

Europäische Leitlinien zur molekulargenetischen Diagnostik der Charcot-Marie-Tooth'schen Erkrankung des Typs 1A sowie der tomakulösen Neuropathie

Bernd Rautenstrauß, James R. Lupski, Vincent Timmerman

Stand: 27.5.2000

Die vorliegenden Leitlinien sind das Resultat eines „Best Practice“ Workshops in Amsterdam, 27. Mai 2000, welcher mit Unterstützung durch das European Molecular Genetics Quality Network (EMQN) durchgeführt wurde. Die Mittel stammen von der Europäischen Union, Vertrag Nr. SMT4-CT98-7515. Die englische Originalversion ist auf der EMQN Homepage (www.emqn.org) verfügbar.

1. Beschreibung des Krankheitsbildes

Die Charcot-Marie-Tooth'sche Erkrankung (CMT) ist die häufigste, erbliche neurogene Muskelatrophie. Bald nach der Erstbeschreibung im Jahr 1886 wurde klar, daß die CMT Erkrankung keine isolierte Krankheitsentität darstellt, sondern sowohl klinisch als auch genetisch heterogen ist. Dyck and Lambert führten 1968 eine Klassifikation peripherer Neuropathien basierend auf genetischen, elektrophysiologischen und neuropathologischen Kriterien ein. Die hereditäre motorische und sensorische Neuropathie Typ I (HMSN I, CMT1) ist charakterisiert durch deutlich reduzierte motorische und sensorische Nervenleitgeschwindigkeiten (NLG) sowie morphologische Zeichen einer De- und Remyelinisierung in Biopsien des Nervus suralis. Die Erkrankung wird meist autosomal-dominant vererbt, es werden aber auch X-gekoppelte, autosomal-rezessive und sporadische Fälle beschrieben. Die Prävalenz liegt bei 10 - 40 / 100 000. Am weitesten häufigsten wird eine 1,5 Mb Tandem Duplikation als genetische Ursache beobachtet, die das *PMP22* Gen einschließt, darüberhinaus wurden aber auch Mutationen des Peripheren Myelin Proteins 22 (*PMP22*, 17p11.2), des Myelin Protein Zero (*MPZ*, P0, 1q22-23), Connexin32 (*Cx32*, Xq13.1) und des Early Growth Response 2 (*EGR2*, 10q21.1-22.1) Genes berichtet. Alle diese Gene außer *EGR2*, einem Transkriptionsfaktor, kodieren Transmembranproteine, die in der Myelinscheide der peripheren Nerven lokalisiert sind. Die HMSN II oder CMT2 Erkrankung ist charakterisiert

durch normale oder leicht reduzierte motorische und sensorische NLGs. Auch die CMT2 ist genetisch heterogen mit einem autosomal dominanten oder rezessiven Erbgang. Die HMSN III, auch Dejerine Sottas Syndrom (DSS) genannt, stellt eine sehr schwere Neuropathie mit extrem reduzierter NLG und Beginn der Erkrankung bereits in der Kindheit bzw. Jugend dar. Patienten einer hereditären Neuropathie mit Neigung zu Druckläsionen (engl. hereditary neuropathy with liability to pressure palsies, HNPP) entwickeln nach geringem Trauma eine Mononeuropathie. Bei sorgfältiger Untersuchung zeigen einige Patienten eine eher generalisierte periphere Neuropathie. Die HNPP, auch tomakulöse Neuropathie genannt, wird autosomal dominant vererbt, am häufigsten wird eine Deletion reziprok zu der CMT1A Duplikation beobachtet.

2. Nomenklatur und krankheitsverursachende Gene

Die Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die genetische Heterogenität der neurogenen Muskelatrophie-Erkrankungen.

3. Übliche Gründe für eine molekulargenetische Untersuchung

Obwohl die Phänotypen sehr stark variieren können, gibt es für die Patienten einige typische Krankheitsanzeichen, die den Besuch beim Arzt notwendig machen. Am häufigsten sind es Gangstörungen sowie langsam progrediente, distale Schwäche in den Beinen und/oder Händen, aber auch rezidivierende Lähmungen oder Fußdeformitäten, die eine ärztliche Untersuchung begründen. Eine Überprüfung der Nervenleitgeschwindigkeit und Elektromyographie, gelegentlich auch eine Biopsie des N. suralis sowie eine familiäre Häufung der Erkrankung führen zur genetischen Beratung. Die erblichen Neuropathien müssen sehr sorgfältig von den vielfältigen erworbenen (nicht-genetischen) Neuropathien, wie z. B. den immun-vermittelten, toxischen und infektiösen Formen unterschieden werden.

4. Herangehensweise und Protokolle

Für den molekular-diagnostischen Test auf eine CMT Erkrankung steht eine ganze Palette von Methoden bereit. Die vorliegenden Leitlinien sind nicht als Vorschrift aufzufassen, sondern als Beschreibung der Vor- und Nachteile für einige der Techniken. Die meisten Laboratorien führen nach wie vor eine Southernhybridisierung basierend auf den Dosisunterschieden der Restriktions Fragment Längen Polymorphismen durch, andere Techniken wie FISH oder PCR basierte Methoden entwickeln sich von der Forschung zur Routine.

1. Klinische Untersuchung

An Neuropathien können sowohl das motorische als auch das sensorische Nervensystem beteiligt sein. Eine Messung der Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) und eine Elektromyographie resultieren fast immer in abnormalen Werten. Die Sehneneigenreflexe sind oft eingeschränkt, ebenso fehlt häufig die Erregbarkeit. Gelegentlich ist eine N. suralis Biopsie bei der Differenzierung der verschiedenen Neuropathie-Typen hilfreich, z. B. für die chronische inflammatorische Polyneuropathie (CIDP) und die CMT. Der CMT Phänotyp überlappt manchmal mit denjenigen von anderen Erkrankungen wie Dejerine Sottas Syndrom (DSS), Roussy-Levy-Syndrom oder einer Friedreich'schen Ataxie. In den zweifelhaften Fällen kann eine genetische Diagnostik sehr hilfreich sein.

2. Genetische Analyse

Auf dieser Stufe der Leitlinien wird nur die CMT1A Duplikation sowie die HNPP Deletion berücksichtigt, weitere Mutationsanalyse-Strategien werden in einer späteren Version eingebunden.

Nachdem die große Mehrzahl der CMT1 Patienten eine 1,5 Mb Tandem Duplikation in Chromosom 17p12 unter Einschluß des *PMP22* Gens trägt, ist die Bestimmung bzw. der Ausschluß dieser Mutation der erste Schritt in der diagnostischen Vorgehensweise. Auch die hierzu reziproke HNPP Deletion ist üblicherweise in diesen ersten Test eingeschlossen. HNPP Patienten haben hin und wieder Symptome, die einer CMT Typ 1 Er-

Tab 1 Übersicht über die genetische Heterogenität der neurogenen Muskelatrophie-Erkrankungen

OMIM	OMIM Bezeichnung	Gen	Vererbung	GDB ID
#118220 *601097	CMT1A	Peripheral myelin protein 22 (<i>PMP22</i>)	AD	134190
#118200 *159440	CMT1B	Myelin Protein Zero (<i>MPZ</i> , <i>P0</i>)	AD	125266
601098	CMT1?	Early Growth response gene 2 (<i>EGR2</i>) ?	AD	120611
#145900 *601097 *159440	Dejerine Sottas Syndrom (DSS)	<i>PMP22/MPZ/</i> <i>EGR2</i>	AD/AR	
#605253 *159440. 0013	congenitale Hypomyelinisierung (CH)	<i>EGR2/MPZ</i>	AR	120611/ 125266
*214400	CMT4A	?	AR	
*601382 *603557	CMT4B	<i>MTMR2</i>	AR	9957577
	CMT4C	?	AR	
*601596	CMT4D	?	AR	
*601455	CMT4F (Lom)	N-myc downstream-regulated gene 1 (<i>NDRG1</i>)	AR	9958844
#302800 *304040	CMTX	Connexin32 (<i>Cx32</i> , <i>GJB1</i>)	XD	125246
*302801	CMTX2	?	XR	
*302802	CMTX3	?	XR	
#162500 *601097	HNPP	<i>PMP22</i>	AD	
*118210	CMT2A	?	AD	
*600882	CMT2B	?	AD	
*158580	CMT2C	?	AD	
*601472	CMT2D	?	AD	
	CMT2E	Neurofilament light gene (<i>NEFL</i>)	AD	168635
	ARCMT2A	?	AR	

krankung stark ähnlich sind, daher ist es sehr wichtig, die Deletionsanalyse in dieses erste Methodenset mit aufzunehmen. Der HNPP Test benötigt dieselben Proben/Marker wie der Test auf die CMT1A Duplikation. Nach dem Ausschluß oder der Bestätigung der CMT1A Duplikation/HNPP Deletion können weitere genetische Tests und/oder eine klinische Wiedervorstellung notwendig werden.

Die einzelnen Laboratorien sollten klar angeben, welcher spezifische Test verfügbar ist, z. B. nur Duplikationsanalyse oder auch Deletionstest oder auch eine vertiefende Mutationssuche in weiteren bekannten Genen. Allgemein sind zwei verschiedene Arten von Methoden verfügbar:

1. Binäre Methoden mit einer „Ja“ oder „Nein“ Antwort:

Pulsfeld Gelelektrophorese (PFGE) der CMT1A Duplikation/HNPP Deletion.
Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) der CMT1A Duplikation/HNPP Deletion.

2. Dosis-sensitive und andere Methoden

RFLP Southern blot Analyse (Proben aus der CMT1A/HNPP Region).
STR Marker aus der CMT1A/HNPP Region.
PCR Methoden, die auf der CMT1A-REP Sequenz basieren, um spezifische Bruchpunktfragmente nachzuweisen.

1. Binäre Methoden

In dieser Kategorie werden sowohl die Nachweise von Bruchpunktfragmenten aus restringierter genomischer

DNA und anschließender Pulsfeldgelelektrophorese als auch die Fluoreszenz in situ Hybridisierungen (FISH) zusammengefasst. Eine FISH Analyse kann zuverlässig nur in sehr erfahrenen Laboratorien mit der entsprechenden Ausrüstung durchgeführt werden. PFGE in der Routine ist eine in USA sehr verbreitete Methode, nicht jedoch in Europa. Die Methode führt zu klaren Resultaten (siehe Tabelle 2), hat aber auch Limitierungen, wie z. B. in der Qualität der eingesandten Blutprobe sowie in der aufwendigen und arbeitsintensiven Prozedur, bis letztendlich ein belichtetes Autoradiogramm vorliegt. Nicht interpretierbare Resultate liegen geschätzt bei ca. 10% der Analysen.

FISH basiert auf Cosmiden oder Klonen mit großen Insertionen (BACs, PACs), die aus der CMT1A Region abgeleitet sind und *PMP22* einschließen. Gegenwärtig ist keine kommerzielle Sonde verfügbar, dies kann sich in naher Zukunft ändern. Um die 1.5 Mb Duplikation anzuweisen, muß in der Regel eine Interphase-FISH durchgeführt werden. Zur Vermeidung von Interpretationsfehlern aufgrund des Zellzyklus- Zustandes der Zelle ist die gleichzeitige Verwendung einer zweiten für das Chromosom 17 spezifischen Probe angeraten. Dies gewährleistet, daß tatsächlich eine Duplikation beobachtet wird und nicht falsch-positive Signale aufgrund der Replikation in der Interphase in die Bewertung eingehen. Daher empfiehlt sich ein zweifarbiges Ansatz. Um diagnostische Sicherheit zu erzielen, sollen mindestens 50, besser 100 Kerne bezüglich der CMT1A Signale relativ zur Kontrollsonde ausgezählt werden. Prinzipiell gilt dies auch für die HNPP Deletion, wobei die Deletion auf Metaphase-Chromosomen klar erkennbar ist, so daß man mit 10-30 Metaphasen auskommt. Auf den ersten Blick erscheint diese Methode ideal, aber die Qualität und Verlässlichkeit der FISH Resultate hängen stark von den Blutproben ab. Obwohl FISH im Prinzip auf verschiedene gewebetypen angewandt werden kann, werden die besten Resultate mit Heparin-Blut und einer kurzen Kultivierung nach Eingang der Blutprobe erzielt (Tabelle 3). Auch diese Methode hat einen Anteil

Tab 2 Übersicht zur PFGE

Locus	Klon	Subklon	Klonierungsstelle	Insertionsgröße	Methode	Bruchpunktfragment	Literatur
D17S122	pVAW409R3	PVAW409R3a	EcoRI-BamHI	1400 bp	SacII PFGE	500 kb CMT1A junction	1
					FspI PFGE	500 kb CMT1A junction	2
					AsclI PFGE	500 kb CMT1A junction	3
CMT1A-REP	c20G2	PNEA102	EcoRI	1800 bp	SacII PFGE	500 kb CMT1A junction	4
					EagI PFGE	820 + 770 kb HNPP junction	5
						150 kb CMT1A junction	6
						320 (370) kb HNPP junction	
CMT1A-REP	c56A5	CosH1	EcoRI	?	EagI PFGE	150 kb CMT1A junction	7
						300 (350) kb HNPP junction	8

Tab 3 Übersicht zur FISH

Locus	Klon	Markierung	Methode	Literatur
proximal CMT1A-REP	c74F4	FITC avidin	FISH	1
distal CMT1A-REP	c112C10	FITC avidin	FISH	2
CMT1A monomer unit	pVAW409R1	FITC avidin	interphase FISH	3
PMP22	c103B11, c132G8, c77F4	digoxigenin	interphase FISH	4
PMP22	c132G8	digoxigenin	interphase FISH	5

Tab 4 RFLP Southern blot Methoden zum Dosis-Differenz- und Bruchpunktfragment Nachweis

Locus	Lit.	Klon	SubKlon	Klonierungsstelle	Insertionsgröße	Polymorphismus	Allel Größen	Allel-Frequenzen
D17S122	1,2	pVAW409R1	pVAW409R1b	EcoRI-BamHI	2500 bp	MspI RFLP	5.3 kb	0,86
D17S122	2,3	pVAW409R3	pVAW409R3a	EcoRI-BamHI	1400 bp	MspI RFLP	2.7 + 2.6 kb	0,14
							2.8 kb	0,50
							2.7 kb	0,44
							1.9 kb	0,06
D17S125	2,3	pVAW412R3	pVAW412R3HEb	EcoRI-HindIII	1300 bp	MspI RFLP	10.5 kb	0,17
D17S125	2,3	pVAW412R3	pVAW412R3HEc	EcoRI-HindIII	800 bp	MspI RFLP	5.4 kb	0,83
							2.6 kb	0,83
							0.7 + 1.9 kb	0,17
D17S61	2,3, 4	PEW401	pEW401HE	EcoRI-HindIII	850 bp	MspI RFLP	5.5 kb	0,24
							4.4 kb	0,76
							4.7 kb	rare
PMP22 (cDNA)	5	Rat	pCD25F3			EcoRI/HincII RFLP	11 kb	dosage
PMP22	6	Human	p132-G8R1	FspI-EcoRI	10 kb	EcoRI/HincII RFLP	9.6 kb	dosage
CMT1A-REP	7		pNEA101	EcoRI				dosage
CMT1A-REP	7	c20G2	pNEA102	EcoRI	1.8 kb	EcoRI	7.8 + 6.0 kb	dosage
							dosage	
CMT1A-REP	8,9	pLR6.0	pLR6.0	EcoRI	6 kb	EcoRI/SacI/NsiI	7.8 kb	HNPP junction
						EcoRI/SacI/NsiI	1.7 kb	CMT1A junction
								dosage
CMT1A-REP	8,9	pLR7.8	pLR7.8	EcoRI	7.8 kb	EcoRI/SacI	3.2 kb	CMT1A junction
						EcoRI/SacI	7.8 kb	HNPP junction
								dosage
CMT1A-REP	10, 11	proximal CMT1A-REP	pHK1.0P	EcoRI/PstI	1 kb	EcoRI	2.3 + 3.2 kb	CMT1A dosage
CMT1A-REP	11	proximal CMT1A-REP	pHK5.2P			EcoRI/HindIII	3.2 + 3.4 kb	CMT1A dosage
CMT1A-REP	12	proximal CMT1A-REP	pJ7.8P	EcoRI	7.8 kb	EcoRI/SacI	3.2 kb	CMT1A junction
							7.8 kb	HNPP junction
								dosage
	12	proximal CMT1A-REP	pJ5P	EcoRI	5 kb	EcoRI/HindIII	3.3, 3.1, 1.8, 1.7 kb	dosage

Literatur zu Tab 2

- 1) Raeymaekers et al. (1992) J. Med. Genet., 1:93-97.
- 2) Timmerman et al. (1992) Nature Genet., 1: 171-175.
- 3) Timmerman et al. (1992) Nature Genet., 1: 171-176.
- 4) Lorenzetti et al. (1995) Am. J. Hum. Genet., 56:91-98.
- 5) Roa et al. (1995) LabMedica, 12 (4):22-24.
- 6) Timmerman et al. (1996) Hum. Genet., 97:26-34.
- 7) Kennerson et al. (1995) Clinical Chemistry, 41:1534-1535.
- 8) Genome Sequence DataBase, accession Nr. L42108.

Literatur zu Tab 3

- 1) Rautenstrauss et al. (1997) J. Per. Nerv. Syst., 2:319-322.
- 2) Rautenstrauss et al. (1997) J. Per. Nerv. Syst., 2:319-322.
- 3) Liehr et al. (1997) Acta. Neuropathol., 94:266-271.
- 4) Shaffer et al. (1997) Am. J. Med. Genet. 69(3):325-331.
- 5) Rautenstrauss et al. (1998) Int. J. Mol. Med., 1:333-337.

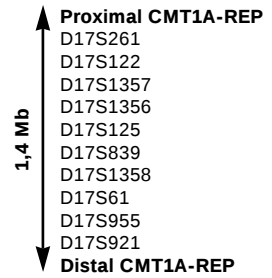
Literatur zu Tab 4

- 1) Raeymaekers et al. (1991) Neuromusc. Dis., 1:93-97.
- 2) Wright et al. (1990) Genomics, 7:103-109.
- 3) Raeymaekers et al. (1992) J. Med. Genet., 1:93-97.
- 4) Bost et al. (1994) Clin. Genet., 46:380-381.
- 5) Spreyer et al. (1991) EMBO J., 10:3661-3668.
- 6) Patel et al. (1992) Nature Genet., 1:159-166.
- 7) Lorenzetti et al. (1995) Am. J. Hum. Genet., 56:91-98.
- 8) Reiter et al. (1996) Nature Genet., 12:288-297.
- 9) Timmerman et al. (1997) J. Med. Genet., 34:43-49.
- 10) Ikegami et al. (1997) Hum. Mut., 9:563-566.
- 11) Yamamoto et al. (1997) Hum. Genet. 99:151-154.
- 12) Lopes et al. (1996) Am. J. Hum. Genet., 58:1223-1230.

Tab 5 STR Analysen

Locus	Lit.	STR	STR-Typ	Allel größe (pb)	Anzahl Allele	PIC	H
D17S122	1	RM11-GT	CA-repeat	153-167	8		74
D17S261	2	Mfd41	CA-repeat	157-171	6	0,44	
D17S921	3	AFM191xh12	CA-repeat	174-183	10	0,69	0,73
D17S1356	4	142E8ac1	CA-repeat	145-157	7		0,48
D17S793	3	AFM165zd4	CA-repeat	99-109	7		0,7
D17S839	3	AFM200yb12	CA-repeat	155-175	5	0,47	0,56
D17S955	3	AFM317yg1	CA-repeat	187-181	4	0,4	0,45
D17S1357	4	103B11ac1	CA-repeat	194-210	6		0,57
D17S1358	4	133C4ac1	CA-repeat	182-194	7		0,74

Tab 6 Relative Anordnung der RFLP/STR Marker nach K. Inoue & JR Lupski, nichtpublizierte Beobachtungen



Tab 7 Übersicht zu CMT1A-REP spezifischen PCR-Analysen

Locus	Lit.	Methode	Primer Name
CMT1A-REP sequence proximal and distal	1 2 3 4	DNA Sequenz von 6 Kontrollen	Keiner
CMT1A-REP	5	PCR Analyse von Bruchpunktfragmenten + EcoRI und NsiI Verdauung	DistF ProxR ProxF DistR
CMT1A-REP	6	PCR Analyse von Bruchpunktfragmenten + NsiI Verdauung	DF1 (pos 1781-1805, distal CMT1A-REP) DF2 (pos 2394 - 2418, distal CMT1A-REP) DR1 (pos 5077 - 5101, distal CMT1A-REP) DR2 (pos 3574 - 3598, distal CMT1A-REP) PR1 (pos 5069 - 5093, proximal CMT1A-REP) PR2 (pos 3560 - 3584, proximal CMT1A-REP)
CMT1A-REP	7, 8	PCR Analyse von Bruchpunktfragmenten + NsiI und AccI Verdauung	primer A (pos 1785 - 1806, distal CMT1A-REP) primer B (pos 5069 - 5093, proximal CMT1A-REP) primer C (pos 3751 - 3771, distal CMT1A-REP) primer D (pos 3489 - 3509, distal CMT1A-REP)
CMT1A-REP	9	PCR Analyse von Bruchpunktfragmenten + EcoRI Verdauung	CMT1A-FOR und HNPP-FOR CMT1A-REV HNPP-REV
CMT1A-REP	10	PCR Analyse von Bruchpunktfragmenten + EcoRI und NsiI Verdauung + EcoRI und SacI Verdauung	Rdist1 (pos 1500-1523 der Sequenz HSU41165) Rprox2 (pos 5177 - 5154 der Sequenz HSU41166)

Tab 8 Quantitative PCR-Analysen (1)

Fragment	Primer und Markierung
PMP22 Exon 4	s. Literatur (reverse) FITC (forward)
CETP (Reporter fragment)	s. Literatur (reverse) FITC (forward)

Literatur zu Tab 5

- 1) Lupski et al. (1991) Cell, 66:219-232.
- 2) Weber et al. (1990) Nucl. Acids Res., 18:4640.
- 3) Cudrey et al. (1995) J. Med. Genet., 32:231-233.
- 4) Blair et al. (1995) Clin. Chem., 41:1105-1108.

Literatur zu Tab 7

- 1) <http://www.bcm.tmc.edu/molgen/lupski>
- 2) GenBank Nr. U41165 (distal) and U41166 (proximal).
- 3) Reiter et al. (1996) Nature Genet., 12:288-297.
- 4) Reiter et al. (1998) Am. J. Hum. Genet., 62:1023-1033.
- 5) Haupt et al. (1997) Hum. Genet. 99:688-691.
- 6) Yamamoto et al. (1998) Hum. Mut. 11:109-113.
- 7) Chang et al. (1998) Clin. Chem., 44:270-274.
- 8) GenBank Nr. 41165 and 41166.
- 9) Stronach et al. (1999) J. Per. Nerv. Syst., 4:117-122.
- 10) Bernard et al. (2000) Eur. J. Hum. Genet., 8:229-235.

Literatur zu Tab 8

- Young et al. (1998) Neurology 50:760-763.

von 10-30% an nicht interpretierbaren Resultaten. Dies kann die verschiedensten Gründe haben, wie z. B. Verwendung der falschen Blutröhrchen (Serum) oder ein langer Transport einhergehend mit einer abnehmenden Qualität der Kerne, in anderen Laboratorien werden mittlerweile 99% der Blutproben erfolgreich analysiert.

2. Dosis-sensitive und andere Methoden

Methoden basierend auf Southern-Hybridisierungen

Die in Tabelle 4 gezeigten Southern-Hybridisierungs-Methoden werden in vielen Laboratorien angewendet. Speziell die MspI Blots sind sehr verbreitet. Einen Nachteil der MspI Blots stellt die häufig beobachtete Homozygotie dar, die dann zu nicht-informativen RFLP Mustern führt. Die Verwendung von zwei Sonden entweder nacheinander (pVAW409R3a und pEW401HE) oder gleichzeitig (pVAW412R3 und pEW401HE) hilft hier gewöhnlich weiter. Bei der Verwendung dieser Sonden muß man sich darüber bewusst sein, daß es sich um anonyme Marker handelt, die u. U. rearrangiert sein können, ohne daß eine CMT1A Duplikation oder HNPP Deletion vorliegt. Die Verwendung der Sonde pNEA102 mit EcoRI verdauter genomischer DNA ist für diagnostische Zwecke nicht empfehlenswert, da die Dosisunterschiede der Duplikation/Deletion nur geringfügig sind (4->5 CMT1A, 4->3 HNPP). Als ergänzende Methode ist pNEA102 jedoch durchaus brauchbar. Die pLR7.8 Sonde zusammen mit EcoRI/SacI verdauter DNA ist im Falle des Nachweises eines Bruchpunktfragmentes sehr hilfreich. Die Dosisunterschiede für Rekombinationen außerhalb des „hotspot“ sind dagegen schwer interpretierbar und sollten daher nur als Indikator für eine Rekombination verwendet werden, die eine zweite Analyse notwendig macht. Wie jüngere Daten zeigen, sind die CMT1A-REP Elemente polymorpher als erwartet, daher sollte auch der Nachweis eines Bruchpunktfragmentes mit einer weiteren Methode bestätigt werden. Dies gilt

ebenfalls, wenn keine Veränderung nachweisbar ist, denn dies kann schlicht den Verlust einer Restriktionsstelle bedeuten.

PCR Methoden basierend auf STR Markern (Tabelle 5 und 6)

Für STR basierende Methoden sind vielfältige Protokoll mittels Multiplex PCRs verfügbar. Es ist nicht empfehlenswert, nur einen Marker zu verwenden, mindestens zwei der Marker sollten positiv für drei Allele sein, um von einer CMT1A Duplikation auszugehen. Eine HNPP Deletion kann angenommen werden, wenn mehrere Marker nur ein Allel zeigen (Hemi-oder Homozygotie). Sollten nur Dosisunterschiede erkennbar sein, so ist eine zweite Methode angeraten, um den Typ der Mutation mit diagnostischer Korrektheit zu bestimmen.

An den CMT1A-REP Elementen orientierte PCR Analysen (Tabelle 7)

Die PCR basierten Methoden für die CMT/HNPP Bruchpunktfragmente wurden in mehreren Laboratorien erprobt. Diese Anwendungen ergaben zwei verschiedene Probleme:

1. Die PCR ist schwierig durchführbar und die Ergebnisse sind nur eingeschränkt reproduzierbar.
2. Die CMT1A-REP Elemente sind polymorpher als erwartet, dies beeinträchtigt hin und wieder die Bindung der Primer.

Daher erscheinen diese PCR Methoden für wissenschaftliche Zwecke durchaus sinnvoll, allerdings nicht für eine diagnostische Routine. Es darf dabei nicht übersehen werden, daß nur ca. 70% der CMT1A Duplikationsträger ein Bruchpunktfragment aufgrund der Rekombination innerhalb des „hotspots“ aufweisen.

Quantitative Methoden sind verfügbar bzw. in der Entwicklung, sie benötigen PCR Maschinen der neuen Generation, die eine Quantifizierung während der Amplifikation erlauben (Tab. 8). Diese Methoden sind noch wenig verbreitet, daher sollten bei tiefergehendem Interesse die entsprechenden Laboratorien direkt kontaktiert werden.

5. Untersuchungsmaterial

Üblicherweise wird DNA aus peripheren Lymphozyten extrahiert und für die weitere Analyse verwendet. Für die PFGE und FISH werden ganze Zellen oder Zellkerne benötigt, die Etablierung lymphoblastoider Zelllinien ist ebenfalls manchmal hilfreich. Für die DNA Extraktion sind unterschiedliche Methoden verfügbar, am verbreitetsten ist die Aussalz-Methode, es werden aber auch Silica-basierte Methoden berichtet.

Andere Gewebe sind in Abhängigkeit der Analysemethoden ebenso geeignet, EPON eingebettete Biopsien sind jedoch für DNA-orientierte Analysen völlig ungeeignet.

6. Kontrollen

Für Southern-Hybridisierungen ist es erforderlich, DNA mit einer typischen CMT1A Duplikation, einer HNPP Deletion sowie eine gesunde Kontrollprobe zu verwenden, die vorab mit mehreren Methoden geprüft wurden (MspI Blot, EcoRI/SacI Blot, FISH, polymorphe Marker). Dies erlaubt beispielsweise, Partialverdaus oder Polymorphismen in den RFLPs zu identifizieren. Für die PCR Methoden gilt sinngemäß dasselbe.

7. Pränatale Diagnose

Eine Pränataldiagnose wird von einigen CMT Zentren angeboten. Nachdem die Pränataldiagnostik ähnlich zur Präimplantationsdiagnostik von nationalen Gesetzen geregelt wird und die Nachfrage gering ist, wird empfohlen, daß die individuellen Laboratorien/Länder den nächst ihre eigenen Regeln definieren bis eine europäische Gesetzgebung erfolgt. Allerdings gibt es für eine Pränataldiagnose einige grundlegende Unterschiede zur Individualdiagnose eines einzelnen Patienten. Für die CMT Erkrankung sollte einerseits die Mutation eines Elternteils bekannt sein, andererseits sollte bei einer erkrankten Mutter, wie üblich, eine maternale Kontamination der analysierten Amnionzellen bzw. Chorionzotten mittels Mikrosatelliten ausgeschlossen werden. Für eine paternale Vererbung sollte ebenfalls mittels Mikrosatelliten sichergestellt werden, daß tatsächlich embryonales Gewebe analysiert wurde.

8. Kopplungsanalyse

Eine Kopplungsanalyse kann nach wie vor für Patienten mit klarem Phänotyp ohne nachweisbare Mutation hilfreich sein. Dies kann der Fall sein, wenn keine CMT1A Duplikation gefunden wurde, eine *PMP22* Mutation jedoch anzunehmen, aber nicht nachweisbar ist (z. B. intronische Mutationen).

9. Sonden

Alle in diesen Leitlinien erwähnten Sonden sind über das europäische CMT Konsortium sowie die nationalen Kontaktlaboratorien verfügbar. Bakterienstämme mit den entsprechenden Plasmiden können in jedem Labor gezüchtet werden, das die diagnostische Prozedur durchführt. Kommerziell verfügbare Proben für diagnostische Zwecke sind gegenwärtig nicht bekannt.

10. PCR Primer

Primersequenzen, PCR Bedingungen etc. sind auf mehreren homepages öffentlich zugänglich (vgl. Punkt 12.).

11. Interpretation

Der Nachweis einer CMT1A Duplikation oder einer HNPP Deletion kann für Neuropathien als krankheitsverursachende Mutation interpretiert werden. Es kann notwendig werden, die klinische Untersuchung zu wiederholen, da nicht alle Duplikationsträger eine NLG unterhalb des „cut off“ Wertes von 38 m/s zeigen, auch Deletionsträger können einen CMT1-ähnlichen Phänotyp zeigen. Selten stellen sich Patienten mit der Diagnose einer Friedreich'schen Ataxie als CMT1A Duplikationsträger heraus. Für diejenigen Patienten ohne nachweisbare Duplikation oder Deletion sowie einer zweifelsfreien klinischen Diagnose empfiehlt sich eine weitere Mutationssuche.

12. WEB Quellen

<http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/nother/myelin.html>
<http://imgen.bcm.tmc.edu/molgen/lupski/>
<http://www.almlc.com/~smith/ResearchOrg.html>
<http://www.mdausa.org/>
<http://molgen-www.uia.ac.be/CMT/>
<http://www.cmtint.org>
<http://www.charcot-marie-tooth.org>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/disease/Charcot.html>
<http://www.muscular-dystrophy.org>

Literatur

CMT/HNPP Diagnostik im Allgemeinen

De Jonghe, P., Nelis, E., Timmerman, V., Löfgren, A., Martin, J.-J., Van Broeckhoven, C. (1999) Molecular diagnostic testing in Charcot-Marie-Tooth disease and related disorders: approaches and results. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 883:389-396.

De Jonghe, P., Timmerman, V., Van Broeckhoven, C. (1998) und workshop participants. 2nd workshop of the European CMT consortium: 53rd ENMC international workshop on classification and diagnostic guidelines for Charcot-Marie-Tooth type 2 (CMT2 – HMSN II) and distal hereditary motor neuropathy (distal HMN – spinal CMT), 26-28 September 1997, Naarden – The Netherlands. *Neuromusc.Disord.* 8:426-431.

De Visser, M. (1993) Diagnostic criteria for autosomal dominant hereditary motor and sensory neuropathy type 1a. *Neuromusc.Disord.* 3:77-79.

De Visser, M., Van Broeckhoven, C., Nelis, E. (1997) Hereditary motor and sensory neuropathy or Charcot-Marie-Tooth disease types 1A and B. In: Diagnostic criteria for neuromuscular disorders, edited by Emery, A.E.H. London: Royal Society of Medicine Press, p. 49-52.

Dubourg, O., Mouton, P., Brice, A., LeGuern, E., Bouche, P. (2000) Guidelines for diagnosis of hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Neuromuscul Disord* 10(3):206-8.

Dyck, P.J., Chance, P., Lebo, R., Carney, J.A. (1993) Hereditary motor and sensory neuropathies. In: *Peripheral Neuropathy*, edited by Dyck, P.J., Thomas, P.K., Griffin, J.W., Low, P.A. and Poduslo, J.F. Philadelphia: W.B. Saunders Company, p. 1094-1136.

Fuchs, C., Liehr, T., Oezbey, S., Ekici, A., Grehl, H., Rautenstrauss, B. (1998) Charcot-Marie-Tooth disease type 1A and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies: a *Sac1* polymorphism in the proximal CMT1A-REP elements may lead to genetic misdiagnosis. *Neurogenetics* 2: 43-46

Haite, N.E., Nelis, E., Van Broeckhoven, C. (1998) 3rd workshop of the European CMT consortium: 54th ENMC international workshop on genotype/phenotype correlations in Charcot-Marie-Tooth type 1 and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies, 28-30 November 1997, Naarden, The Netherlands. *Neuromusc.Disord.* 8:591-603.

Lupski, J.R. (1996) DNA diagnostics for Charcot-Marie-Tooth disease and related inherited neuropathies. *Clin.Chem.* 42:995-998.

Lupski, J. R., Garcia, C.A. (2001) Charcot-Marie-Tooth peripheral neuropathies and related disorders. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases Eighth Edition* (Eds.: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, D. Valle, B. Vogelstein, and B. Childs) McGraw-Hill, New York.

Martin, J.-J., Brice, A., Van Broeckhoven, C. (1999) 4th Workshop of the European CMT-Consortium - 62nd ENMC International Workshop: Rare forms of Charcot-Marie-Tooth disease and related disorders, 16-18 October 1998, Soestduinen, The Netherlands. *Neuromusc.Disord.* 9:279-287.

Präimplantations-Diagnostik

De Vos, A., Sermon, K., Van de Velde, H., et al. (1998) Pregnancy after preimplantation genetic diagnosis for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Mol.Hum.Reproduction* 4:978-984

Korrespondenzadresse

PD Dr. Bernd Rautenstrauß
 Institut für Humangenetik
 Schwabachanlage 10
 91054 Erlangen
 Tel. 09131-852-2352
 Fax 09131-209297
berndwr@humgenet.uni-erlangen.de

Zitierhinweis

Europäische Leitlinien zur molekulargenetischen Diagnostik der Charcot-Marie-Tooth'schen Erkrankung des Typs 1A sowie der tomakulösen Neuropathie. *medgen* 13 (2001) 309-314.