace **p.Arg954Stop** v **homozygotním** stavu. Pacient byl naposledy vyšetřen ve věku 30 let

# Rodina J

Pacient je složený heterozygot pro mutace p.Arg954Stop a p.Asn881Ser. Jde o sporadický případ CMT v rodině. Nemoc se u něj projevila v předškolním věku.

# Závěr klinických vyšetření

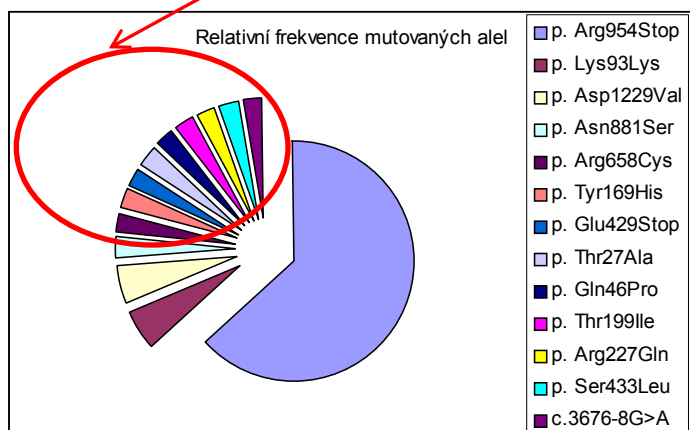
Klinický obraz CMT4C (způsobené mutacemi v *SH3TC2*) byl u všech našich pacientů podobný:

U všech se první **obtíže objevily do 10 let věku** a byly většinou spojené s výraznými **deformitami chodidel a závažnou skoliózou**. Postižení je spíše mírnější a samostatná chůze byla u všech pacientů zachována.

V neurologickém nálezu je **výraznější slabost na dolních končetinách a jen minimální postižení rukou**.

Nápadná je i výrazná **porucha čítí**, zejména vibračního na dolních končetinách.

# Analýza nových, dosud nepopsaných mutací



Frekvence nových variant v nepostížené populaci

Mutace	Počet vyšetřených zdravých alel/chromosomů	Četnost výskytu mutace v nepostížené populaci
p.Lys93Lys	524	0
p.Ser433Leu	598	0.167% alel
p.Thr27Ala	492	0
p.Gln46Pro	492	0.406% alel
p.Val1158Ile	386	2.5% alel
p. Asp1229Val	240	0
p.Thr199Ile	240	0
p.Arg227Gln	240	0

Benigní polymorfizmy?

# In silico analýzy

Dále jsme nově nalezené varianty testovali pomocí **počítačových analýz**.

Výsledek z programu PolyPhen

*Mutace*

*Výsledek (PolyPhen)*

*D1229V*

*probably damaging*

*T199I*

*benign*

*Q46P*

*probably damaging*

*S433L*

*probably damaging*

*R227Q*

*benign*

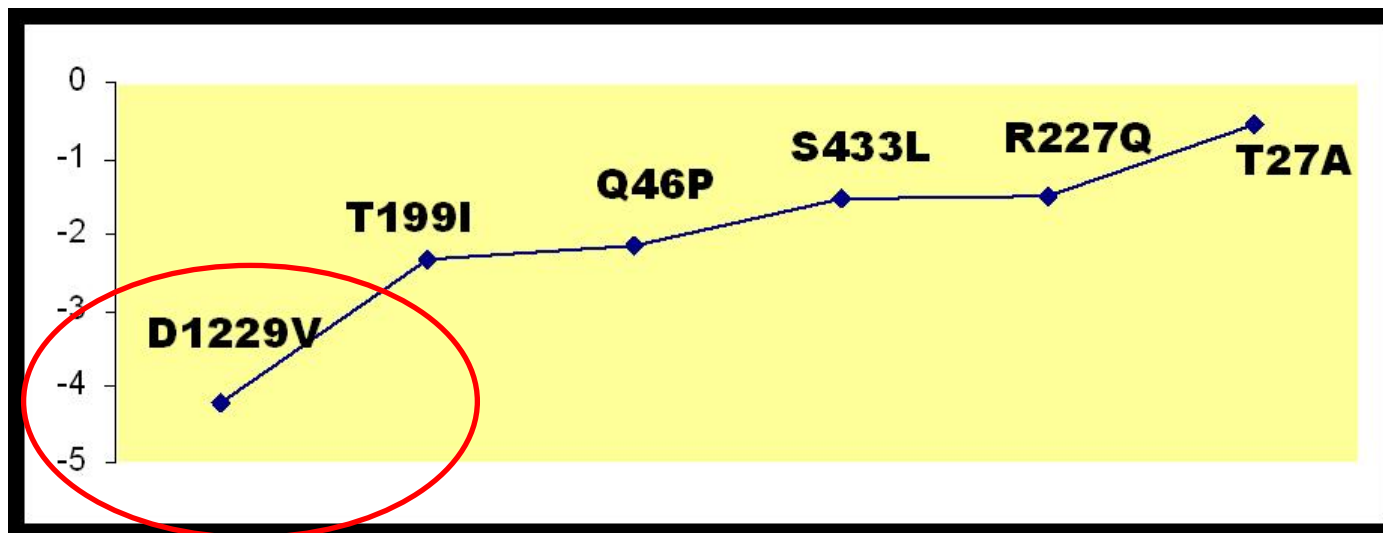
*T27A*

*benign*

Benigní  
polymorfizmy?

# Analýza v programu Panther

ukázala, že mutace p.Asp1229Val má pravděpodobně patogenní efekt (hodnoty menší než 3 jsou významné)



# Analýza v programu ClustalX,

který porovnává homologii DNA pro jednotlivé živočišné druhy, ukázala, že mutace p.Thr27Ala není vysoce konzervována

**Analýza v programu SIFT** ukázala, že mutace p.Asp1229Val a p.Gln46Pro mohou mít patogenní efekt.

**Databáze ASD potvrdila**, že obě mutace, u kterých jsme to předpokládali (p.Lys93Lys a c.3676-8G>A) **mohou ovlivňovat správný sestřih RNA.**

# Souhrn analýzy nových mutací

## Na základě analýzy nových, mutací bylo zjištěno:

Mutace\Nástroj analýzy	SIFT	PolyPhen	Panther	ClustalX	Populační frekvence	Závěr:
p.Thr27Ala	Benigní	Benigní	Benigní	Není vysoce konzervovaná	0	Benigní
p.Gln46Pro	Benigní	Patogenní	Benigní	Konzervovaná	0,406%	Benigní
p.Thr199Ile	Benigní	Benigní	Benigní	Konzervovaná	0	Benigní
p.Arg227Gln	Patogenní	Benigní	Benigní	Konzervovaná	0	?
p.Ser433Leu	Benigní	Patogenní	Benigní	Konzervovaná	0,167%	Benigní
p.Asp1229Val	Patogenní	Patogenní	Patogenní	Konzervovaná	0	Pravděpodobně patogenní

1. Záměna **p.Val1158Ile** je pouze **benigní polymorfismus**.
2. Mutace **p.Thr27Ala** a **p.Ser433Leu** jsou nepatogenními vzácnými polymorfizmy.
3. Mutace **p.Thr199Ile** je nepatogenní vzácný polymorfismus.
4. Povahu mutace **p.Arg227Gln** nebylo možné zcela jasně určit.
5. Mutace **p.Asp1229Val** může být patogenní.

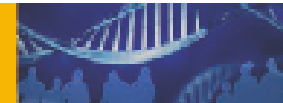
# Závěr:

Mutace v genu *SH3TC2* jsou **překvapivě častou** příčinou HMSN I mezi Českými pacienty.

**Prevalentní mutací je p.Arg954Stop (63 % patogenních alel)**. Testování by primárně mělo být zaměřeno na tuto mutaci.

**Je obtížné stanovit patogenitu některých nově nalezených**, dosud nepopsaných, mutací.

**Vyšetření genu *SH3TC2* doporučujeme** u pacientů s HMSN I, kteří byli testováni na CMT1A/HNPP s negativním výsledkem, a u nichž lze předpokládat autozomálně recesivní typ dědičnosti.



## Original Article

# High frequency of *SH3TC2* mutations in Czech HMSN I patients

Laššuthová P, Mazanec R, Vondráček P, Šišková D, Haberlová J, Sabová J, Seeman P. High frequency of *SH3TC2* mutations in Czech HMSN I patients.

Clin Genet 2011. © John Wiley & Sons A/S, 2011

Charcot–Marie–Tooth (CMT) neuropathy type 4C (CMT4C) is an autosomal recessive (AR), demyelinating neuropathy with early spine deformities caused by mutations in the *SH3TC2* gene. To determine the spectrum of *SH3TC2* mutations in the Czech population, the entire coding

**P Laššuthová<sup>a</sup>, R Mazanec<sup>b</sup>,  
P Vondráček<sup>c</sup>, D Šišková<sup>d</sup>,  
J Haberlová<sup>a</sup>, J Sabová<sup>a</sup>  
and P Seeman<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>DNA Laboratory, Department of Child Neurology, <sup>b</sup>Department of Neurology, 2nd Medical School, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic, <sup>c</sup>Clinic of Pediatric Neurology, The University

Děkuji za pozornost.