

GENETISK STUDIE AV NORSKE FAMILIER MED CHARCOT-MARIE-TOOTH SYKDOM

A GENETIC STUDY OF NORWEGIAN FAMILIES WITH CHARCOT-MARIE-TOOTH
DISEASE

HANNE MARIA HOLM

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP

Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap
Masteroppgave 60 stp. 2012



FORORD

Det praktiske arbeidet i mastergradsoppgaven ble utført ved Enhet for medisinsk genetik, Sykehuset Telemark Helseforetak, fra juni 2010 til mars 2012. Oppgaven er et underprosjekt av doktorgradsstudiet “Molecular Genetic Epidemiology of Charcot-Marie-Tooth disease” av Helle Høyer.

Først vil jeg takke Helle Høyer, stipendiat ved Universitetet i Oslo og Sykehuset Telemark Helseforetak, for hennes uvurderlige hjelp både teknisk i laboratoriet, ved tolkning av resultater og gjennom skriveprosessen. Jeg vil også takke ph.d. Øyvind Busk, som har bistått med bioinformatisk kompetanse, og dr. Geir J. Braathen, nevrolog og genetiker, som har bidratt med kliniske opplysninger om studiepopulasjonen, ved Sykehuset Telemark Helseforetak. Takk til mine veiledere, ph.d. Camilla Furu Skjelbred, avdelingsleder ved Enhet for medisinsk genetik, og Dag Inge Våge, professor ved UMB, for god veiledning og raske tilbakemeldinger. Til slutt vil jeg takke min samboer for korrekturlesing av oppgaven.

Oslo, august 2012

Hanne Maria Holm

TILLEGGSOPPLYSNINGER

Beregning av LOD-score, bearbeiding av rådata fra dypsekvensering, variantdeteksjon og identity-by-descent-analyse ble utført av ph.d. Øyvind Busk ved Enhet for medisinsk genetik, Sykehuset Telemark Helseforetak (STHF).

Sekvensering av 128 individer med CMT2 fra familie 2 for mutasjonen p.His46Arg i genet *SOD1*, sekvensering av 3 affiserte individer fra familie 1 med CMT2 for mutasjon i *LMNA*, bestilling av primere til genene *LMNA*, *SOD1*, *TMOD4* og *HMCN1*, samt dypsekvensering av 3 affiserte individer fra familie 1 ble utført sammen med Helle Høyen ved Enhet for medisinsk genetik, STHF.

INNHALDSFORTEGNELSE

| | |
|--|-----|
| Forord | I |
| Tilleggsopplysninger | II |
| Innholdsfortegnelse | III |
| Ordforklaringer og forkortelser | VI |
| Sammendrag | X |
| Abstract | XI |
| 1. Innledning | 1 |
| 1.1 Charcot-Marie-Tooth sykdom og nervesystemet | 1 |
| 1.2 Charcot-Marie-Tooth sykdom type 2 | 5 |
| 1.3 Charcot-Marie-Tooth sykdom og arvelighet | 6 |
| 1.4 Diagnostiske utfordringer og behandling av CMT | 7 |
| 1.5 Kartlegging av sykdomsgener | 8 |
| 1.5.1 Koblingsanalyser | 8 |
| 1.5.2 LOD-score | 9 |
| 1.5.3 Sangersekvensering | 10 |
| 1.5.4 Dypsekvensering | 11 |
| 1.5.5 Behandling av rådata fra dypsekvensering | 14 |
| 1.6 Hensikten med oppgaven | 16 |
| 2. Material og metode | 17 |
| 2.1 Bakgrunn | 17 |
| 2.2 DNA-ekstraksjon | 18 |
| 2.3 Konsentrasjonsmåling av DNA | 18 |
| 2.4 Koblingsanalyse | 18 |
| 2.4.1 Genetiske markører | 18 |
| 2.4.2 Mikrosatellittanalyse | 19 |
| 2.4.3 Databehandling av fragmentanalyse | 19 |
| 2.4.4 LOD-score | 19 |
| 2.5 Dypsekvensering | 20 |
| 2.5.1 Tillaging av DNA-bibliotek | 20 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2.5.2 | Validering av DNA-bibliotek | 21 |
| 2.5.3 | Klasegenerering | 22 |
| 2.5.4 | Sekvensering med HiScanSQ Systems | 22 |
| 2.5.5 | Dataanalyse av rådata fra dypsekvensering | 22 |
| 2.6 | Sangersekvensering | 23 |
| 2.6.1 | Primere | 23 |
| 2.6.2 | Sangersekvensering | 23 |
| 2.6.3 | Dataanalyse av sekvenseringsresultater | 23 |
| 3. | Resultater | 24 |
| 3.1 | Karakteristikk av studiepopulasjonen | 24 |
| 3.2 | Koblingsanalyse av to store familier | 28 |
| 3.3 | Sekvensering av <i>LMNA</i> | 31 |
| 3.4 | Sekvensering av <i>SOD1</i> | 31 |
| 3.5 | Eksomsekvensering av familie 1 | 33 |
| 3.6 | Sekvensering av <i>TMOD4</i> og <i>HMCN1</i> | 35 |
| 4. | Diskusjon | 40 |
| 4.1 | Koblingsanalyse | 40 |
| 4.2 | Sekvensering av <i>LMNA</i> | 41 |
| 4.3 | Sekvensering av <i>SOD1</i> | 42 |
| 4.4 | Eksomsekvensering av familie 1 | 43 |
| 4.5 | Sekvensering av <i>TMOD4</i> og <i>HMCN1</i> | 43 |
| 4.6 | Hva kan være årsaken til aksonal CMT i familie 1? | 44 |
| 4.7 | Metodiske svakheter | 45 |
| 4.7.1 | Koblingsanalyse | 46 |
| 4.7.2 | aCGH | 46 |
| 4.7.3 | Dypsekvensering | 47 |
| 4.7.4 | Basebestemmelse og feilbestemmelse av disse | 48 |
| 4.7.5 | Dataanalyse | 49 |
| 4.8 | Etiske hensyn | 50 |
| 5. | Konklusjon | 51 |
| 6. | Litteraturliste | 52 |

| | |
|-----------|----|
| Vedlegg 1 | 60 |
| Vedlegg 2 | 61 |
| Vedlegg 3 | 62 |
| Vedlegg 4 | 64 |
| Vedlegg 5 | 66 |

ORDFORKLARINGER OG FORKORTELSER

| | |
|-------------------------|---|
| AD | Forkortelse for autosomal dominant. Uttrykket benyttes ofte i sammenheng med dominant arvegang av en sykdomsfremkallende mutasjon som befinner seg på et autosomalt kromosom. |
| aCGH | Forkortelse for “array-comparative genomic hybridization”. En teknikk som brukes for å detektere kopitallvariasjoner (duplikasjoner eller delesjoner). |
| Allele | Alleler er ulike varianter av et gen med et bestemt locus på kromosomet. Av den grunn blir de derfor også kalt genvarianter. |
| Aksjonspotensial | Et aksjonspotensial fører til muskelkontraksjon, og oppstår ved at celler oppnår et elektropotensial på bakgrunn av ladningsforskjeller på innsiden og utsiden av cellemembranen. |
| Amplifisere | Betyr å forsterke noe, men i sammenheng med PCR brukes uttrykket om oppkopiering av DNA-templater. |
| Antenatal | Før fødsel. |
| AR | Forkortelse for autosomal recessiv. Uttrykket benyttes ofte i sammenheng med recessiv arvegang av en sykdomsfremkallende mutasjon som befinner seg på et autosomalt kromosom. |
| Atrofi | Svinn av vev, organ eller muskel. |
| Autosomal | Ikke-kjønnskromosomer. Et menneske innhar 23 kromosompar, hvor 22 av parene er autosomale, mens det siste paret er kjønnskromosomer. |
| BWA | BWA er et raskt bioteknologisk verktøy som sammenstiller relativt korte sekvenser til en sekvensdatabase som for eksempel det humane genom. |

| | |
|-------------------------|--|
| centiMorgan (cM) | Enhet på genetisk avstand. Innenfor mindre intervaller nærmest ekvivalent med 1 % sannsynlighet for rekombinasjon under meiosen. Hos menneske er 1 centiMorgan i gjennomsnitt ekvivalent med en avstand på ca. 1 million nukleotider. |
| CMT | Charcot-Marie-Tooth sykdom. |
| CMT1 | Charcot-Marie-Tooth sykdom type 1. Denne typen CMT har nerveledningshastighet under 38 m/s. |
| CMT2 | Charcot-Marie-Tooth sykdom type 2. Denne typen CMT har nerveledningshastighet over 38 m/s. |
| CMTX | Charcot-Marie-Tooth sykdom som er koblet til kromosom X. |
| CNS | Sentralnervesystemet, omfatter hjerne og ryggmarg. |
| CNV | Fortkortelse for " <i>copy number variation</i> ". Oversettes til kopitallvariasjon. |
| Denervasjon | Blokkering av nerveforsyningen som følge av nevrologiske sykdommer som skader nerveforsyningen til et bestemt område slik at den opphører. |
| Demyelinisering | Degradering av det isolerende myelinlaget på nerveledningene. Det isolerende myelinlaget gjør at nervesignalet raskt og effektivt kan nå frem til målceller eller organer. |
| Eksomanalyse | Analyse/sekvensering av alle eksonene i et genom. |
| Elektromyografi | En undersøkelse av den elektriske aktiviteten i muskler. |
| GATK | Forkortelse for "The Genome Analysis Toolkit". GATK er et analyseverktøy for å behandle sekvenseringsdata fra dypsekvensering ved å benytte programmeringsfilosofi fra Map/Reduce. Verktøyet hjelper til med å rekalkibrere kvalitetsscore, finne SNPer, delesjoner, insersjoner, og er en lokal resammenstillere. |
| Heterozygot | To ulike alleler i et genlocus. |

| | |
|---------------------------|--|
| HMSN | Engelsk forkortelse for “ <i>Hereditary motor and sensory neuropathies</i> ”, som på norsk oversettes til “ <i>arvelig motorisk og sensorisk nevropati</i> ”. |
| Homozygot | To like alleler i et genlocus. |
| Idiopatisk | Betegnelse for en selvstendig opptredende sykdomstilstand som ikke skyldes forutgående sykdom eller noen påviselig årsak. |
| Kopitall-variasjon | Genmutasjon i form av duplikasjoner eller delesjoner av en DNA-sekvens. Forkortes “CNV”, som står for “ <i>copy number variation</i> ”. |
| Locus | Et locus er et område på et kromosom, og kan brukes til å angi posisjonen til et gen. |
| Missense-mutasjon | En mutasjon som fører til aminosyreforandring i et protein. En slik mutasjon kan gi endret proteinfunksjon. |
| Multippel sklerose | Kronisk og uhelbredelig nevropatisk sykdom i det sentrale nervesystem. Sykdommen forårsaker betennelse og skader myelinlaget rundt nervecellene i det sentrale nervesystem slik at nervesignalene ikke når frem til målceller eller organer. |
| Nevron | Nervecelle med tilhørende utløpere som dendritter og aksoner. |
| Nevropati | Fellesbetegnelse for sykdom i nervesystemet. |
| Perifert | Betyr det ytre, ut fra midten. Et eksempel er det perifere nervesystemet som omhandler hele nervesystemet utenom hjerne og ryggmarg. |
| Pipeline | Prosessering av sekvensdataene fra dypsekvensering. Dette innebærer blant annet sammenstilling mot referansegenom, deteksjon av SNPer og filtrering av data. |
| Schwann celler | Amorfe/formløse støtteceller som følger og omgir de umyeliniserte aksonene i det perifere nervesystemet. |
| SNP | Forkortelse for “ <i>single nucleotide polymorphism</i> ”, som er en enslig nukleotidpolymorfisme i en DNA-sekvens. |

SNV

Forkortelse for “*single nucleotide variation*”, som er en enslig nukleotidvariasjon i en DNA-sekvens.

Terskelverdi

Et aksjonspotensial dannes dersom membranpotensialet når terskelverdien på ca. -55mV . Da er membranpotensialet depolarisert av at Na^+ har strømmet inn i cellen, slik at det er en ladningsforskjell på innside og utside av cellemembranen.

SAMMENDRAG

Charcot-Marie-Tooth sykdom er den vanligste arvelige perifere nevropatien i Norge, og forekommer hos 1 av 1214 personer. To store familier diagnostisert med autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth sykdom type 2, ble undersøkt med formål om å identifisere den genetiske årsaken til sykdommen. Familie 1, som består av 49 individer med avgitt blodprøve, har en gjennomsnittlig sykdomsdebut i fjerde tiår. De affiserte familiemedlemmene har symptomer som muskelsvakheter og atrofier i ben. Familie 2, som består av 159 individer med avgitt blodprøve, har også en gjennomsnittlig sykdomsdebut i fjerde tiår. Familie 2 er hardere rammet av pareser og atrofier i underlemmene. Begge familier er tidligere utredet for duplikasjoner og delesjoner i *PMP22*, *MPZ* og *MFN2*, samt punktmutasjoner i eksonene i genene *GJB1* (*Cx32*), *PMP22*, *MPZ*, *LITAF*, *EGR2*, *NEFL* og *MFN2* uten funn. Det er også utført aCGH med 180 000 prober gjennom genomet for å finne eventuelle kopitallvariasjoner.

Etter utført koblingsanalyse av familie 1, ble det avdekket en LOD-score på 1,96, tilhørende markør D1S498 på kromosom 1. Dette viser en mulig kobling til området 1q21.3. Resultatet av dette og tidligere studier kombinert med familiens symptomer impliserer at det er et mulig hittil ukjent genetisk locus for denne sykdommen. Genet *LMNA* som tidligere er assosiert med CMT2, befinner seg i dette locuset. Alle eksonene i *LMNA* ble sekvensert og undersøkt for mutasjon hos 3 affiserte individer fra familie 1 uten å identifisere mutasjonen. Av den grunn ble det undersøkt bredere med eksomsekvensering av 3 affiserte individer fra familie 1. Det ble funnet variasjoner i genene *TMOD4* og *HMCN1* som befant seg i området med høy LOD-score hos alle de 3 individene. For å undersøke om variasjonene ko-segregerte med fenotypen, ble henholdsvis 49 og 16 familiemedlemmer Sangersekvensert. Resultatene fra sekvenseringen av *HMCN1* utelukket genet som patologisk årsak. I *TMOD4* hadde alle affiserte personer substitusjonsvariasjonen p.Met332Val, mens ingen friske individer bar den. For å utelukke at varianten i *TMOD4* var en polymorfisme, ble 150 nevrologisk friske individer undersøkt. Resultatene viste at 2 av 150 av de friske individene bar variasjonen, hvilket antyder at dette er en normalvariasjon i befolkningen.

Det ble også utført mikrosatellittanalyse av familie 2, samt at 128 affiserte individer og 1 uaffisert kontroll fra familie 2 ble sekvensert for mutasjonen p.His46Arg i genet *SOD1*. Det ble avdekket at alle affiserte bar mutasjonen og at kontrollen var negativ. Mutasjoner i *SOD1* er tidligere assosiert med amyotrofisk lateral sklerose.

ABSTRACT

Charcot-Marie-Tooth disease is the most common hereditary peripheral neuropathy in Norway, occurring in 1 out of 1214 people. Two large families diagnosed with autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2, was investigated with the aim of identifying the genetic causes of the disease. Family 1, consisting of 49 individuals with a given blood sample, has an average age of onset in the fourth decade. The affected family members have symptoms such as muscle weakness and atrophy in the legs. Family 2, consisting of 159 individuals with a given blood sample, has an average age of onset in the fourth decade. Family 2 is more severely affected by paresis and atrophy in the lower limbs. Both families have previously been examined for duplications and deletions in the *PMP22*, *MPZ* and *MFN2*, and point mutations in all coding exons of the genes *GJB1 (Cx32)*, *PMP22*, *MPZ*, *LITAF*, *EGR2*, *NEFL* and *MFN2* without any findings. It has also been performed aCGH with 180 000 probes throughout the genome to locate any copy number variations.

A linkage analysis revealed that the highest LOD score was 1.96 at marker D1S498. This shows a possible link to the locus 1q21.3. The results of this and previous studies combined with the family's symptoms imply that there is a possible previously unknown genetic locus for this disease. The *LMNA* gene is located at this locus, and formerly associated with CMT2. All exons of the *LMNA* gene was sequenced and examined for the mutation in three affected individuals from family 1 without identifying the cause. It was therefore performed exome sequencing of the three affected members from family 1. In the area with high LOD-score it was found variants in the genes *TMOD4* and *HMCN1* in all three individuals. The variant in *TMOD4* and *HMCN1* was further investigated to see whether it co-segregated with the phenotype for respectively 49 and 16 members of the family. The sequencing results for *HMCN1*, ruled out this gene as a pathological cause. In *TMOD4* all affected persons had the variation p.Met332Val, but no healthy individuals had this variation. To exclude the possibility that the genetic variant in *TMOD4* was a polymorphism, 150 neurological healthy individuals were screened for the variation. The results showed that 2 out of 150 individuals had the variation in *TMOD4*, suggesting that this is a normal variation in the population.

It was also performed microsatellite analysis of family 2, and 128 affected individuals and 1 control from family 2 was sequenced for the mutation p.His46Arg in the gene *SOD1*. The results revealed that all affected carried the mutation and that the control was negative. Mutations in *SOD1* have previously been associated with amyotrophic lateral sclerosis.

1. INNLEDNING

Charcot-Marie-Tooth sykdom (CMT) er den vanligste arvelige perifere nevropatien i Norge, og forekommer hos 1 av 1214 personer (1). CMT er også kjent som arvelig motorisk og sensorisk nevropati (HMSN) (2). Sykdommen ble først beskrevet i 1886 av de tre legene Jean-Martin Charcot, hans student Pierre Marie og Howard Henry Tooth, og det er disse sykdommen er oppkalt etter (3;4;5). Fra både et genetisk og et klinisk synspunkt er CMT en meget heterogen tilstand (6). Nevropatien kan føre til motorisk og sensorisk tap i det perifere nervesystemet, muskelsvakhet, reduserte reflekser og derformiteter i føttene. Til dags dato er mer enn 33 CMT-gener identifisert, men i omtrent 50 % av CMT-rammede familier er det fortsatt ukjente mutasjoner som forårsaker nevropatien (1;7). Den vanligste variasjonen som forårsaker CMT er en duplikasjon av *peripheral myelin protein 22 (PMP22)*, og denne er årsaken til 20-50% av alle CMT tilfeller (1;8). De resterende CMT-tilfellene forårsakes for det meste av punktmutasjoner og noen kopitallvariasjoner (CNV) (1;9).

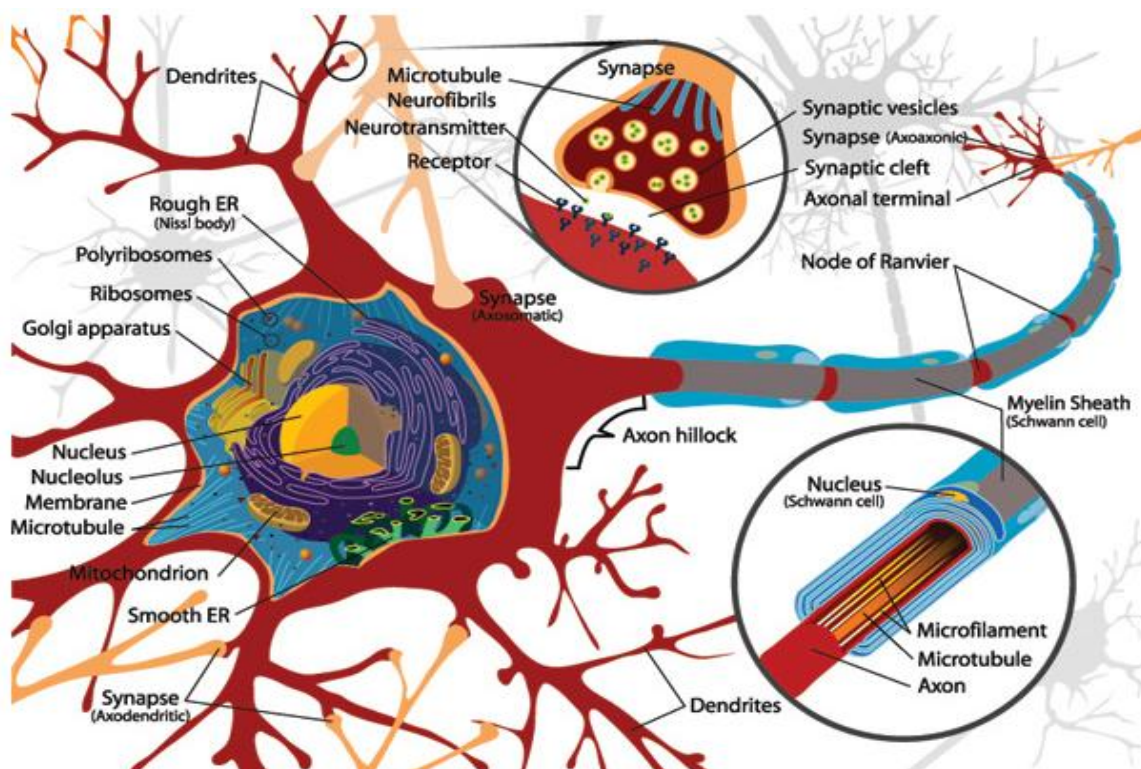
1.1 CHARCOT-MARIE-TOOTH SYKDOM OG NERVESYSTEMET

Nervesystemet består av to hoveddeler; sentralnervesystemet (CNS) og det perifere nervesystemet (PNS). Sentralnervesystemet består av hjernen og ryggmargen, mens det perifere nervesystemet består av flere nerver som går parvis ut fra de nederste delene av hjernen og ryggmargen. Nervecellene i det perifere nervesystemet består av sensoriske- og somatisk motoriske nerveceller. De sensoriske nervecellene videregirer nerveimpulser fra sanseceller som registrerer tilstanden i og utenfor kroppen til ryggmargen og hjernen, mens de motoriske nervecellene videregirer nerveimpulser fra hjernen og ryggmargen til celler i ulike målorganer (10).

Nerveceller er spesialiserte celler som har en tynn utløper fra cellekroppen, som kalles et akson (Figur 1). Ved hjelp av aksonet ledes nerveimpulser svært hurtig i hele sin lengde. Det er i enden av aksonet, i synapsen hvor kontaktpunktet mellom nervecellen og målcellen nerveimpulsene blir overført. Nerveimpulsene ledes med svært høy hastighet langs myeliniserte aksoner (opptil 100 m/s), og kan frigjøres ved spontane utladninger i cellemembranen, påvirkning av sanseceller, eller synaptisk stimulering fra andre nerveceller. Frigjøring av nerveimpulsene utløses i alle tilfellene ved at cellemembranen depolariseres til terskelnivå.

Fordi aksonet er myelinisert er lekkasjen av positiv ladning ut gjennom cellemembranen liten før det aktiverte målområdet. Dette gjør at nerveimpulsene har stor rekkevidde (10). Hvert akson er omgitt av gliaceller som fungerer som støtteceller. De danner en isolerende kappe rundt aksonet som kalles myelin. PNS består av et komplekst nettverk av slike myeliniserte og ikke-myeliniserte nervefibre av ulike tykkelser (11). Gliaceller pakker sin plasmamembran konsentrisk rundt aksonet i en spiral, og danner et myelinlag som er omtrent 1 mm langt (12). Dette gjør at nerveledningshastigheten i aksonene kan opprettholdes. Det er en kontinuerlig høyt regulert toveis dialog mellom gliaceller og nevroner, som har en essensiell rolle ved myelindannelse under utvikling, vedlikehold og remyelinisering etter nerveskader (13).

I det perifere nervesystemet kalles gliacellene for schwannceller. Schwannceller øker nerveledningshastigheten ved å myelinisere aksonene og regulere den synaptiske aktiviteten ved presynaptiske nerveender (14). Funksjonen til nervesystemet er kritisk, da også andre nevropatier som multippel sklerose (MS) oppstår på bakgrunn av deregulering av systemet (15). Genene som er assosiert med CMT er involvert i regulering av schwannceller og/eller aksonale funksjoner (16). I de fleste tilfeller forringer gendefekten primært de myeliniserende schwanncellene, og sekundært aksonal degenerering (17). Defekter i aksonal transport er trolig involvert i de fleste eller alle former for CMT. De perifere nevronene ser ut til å være spesielt sensitive for slike forstyrrelser siden korresponderende aksoner strekker seg over lange distanser (18). CMT kan forårsakes av CNVer eller punktmutasjoner i flere gener som er uttrykt i schwannceller og nevroner (19).



Figur 1: En nervecelle består av en cellekropp hvor cellekjernen befinner seg. Ut i fra cellekroppen er det flere utløpere; dendritter og et akson (nevritt). Dendritter er forgrenete utløpere som fører signaler og inntrykk inn til nervecellen, mens aksonet er lengere strukturer som leder signaler ut i fra cellen. Kontaktpunktet mellom aksonet og målcellen/organet kalles en synapse (20). Det forstørrede bildet viser en schwanncelle, og hvordan den myeliniserer aksonet til nervecellen. Bildet er hentet fra (21).

Basert på nevrofysiologi, deles CMT vanligvis inn i to hovedformer; Charcot-Marie-Tooth sykdom type 1 (CMT1), og Charcot-Marie-Tooth sykdom type 2 (CMT2). Klassifiseringen er avhengig om nerveledningshastigheten i nervus medianus er henholdsvis under 38 m/s, eller over denne hastigheten. Denne klassifiseringen fra 1980, er fortsatt hjørnesteinen i moderne diagnostisering (22).

CMT1 forårsaker demyelinisering av det isolerende myelinlaget på nerveledningene. Det vil si at myelinlaget i schwanncellene brytes ned og mister sin funksjon. Schwannceller beskytter og isolerer aksonene, og hvis dette isolerende laget brytes ned senkes nerveledningshastigheten i aksonene. Nevropatiske funn som innebærer demyelinisering av aksoner indikerer ofte en segmental nedbryting og “lyspære”-formasjon, på grunn av sykler med de- og remyelinisering (12,23). CMT2 forårsaker denervasjon/blokkering av aksoner, og er en ikke-demyeliniserende form for CMT (23).

CMT1 er vanligvis en sakte progressiv sykdom som ofte er assosiert med hulfot og manglende styrke til å løfte føttene ved gange. Mange pasienter får også merkbart større

albue- og aurikkelnerver. Alder for sykdomsdebut hos CMT1-affiserte individer kan variere fra 5 til 25 år. Omtrent 5 % av affiserte individer blir så hardt rammet av sykdommen at de blir rullestolavhengige, men levetiden for CMT1-pasienter blir ikke nedkortet av sykdommen. Den hyppigst forekommende genvariasjonen er duplikasjon i genet *PMP22*, som forårsaker 70-80 % av alle CMT1-tilfellene. De resterende CMT1-tilfellene forårsakes hovedsakelig av mutasjoner i *Early growth response protein 2 (EGR2)*, *Lipopolysakkarid-indusert TNF α (LITAF)* og *Myelin protein Zero (MPZ)* (24).

CMT2-pasienter har lite eller ingen redusert nerveledningshastighet. Mange pasienter har ingen redusert nerveledningshastighet før aksonal degenerering finner sted, da tapes store fibre som kan gi milde reduksjoner i nerveledningshastigheten (25). På grunn av lav reduksjon i nerveledningshastigheten diagnostiseres ofte pasienter med CMT2 ved en høyere alder enn ved CMT1. Mutasjoner som forårsaker CMT2 har vist seg å være vanskelige å identifisere. Dette skyldes at alle former for CMT2 er forholdsvis sjeldne, og at det er relativt mange kausale mutasjoner som enda ikke er kjent. Den vanligste genvariasjonen som forårsaker CMT2 er mutasjon i genet *Mitofusin 2 (MFN2)*. *MFN2* forårsaker aksonal nevropati som hovedsakelig oppstår i barndommen. Nervebiopsier fra aksonale CMT-typer viser ikke "lyspære"-formasjon eller mye segmental demyelinisering, men tap av myeliniserte fibre og atrofiske aksoner med neurofilamenter (26).

Det finnes også en X-koblet form av CMT (CMTX). CMTX er den nest vanligste CMT-fenotypen etter CMT1. Sykdommen forårsakes som oftest av mutasjoner i *Gap junction β -1 protein (GJB1)*, også kjent som *connexin 32 (Cx32)*. Genet er med på å opprettholde kommunikasjonen mellom schwanncellekjernen og aksonet, som er viktig for nervesystemets funksjon (27). Denne formen for CMT kan være både demyeliniserende og virke inn aksonalt (28). Ettersom denne varianten er X-kromosomkoblet blir ofte menn hardere rammet enn kvinner.

Andre sjeldnere former for CMT inkluderer intermediat CMT (DI-CMT) med en nerveledningshastighet på 25-45 m/s, som kan ha både demyeliniserende og aksonale trekk. En annen sjelden form er CMT4, som er demyeliniserende i likhet med CMT1, men med en recessiv arvegang. CMT4-pasienter har ofte muskelsvakhet og atrofi som er assosiert med sensorisk tap, og ofte utvikles hulfot (29). Elektromyografi (EMG) viser økt kronisk nevrogenetisk denervasjon ved motoriske nevroner i alle CMT-typene (30).

1.2 CHARCOT-MARIE-TOOTH SYKDOM TYPE 2

Omtrent 60 % av CMT2 tilfellene skyldes ukjente gener, slik at den nøyaktige prevalensen til CMT2 er uvisst. Autosomal dominant (AD) CMT2 kan være vanskelig å differensiere fra en idiopatisk aksonal nevropati, spesielt hos eldre pasienter som er mildt, langtidsrammet og uten familiehistorie eller familiemedlemmer som er tilgjengelig for eksaminasjon. Det er til nå identifisert 11 gener som forårsaker AD CMT2, og disse står for omtrent 40 % av sykdomstilfellene (Vedlegg 1, Tabell 10). CMT2 er en sykdom som utvikles progressivt med alderen, men mange affiserte individer kan ha lange perioder uten forringelse av sykdommen. I noen tilfeller kan pasienter være så mildt rammet at den ikke blir oppdaget av individet selv eller legen. Sykdommen forkorter ikke levetiden til individer med CMT2 (23). Pasienter som er affisert med "klassisk CMT" har ofte mer uttalte motoriske symptomer enn sensoriske symptomer. Den klassiske CMT-fenotypen karakteriseres av sykdomsdebut i løpet av de to første tiårene, distal svakhet, hulfot og fravær av ankelreflekser (31;32).

Mutasjoner i genet *MFN2*, som er lokalisert på kromosom 1, er forbundet med CMT2A og gir en klassisk CMT-fenotype. 20 % av alle AD CMT2-tilfellene skyldes mutasjoner i *MFN2*, hvilket er også den hyppigste årsaken til denne fenotypen (5;6). Mutasjoner i genene *MPZ* og *Neurafilament light chain polypeptide (NEFL)* kan også forårsake klassisk CMT-fenotype. *MPZ*-genet er involvert i dannelsen og vedlikehold av perifert myelin, mens *NEFL* er en av mest tallrike bestanddelene i cytoskjelettet i nevronene (33;34).

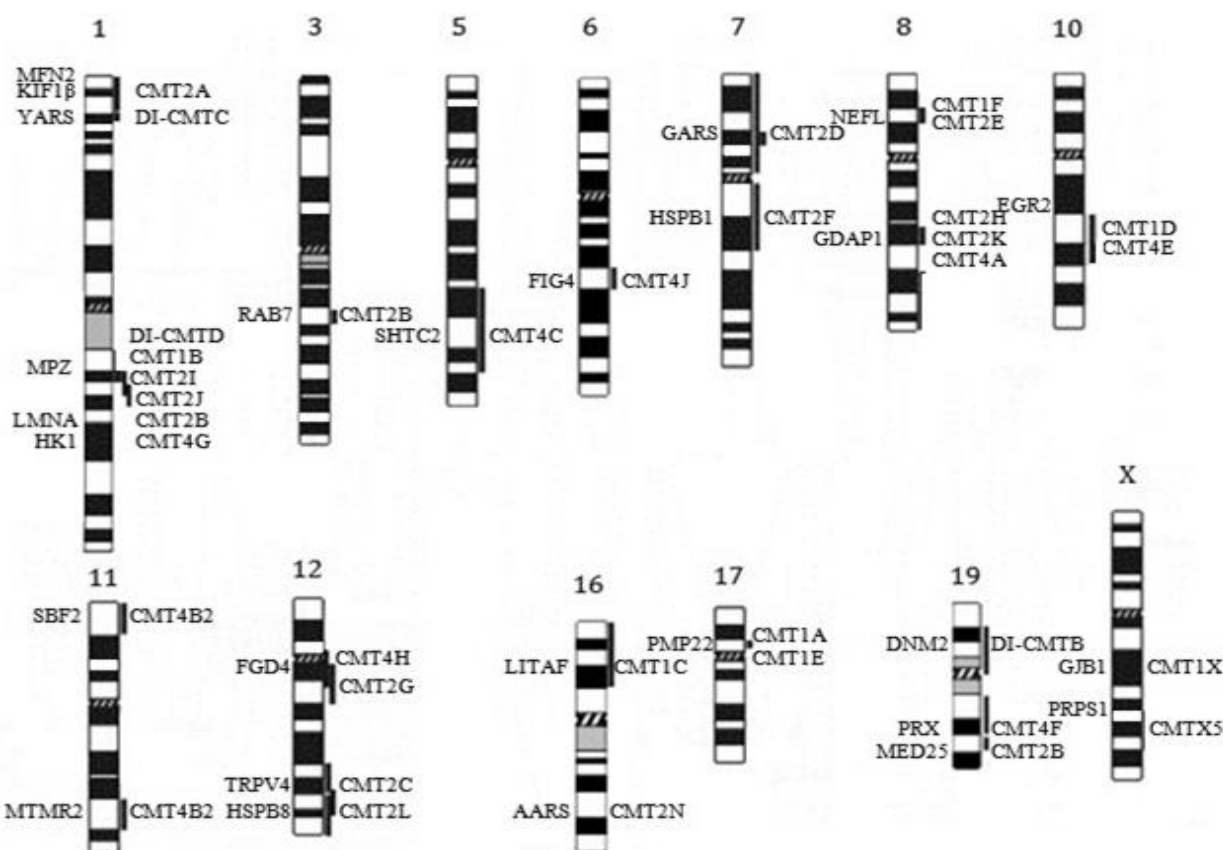
Autosomal recessiv (AR) CMT2 er en meget sjelden sykdomsform i forhold til AD CMT2. Den er rapportert i blant annet noen områder i Nord-Afrika og Midtøsten hvor ekteskap innenfor nær familie fortsatt er vanlig. Det er hittil identifisert tre gener som fører til lidelsen; *Lamin A/C (LMNA)*, *Mediator kompleks subenhet 25 (MED25)*, og *Gangliosid-indusert differensieringsassosiert protein 1 (GDAP1)* (35).

1.3 CHARCOT-MARIE-TOOTH SYKDOM OG ARVELIGHET

CMT er i de fleste tilfeller en autosomal nevropati som innehar en dominant arvegang, men sykdommen kan også som nevnt tidligere være X-koblet, eller ha et recessivt arvemønster. En autosomal arvegang vil si at for eksempel en patogen mutasjon befinner seg i et gen som er lokalisert på ett av de 22 autosomale kromosomene. En tilstand blir betraktet som X-koblet hvis det muterte genet som forårsaker sykdommen er lokalisert på X-kromosomet. Ved dominant arvegang vil det være nok å være bærer av ett allel med et mutert CMT-gen fra en av foreldrene (heterozygot) for å bli affisert av sykdommen. Barn av et affisert individ med en autosomal dominant sykdom har 50 % sannsynlighet for å være bærer av sykdomsgenet.

Ved en recessiv arvegang er det affiserte individet homozygot for mutasjonen som skaper sykdommen. Oftest er foreldrene til et individ med autosomal recessiv tilstand bærere av et mutert gen, men selv uaffisert. Barn av individer med en recessiv sykdom vil ha 25 % sannsynlighet for å være bærer av sykdomsgenet. Recessive sykdomstilstander er relativt sjeldne, men på tross av dette er det vanlig å være bærer av titalls ulike recessive sykdomsgen (36).

I de fleste tilfeller har én affisert person én affisert forelder, så fremt det ikke er en de-novo mutasjon eller en recessiv arvegang som er årsaken til sykdommen. En de-novo mutasjon er en mutasjon som kan opptre hos personer som ikke har noen kjent sykdomshistorie i familien (37). CMT1, de fleste tilfellene av CMT2, og ID-CMT nedarves ved et autosomalt dominant mønster. CMT4 og noen få andre former av CMT2 blir nedarvet ved et autosomalt recessivt mønster. CMTX blir nedarvet dominant med koblinger til kromosom X. CMT er med kun noen få unntak en monogen eller en Mendelsk sykdom, hvilket karakteriseres av at en mutasjon i ett gen er nok til å forårsake nevropati. For ulike CMT-typer og deres arvegang, se Figur 2.



Figur 2: Oversikt over lokalisering av CMT-gener og deres tilhørende CMT-fenotype, på ulike kromosomer i det humane genomet. Genene som forårsaker CMT er på høyre side av kromatiden og tilhørende fenotyper er skrevet på venstre side. Bildet er modifisert og hentet fra (38).

1.4 DIAGNOSTISKE UTFORDRINGER OG BEHANDLING AV CMT

Det er mange ulike utfordringer assosiert med CMT. Ikke minst de relativt få genene som er tilgjengelig for rutineanalyse i mange land, selv om antall identifiserte gener øker raskt. For mange pasienter gjør dette det vanskeligere å få en genetisk diagnose, men med nyere dypsekvenseringsteknologi blir dette enklere. Det er også noen leger som har en nihilistisk holdning til genetisk testing fordi det ikke finnes noen behandling mot noen av CMT-typene. Men det er viktig for pasienter å få riktig diagnose slik at de får en mer presis prognose, en mer spesifikk genetisk rådgivning og antenatal informasjon (11). Det er også utfordringer knyttet til forutsigbarhet om hvorvidt ukjente mutasjoner som gir aminosyre endring i eksonet er patologisk. For å undersøke om en mutasjon er patologisk, isoleres området med mutasjonen som skaper sykdom i en familie, og sammenligner dette området med et passende antall kontroller.

I tillegg konserveres den muterte basen blant et mangfold av ulike arter, og det benyttes forutsigbare dataprogrammer for å undersøke patogenitet. Så funksjonelle genspesifikke patologiske tester trengs i fremtiden. Å forutse patogenitet blir enda mer utfordrende med spleisesteder, introner og promotorforandringer og det er spådd at det blir enda vanskeligere med neste generasjons sekvensering (5). Nyere publiserte artikler har bidratt til innsikt over den molekylære patogenesen til CMT og for første gang kan dette bidra til potensielle terapeutiske mål. Selv om det ikke finnes noen effektive medisiner mot CMT, pågår flere kliniske forsøk og flere er under planlegging. Ved å utføre genetiske analyser i norske familier med CMT kan det identifiseres nye CMT-gener og i tillegg kartlegge i hvilken grad disse forskjellige genene forårsaker CMT i den norske befolkningen. Dette vil medføre en mer rasjonell helsetjeneste i forhold til genetiske analyser av norske familier med CMT, og det vil gi økt kunnskap om det perifere nervesystemet og hvordan mutasjoner i disse genene forårsaker sykdom.

1.5 KARTLEGGING AV SYKDOMSGENER

1.5.1 KOBLINGSANALYSER

Genetisk kartlegging av monogene sykdommer har tradisjonelt blitt utført ved bruk av koblingsanalyser. Koblingsanalysen er basert på prinsippene om arvelighet som først ble beskrevet av Gregor Mendel. Analysen brukes i dag for å bestemme lokalisering av spesifikke gen innen store familier på kromosomer (39).

Det benyttes genetiske markører i form av "*single nucleotide polymorphisms*" (SNPer) eller mikrosatellitter i koblingsanalyser, for å identifisere kromosomale områder som er isolert for en bestemt sykdom innenfor en familie. Mikrosatellitter er også kjent som "short tandem repeats" (STR), og er polymorfiske DNA-locus som inneholder repeterte sekvenser på opptil 13 nukleotider. Antall repeteringer for et gitt locus kan variere fra person til person, noe som resulterer i locus av ulike lengder. Mikrosatellitter er jevnt fordelt i arvematerialet, meget utstabile, og viser en høy grad av variasjon blant individer (40;41). Dette er noen av grunnene til at de er godt egnet til slektskaps- og koblingsanalyser. Markører plasseres i de ikke-kodende intronene hvor STR eller SNPer befinner seg, og vil kunne avsløre om rekombinasjoner har funnet sted innen en familie. I intronene er det DNA-variasjoner som ikke er assosiert med målbare fenotyper (42). Hvert individ har to mikrosatellittmarkører i hvert locus av sitt arvematerialet, fordi alle arver ett kromosomsett fra far og ett fra mor (43).

Det antas at affiserte familiemedlemmer vil ha lik polymorfisme eller like lange mikrosatellitter i et området hvor et eventuelt sykdomsfremkallende gen befinner seg (44). Undersøkes mikrosatellitter hos både affiserte og uaffiserte personer kan markørene benyttes for å undersøke hvilke kromosomale områder som ko-segregerer med sykdommen. Data for allelevariasjon, antall repeteringer, og hyppighet av alleler er tilgjengelig for tusenvis av markører på mange organismer. Muligheten til å velge fra så mange og store utvalg av høyt informative markører har gjort at mikrosatelittanalyser er mye benyttet i koblingsanalyser, assosieringsanalyser og til identifisering av organismer. Hvor lang avstand det er mellom to markører eller to gener regnes ut ved å bruke frekvensen på antall rekombinasjoner. Får å identifisere det kausale genet, Sangersekvenseres det aktuelle kromosomale området hvor sykdomsgenet kan befinne seg.

1.5.2 LOD-SCORE

LOD-score (logaritmen (base 10) av odds) ble utviklet av Newton E. Morton, og er en statistisk test som ofte benyttes for koblingsanalyser i menneske-, dyre- og plantepopulasjoner. LOD-score beregner sannsynligheten for at to locus har en sammenheng med hverandre, eller om sannsynligheten er større for at resultatet av en analyse bare er tilfeldig (Figur 3). En positiv LOD-score favoriserer tilstedeværelsen av en kobling, mens en negative LOD-score er en indikasjon på at en kobling er mindre sannsynlig. Beregning av LOD-score på data er en enkel måte å analysere komplekse familiære stamtavler og finne ut om det foreligger koblinger mellom Mendelske egenskaper, to markører, eller en sykdom og en markør (45).

$$\begin{aligned} LOD = Z &= \log_{10} \frac{\text{probability of birth sequence with a given linkage value}}{\text{probability of birth sequence with no linkage}} \\ &= \log_{10} \frac{(1 - \theta)^{NR} \times \theta^R}{0.5^{(NR+R)}} \end{aligned}$$

Figur 3: LOD-score beregning. NR = antall ikke-rekombinante avkom, R = antall rekombinante avkom. 0.5 er en konstant fordi det er 50% sjans for at ukoblede alleler rekombineres. θ = rekombinantfraksjonen som er lik $R/(NR+R)$ (45). Bildet er hentet fra (45).

1.5.3 SANGERSEKVENSERING

På 1970-tallet var det allerede etablert flere metoder for å sekvensere DNA, men det var metoden som ble dannet av Fredrick Sanger og hans kollegaer i 1975-1977, som viste seg å være den mest allsidige og praktiske tilnærmingen. I dag, nesten 40 år senere er det en fortsatt mye brukt sekvenseringsteknologi. Ulempen med denne metoden er at kapasiteten ikke er så stor, ettersom sekvenseringen kan bare utføres på et enkelt templat om gangen. Dette gjør at store sekvenseringsprosjekter tar lang tid og blir ganske dyre. Sekvenseringen av det humane genom som tok mange år, ble utført ved hjelp av denne metoden. Det måtte benyttes flere hundre maskiner til sekvenseringen og kostnadene endte på omtrent 300 millioner dollar. Metoden er også kjent som dideoksysekvensering fordi den involverer bruk av 2',3'-dideoksynukleosid trifosfater (ddNTPer) under syntese av DNA (46).

Sangersekvenseringsmetoden bestemmer baserekkefølgen i en gitt DNA-sekvens. Metoden benytter DNA-fragmentet som ønskes sekvensert som templat for å generere mange nye DNA-fragmenter. ddNTPer mangler 3'OH-gruppen, noe som gjør at syntesen vil terminere når ddNTP har blitt bundet på et voksende DNA-fragment, på grunn av at ddNTP kan ikke danne fosfodiesterbindinger med neste nukleotid. DNA-syntesen initieres fra en primer som er blitt merket med en fluorescerende farge på den ene enden. Under hver runde inkluderes et dideoksynukleosid trifosfat (ddATP, ddCTP, ddTTP, og ddGTP) i tillegg til normale dNTPer. I reaksjonen har man en overvekt av dNTPs, slik at det som oftest er dNTPs som inkorporeres i det voksende DNA-fragmentet, og kun unntaksvis ddNTPs (47). Slik får man produsert mange DNA-fragmenter med ulike lengder. DNA-fragmentene vil kanskje bare ha 1 bp forskjell i lengde. Hver av de fire ulike ddNTPene (ddATP, ddCTP, ddTTP, og ddGTP) er merket med ulike fluorescerende farger. Dermed vil hvert fragment avgi fluorescens som tilsvarende den siste nukleotiden som ble inkorporert. Deteksjon på et genskannerinstrument er basert på størrelse, hvor de korteste fragmentene migrerer raskest, på denne måten vil man kunne bestemme baserekkefølgen. Det vil dannes et elektroferogram på bakgrunn av deteksjon av fluorescensen fra de fire forskjellige ddNTPene som er inkorporert i DNA-fragmentene. På grunn av de ulike bølgelengdene fargene har kan fargene skilles fra hverandre i en kapillærinjeksjon (48). Sangersekvensering kan benyttes etter både koblingsanalyser for å undersøke om det foreligger mutasjoner i aktuelle gener, og for å verifisere funn gjort med dypsekvensering.

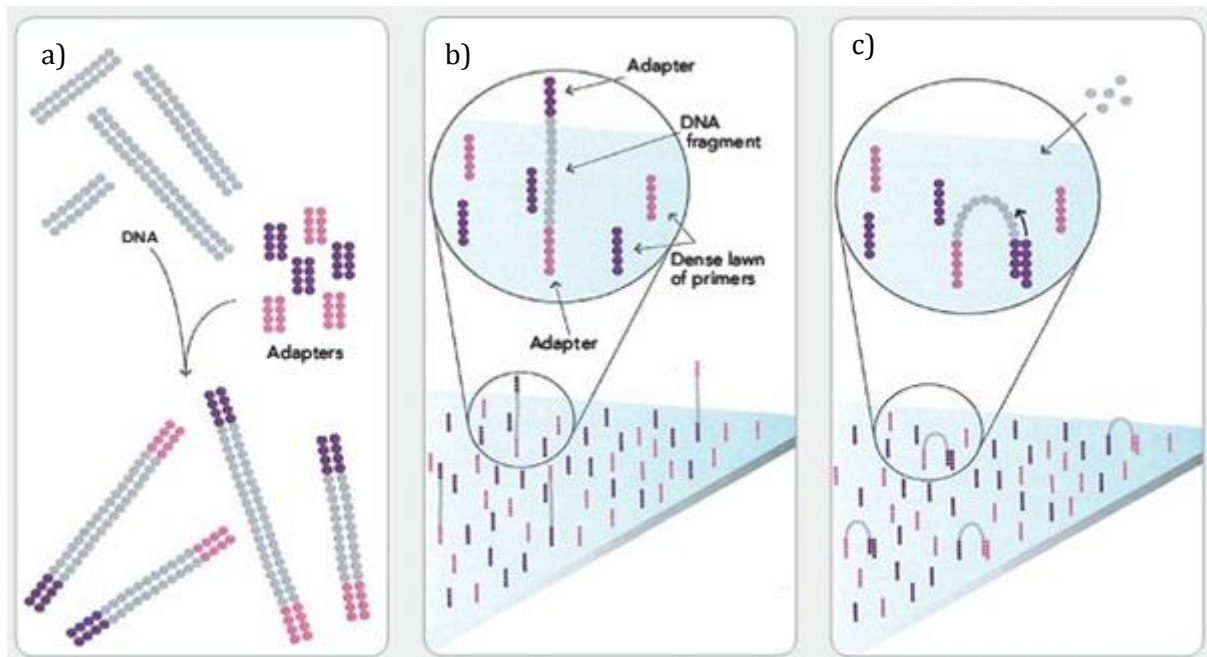
1.5.4 DYPSEKVENSERING

Det var først i 2005 at dypsekvenseringsteknologien kommersielt ble tilgjengelig.

Dypsekvensering er også kjent under det engelske navnet “next generation sequencing” (NGS). Dypsekvensering er trolig en av de viktigste teknologiske fremskrittene i biologisk vitenskap i løpet av de siste 30 årene. Denne teknologien har rask utviklet seg, og det er nå mulig å sekvensere flere ulike genomer samtidig på et instrument på under to uker (49).

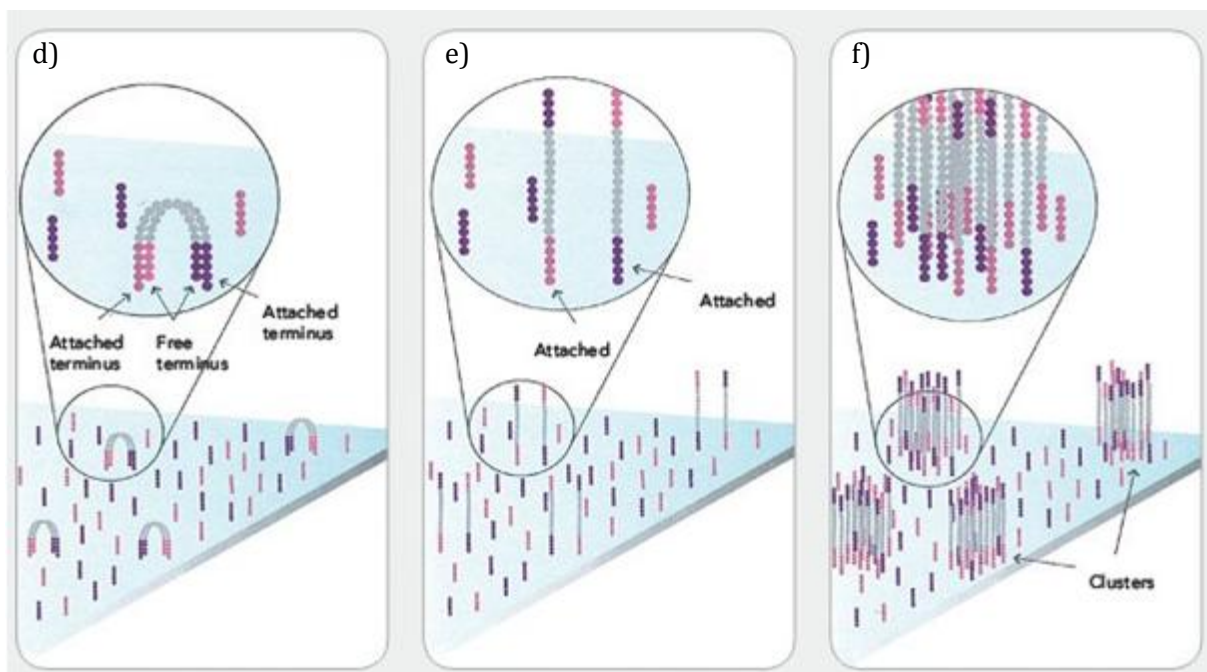
Det første steget i dypsekvensering er tillaging av et DNA-bibliotek fra ekstrahert genomisk DNA. Genomisk DNA-fragmenteres ved at isoterminale mekaniske energibølger fra en transformator fokuserer på et lite område hvor prøven befinner seg. DNA-biblioteket skal inneholde DNA-fragmenter som har fått påsatt indekser med gjenkjennbare sekvenser og adaptere som kan binde seg til flowcelleprimern for å kunne delta i klase-amplifikasjonen og –sekvenseringen. DNA-biblioteket må også gjennomgå endereparering av 3′- og 5′-ende overheng som følge av tilfeldig fragmentering av genomisk DNA, og påsetting av et enslig A-nukleotid til 3′-enden av fragmentene, slik at prosessen med å påsette adaptere effektiviseres. Disse to prosessene må skje før adapterne kan liggeres på. DNA-biblioteket må kvalitetskontrolleres og kvantiteres, før amplifisering og dypsekvenseringen kan påbegynnes.

Det er flere ulike tilnærminger for å utføre dypsekvensering, men i dette avsnittet vil fremgangsmetoden for Illumina bli nærmere forklart. Illumina benytter en “sekvensering ved syntese”-tilnærming. Det vil si at alle fire nukleotider blir tilsatt samtidig til flowcellekanaler sammen med DNA-polymerase, slik at det dannes klaser av DNA-sekvenser (50). For å få dannet DNA-sekvenser benyttes det templatere med påsatte adaptere på hver ende som bindes til primere festet til flowcellen. Analysen dekker 62.0 Mb av de proteinkodende eksonene i genomet. Flowcellens primere polymeriseres av Taq polymerase, og genererer en omvendt komplementær DNA-tråd i forhold til templatet. Den originale templatet fjernes så med NaOH. Den frie enden til den omvendt komplementære kopien av den originale templatet kan hybridisere til en annen flowcelleprimer og danner en bro (Figur 4).



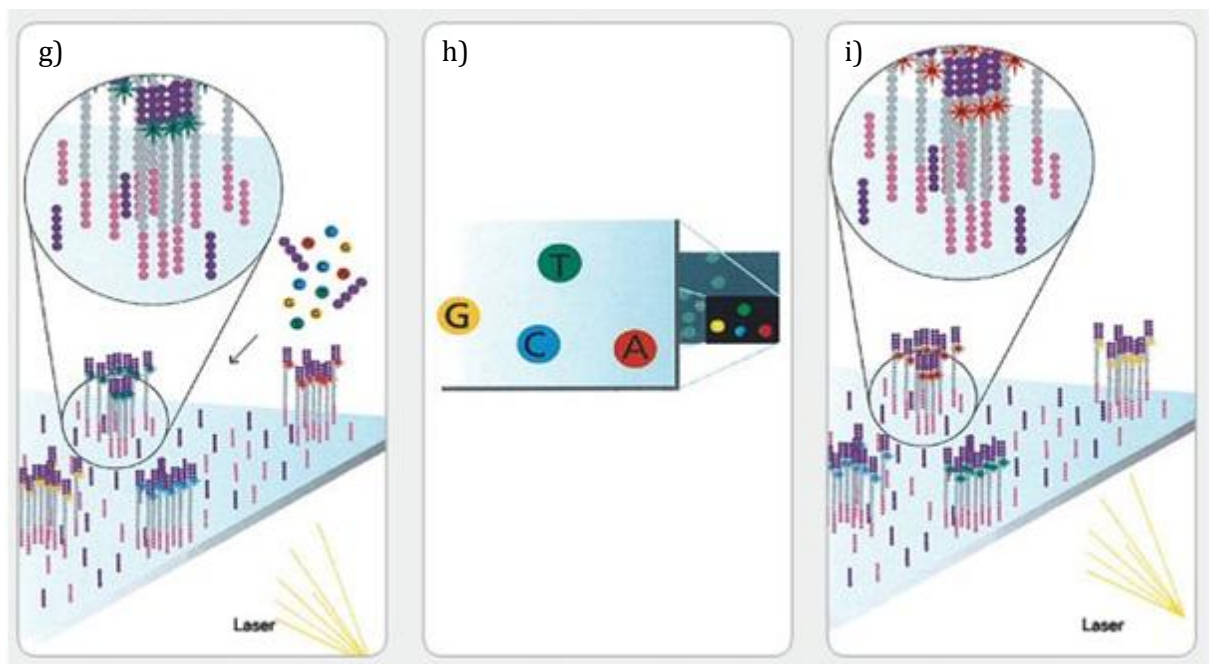
Figur 4: a) Fragmenter påsettes adaptore på enden av sekvensen. b) Fragmentene blir distribuert tilfeldig i flowcellen og bindes tilfeldig til flowcellens primere. c) Initiering av broamplifikasjon og fragmentets frie adapterende binder til en komplementær primer festet til flowcellen (51). Bildet er hentet fra (52).

Flowcelleprimeren blir så polymerisert i en reaksjon med konstant temperatur, som generer et dobbeltrådet produkt. Klaseene dannes spontant fordi nye produserte fragmenter fester seg nært til det originale fragmentet. Etter broamplifisering og klasegenereringen inneholder flowcellekanalene millioner av unike tette klaser som skal sekvenseres (Figur 5).



Figur 5: d) Neste steg i klasegenereringen er ferdiggjøring av broamplifisering. e) Fragmentene denatureres og syklusen blir repetert. f) Klaser av fragmenter blir dannet etter mange gjentakelser (51). Bildet er hentet fra (52).

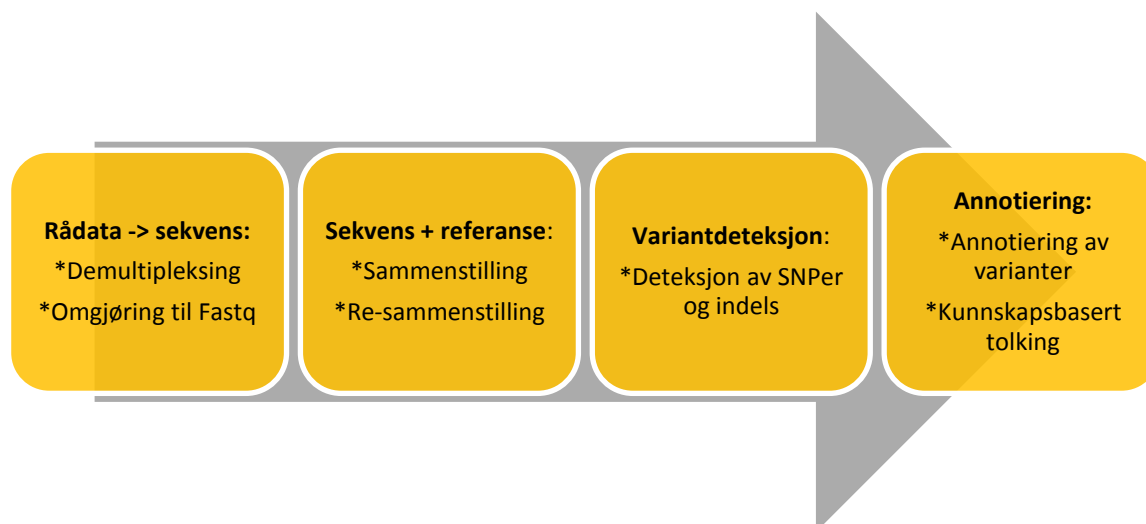
I den første sekvenseringszyklus initieres bestemmeslsen av basene ved at fire merkede reversible terminatorer, primere og DNA polymerase enzymer tilsettes til flowcellen. Et fluorescerende nukleotid binder seg til den komplementære DNA-templaten ved hjelp av polymeraseaktivitet og når dette belyses med en laser, fanges bildet av emittert fluorescens fra hver klasse i flowcellen. Figur 6 illustrerer den første basebestemmelsen. Hvert signal som er høyere enn bakgrunnen, identifiserer den fysiske lokaliseringen av en klasse, og den fluorescerende emisjonen identifiserer hvilken av de fire basene som ble inkorporert ved denne posisjonen. Denne sekvenseringssyklusen gjentas for å bestemme baserekkefølgen, en base av gangen. Dette genererer en serie av bilder som representerer en basebestemmelse ved en spesifikk base av gangen. Analysering av resultatene skjer ved sammenstilling av dataene og sammenligning med referansesekvenser for å identifisere sekvensulikheter.



Figur 6: g) Sekvensering ved syntese av klasene. Når et nukleotid binder seg stopper replikeringen. h) En laser eksiterer den fluorescerende fargen, og et kamera fanger fargen som emitteres. i) Reversible terminatorer fjernes og syklusen blir repetert (51). På grunnlag av dette kan baserekkefølgen bestemmes. Bildet er hentet fra (52).

1.5.5 BEHANDLING AV RÅDATA FRA DYPSEKVENSERING

Det kreves en del bearbeiding av rådataene fra dypsekvenseringen før de sekvenserte sekvensene kan tolkes. Prosessering av rådataene utføres som oftest ved automatisert pipeline, som består av en rekke ulike trinn (Figur 7). Det er flere ulike programmer innenfor pipeline som kan benyttes for samme formål, men i dette avsnittet vil kun utvalgte metoder gjennomgås.



Figur 7: Pipelineanalyse av rådata fra dypsekvensering.

Det første trinnet i pipeline er demultipleksing av rådata. I dette steget konverteres rådataen fra bcl-filer til fastq.gz-filer. Dataen blir demultiplexert, hvilket betyr at dataen separeres basert på indeksen som er påsatt hver prøve under laging av DNA-biblioteket. For dette kan programmet CASAVA (Consensus Assessment of Sequence and Variation) fra Illumina brukes. Fastq.gz-filene blir skrevet i ASCII (American Standard code for Information Interchange) format. I det neste trinnet sammenstilles sekvenserte sekvenser mot referansesekvenser, for dette kan Burrows-Wheeler Aligner (BWA) benyttes. BWA sammenstiller fast.qz-filene mot referansegenomet og lagrer disse som sam- og bam-filer. Sam-filer kan leses av mennesker mens bam-filer er binære og kan leses av datamaskiner, hvilket tar mindre lagringsplass (53). Videre kan Genome Analysis Toolkit (GATK) benyttes til å resammenstille sekvensene for å optimalisere sammenstillingen og minimere falske positive SNPer. GATK fjerner også PCR-duplikater som kan innvirke på antall heterozygote/homozygote sekvenser for en gitt SNP, og resammenstiller sekvensene rundt kjente og ukjente insersjoner og delesjoner (54).

Videre dannes en variantdeteksjonsfil, for å detektere ulike SNVer (single nukleotidvariasjoner), delesjoner og insersjoner. Denne variantdeteksjonsfilen kan filtreres mot ulike SNP-databaser for å fjerne normalvarianter. Når variantdeteksjonsfilen er filtrert som ønsket, vil filen bli annotert med ANNOVAR (55). Dette bioinformatiske verktøyet genererer csv-filer som kan vises i tekstbehandlingsprogram. Slike filer gir mye informasjon om hver enkelt SNV som funksjon, gennavn, type SNV, aminosyreforandring og nivå av konservering.

Etter en pipelineanalyse kan identity-by-descent (IBD) benyttes for å identifisere kromosomaleområder hos individer som er nedarvet fra en felles ane (56). For å detektere slike områder benyttes ofte identifiserte SNPer fra dypsekvensering. Med en slik tilnærming kan det også kartlegges sykdomsassosierte gener.

1.6 HENSIKTEN MED OPPGAVEN

Denne masteroppgaven er et underprosjekt av et større doktorgradsstudie om CMT, med tittelen "Molecular Genetic Epidemiology of Charcot-Marie-Tooth disease" av Helle Høyer. Studiet inneholder materiale samlet fra 400 norske familier med CMT, og har som formål å kartlegge de genetiske årsakene til CMT i disse familiene.

Masteroppgavens formål er å identifisere mutasjonene som fører til CMT i to store familier ved bruk av koblingsanalyser, sangersekvensering og dypsekvensering. Disse to familiene er store nok til at det kan utføres koblingsanalyser på materialene. De affiserte individene fra familie 1 og 2 har fått diagnosen CMT2 ut i fra nevrologiske undersøkelser, men det er ikke identifisert noen genetisk mutasjon som forårsaker CMT2 i disse familiene. Begge familiene har blitt undersøkt for mutasjoner i de vanligste CMT-assosierte genene uten funn. Det antas av den grunn at sykdommen i disse familiene er forårsaket av mutasjoner i mindre vanlige CMT-gen eller gen som foreløpig ikke er assosiert med CMT.

Det benyttes koblingsanalyser for å finne mulige kromosomale områder som inneholder gener som kan føre til CMT2. Videre brukes Sangersekvensering for å identifisere mulige kausale mutasjoner i disse områdene. Om Sangersekvenseringen ikke fører til identifikasjon av de kausale mutasjonene i disse familiene, vil eksomsekvensering med dypsekvenseringsteknologi bli tatt i bruk for å finne eventuelle gener som ikke tidligere er assosiert med CMT. Deretter vil Sangersekvering kunne verifisere eventuelle funn gjort med dypsekvenseringsteknologi.

2. MATERIAL OG METODE

2.1 BAKGRUNN

I 1992 startet Dr. Geir Julius Braathen blodprøvetaking av pasienter med CMT. Dette ble begynnelsen på et større CMT-prosjekt i Norge. De affiserte pasientene og deres slekninger har gjennomgått semistrukturelle kliniske intervjuer, genetiske og nevrologiske eksaminasjoner. Diagnosene er basert på nevrogenetiske funn på elektromyografi og nevrologiske eksaminasjoner. I dag består prosjektet av mer enn 1200 individer fra over 400 familier fra hele Norge, og prøvetakningen er fortsatt pågående.

Masteroppgaven tar utgangspunkt i to ulike norske familier som er diagnostisert klinisk med AD CMT2, men den genetiske årsaken er fortsatt ikke identifisert. De har tidligere blitt utredet for duplikasjoner og delesjoner i *PMP22*, *MPZ* og *MFN2*, og for punktmutasjoner i alle eksoner i genene *GJB1* (*Cx32*), *PMP22*, *MPZ*, *LITAF*, *EGR2*, *NEFL* og *MFN2* uten funn. I tillegg har det blitt utført aCGH-analyse med 180 000 oligonukleotidprober spredt gjennom hele genomet for å undersøke om CNVer kunne være årsaken til deres nevropati. Familiene er store nok til å demonstrere en signifikant kobling ($Z > 3.0$ ved $\theta = 0.05$).

Disse familiene har andre symptomer enn andre kjente CMT-fenotyper, som indikerer at det kan være et hittil ukjent gen som forårsaker CMT i disse familiene. Familie 1 har forholdsvis milde symptomer med muskelsvakheter i føtter og legger, og med en gjennomsnittlig sykdomsdebut i fjerde tiår. Familie 2 er hardere rammet med mer alvorlige pareser i både armer og ben, samt redusert smertefølelse. Deres gjennomsnittlige sykdomsdebut er også i fjerde tiår.

Koblingsanalyse ble utført før dypsekvensering, fordi dypsekvensering ikke var tilgjengelig i 2010 ved STHF. Det var heller da ikke fattet at teknologien skulle anskaffes. Det ble derfor utført koblingsanalyse av 8 affiserte og 8 friske individer fra familie 1, og 8 affiserte individer fra familie 2. Det ble videre sekvensert relevante områder for å eventuelt identifisere CMT-gener og mutasjoner. Etter koblingsanalyse ble det utført eksomsekvensering av 3 affiserte individer fra familie 1 ved bruk av dypsekvenseringsteknologi.

2.2 DNA-EKSTRAKSJON

Majoriteten av prøvene har blitt ekstrahert fra hvite blodceller ved bruk av FlexiGene DNA Kit (Qiagen), og for noen få prøver har EZ1 Blood Kit blitt benyttet på BioRobot EZ1 (Qiagen). Alle blodprøvene og ekstrahert DNA er blitt oppbevart i biofrysere ved -80°C , ved STHF. Dette ble utført før denne masteroppgaven ble påbegynt.

2.3 KONSENTRASJONSMÅLING AV DNA

DNA-konsentrasjonsmålingen av prøvene ble utført på BioPhotometer Plus, fra Eppendorf. Hver prøve ble målt to ganger, og fortynnet med dH_2O til $50\text{ ng}/\mu\text{l}$.

2.4 KOBLINGSANALYSE

Det ble utført koblingsanalyser av 8 affiserte og 8 friske individer fra familie 1, og 8 affiserte individer fra familie 2. Koblingsanalysene ble utført med formål om å identifisere eventuelle koblinger mellom familienes CMT2-sykdom og kromosomale områder. For innsikt i fremgangsmåte, se Vedlegg 2.

2.4.1 GENETISKE MARKØRER

I koblingsanalysen ble det benyttet markører fra settet ABI PRISM Linkage Mapping Set v2.5 MD10 fra Applied Biosystems, som har et gjennomsnittlig markørintervall på 10 centiMorgan (cM) gjennom genomet. Markørsettet består av 400 fluorescerende merkede PCR-primerpar (markører), som er optimalisert for å amplifisere høyst informative mikrosatellitt-loci selektert fra Généthon human linkage map (57). Markørene er organisert inn i paneler bestående av fra 3 til 20 fluorescerende merkede primerpar. Hver av markørene er merket med en av fluorescensfargene 6-FAM, VIC og NED slik at produktene kan detekteres ved kapillærelektroforese. For å dekke hele genomet med markører trenger man minst 300 av dem, slik at markøren ikke er lengere enn 10Mbp unna en fenotype som kan forårsake sykdom (58).

2.4.2 MIKROSATELLITTANALYSE

Polymerasekjedereaksjon (PCR) benyttes for å amplifisere sekvenser med mikrosatellitter hvor de fluorescerende markørene plasseres (59). PCR ble utført ved hjelp av Gene AMP® PCR System 9700, Veriti® Thermo Cyclers, 2720 Thermal Cyclers og 2700 Thermal Cyclers alle fra Applied Biosystems.

Etter PCR-reaksjonene ble produktene til hvert panel blandet sammen for hver prøve slik at de kunne kjøres sammen under kapillærelektroforesen. Det ble også benyttet en størrelsesstandard merket med Genescan™-500 LIZ™ (oransje). For fremgangsmåte, se Vedlegg 2; Tabell 11, Tabell 12 og Tabell 13.

2.4.3 DATABEHANDLING AV FRAGMENTANALYSE

Databehandling av resultatene fra fragmentanalysen ble utført med GeneMarker versjon 1.85 fra SoftGenetics. Programvaren bruker en størrelsesstandard for å danne en kurve for hver kapillær, og deretter bestemme lengden på hvert fargemerket fragment ved å sammenligne det med standardkurven for den spesifikke kapillæren. Resultatet blir at mikrosatellitter fra ulike personer kan sammenlignes. Dette ble utført i en koblingsanalysedatabase opprettet i Microsoft Office Access 2003. Databasen ble opprettet av Marit Svendsen, avdelingsingeniør, ved Enhet for medisinsk genetik, STHF.

2.4.4 LOD-SCORE

Det ble beregnet LOD-score basert på markørdataene fra familie 1. LOD-score ble beregnet ved hjelp av bioinformatikkprogrammet MERLIN (multipoint engine for rapid likelihood inference). Programmet kan takle flere markører enn andre typer stamtavleanalyser (60). MERLIN krever tre ulike informasjonsfiler; en stamtavlefil (.ped), en datafil (.dat) og en kartfil (.map). Disse tre filene inneholder henholdsvis den aktuelle fenotypen og genotype data, merkelappene på dataen inkludert stamtavlefilen, og markørenes posisjon (61).

Etter sedvane blir en LOD-score høyere enn $Z > 3$ ansett som et bevis på kobling. En LOD-score på $Z > 3$ indikerer 1000 til 1 sjanse for at koblingen som er blitt observert ikke har oppstått på grunn av en tilfeldighet. På den andre siden er en LOD-score på -2 et antatt bevis for å ekskludere kobling. Det kan være vanskelig å oppnå en LOD-score på $Z > 3$ fra ett stamtre, slik at de matematiske egenskapene til testen tillater data fra flere stamtrær og kombinerer disse ved å summere LOD-scorene (45).

2.5 DYPSEKVENSERING

3 affiserte individer med diagnosen CMT2 fra familie 1 ble eksomsekvansert med dypsekvenseringsteknologi på instrumentet HiScanSQ fra Illumina GA. Ved å eksomsekvansere undersøkes alle eksonene i genomet, hvor de fleste sykdomsrelaterte forandringene forekommer. Disse områdene utgjør omkring 50 megabaser når 5'- og 3'-UTR områdene regnes med.

2.5.1 TILLAGING AV DNA-BIBLIOTEK

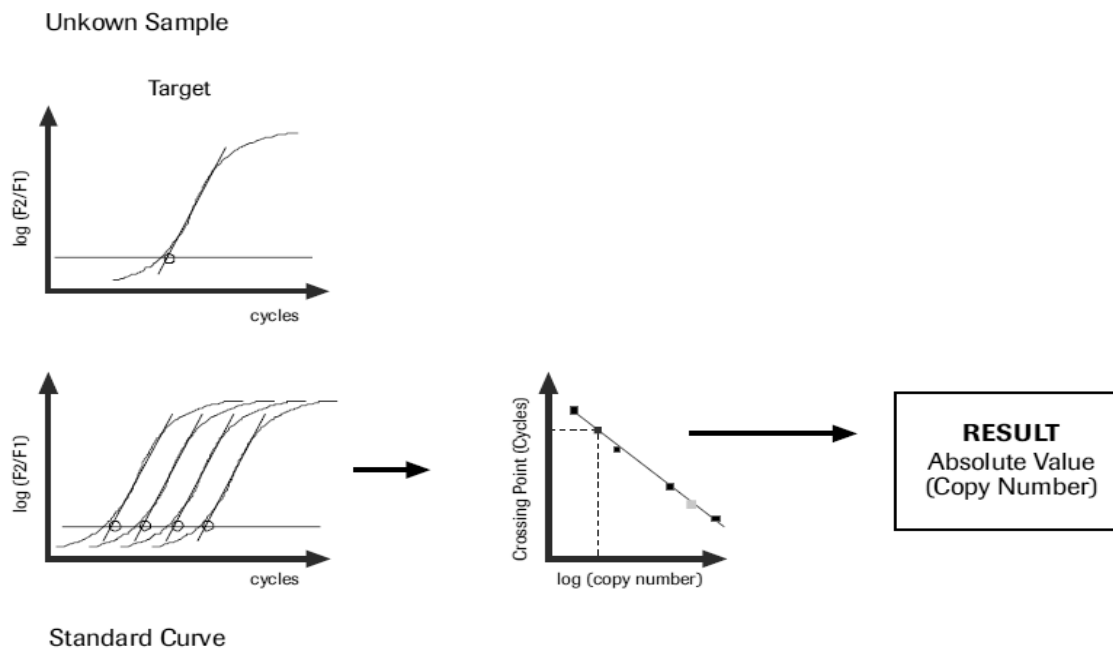
DNA-biblioteket ble dannet ved at ferdig ekstrahert genomisk DNA først ble konsentrasjonsmålt og fragmentert. Fragmenteringen av genomisk DNA, 50ng/μl ble utført med Covaris S220 (The Covaris Adaptive Focused Acoustics) som kutter DNA ved hjelp av lydbølger (62). Maskinen ble stilt inn til å fragmentere DNA i 180 s, slik at den genererte fragmenter på 200-300 bp. DNA-bibliotek for dypsekvensering ble generert ved bruk av TruSeq DNA Sample Prep Kit og protokollen TruSeq DNA Sample Prep user Guide Part # 15005180 Rev. C, June 2011 (Vedlegg 3, Tabell 14, Tabell 15).

Det ble deretter utført reparering av 3'- og 5'-ende overheng, vasking og påsetting av single adenosin-nukleotider til 3'-enden av fragmentene, slik at prosessen med å påsette adaptere effektiviseres. Etter påsetting av adaptere med unike indekser og kvantitering med qPCR og Bioanalyser, ble TruSeq Exome Enrichment Kit benyttet for å amplifisere mål-DNA. Protokollen TruSeq Exome Enrichment Guide Part # 15013230, Rev C, Dec 2010 ble fulgt (Vedlegg 3; Tabell 16, Tabell 17, Tabell 18, Tabell 19).

2.5.2 VALIDERING AV DNA-BIBLIOTEK

Det ble utført validering av produktene fra amplifiseringen med TruSeq Exome Enrichment kit med både kvalitetskontroll og kvantifisering. Kvalitetskontrollen ble utført på Agilent Bioanalyser 2100 med en High Sensitivity DNA Chip. Enriched DNA-fragmentene ble fortynnet 25 ganger med dH₂O, og 1 µL fra hver fortynnede prøve ble tilsatt. Kvantitering av Enriched DNA-fragmenter ble utført med kvantitativ-PCR-metode (QPCR) på Light Cycler 480 II fra Roche ved bruk av QPCR NGS Library Quantification Kit (Illumina GA), nummer G4880A fra Agilent Technologies.

Dette ble gjort siden dette er anbefalt av Illumina, og fordi det er den mest nøyaktige kvantiteringsmetoden. Til kvantifiseringen ble det benyttet en serie av fortynninger av eksterne standarder med kjent konsentrasjon, som brukes for å danne en standardkurve. Standardenes krysspunkter brukes deretter for å bestemme konsentrasjonen til DNA. Standardenes krysspunkter kalles også for Cp (Crossing point) som er et mål på hvor mange sykluser av PCR-reaksjonen som må til før fluorescensen i en prøve er signifikant høyere en bakgrunnen (Figur 8). Prøvene som fra før var fortynnet 25 ganger ble ytterligere fortynnet 4000 ganger og 40 000 ganger i fortynningsbuffer, slik at den totale fortynningen ble 100 000 og 1 000 000 ganger (Vedlegg 3; Tabell 20).



Figur 8: Konsentrasjon av prøvene beregnes etter QPCR-analyse ved hjelp av "Fit Points"-metoden. Metoden går ut i fra standardene med kjente konsentrasjoner for å beregne konsentrasjonen til prøvene (63).

2.5.3 KLASSEGENERERING

Klasegenerering ble utført på cBot fra Illumina etter cBot User Guide, part# 15006165, Rev G, Oct 2011, med TruSeq Cluster Kit v. 3.0. Mengde DNA-bibliotek til klasegenerering ble beregnet ut på bakgrunn av QPCR-resultatene. En fortynningsrekke på 16, 20 og 24pM ble tilsatt flowcellen, spiket med 1 mol % PhiX for kontroll. DNA-konsentrasjonen er kritisk for å få dannet en passe mengde med klaser. For få klaser vil føre til dårlig dekning av de sekvenserte fragmentene under dataanalysen. For høy konsentrasjon av klaser vil kunne komplisere dataanalysen (64).

2.5.4 SEKVENSERING MED HiSCAN SQ SYSTEMS

Sekvensering av de genererte klasene ble utført på HiScanSQ fra Illumina, med TruSeq SBS Kit og fulgt etter protokoll HiScanSQ Systems User Guide Part # 15015392, Rev G, Oct 2011. Det ble foretatt 150 sekvenseringssykluser, slik at det ble sekvensert 75 baser fra hver side av fragmentet, og sekvensert 6 baser til indeksen.

2.5.5 DATAANALYSE AV RÅDATA FRA DYPSEKVENSERING

Resultatene fra dypsekvenseringen ble prosessert i hovedsak ved bruk av automatisert pipeline. Dette innebærer at kvalitets filtrerte sekvenserte fragmenter ble sammenstilt mot referansesekvenser i det humane genom ved bruk av BWA. GATK ble videre benyttet for å fjerne PCR-duplikater, og for å resammenstillinge lokale sekvenser rundt delesjoner og insersjoner. Kravet for dekning av heterozygote SNPer var 30 sekvenser. Tolkning og validering av resultatene ble utført ved bruk av programmet Alamut. Variantene ble filtrert mot SNPer i databasen dbSNP Human Build 129. Det ble også utført identity by descent-analyse (IBD) av alle variantene som de 3 affiserte individene fra familie 1 er bærere av.

2.6 SANGERSEKVENSERING

2.6.1 PRIMERE

Det ble bestilt primere til sangersekvensering for de aktuelle genene *LMNA*, *SOD1*, *TMOD4* og *HMCN1* fra Invitrogen. Primerne som passet området for genet best, ble funnet ved hjelp av Primer Express versjon 2.0 (Applied Biosystems). Tabell 21 i Vedlegg 4, viser en oversikt over primerne som ble benyttet til de ulike genene.

2.6.2 SANGERSEKVENSERING

Det ble først utført PCR på Veriti® Thermo Cycler fra Applied Biosystems i en 11,3 µl reaksjon, for å amplifisere DNA-området som skal sekvenseres. PCR-produktene ble videre rensert for å fjerne ubrukte primere og nukleotider samt salter. Rens av PCR-produktene ble gjort ved bruk av MiniElute 96UF PCR purification plates fra Qiagen.

Deretter ble sykelsekvensering utført på Veriti® Thermo Cycler fra Applied Biosystems i 10,10 µl reaksjoner med BigDye v 3.1. Cycle Sequencing kit fra Applied Biosystems. Rens av sekvenseringsproduktene ble utført for å fjerne uinnkorporerte dNTP'er, ddNTP'er, primere og salter slik at disse ikke ble injisert sammen med sekvenseringsproduktene under elektroforesen. BigDye X Terminator Purification Kit fra Applied Biosystems ble brukt for å rense sekvenseringsproduktene. Sekvenseringsproduktene ble analysert med elektroforese på genskannerinstrumentet 3130XL Genetic Analyzer fra Applied Biosystems (Vedlegg 5; Tabell 22, Tabell 23, Tabell 24, og Tabell 25).

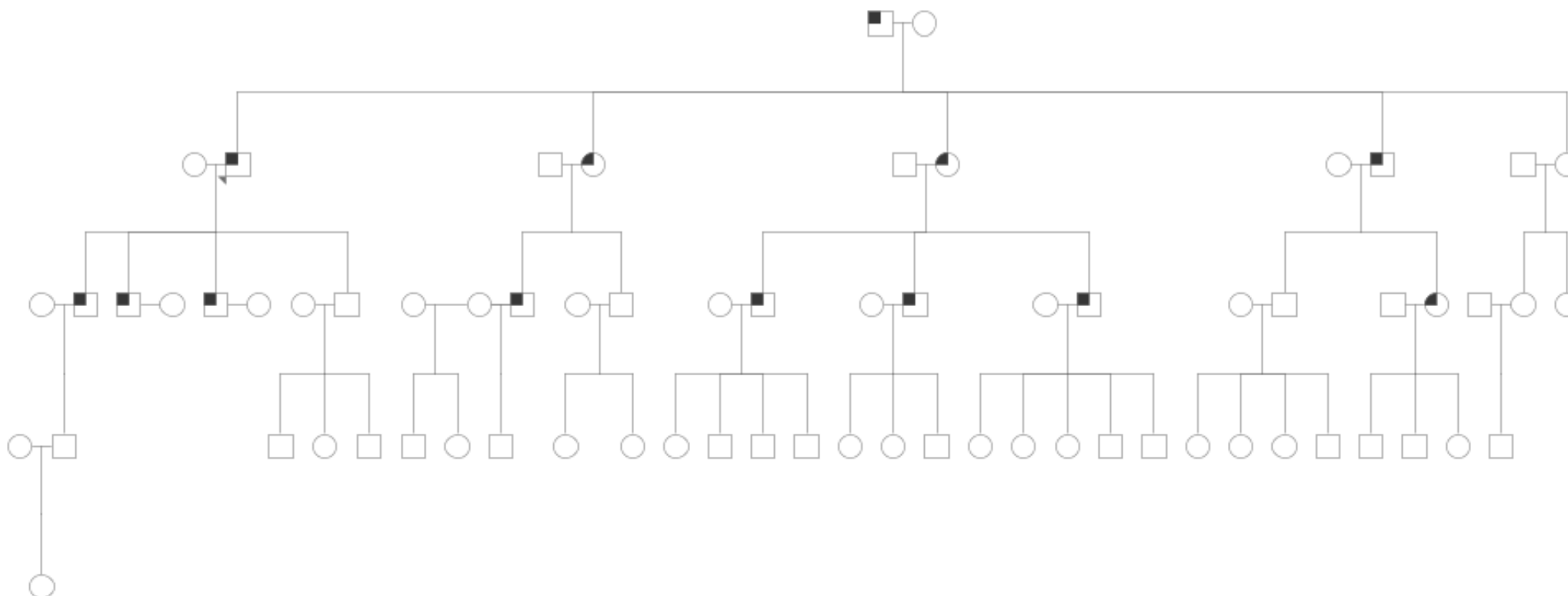
2.6.3 DATAANALYSE AV SEKVENSERINGSRESULTATER

Dataene fra Sangersekvenseringen ble analysert i analyseprogrammet SeqScape versjon 2.5 fra Applied Biosystems. Analyseprogrammet sammenstiller sekvenserte DNA-sekvenser med kjente referansesekvenser lastet ned fra NCBI i GenBank-format, for å undersøke eventuelle variasjoner i sekvensene.

3. RESULTATER

3.1 KARAKTERISTIKK AV STUDIEPOPULASJONEN

Studiepopulasjonen består av 49 individer fra familie 1, og 159 individer fra familie 2, både affiserte og uaffiserte med avgitt blodprøve. De affiserte individene er diagnostisert med CMT2. Den gjennomsnittlige alderen hos familie 1 for sykdomsdebut er i fjerde tiår, hvilket er relativt høyt. Muskelatrofi i føtter og legger er noen av de kliniske karakteristikkene av familie 1, hvilket samsvarer med en klassisk fenotype. Majoriteten av de affiserte pasientene i familien har også reduserte reflekser i knærne og i akillesene. Det er også tilfeller av deformiteter som hulfot og hammertær blant medlemmene i familie 1 (Tabell 1). For slektstre med oversikt over affiserte og uaffiserte individer fra familie 1, se Figur 9. I familie 2 er den gjennomsnittlige sykdomsdebuten også i fjerde tiår, samt at majoriteten av de affiserte individene lider av alvorlig parese i både ankler, knær og i noen tilfeller også armer. Reduserte reflekser i ankler og knær er også tilstede hos pasienter fra familien (Tabell 2). Familie 2 er en stor familie fordelt på 6 slektsgrener. Totalt består familien av 1200 individer som har blitt koblet sammen ved hjelp av en felles ane fra 1600-tallet. Siden familien er så stor blir den for omfattende til at den kan illustreres ved hjelp av et slektstre her. Kontrollgruppen består av 150 nevrologisk ikke-familiære friske individer.



Figur 9: Slektstre med familie 1 diagnostisert med CMT2 med et tydelig autosomal dominant arvemønster. Slektstreet består av 69 individer i 5 generasjoner, hvor 49 av individene har avlagt blodprøve og er en del av studiepopulasjonen. □ = mann, ○ = kvinne, sort = individ diagnostisert med CMT2. De andre individene er enten friske, ikke undersøkt, eller affiserte men fortsatt symptomfrie.

Tabell 1: Kliniske karakteristikk av 8 affiserte medlemmer fra familie 1. Dette er de samme 8 affiserte individene som er undersøkt med koblingsanalyse.

| Id. nr. | 46 | 135 | 140 | 144 | 147 | 154 | 160 | 166 |
|------------------------------------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Kjønn | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♂ | ♂ | ♀ |
| Symptomdebut, alder | 37 | 53 | 44 | 81 | 49 | 20 | 54 | 53 |
| Sykdomsvarighet, år | 22 | 30 | 12 | 2 | 4 | 36 | 2 | 1 |
| <i>Kliniske karakteristika</i> | | | | | | | | |
| <u>Muskel atrofi¹</u> | | | | | | | | |
| Underarm | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hånd | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Lår | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Legg | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| Fot | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 |
| <u>Muskelsvakhet^{NIS}</u> | | | | | | | | |
| Albuefleksjon | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Albueekstensjon | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Håndleddsflexjon | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Håndleddsekstensjon | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Fingerfleksjon | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Fingerspredning | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tommelabduksjon | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hoftefleksjon | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hofteekstensjon | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Knefleksjon | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Kneekstensjon | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ankel dorsifleksjon | 3,5 | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| Ankel plantarfleksjon | 3,25 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tå-ekstensorer | 3,5 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Tå-fleksorer | 3,5 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| <u>Sensibilitetstap</u> | | | | | | | | |
| <u>Berøring¹</u> | | | | | | | | |
| Føtter, legger | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Arm, hand | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <u>Reflekser¹</u> | | | | | | | | |
| Biceps | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Triceps | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Brachioradialis | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Patellar | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 0 |
| Achilles | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 0 |
| <u>Deformiteter¹</u> | | | | | | | | |
| Hulfot | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hammertær | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Pes planus | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <u>Ataksi¹</u> | | | | | | | | |
| Armer | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ben | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <u>Tremor</u> | | | | | | | | |
| Armer | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Ben | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

¹0 = normal; 1 = mild/moderat affisert modalitet; 2 = alvorlig affisert modalitet. ²Asymmetrisk funn høyre/venstre. Neuropathy Impairment Score (NIS) graderer muskelsvakhet (parese) fra 0 til 4: 0 = normal kraft, 1 = 25% parese, 2 = 50% parese, 3 = 75% parese og 4 = 100% muskelsvakhet (paralyse).

Tabell 2: Kliniske karakteristikk av 8 affiserte medlemmer av familie 2. Dette er de samme 8 affiserte individene som er undersøkt med koblingsanalyse.

| Id. nr. | 6 | 19 | 58 | 172 | 247 | 558 | 836 | 888 |
|------------------------------------|----------|-----------|------------------|---------------------|------------|------------|---------------------|------------|
| Kjønn | ♂ | ♀ | ♀ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ |
| Symptomdebut, alder | 41 | 40 | 33 | 37 | 44 | 39 | 43 | 32 |
| Sykdomsvarighet, år | 15 | 14 | 11 | 10 | 13 | 13 | 5 | 17 |
| <i>Kliniske karakteristika</i> | | | | | | | | |
| <u>Muskel atrofi¹</u> | | | | | | | | |
| Underarm | 1 | 2 | 0 | 2 | 0 | 1 | 1 | 2 |
| Hånd | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 |
| Lår | 2 | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 |
| Legg | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 |
| Fot | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 |
| <u>Muskelsvakhet^{NIS}</u> | | | | | | | | |
| Albuefleksjon | 0 | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2/3,25 ² | 3 |
| Albueekstensjon | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 |
| Håndleddsfleksjon | 0 | 3,5 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2/3,25 ² | 3,25 |
| Håndleddsekstensjon | 0 | 3,5 | 1/2 ² | 1 | 1 | 0 | 2/3,25 ² | 3,25 |
| Fingerfleksjon | 0 | 3,5 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2/3 ² | 3,25 |
| Fingerspredning | 1 | 3,5 | 1 | 2 | 0 | 0 | 2 | 3,25 |
| Tommelabduksjon | 0 | 3,75 | 1 | 4/3,75 ² | 2 | 0 | 2 | 3,5 |
| Hoftefleksjon | 0 | 3 | 0 | 2 | 0 | 2 | 3,25 | 3,25 |
| Hofteekstensjon | 0 | 3 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 3,25 |
| Knefleksjon | 2 | 3,25 | 0 | 3,25 | 1 | 2 | 0 | 3,25 |
| Kneekstensjon | 0 | 3,25 | 0 | 3,25 | 1 | 3 | 3,25 | 3,25 |
| Ankel dorsifleksjon | 3 | 3,5 | 2 | 3,5 | 3 | 3 | 3,5 | 3,5 |
| Ankel plantarfleksjon | 3 | 3,5 | 0 | 3,5 | 2 | 3 | 3,5 | 3,5 |
| Tå-ekstensorer | 3 | 3,5 | 1 | 3,5 | 3 | 3 | 3,5 | 3,5 |
| Tå-fleksorer | 3 | 3,5 | 1 | 3,5 | 2 | 3 | 3,5 | 3,5 |
| <u>Sensibilitetstap</u> | | | | | | | | |
| <u>Berøring¹</u> | | | | | | | | |
| Føtter, legger | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Arm, hand | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <u>Reflekser¹</u> | | | | | | | | |
| Biceps | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| Triceps | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| Brachioradialis | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Patellar | 0 | 2 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 |
| Achilles | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| <u>Deformiteter¹</u> | | | | | | | | |
| Hulfot | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hammertær | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Pes planus | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <u>Ataksi¹</u> | | | | | | | | |
| Armer | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ben | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <u>Tremor</u> | | | | | | | | |
| Armer | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ben | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

¹0 = normal; 1 = mild/moderat affisert modalitet; 2 = alvorlig affisert modalitet. ²Asymmetrisk funn høyre/venstre. Neuropathy Impairment Score (NIS) graderer muskelsvakhet (parese) fra 0 til 4: 0 = normal kraft, 1 = 25% parese, 2 = 50% parese, 3 = 75% parese og 4 = 100% muskelsvakhet (paralyse).

3.2 KOBLINGSANALYSE AV TO STORE FAMILIER

Det ble utført koblingsanalyse av 8 affiserte individer fra familie 1 og 2. Fra familie 1 ble det i tillegg utført koblingsanalyse i enkelte områder for 8 uaffiserte individer. Resultatene fra mikrosatellittanalysene ble analysert i GeneMarker v.1.85 (SoftGenetics LLC) og videre sortert i Microsoft Office Access 2003, etter lengden på mikrosatellittene hos affiserte personer i forhold til friske personer. Det ble beregnet multipoint LOD-score med MERLIN av resultatene fra familie 1.

Beregningen av LOD-score av markørdataene fra familie 1, resulterte i høy LOD-score ved visse områder/markører på kromosom 1 og 20. Områdene omfatter markørene mellom D1S2726 og D1S413 som har en lokalisering 1:111,184,265 -198,620,651, med maksimum LOD-score 1,96 (Tabell 3). Og markørene mellom D20S117 og D20S195 som har en lokalisering på 20:655,244 - 31,825,948, med maksimum LOD-score 0,39 (Tabell 4). Det ble også utført en identity-by-descent-analyse (IBD) av markørene fra familie 1, denne analysen viste også høyest LOD-score på kromosom 1 i forhold til kromosom 20 (Figur 10, Figur 11). På grunn av høyest sannsynlighet for sykdomskobling til kromosom 1, ble området på dette kromosomet prioritert og videre undersøkt. Det er heller ingen kjente CMT-gener på kromosom 20, noe som styrket grunnlaget for å undersøket kromosom 1. Både *MPZ*- og *LMNA*-genet befinner seg på området 1:111,184,265 -198,620,651, og er assosiert med CMT2 (65) (Vedlegg 1; Tabell 10). *MPZ* er et relativt vanlig CMT2-gen og pasientene har allerede blitt utredet for en mutasjon i dette genet uten funn. Det ble av den grunn undersøkt om det forelå en mutasjon i *LMNA* hos affiserte individer fra familie 1.

Mikrosatellittanalysen av familie 2 avslørte et interessant område på kromosom 21. Familie 2 er en meget stor familie, hvor de 8 affiserte individene som ble analysert befinner seg langt fra hverandre i slektstreet. Det viste seg derfor svært vanskelig å utføre LOD-scoreanalyser for alle 8 affiserte med programmet MERLIN eller andre programmer som beregner LOD-score. Dataene ble derfor analysert i Access-databasen. Området på kromosom 21 inneholder genet *SOD1* som blant annet er assosiert med sykdommen amyotrofisk lateralsklerose (ALS) (66). På dette tidspunkt, høsten 2010, ble deler av denne familien presentert av forskningsgruppe fra Universitetet i Tromsø (UIT) på De XXIII Nevrodagene i Oslo (67). I denne presentasjonen ble en mutasjon i *SOD1*, c.140A>G p.Arg46His identifisert til å være familiens sykdomsfremkallende mutasjon (68). Det ble med bakgrunn i dette besluttet å sekvensere de affiserte og uaffiserte familiemedlemmene i familien for denne mutasjonen.

Tabell 3: Multipoint LOD-score-analyse for angitte markører hos familie 1 på kromosom 1. Beregningen tar utgangspunkt i lengden på mikrosatellittene hos 8 affiserte og 8 friske personer fra familie 1.

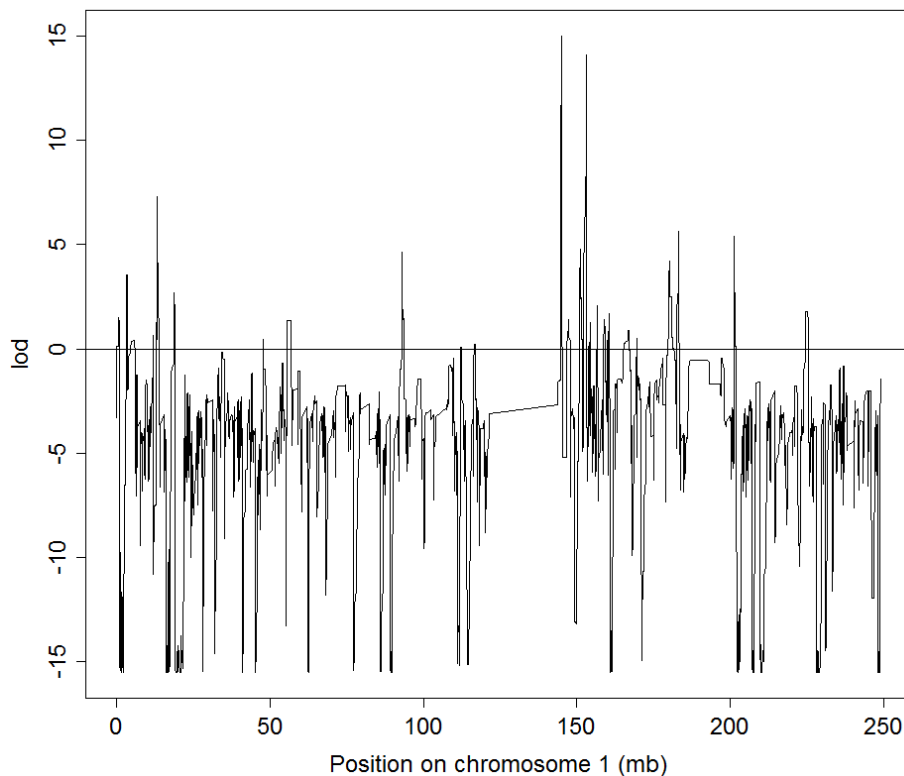
| Posisjon | Z-gjennomsnitt | P _Z -verdi ¹ | Delta | LOD-score | P _L -verdi ² |
|-----------------|----------------|------------------------------------|--------|-----------|------------------------------------|
| Minimum | -0.13 | 0.6 | -0.025 | -0.00 | 0.5 |
| Maksimum | 57.10 | 0.00000 | 6.127 | 2.39 | 0.0004 |
| D1S468 | -0.02 | 0.5 | -0.025 | -0.00 | 0.5 |
| D1S214 | -0.06 | 0.5 | -0.025 | -0.00 | 0.5 |
| D1S450 | -0.12 | 0.5 | -0.025 | -0.00 | 0.5 |
| D1S2667 | -0.12 | 0.5 | -0.025 | -0.00 | 0.5 |
| D1S2697 | -0.15 | 0.6 | -0.025 | -0.00 | 0.5 |
| D1S199 | -0.15 | 0.6 | -0.025 | -0.00 | 0.5 |
| D1S234 | -0.15 | 0.6 | -0.025 | -0.00 | 0.5 |
| D1S255 | -0.15 | 0.6 | -0.025 | -0.00 | 0.5 |
| D1S2797 | -0.15 | 0.6 | -0.025 | -0.00 | 0.5 |
| D1S2890 | -0.15 | 0.6 | -0.025 | -0.00 | 0.5 |
| D1S230 | -0.15 | 0.6 | -0.025 | -0.00 | 0.5 |
| D1S2841 | -0.12 | 0.5 | -0.025 | -0.00 | 0.5 |
| D1S207 | -0.13 | 0.6 | -0.025 | -0.00 | 0.5 |
| D1S2868 | -0.10 | 0.5 | -0.025 | -0.00 | 0.5 |
| D1S206 | 0.49 | 0.3 | 6.127 | 0.60 | 0.05 |
| D1S2726 | 11.52 | 0.00000 | 6.127 | 1.85 | 0.002 |
| D1S252 | 13.29 | 0.00000 | 6.127 | 1.92 | 0.0015 |
| D1S498 | 14.71 | 0.00000 | 6.127 | 1.96 | 0.0013 |
| D1S484 | 13.77 | 0.00000 | 6.127 | 1.93 | 0.0014 |
| D1S2878 | 2.81 | 0.002 | 6.127 | 1.26 | 0.008 |
| D1S196 | 2.31 | 0.010 | 6.127 | 1.18 | 0.0010 |
| D1S218 | 1.98 | 0.02 | 6.127 | 1.12 | 0.0012 |
| D1S238 | 1.54 | 0.06 | 6.127 | 1.02 | 0.02 |
| D1S413 | 0.68 | 0.2 | 6.127 | 0.71 | 0.03 |
| D1S249 | -0.06 | 0.5 | -0.025 | -0.00 | 0.5 |
| D1S425 | -0.10 | 0.5 | -0.025 | -0.00 | 0.5 |
| D1S213 | -0.13 | 0.6 | -0.025 | -0.00 | 0.5 |
| D1S2800 | -0.03 | 0.5 | -0.025 | -0.00 | 0.5 |
| D1S2785 | 0.04 | 0.5 | 6.127 | 0.10 | 0.3 |
| D1S2842 | 0.07 | 0.5 | 6.127 | 0.15 | 0.2 |
| D1S2836 | 0.07 | 0.5 | 6.127 | 0.16 | 0.2 |

Maksimum LOD-score er oppnådd ved å teste ulike verdier av θ .¹ Feilsannsynlighet for Z-gjennomsnitt,
²feilsannsynlighet for LOD-score.

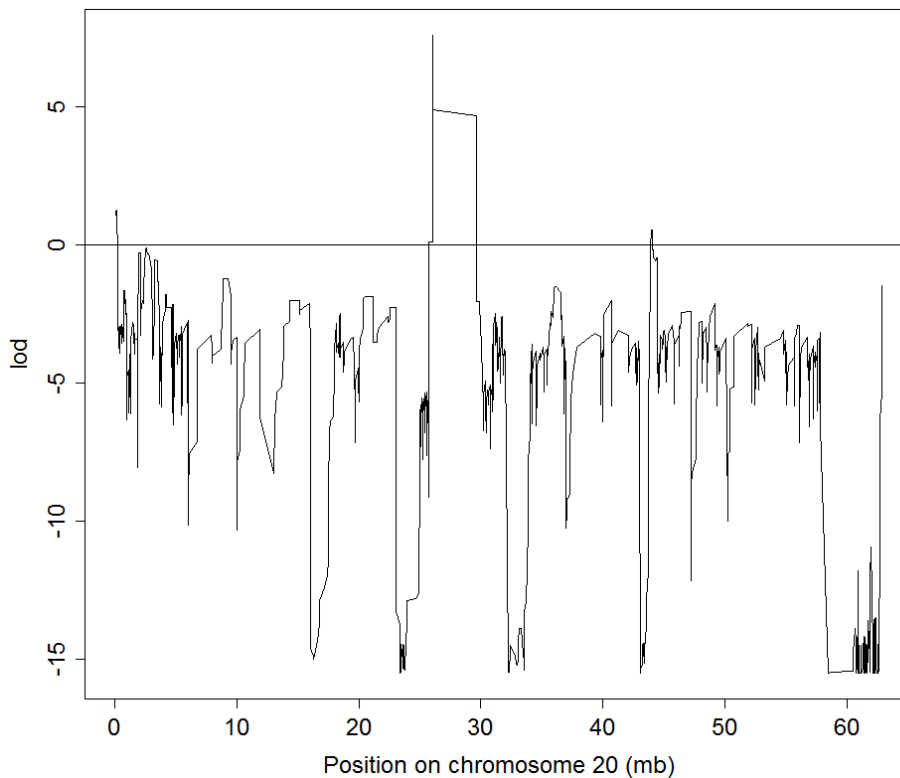
Tabell 4: Multipoint LOD-score-analyse for angitte markører i familie 1 på kromosom 20. Beregningen tar utgangspunkt i lengden på mikrosatellitter hos 8 syke og 8 friske personer fra familie 1.

| Posisjon | Z-gjennomsnitt | P_Z -verdi ¹ | Delta | LOD-score | P_L -verdi ² |
|----------|----------------|---------------------------|--------|-----------|---------------------------|
| Minimum | -0.16 | 0.6 | -0.025 | -0.00 | 0.5 |
| Maksimum | 40.29 | 0.00000 | 6.127 | 2.39 | 0.0004 |
| D20S117 | -0.02 | 0.5 | -0.025 | -0.00 | 0.5 |
| D20S889 | -0.04 | 0.5 | -0.025 | -0.00 | 0.5 |
| D20S115 | -0.04 | 0.5 | -0.025 | -0.00 | 0.5 |
| D20S186 | 0.13 | 0.4 | 6.127 | 0.25 | 0.14 |
| D20S112 | 0.24 | 0.4 | 6.127 | 0.39 | 0.09 |
| D20S195 | 0.13 | 0.4 | 6.127 | 0.25 | 0.14 |
| D20S107 | -0.14 | 0.6 | -0.025 | -0.00 | 0.5 |
| D20S119 | -0.12 | 0.5 | -0.025 | -0.00 | 0.5 |
| D20S178 | -0.06 | 0.5 | -0.025 | -0.00 | 0.5 |
| D20S196 | -0.12 | 0.5 | -0.025 | -0.00 | 0.5 |
| D20S100 | -0.14 | 0.6 | -0.025 | -0.00 | 0.5 |
| D20S171 | -0.15 | 0.6 | -0.025 | -0.00 | 0.5 |
| D20S173 | -0.15 | 0.6 | -0.025 | -0.00 | 0.5 |

Maksimum LOD-score er oppnådd ved å teste ulike verdier av θ .¹Feilsannsynlighet for Z-gjennomsnitt, ²feilsannsynlighet for LOD-score.



Figur 10: IBD-analyse av dataene fra kromosom 1 fra mikrosatellittanalysen av familie 1.



Figur 11: IBD-analyse av dataene fra kromosom 20 fra mikrosatellittanalysen av familie 1.

3.3 SEKVENSERING AV *LMNA*

Ekstrahert DNA fra de 3 affiserte personene, CMT0089, CMT0126 og CMT0147 fra familie 1, ble sekvensert for å undersøke om det forelå en mutasjonen i genet *LMNA*. Alle eksonene med ekson/intron overganger i genet ble analysert uten funn.

3.4 SEKVENSERING AV *SOD1*

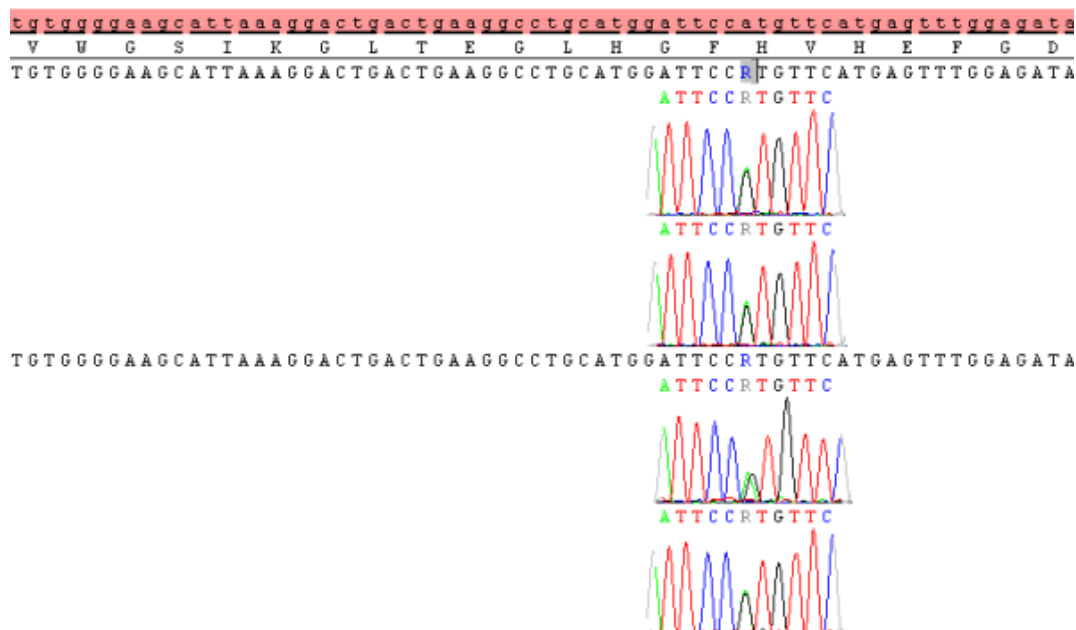
Ekstrahert DNA fra 128 individer fra familie 2 ble undersøkt for mutasjonen c.140A>G p.His46Arg i ekson 2 av *SOD1*-genet. 31 inngiftede uaffiserte familiemedlemmer ble ekskludert fra analysen. Analysen viste at alle affiserte familiemedlemmer hadde denne mutasjonen i heterozygot form i *SOD1*-genet, totalt 28 individer. Alle uaffiserte familiemedlemmer var normale, totalt 98 individer (Tabell 5). For 2 individer var det ikke mulig å få et vellykket sekvenseringsresultat. Mutasjonen p.His46Arg segregerer derfor med fenotypen i denne familien, og er mest sannsynlig årsaken til familiens sykdom.

Denne mutasjonen er beskrevet tidligere i flere rapporter og har blitt forbundet med en mild ALS-fenotype (69;70;71). En mild ALS-fenotype kan forveksles med en CMT-fenotype, og en revurdering av de nevrofysiologiske undersøkelsene for denne familien viste at enkelte familiemedlemmer har en mild ALS fenotype. For grafisk fremstilling av resultatene se Figur 12.

Tabell 5: Tabellen viser de første 8 av totalt 128 individene som ble sekvensert for mutasjonen p.His46Arg i ekson 2 i genet *SOD1*. De første 8 individene bestod av 7 affiserte personer og 1 uaffisert person. Hvorav alle de 7 affiserte individene bar den heterozygote substitusjonsmutasjonen, mens kontrollen var negativ.

| Pasient ID | Krom- Osom | Base- Endring | Ekson | Posi- Sjon | Type Mut. | AA- Endring | Aa-pos- Isjon |
|------------|---------------|------------------|-------|---------------|--------------|----------------|------------------|
| CMT0001 | 21 | A → G | 2 | 140 | Missense | H→R | 46 |
| CMT0052 | 21 | A → G | 2 | 140 | Missense | H→R | 46 |
| CMT0159 | 21 | A → G | 2 | 140 | Missense | H→R | 46 |
| CMT0231 | 21 | A → G | 2 | 140 | Missense | H→R | 46 |
| CMT0499 | 21 | A → G | 2 | 140 | Missense | H→R | 46 |
| CMT0623 | 21 | A → G | 2 | 140 | Missense | H→R | 46 |
| CMT0743 | 21 | A → G | 2 | 140 | Missense | H→R | 46 |
| CMT0617* | - | - | - | - | - | - | - |

*Kontrollprøve fra en uaffisert person.



Figur 12: Grafisk fremstilling av deteksjon av punktmutasjonen c.120A>T i ekson 2 i genet *SOD1* hos individer fra familie 2, ved bruk av programmet SecScape V.2.6.

3.5 EKSOMSEKVENSERING AV FAMILIE 1

Eksomsekvensering ble utført for 3 affiserte individer fra familie 1. Resultatene ble i første omgang sortert etter kriteriet om at variasjonene skulle befinne seg hos alle 3 pasientene, og at den ikke skulle være synonym (Tabell 6). Deretter ble kromosom 1 undersøkt mer grundig med bakgrunn i LOD-score beregningen. Det ble også undersøkt om det var variasjoner som kun var tilstede hos 2 av 3 personer, og som ikke hadde blitt detektert på grunn av dårlig sekvensdekning hos affiserte individer (Tabell 7). Resultatene viste to SNPer av stor interesse. Punktmutasjonen c.5552A>G, p.Asp1851Ser i ekson 35 i *Hemicentin 1 (HMCN1)*, og punktmutasjonen c.994A>G, p.Met332Val i ekson 9 i *Tropomodulin4 (TMOD4)*, var begge tilstede hos alle 3 affiserte individer og lokalisert på koblingsområde på kromosom 1.

Varianten Asp1851Ser i *HMCN1*-genet er ikke beskrevet tidligere, hverken i litteraturen eller i 1000 genomes. Dette genet er imidlertid assosiert med aldersrelatert macula degenerering (AMD) (72;73). Varianten er meget konservert og befinner seg i 5 proteindomener, men den er imidlertid predikert til å være benign av varianteffekt prediksjonsdatabaser. Varianten p.Met332Val i *TMOD4* genet er heller ikke beskrevet tidligere, hverken i litteraturen eller i 1000 genomes. Dette genet har foreløpig ingen assosiert fenotype men er involvert i aktinfilament regulering (73;74). Varianten er meget konservert men befinner seg ikke i et proteindomene, og den er predikert til å være benign av varianteffekt prediksjonsdatabaser. Se Figur 13, for plassering av disse genene.

Tabell 6: Resultatet av eksomsekvensering av pasientene CMT0040, CMT0147 og CMT0139 fra familie 1. Tabellen inneholder gener med variasjoner som finnes hos alle 3 affiserte pasientener, lokalisering, genvariasjonen, aminosyreforandringen og hvis tilfelle konserverte domene.

| Funk- sjon | Gen | Kromo- som | Mutasjonstype | Aa-forandring og posisjon | Konservert sekvens | Referanse sekvens | Observert sekvens |
|---------------|----------|---------------|----------------------|------------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| Ekson | DNAH14 | 1 | Rammeskift del. | p.1923_1924del | | AAAG | - |
| Ekson | DNAH14 | 1 | Ikke-synonym SNV | p.F405L | | T | C |
| Ekson | DNAH14 | 1 | Ikke-synonym SNV | p.Y1392D | | T | G |
| Ekson | DNAH14 | 1 | Ikke-synonym SNV | p.N2435S | | A | G |
| Ekson | FAM58BP | 1 | Ikke-synonym SNV | p.D14G | | A | G |
| Ekson | GJB4 | 1 | Rammeskift del. | p.51_52del | | TGTC | - |
| Ekson | HMCN1 | 1 | Ikke-synonym SNV | p.N1851S | 495;Name=lod=137 | A | G |
| Ekson | TMOD4 | 1 | Ikke-synonym SNV | p.M332V | 559;Name=lod=249 | T | C |
| Ekson | ESPNL | 2 | Ikke-synonym SNV | p.V610M | | G | A |
| Ekson | ESPNL | 2 | Ikke-synonym SNV | p.A955T | | G | A |
| Ekson | TMEM87B | 2 | Ikke-rammeskift del. | p.166_167del | | AAT | - |
| Ekson | CCDC66 | 3 | Ikke-rammeskift ins. | p.T571delinsTS | | - | CTT |
| Ekson | MLF1 | 3 | Ikke-synonym SNV | p.P201T | | C | A |
| Ekson | MUC4 | 3 | Ikke-synonym SNV | p.S574F | | G | A |
| Ekson | OR10C1 | 6 | Ikke-synonym SNV | p.M246V | 329;Name=lod=29 | A | G |
| Ekson | PKD1L1 | 7 | Ikke-synonym SNV | p.R1922W | | G | A |
| Ekson | CRIB | 8 | Ikke-synonym SNV | p.A551T | | C | T |
| Ekson | PRUNE2 | 9 | Ikke-synonym SNV | p.P2464L | | G | A |
| Ekson | VPS13A | 9 | Ikke-synonym SNV | p.H3085N | 664;Name=lod=668 | C | A |
| Ekson | CCDC3 | 10 | Ikke-synonym SNV | p.P266H | 265;Name=lod=16 | G | T |
| Ekson | TMEM132D | 12 | Ikke-synonym SNV | p.V767I | 460;Name=lod=99 | C | T |
| Ekson | CHRFAM7A | 15 | Rammeskift del. | p.76_76del | 654;Name=lod=609 | CA | - |
| Ekson | HERC1 | 15 | Ikke-synonym SNV | p.L1682V | 573;Name=lod=285 | G | C |
| Ekson | MYO9A | 15 | Ikke-synonym SNV | p.N1631I | | T | A |
| Ekson | PAQR5 | 15 | Ikke-synonym SNV | p.S11N | | G | A |
| Ekson | PIF1 | 15 | Ikke-synonym SNV | p.C284R | 516;Name=lod=166 | A | G |
| Ekson | CEP112 | 17 | Ikke-synonym SNV | p.A364G | 584;Name=lod=314 | G | C |
| Ekson | GH2 | 17 | Ikke-synonym SNV | p.L203P | | A | G |
| Ekson | ZNF880 | 19 | Ikke-rammeskift ins. | p.N306delinsSY | | - | GTT |
| Ekson | PLXNB3 | X | Ikke-synonym SNV | p.V1596E | 500;Name=lod=144 | T | A |

Tabell 7: Tabellen viser variasjoner i eksoner på kromosom 1 med lokalisering 1:101.685.337 – 198.620.651, som finnes hos minst 2 av 3 individer fra familie 1 som er dypsekvensert.

| Funksjon | Gen | Kromosom | Mutasjonstype | Aa-forandring og posisjon | Konservert sekvens | Referanse sekvens | Observert sekvens |
|----------|---------|----------|---------------------------|---------------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| Ekson | NOTCH2 | 1 | Rammeskift delesjon | p.6_6del | 428;Name=lod=73 | GG | - |
| Ekson | AXDND1* | 1 | Ikke-rammeskift delesjon | p.987_988del | | AAG | - |
| Ekson | IGSF3* | 1 | Ikke-rammeskift insersjon | p.D1021delinsED | | - | TCC |
| Ekson | TMOD4* | 1 | Ikke-synonym SNV | p.M332V | 559;Name=lod=249 | T | C |
| Ekson | HMCN1* | 1 | Ikke-synonym SNV | p.N1851S | 495;Name=lod=137 | A | G |
| Ekson | PRG4 | 1 | Ikke-synonym SNV | p.C612S | | G | C |

* Dårlig dekning av sekvenserte sekvenser.



Figur 13: Lokalisering av genene *LMNA*, *TMOD4* og *HMCN1* på kromosom 1.

3.6 SEKVENSERING AV *TMOD4* OG *HMCN1*

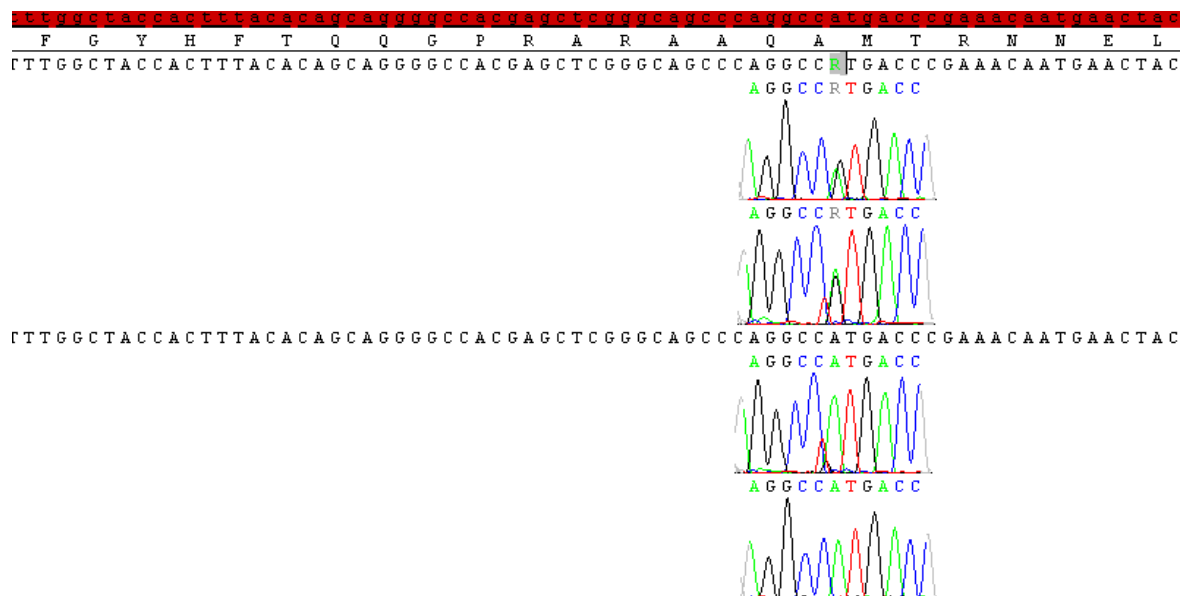
Sangersekvensering av *TMOD4* og *HMCN1* ble videre utført for 8 affiserte og 8 uaffiserte familiemedlemmer fra familie 1. Kun relevante områder med variasjoner ble sekvensert. Sekvensering av området med M332V-varianten i *TMOD4*-genet viste at denne heterozygote varianten var tilstede hos alle 8 affiserte, mens den var fraværende hos de 8 uaffiserte. De resterende 33 familiemedlemmene ble sekvensert for denne varianten. Varianten segregerte med CMT-fenotypen til familien (Tabell 8). Videre ble 150 kontroller sekvensert for denne varianten. Sekvenseringen viste at p.Met332Val var tilstede hos 2 av 150 kontroller. Det konkluderes dermed med at denne varianten mest sannsynlig ikke er årsak til familiens sykdom, men en polymorfisme i den norske befolkningen.

Fra sekvensering av p.N1851S-varianten i *HMCN1*-genet kom det frem at denne varianten ikke var tilstedet hos alle affiserte, og i tillegg var den til stedet hos 2 uaffiserte familiemedlemmer (Tabell 9). Det ble dermed konkludert at denne varianten ikke er årsak til familiens sykdom. For grafisk fremstilling av sangersekvenseringen for disse to variantene, se Figur 14 og Figur 15. Se Figur 16 for slektstre, affisert status og genotype i genene *TMOD4* og *HMCN1* hos familie 1.

Tabell 8: 49 familiemedlemmer fra familie 1 ble undersøkt for variasjonen p.Met332Val i genet *TMOD4* ved bruk av sangersekvensering. 22 av 49 familiemedlemmer fikk påvist variasjon p.M332V i *TMOD4*, hvorav alle som fikk påvist mutasjonen var affiserte.

| Pasient ID | Base- Endring | Lengde | Ekson | Posisjon i cDNA | Effekt | Aminosyre Endring | AA- posisjon |
|------------|------------------|--------|-------|--------------------|----------|----------------------|-----------------|
| CMT0040 | A → G | 1 | 9 | 994 | Missense | M→V | 332 |
| CMT0089 | - | - | - | - | - | - | - |
| CMT0090 | - | - | - | - | - | - | - |
| CMT0091 | - | - | - | - | - | - | - |
| CMT0099 | A → G | 1 | 9 | 994 | Missense | M→V | 332 |
| CMT0101 | A → G | 1 | 9 | 994 | Missense | M→V | 332 |
| CMT0102 | - | - | - | - | - | - | - |
| CMT0103 | A → G | 1 | 9 | 994 | Missense | M→V | 332 |
| CMT0104 | A → G | 1 | 9 | 994 | Missense | M→V | 332 |
| CMT0105 | - | - | - | - | - | - | - |
| CMT0106 | - | - | - | - | - | - | - |
| CMT0107 | - | - | - | - | - | - | - |
| CMT0108 | - | - | - | - | - | - | - |
| CMT0109 | - | - | - | - | - | - | - |
| CMT0110 | - | - | - | - | - | - | - |
| CMT0112 | - | - | - | - | - | - | - |
| CMT0113 | - | - | - | - | - | - | - |
| CMT0114 | - | - | - | - | - | - | - |
| CMT0115 | - | - | - | - | - | - | - |
| CMT0116 | - | - | - | - | - | - | - |
| CMT0117 | - | - | - | - | - | - | - |
| CMT0119 | A → G | 1 | 9 | 994 | Missense | M→V | 332 |
| CMT0120 | - | - | - | - | - | - | - |
| CMT0121 | A → G | 1 | 9 | 994 | Missense | M→V | 332 |
| CMT0122 | - | - | - | - | - | - | - |
| CMT0126 | A → G | 1 | 9 | 994 | Missense | M→V | 332 |
| CMT0127 | - | - | - | - | - | - | - |
| CMT0128 | - | - | - | - | - | - | - |
| CMT0129 | - | - | - | - | - | - | - |
| CMT0130 | A → G | 1 | 9 | 994 | Missense | M→V | 332 |
| CMT0132 | A → G | 1 | 9 | 994 | Missense | M→V | 332 |
| CMT0133 | - | - | - | - | - | - | - |
| CMT0134 | A → G | 1 | 9 | 994 | Missense | M→V | 332 |
| CMT0135 | A → G | 1 | 9 | 994 | Missense | M→V | 332 |
| CMT0136 | - | - | - | - | - | - | - |

| | | | | | | | |
|---------|-------|---|---|-----|----------|-----|-----|
| CMT0137 | - | - | - | - | - | - | - |
| CMT0138 | A → G | 1 | 9 | 994 | Missense | M→V | 332 |
| CMT0139 | A → G | 1 | 9 | 994 | Missense | M→V | 332 |
| CMT0144 | A → G | 1 | 9 | 994 | Missense | M→V | 332 |
| CMT0147 | A → G | 1 | 9 | 994 | Missense | M→V | 332 |
| CMT0148 | - | - | - | - | - | - | - |
| CMT0153 | A → G | 1 | 9 | 994 | Missense | M→V | 332 |
| CMT0168 | A → G | 1 | 9 | 994 | Missense | M→V | 332 |
| CMT0169 | A → G | 1 | 9 | 994 | Missense | M→V | 332 |
| CMT0170 | A → G | 1 | 9 | 994 | Missense | M→V | 332 |
| CMT0171 | - | - | - | - | - | - | - |
| CMT0172 | A → G | 1 | 9 | 994 | Missense | M→V | 332 |
| CMT0173 | A → G | 1 | 9 | 994 | Missense | M→V | 332 |
| CMT0207 | - | - | - | - | - | - | - |

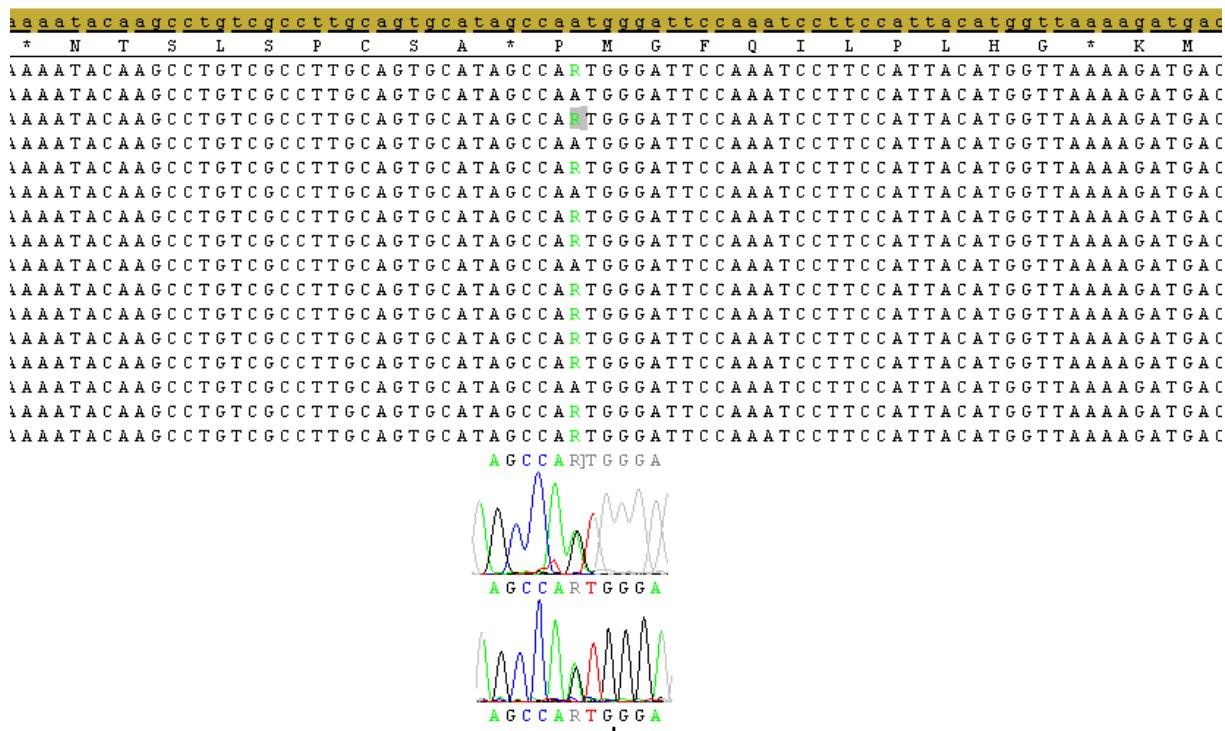


Figur 14: Grafisk fremstilling av sekvensering av den heterozygote punktmutasjonen M332V (øverst), og normalvarianten (nederst) av genen *TMOD4* hos individer fra familie 1 i SecScape V.2.6.

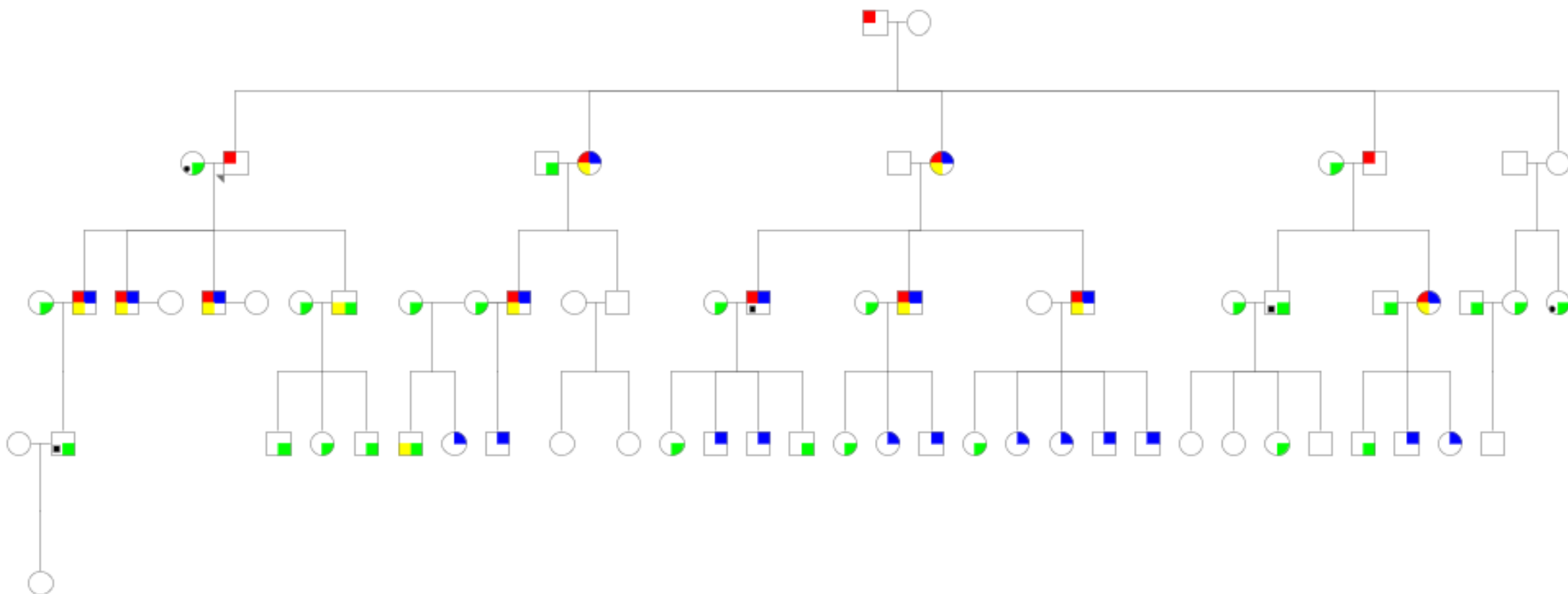
Tabell 9: 16 familiemedlemmer fra familie 1, ble undersøkt for mutasjon i *HMCN1* med sangersekvensering. 11 av 16 personer fikk påvist SNV i genet *HMCN1*.

| Pasient ID | Base-Endring | Lengde | Ekson | Posisjon i cDNA | Effekt | Aminosyre Endring | AA-posisjon |
|------------|--------------|--------|-------|-----------------|----------|-------------------|-------------|
| CMT0040* | A → G | 1 | 35 | 5552 | Missense | N→S | 1851 |
| CMT0121* | A → G | 1 | 35 | 5552 | Missense | N→S | 1851 |
| CMT0130* | A → G | 1 | 35 | 5552 | Missense | N→S | 1851 |
| CMT0132* | A → G | 1 | 35 | 5552 | Missense | N→S | 1851 |
| CMT0139* | A → G | 1 | 35 | 5552 | Missense | N→S | 1851 |
| CMT0147* | A → G | 1 | 35 | 5552 | Missense | N→S | 1851 |
| CMT0126* | A → G | 1 | 35 | 5552 | Missense | N→S | 1851 |
| CMT0153* | - | - | - | - | - | - | - |
| CMT0089 | - | - | - | - | - | - | - |
| CMT0103* | A → G | 1 | 35 | 5552 | Missense | N→S | 1851 |
| CMT0109 | - | - | - | - | - | - | - |
| CMT0112 | A → G | 1 | 35 | 5552 | Missense | N→S | 1851 |
| CMT0116 | - | - | - | - | - | - | - |
| CMT0128 | - | - | - | - | - | - | - |
| CMT0173* | A → G | 1 | 35 | 5552 | Missense | N→S | 1851 |
| CMT0207 | A → G | 1 | 35 | 5552 | Missense | N→S | 1851 |

*Affiserte individer



Figur 15: Grafisk fremstilling av sekvenseringen av den heterozygote punktmutasjonen N1851S i genet *HMCN1* hos individer fra familie 1 i SecScape V.2.6.



Figur 16: Slektstre med familie 1 diagnostisert med AD CMT2. Slektstreet består av 69 individer i 5 generasjoner, hvor 49 av dem har avlagt blodprøve og er undersøkt for kobling til 1p22.1-q31.3. □ = mann, ○ = kvinne, rød = individ er diagnostisert med CMT2, blå = påvist variasjon i genet *TMOD4*, grønn = ingen variasjon i *TMOD4*, gul = påvist variasjon i genet *HMCN1*, svart prikk = ingen variasjon i *HMCN1*.

4. DISKUSJON

I dette studiet ble to store norske familier med AD CMT2 undersøkt med koblingsanalyse for å identifisere kromosomale områder hvor eventuelle sykdomsfremkallende mutasjoner kunne befinne seg. Den kausale mutasjonen hos familie 1 ble ikke identifisert, men det ble identifisert flere interessante kromosomale områder. Det kan være flere grunner til at den kausale mutasjonen ikke ble funnet. En grunn kan være at de biologiske antagelsene ikke var korrekte, mens en annen årsak kan være at de genetiske analysemetodene ikke var tilstrekkelige for akkurat denne mutasjonen. Vurdering av de biologiske antagelsene og metodene vil bli diskutert under. Mutasjonen p.His46Arg i genet *SOD1* ble identifisert som årsaken til CMT2 i familie 2.

4.1 KOBLINGSANALYSE

Ettersom flere gener var blitt undersøkt for kausale mutasjoner før dette studiet, ble antagelsene at sykdommen i familiene skyldtes enten en mutasjon i andre CMT-assosierte gener, eller gener som ikke tidligere var forbundet med CMT. Med koblingsanalyse ble det funnet regioner på kromosom 1, 8 og 20 hos familie 1 med relativt høy LOD-score. Alle disse tre områdene er interessante med tanke på at det er statistisk høyere sannsynlighet for at en kausal mutasjon kan være lokalisert der, enn andre steder i genomet. Det er området rundt centromeren på kromosom 1 som helt klart har den høyeste LOD-scoren, hvor markøren D1S498 har en LOD-score på 1.96. Dette er ikke signifikant ($Z > 3$), men det var interessant nok til å undersøke området videre. Høy LOD-score på kromosom 1 og 20 ble også bekreftet ved IBD-analyse. Området på kromosom 1 har flere markører med relativt høy LOD-score, og av den grunn ble dette området prioritert fremfor de andre områdene på kromosom 8 og 20. På kromosom 1 er det lokalisert flere CMT-assosierte gener, som blant annet genene *MPZ*, *Heksokinase1 (HK1)* og *LMNA*. Av disse er det kun *LMNA* og *MPZ* som tidligere er assosiert med CMT type 2. Alle eksonene i *MPZ* var tidligere sekvensert for punktmutasjoner, og derfor ble *LMNA* prioritert videre og undersøkt. Markøren D1S498 med høyest koblingssannsynlighet til CMT, har en avstand på ~5 cM til *LMNA*.

Koblingsanalysen av familie 2 ble utført sommeren 2010, men analyseresultatene ble ikke undersøkt før etter at mutasjonen p.His46Arg i *SOD1* ble identifisert som årsaken til CMT2 i

deler av familie 2 av forskere fra UIT (67;68). Slik at da analyseresultatene fra mikrosatellitanalysen ble gjennomgått stemte disse overens med hva som tidligere var funnet.

4.2 SEKVENSERING AV *LMNA*

Mutasjoner i *LMNA* er tidligere blitt knyttet opp mot flere sjeldne patologiske tilstander, som Hutchinson–Gilford progeria syndrom, cardiomyopater og CMT2B1. Slik at ulike mutasjoner i *LMNA* kan forårsake mangfoldige sykdommer. Majoriteten av mutasjonene i *LMNA* er autosomal dominante og forårsaker cardiomyopati. *LMNA* koder for proteiner som primært er lokalisert i den indre nukleære membranen, hvor de danner kjernelamina ved å polymerisere til et nettverk (75). Genet spiller også en viktig rolle i genuttrykkelse, samt i cellyklus og DNA-repareringsmekanismer (76). Etersom mutasjoner i *LMNA* tidligere er blitt forbundet med CMT2B1, var det derfor en mulighet for at dette kunne være årsaken til CMT2 i familie 1. Alle eksonene i *LMNA* hos 3 affiserte individer fra familie 1 ble Sangersekvensert, uten å identifisere noen mutasjon. At mutasjonen ikke ble funnet kan skyldes at den befinner seg i de ikke-kodende områdene av *LMNA*, hvor det ikke har blitt undersøkt for mutasjoner. Men resultatene samsvarer med tidligere studier, ettersom få pasienter med mutasjon i *LMNA*-genet har blitt beskrevet i litteraturen i senere tid. Et tidligere studie utført på tjekkiske pasienter, dog med en tidligere sykdomsdebut enn de norske familiene, viste også at *LMNA*-genet ikke er en signifikant årsak til aksonal CMT-sykdom i tjekkiske pasienter (77). Dette kan også derfor gjelde andre europeiske land.

Et annet studie av en stor marokkansk familie med 9 affiserte søsken med AR CMT2, var det første studiet som beskrev at en kobling til området 1q21.2-q21.3 på kromosom 1 mulig er forårsaket av en mutasjon i genet *LMNA*. Denne marokkanske familien hadde relativt ulik fenotype sammenlignet med familie 1. I tillegg til de vanlige klassiske CMT-symptomene hadde familien muskelatrofi og svakheter i hofteleddene, og en sykdomsdebut som fant sted i andre tiår hos alle affiserte i familien (78). Senere har det kommet frem at flere algeriske familier bærer mutasjonen p.Arg298Cys i *LMNA*-genet (79). I 2008 ble det vist at alle pasienter med CMT2B1 som er homozygot for mutasjonen p.Arg298Cys i *LMNA*-genet stammer fra en avgrenset region i Nordvest-Algerie og Øst-Marokko, og at de er bærere av en felles homozygot nedarvet haplotype på *LMNA*-locuset (80). To andre mutasjoner i *LMNA*-

genet har blitt identifisert ved perifer nevropati, men alltid i kombinasjon med andre kliniske tegn (65;81). I en undersøkelse av 32 sporadiske kinesiske pasienter med CMT2 ble det heller ikke funnet noen mutasjon i *LMNA* (82). Hvilket da tyder på en mutasjon i *LMNA* sjelden forårsaker CMT, spesielt i områder utenfor Nordvest-Algerie og Øst-Marokko. Siden familien også tidligere har blitt utredet for delesjoner og duplikasjoner med aCGH uten funn, kan dette tyde på at en mutasjon i *LMNA* ikke er årsaken til CMT i denne familien.

4.3 SEKVENSERING AV *SOD1*

Den norske familien som tidligere hadde fått identifisert at mutasjonen p.His46Arg i genet *SOD1* var deres kausale mutasjon, var opprinnelig klinisk diagnostisert med CMT2. Familien hadde med symptomer som muskelatrofi og muskelsvakheter i ekstremitetene. Denne familien er en del av familie 2 fra dette studiet. Det ble av den grunn antatt at samme mutasjon forårsaket CMT2 hos affiserte individer fra familie 2. Ekson 2 i *SOD1*-genet ble derfor Sangersekvensert for mutasjonen p.His46Arg, og som forventet ble den samme heterozygote substitusjonsmutasjonen identifisert hos samtlige affiserte medlemmer i familie 2.

Denne mutasjonen ble første gang observert hos en japansk familie assosiert med en mild familiær ALS (fALS) (83). Det har tidligere vært antatt at p.His46Arg substitusjonen har vært avgrenset til den japanske populasjonen, men i senere tid har mutasjonen også blitt observert hos en norsk mann med pakistansk opprinnelse (84), noen få tilfeller i Tyskland (85), og nå også hos denne store norske familien (68). Med ytterligere identifiserte p.His46Arg mutasjoner andre steder i verden, antas det at mutasjonen er en relativt vanlig patogen *SOD1*-substitusjon.

Sykdomsdebuten hos familie 2 fant i gjennomsnitt sted i fjerde tiår i livet. Dette er noe lavere enn ved den gjennomsnittlige sykdomsdebuten som er 46.9 år, for individer med mutasjoner generelt i *SOD1* (86). Parese og muskelatrofi i underlemmene er tilstede hos nesten alle affiserte individer. Det er også tilfeller av parese og muskelatrofi i hånledd. Dette er symptomer som passer inn i sykdomsbilde hos andre familier med samme mutasjon (87). Mutasjoner i *SOD1* er assosiert med ALS, men denne mutasjonen ser ut til å gi mildere symptomer. Villtype *SOD1* er i prinsippet et løselig cytosolisk protein mens ALS-assosierte mutanter av *SOD1* har en tendens til å oppsamle uløselige aggregater observert som

inkludering i cytoplasma (88;89). Det vites ikke om inkluderingene er en årsak, eller om de er et produkt av degenerering av nervene. Kodonet His⁴⁶ er konserverv blant mange ulike arter, alt fra mennesker til planter. His46Arg er lokalisert i Cu-bindingssete i Cu/Zn-SOD-proteinet. Pasienter med ALS med p.His46Arg har et benignt sykdomsforløp, og dette kan ha en sammenheng med at Cu/Zn SOD-aktiviteten minskes lite (69). Dette kan være grunnen til at pasienter har blitt diagnostisert med CMT2, mens det i realiteten egentlig er en mindre forekommende ALS-variant.

4.4 EKSOMSEKVENSERING AV FAMILIE 1

Antagelsen om at den kausale mutasjonen kunne befinne seg i *LMNA* ble avkreftet etter tidligere analyse med aCGH med 180 000 prober gjennom hele genomet, og senere Sangersekvensering av alle eksonene i *LMNA*. Ettersom alle eksonene i genet *MPZ* tidligere var undersøkt for mutasjoner, og genet *HK1* kun var assosiert med CMT1, ble det derfor valgt å undersøke 3 affiserte medlemmer fra familie 1 bredere med eksomsekvensering. Variasjonene p.M332V på ekson 9 i genet *TMOD4*, og p.N1851S på ekson 35 i genet *HMCN1* ble identifisert hos alle de tre affiserte individene. Det var kun disse genene som både var lokalisert innenfor området med høy LOD-score, hvor alle de affiserte individene bar en variasjon, og at variasjonen var ikke-synonym. Det ble av disse grunnene valgt å undersøke genene *TMOD4* og *HMCN1* videre.

4.5 SEKVENSERING AV *TMOD4* OG *HMCN1*

Hverken *TMOD4* eller *HMCN1* har tidligere vært forbundet med CMT eller andre nevropatier, men siden CMT er en meget heterogen nevropati kunne det ikke utelukkes at en av disse genene kunne være en mulig årsak til CMT2. Det ble derfor valgt å Sangersekvensere 16 individer fra familie 1 for å undersøke om variasjonen p.N1851S på ekson 35 i *HMCN1* segregerte med fenotypen. To friske individer hadde samme variasjon, samt at et affisert individ ikke hadde variasjonen. Hvilket tydet på at variasjonen var en vanlig polymorfisme. Konklusjonen var da at variasjonen p.N1851S i *HMCN1* ikke forårsaker CMT2 i familie 1.

For å undersøke om variasjonen p.M332V på ekson 9 i *TMOD4* segregerte med fenotypen i familie 1, ble 49 affiserte og 8 friske individer fra familien Sangersekvensert. Alle de 49

affiserte individene var bærere av den heterozygote mutasjonen p.M332V, mens ingen av de 8 friske individene ikke hadde denne variasjonen. For å ekskludere muligheten for at variasjonen p.M332V var en vanlig polymorfisme, ble 150 nevrologisk friske ikke-familiære personer Sangersekvensert for variasjonen. Det viste seg at variasjonen var til stede hos 2 av de 150 friske personene som ble undersøkt. Det ble da konkludert med at p.M332V i *TMOD4* trolig er en normalvariasjon. Den klassiske karakteriseringen av en polymorfisme er at variasjonen er til stede hos mer enn 1 % av befolkningen i hver av de fem store populasjonene i Europa, Øst-Asia, Sør-Asia, Vest-Afrika og Amerika (90).

4.6 HVA KAN VÆRE ÅRSAKEN TIL AKSONAL CMT I FAMILIE 1?

Det er fortsatt flere områder som ikke er undersøkt for mutasjonen, eller områder som har blitt undersøkt med metoder som mulig ikke har oppdaget mutasjonen. Genet *MPZ* som er lokalisert 1q22-1q23 på kromosom 1 er assosiert med flere ulike CMT-fenotyper, som blant annet CMT1B, CMT2I, CMT2J og IDCMTD (Vedlegg 1, Tabell 10). Det humane *Myelin Protein Zero* er et transmembrant protein bygget opp av totalt 219 aminosyreresiduer. Proteinet består av tre domener; et immunoglobulin-lignende ekstracellulært domene, et transmembrant domene og et interacellulært domene (91). *MPZ* utgjør omtrent 50 % av proteininnholdet i myelin, og er i hovedsak uttrykket i schwanncellene i PNS (92). Individuer som er rammet av mutasjoner i *MPZ* kan ha store kliniske fenotypevariasjoner. Noen blir alvorlig rammet av svakhet i muskler, treg nerveledningshastighet og følelsetap allerede som nyfødte. Sistnevnte er symptomer som er assosiert med Dejerine-Sottas syndrom. Mens andre har milde symptomer, sen sykdomsdebut og ingen eller lite redusert nerveledningshastighet. Dette er symptomer hvilket er assosiert med CMT2 (93). Mutasjoner i *MPZ* står for omlag 1,2 % av alle CMT-tilfeller i Norge (1).

Det har kommet frem av senere forskning at perifere nervespesifikke uttrykkelser av *MPZ*-genet er regulert av både oppstrøms og intron-assosierte regulatoriske elementer, som kan føre til en forandret og/eller redusert aktivitet i genet (94;95). Det kan dermed ikke utelukkes at mutasjonen som forårsaker CMT2 hos familie 1 kan befinne seg i de ikke-kodende delene i *MPZ*, selv om familien tidligere har blitt utredet for mutasjoner i genet (96). Ulike mutasjoner i *MPZ* er et eksempel på at det er vanskelig å anslå hva slags gen mutasjonen i familien befinner seg i, ettersom ulike mutasjoner i samme gen kan gi et vidt spekter med ulike

fenotyper. Av den grunn kan heller ikke genet *HK1* som tidligere kun har vært assosiert med CMT1 utelukkes som en mulig årsak til familiens CMT2-sykdom.

Genet *NEFL* som er lokalisert innenfor området med for høyet LOD-score på kromosom 8, er også som tidligere beskrevet assosiert med CMT. *NEFL* er viktig for vedlikehold av den mekaniske helheten av cellen, og er delaktig i organisering av cytoarkitekturen, cellesignalisering, transkripsjonsregulering og mitokondriell distribusjon (97;98). Det er tidligere rapportert om at mutasjoner i *NEFL* kan både forårsake CMT1 og CMT2, avhengig av hvor mutasjonen er lokalisert og hvilken type mutasjon (99;100;101). En slovensk familie ble diagnostisert med CMT2E etter funn av mutasjonen p.Pro22Ser i *NEFL*. De affiserte i familien hadde en sykdomsdebut i første tiår, og hadde vanskeligheter med å gå på grunn av progressive distale svakheter samt atrofi i underlemmene. Hulfot, hammertær og krokhender var også tilstede hos flere av de affiserte (100). En russisk familie diagnostisert med CMT2 med en identifisert mutasjon i p.Gln333Pro i *NEFL*, hadde sykdomsdebut i andre til tredje tiåret i livet. De affiserte individene i denne familien hadde også vanskeligheter med å gå på grunn av svakheter i leggmusklene, muskelatrofi i underlemmene og til en visst grad ulike deformiteter. 6 av 12 affiserte individer hadde også muskelsvakheter og nedsunkne hofter (101). Dette er til dels like symptomer sammenlignet med familie 1, bortsett fra de forholdsvise tidlige sykdomsdebutene og de nedsunkne hoftene. Slik at en mutasjon i genet *NEFL* kunne passet inn i sykdomsbildet som noen av mutasjonene i *NEFL* gir. Ettersom affiserte individer fra familie 1 allerede er undersøkt for mutasjoner i *NEFL*, er det mest sannsynlig at denne mutasjonen hadde befunnet seg i UTR-områder eller i introner.

4.7 METODISKE SVAKHETER

Det er begrensinger ved metodene som er benyttet for å identifisere årsaken til CMT2 i familie 1, som kan ha medvirket til manglende funn. Videre undersøkelser av introner og regulatoriske ikke-kodende områder rundt kjente CMT-gener, da spesielt på kromosomene 1,8 og 20 vil mulig kunne føre til nye funn. Det er også en mulighet å helgenomsekvensere individer fra familie 1, for å undersøke de ikke-kodende regionene i genomet. Dette er ikke bare mer tidskrevende, men også mye dyrere enn å bare eksomsekvensere. Det vil også føre til mye data som vil kunne være vanskeligere å tolke, på grunn av at områdene utenfor

eksonene ikke er like kjent og like mye forsket på som de kodende områdene er. De ulike metodene vil bli videre diskutert under.

4.7.1 KOBLINGSANALYSE

For å kunne utføre koblingsanalyse er det en betingelse at familien er stor nok og at den består av minst to generasjoner slik at mutasjonen hos de affiserte kan utgjøre en statistisk signifikans. Det er også en fordel at sykdommen er monogen, som vil gjøre det lettere å finne koblingen mellom markørene og sykdommen. I dette studiet er begge familiene store nok slik at det var mulig å utføre koblingsanalyse på dem, og den kausale mutasjonen er antatt monogen. Koblingsanalysen av familie 1 resulterte ikke en signifikant LOD-score på noen av kromosomene, og det kan være flere ulike årsaker til dette. En årsak kan være at det er en feil i beregningsmodellen, eller at det er en feil i affisertstatus hos en eller flere av familiemedlemmene slik at resultatet ikke viser signifikant kobling til noen markører. Det kan også være på grunn av kartet ikke er tett nok. Dersom allelefrekvensene for markørene er skjeve vil dette også kunne gi et endret uttrykk, og virke inn på LOD-scoren. Det har også vist seg at koblingsanalyser detekterer lettere locus med alleler eller varianter som har stor effekt på en sykdom. Problemet med dette er at slike alleler som utgjør en stor effekt er relativt sjeldne i befolkningen.

4.7.2 ACGH

Valg av analysemetoder kan være avgjørende for å klare å identifisere en sykdomsforårsakende mutasjon. Det er tidligere blitt utført analyse med aCGH med 180 000 prober gjennom hele genomet med mål om å identifisere duplikasjoner, eller delesjoner som forårsaker CMT hos familie 1. Genetiske abnormaliteter kan uttrykkes som delesjoner eller duplikasjoner i store segmenter i arvematerialet. aCGH brukes ikke til å detektere små delesjoner, insersjoner eller duplikasjoner, på grunn av at slike CNVer kan unnsnippe deteksjon (102). I tillegg detekterer ikke aCGH balanserte kromosomrearrangementer, hvor det ikke er skjedd en delesjon eller duplikasjon (103). Det har tidligere blitt avdekket at CNVer er tilstedet gjennom hele genomet, men på grunn av begrensede dekkevner eller begrensninger på ulike matriser som aCGH antar man at det finnes flere tusen uoppdagete CNVer i det humane genom (104). Matrisen som ble benyttet for å undersøke om det forelå

delesjoner og duplikasjoner i genomet til familie 1, egnert seg derfor dårlig til å detektere små ubalanserte genomiske variasjoner. Hvilket kan føre til at mindre CNVer som kan forårsake CMT2 i familie 1 ikke har blitt oppdaget. Dypsekvensering har begynt å utfordre matriseanalyser på dette området, men metodene er enda ikke godt innarbeidet og validert. Variasjonen av sekvensdekning på et genomisk område kan benyttes som en indikator for å lete etter eventuelle CNVer, men denne tilnærmingen er ikke problemfri. Ukorrekte variasjoner i sekvensdekningen kan gi feilaktige indikasjoner av CNVer (105). Utifra resultatene på aCGH og dypsekvenseringen kan det være en liten CNV som er årsak til sykdom hos familie 1.

4.7.3 DYPSEKVENSERING

Det ble utført eksomsekvensering i stedet for genomsekvensering, siden det er en velkjent strategi for å identifisere alleler som forårsaker en Mendelsk sykdom. Tidligere studier hvor fokuset har vært analyse av de kodende områdene av genomet, har vist seg å være svært suksessfulle. Selv om eksonene kun utgjør omtrent 1 % av genomets størrelse, er det klart at majoriteten av mutasjoner i eksoner er årsaken til Mendelske sykdommer (106;107;108). Av 2600 Mendelske sykdommer som har blitt oppdaget, skyldes omtrentlig 85 % av sykdommene mutasjoner funnet i de kodende regionene eller i spleisesteder (109). Dette står i kontrast til de ikke-kodende områdene hvor det er mer sannsynlig at varianter vil ha en nøytral eller svak innvirkning på fenotypen, selv i høyt konservative områder (110;111). I tillegg antas det at eksomsekvensering koster bare omlag 5 % av hva helgenomsekvensering gjør. Det er også et faktum at eksonvarianter er de mest kjente og studerte variantene i det humane genom. Men ved å kun utføre eksomsekvensering vil mutasjoner av interesse kunne unnsnippe deteksjon, ettersom omlag 99 % av det resterende genomet ikke undersøkes. Dette kan være variasjoner i de ikke-kodende regulatoriske områdene eller strukturelle varianter (112). På tross av at sannsynligheten for at en kausal mutasjon befinner seg i eksonene er betraktelig høyere enn i de ikke-kodende regionene, kan det ikke utelukkes at det finnes variasjoner i høyt konservative og regulatoriske områder som ligger til grunn for nevropatien i familie 1. Dermed kan manglende identifisering av en mutasjon i eksonene ha sammenheng med valg av metode, ettersom metoden ikke kunne detektere eventuelle variasjoner i ikke-kodende DNA.

4.7.4 BASEBESTEMMELSE OG FEILBESTEMMELSE AV DISSE

Etter snart fire tiår med gradvis forbedring av Sangersekvensering, kan det nå oppnås sekvenser på opptil 1000 bp lengde, med en nøyaktighet på 99,99 % når det kommer til å bestemme korrekt base for rådata. Gjennomsnittlig nøyaktighet ved basebestemmelse med nyere plattformer er omlag tifolds lavere (113). Nøyaktigheten av dypsekvenseringen kan forbedres ved å øke deknningen av sekvensene, ved å resekvensere det samme DNA-området flere ganger (massiv parallell sekvensering). Når DNA-sekvensene samles blir det lavere feilbestemmelse av basene (114). Basebestemmelsen er derfor et avgjørende punkt ved nøyaktigheten av denne analysen.

Det ble satt en nedre grense på 30 sekvenser i dekning av de sekvenserte områdene under variantdeteksjonen av dataene fra dypsekvenseringen. Slik at kun variasjoner med dekning på 30 sekvenser eller mer ble undersøkt. Dette ble gjort for å unngå falske negative og positive variasjoner. I tillegg ble også variasjoner på kromosom 1 med dårligere dekning enn 30x sekvenser undersøkt. Dette ble gjort for å ikke ekskludere eventuelle variasjoner på grunn av lav dekning i området med høy LOD-score. Det er antatt at ved å øke sekvensdekningen fra 5x til 20x vil sensitiviteten ved identifisering av heterozygote punktmutasjoner øke atskillig, og ved 50x vil den flate (115). Slik at dersom de sekvenserte områdene ikke er godt nok dekket, vil heterozygote mutasjoner kunne unnsnippe deteksjon.

I dette studiet var i gjennomsnitt 87 %, 70 % og 59 % av de sekvenserte områdene dekket med henholdsvis 10x, 20x og 30x sekvenser hos de tre pasientene fra familie 1. Slik at det er forholdsvis store områder hvor deknningen ikke er optimal, og er dermed kanskje ikke sensitiv nok. I områder med lav sekvensdekning kan falske positive og falske negative mutasjoner oppstå under basebestemmelsen. Det er de falske negative variasjonene som er det største problemet, siden de virkelige variasjonene da ikke detekteres. Ettersom det er flere områder som er dårlig dekket kan det derfor ikke utelukkes at det finnes falske negative mutasjoner i disse områdene.

Det er også andre feil som kan bidra til at mutasjoner ikke oppdages ved dypsekvensering. Dette kan være faseforskyvning, forholdet mellom signalstyrken og bakgrunnstøyen, og ”crosstalk” mellom klaser som er nærstående i flowcellen (116). Crosstalk er overlapping i eksitasjonsspektra til fluoroforene, som kan føre til at lysemisjon blir detektert over flere klaser i flowcellen. Fluoroforene til adenin og guanin er spesielt utsatt for dette. Dette kan føre til at feil base registreres under basebestemmelsen. Ufullstendig fjerning av

3' terminatorer og fluoroforer kan føre til faseforskyvning ved at klaser mister et nukleotid ved inkorporering, eller ved inkorporering av nukleotider uten en effektiv 3' terminator (117).

Dette øker faren for falske positive og negative genvariasjoner.

4.7.5 DATAANALYSE

Filtreringen og sorteringen av genvariasjonene etter dypsekvenseringen, la til grunn for at det er betydelig større sannsynlighet for at ikke-synonyme genvarianter forårsaker forandringer i fenotyper, enn nøytrale genvarianter (118;119). Dermed ble kun ikke-nøytrale genvarianter undersøkt. Det er i noen få tilfeller blitt rapportert om at synonyme mutasjoner kan forårsake sykdomstilstander (120). Degenerering av den genetiske koden betyr at mange mutasjoner i de kodende sekvensene, spesielt ved tredje base i kodonet, som ikke påvirker proteinsekvensen er ansett som synonym.

Men det er et økende bevis for at synonyme mutasjoner kan ha en effekt på transkripsjon, spleising, mRNA-transport eller translasjon som innvirke på fenotypen. Nyere forskning har vist at en synonym polymorfisme som er en del av en haplotype påvirker det kodede proteinet ved å forandre dets struktur (121). Etersom eksomsekvenseringen og den påfølgende filtreringen og sorteringen ikke førte til identifikasjon av det muterte sykdomsgenet, kan dette være fordi nevropatien skyldes en synonym mutasjon.

Etter eksomsekvensering ble de sekvenserte fragmentene filtrert mot kjente normalvarianter i databasen dbSNP129, slik at eventuelle kjente normalvarianter i familie 1 ble filtrert bort. Dette gjorde at de variasjonene som gjenstod ble lettere å undersøke for patogene egenskaper. Ulempen med denne fremgangsmåten er at det antas at de mest brukte SNP-databasene inneholder feilaktige SNPer (122;123). Noen av SNPene i disse databasene er feilaktig blitt konstantert som normalvarianter, mens de er mest sannsynlig er patogene mutasjoner. Det kan derfor være mulig at en eventuell mutasjon som forårsaker CMT2 i familie 1 har blitt filtrert bort.

4.8 ETISKE HENSYN

Teknologien innenfor genetikken gjør det nå mulig å sekvensere hele humane genomer på kun få dager. Med så mye informasjon som anskaffes ved slike analyser vil det oppstå etiske problemstillinger. Det er flere store betraktninger som må overveies ved storskalaanalyser, som for eksempel hva man skal gjøre med all informasjonen som dannes. Ikke bare med tanke på personene er analysert, men også overfor deres nære genetiske slektninger spesielt ved Mendelske sykdommer. Andre overveielser som må tas er i forhold til hvem som får tilgang til opplysningene, hvem kan benytte dem og til hvilke formål de kan bli brukt (124). Det er også etiske problemstillinger rundt omstendighetene vedrørende hvordan prøvene og dataene fra dypsekvensering skal bli håndtert i fremtiden (125).

Forskning med metoder som dypsekvensering, vil føre til at forskere får mye annen genetisk informasjon enn hva de i utgangspunktet leter etter. Noe av informasjonen er av kjent betydning mens annen informasjon er av ukjent betydning. Det har vært mye diskusjon rundt hvordan man skal håndtere informasjon som ikke er relatert til forskningsprosjektet, men som kan innvirke på deltakerenes liv i senere tid.

Burde deltakerne få vite om eventuelle sykdommer som kan oppstå senere i livet som følge av et identifisert mutert sykdomsgen? Det kan være positivt for en pasient å få vite om vedkommende har en sykdomsbærende mutasjon, hvis det finnes forebyggende behandlinger eller tiltak. Det kan også være en fordel på sikt at vedkommende kan planlegge sitt liv, og med hensyn til fremtidige barn, jobb og utdanning. Men uansett vil slik informasjon ikke bare ramme deltakeren men også dets nærmeste genetiske slektninger. Men hva hvis det ikke finnes noen forebyggende behandling av sykdommen? Da vil slik informasjon kunne redusere livskvaliteten til vedkommende. Det vil også kunne bringe på banen valg som man i utgangspunktet ikke ønsker å ta stilling til, slik som foster diagnostikk (126). Ved initiering av et forskningsprosjekt som innebærer sekvensering i stor skal burde forskere diskutere med sine deltakere i prosjektet om hvordan de skal håndtere informasjon som kan oppstå. De burde også diskutere hvor vidt de skal inkludere sine nærmeste genetiske slektninger, men pasientene selv burde få muligheten til å velge mellom å få vite slik informasjon eller ikke. I dette prosjektet som er godkjent av Regionale komiteer for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK), har alle individene i familiene samtykket til all genetisk forskning.

5. KONKLUSJON

Mutasjonen i *LMNA*-genet er mest trolig ikke årsaken til CMT2 i familie 1. Det er heller trolig ikke en signifikant årsak til CMT generelt i den europeiske populasjonen, da det er få eller ingen andre rapporter om at *LMNA* forårsaker CMT i europeiske familier. Mutasjonene i *TMOD4* og *HMCN1* er heller trolig ikke mutasjonen som kausal for deres sykdom. Selv etter eksomsekvensering er mutasjonen som forårsaker CMT2 i familie 1 er fortsatt ukjent, men det har blitt kartlagt flere interessante kromosomle områder i dette studiet. I disse interessante områdene ligger det gener som tidligere har vært assosiert med CMT, hvilket betyr at mutasjonen kan være lokalisert i de ikke-kodende områdene rundt CMT-assosierte gener. En annen mulighet er at den kausale mutasjonen befinner seg i et gen som tidligere ikke er assosiert med CMT, men som ikke ble fanget opp med analysemetodene som ble benyttet i dette prosjektet.

Substitusjonsmutasjonen His46Arg i *SOD1* er tidligere blitt identifisert som årsaken til nevropatien i deler av familie 2. Etter identifikasjon av samme mutasjon hos alle affiserte individer i familie 2, er det konstantert at dette er årsaken til deres nevropati. Andre pasienter med distal arvelig motor nevropati med lik fenotype som unilaterale svakheter i underlemmene og en relativt sen sykdomsdebut uten kjent årsak burde testes for substitusjonen p.His46Arg.

6. LITTERATURLISTE

1. Braathen GJ, Sand JC, Lobato A, et al. Genetic epidemiology of Charcot–Marie–Tooth in the general population. *EJN*. 2011 Jan;18(1):39-48
2. Bucci C, Bakke O, Progida C. Charcot-Marie-Tooth disease and intracellular traffic. *Prog.Neurobiol*. 2012 Mar;[Epub ahead of print].
3. Charcot JM, Marie P. Sur une forme particulière d'atrophie musculaire progressive, souvent familiale débutant par les pieds et les jambes et atteignant plus tard les mains. *Revue médicale*. 1886 6:97-138.
4. Tooth HH. The peroneal type of progressive muscular atrophy. Dissertation, London. H. K. Lewis, 1886.
5. Reilly MM, Murphy SM, Lauá M. Charcot-Marie-Tooth disease. *JPNS*. 2011 Mars;16(1):1-14.
6. Patzko Á, Shy ME. Update on Charcot-Marie-Tooth Disease. *CNNR*. 2010 Nov;11(1):78-88.
7. Gentil BJ, Cooper L. Molecular basis of axonal dysfunction and traffic impairments in CMT. 2012 Aug 1;88(5):444-453.
8. Szigeti K, Lupski JR. Charcot-Marie-Tooth disease. *EJHG*. 2009 Jun;17(6):703-710.
9. Weterman MAJ, Ruissen F, Wissel M, et al. Copy number variation upstream of *PMP22* in Charcot-Marie-Tooth disease. *EJHG*. 2010 April;18(4):421-428.
10. Sand O, Sjaastad Ø, Haug E, Bjålie J. *Menneskekroppen: Fysiologi og anatomi*. 2.utg. Oslo: Gyldendal akademisk; 2006. 554 s.
11. Juárez P, Palau F. Neural and Molecular Features on Charcot-Marie-Tooth Disease Plasticity and Therapy. *Neural Plast*. 2012;2012:171636.
12. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the cell*. 5.utg. New York: Taylor & Francis Group; 2008, 1268 s.
13. Pereira JA, Lebrun-Julien F, Suter U. Molecular mechanisms regulating myelination in the peripheral nervous system. *Trend Neurosci*. 2012 Feb;35(2):123-134.
14. Lopez-Verilli MA, Court FA. Transfer of Vesicles From Schwann Cells to Axons: a Novel Mechanism of Communication in the Peripheral Nervous System. *Front Physiol*. 2012 juni;3:205.
15. Hagemeyer K, Brück W, Kuhlmann T. Multiple sclerosis – remyelination failure as a cause of disease progression. *HH*. 2012 Mar;27(3):277-287.
16. Benedettis S, Previtali SC, Coviello S, et al. Analysing histopathological features of rare Charcot-Marie-Tooth neuropathies to unravel their pathogenesis. *Arch neurol*. 2010 Des;67(12):1498-1505.

17. Berger P, Niemann A, Suter U. Schwann cells and the pathogenesis of the inherited motor and sensory neuropathies (Charcot-Marie-Tooth disease). *GLIA*. 2006 Sept;54(4):243-257.
18. Niemann A, Berger P, Suter U. Pathomechanisms of Mutant Proteins in Charcot-Marie-Tooths Disease. *NM*. 2006;8(1-2):217-242.
19. Nave K, Sereda MW, Ehrenreich H. Mechanisms of Disease: Inherited demyelinating neuropathies – from basic to clinical research. *NCPN*. 2007 Aug;8(3):453-464.
20. Fox SI, Human physiology. 12 utg. New York; McGraw-Hill; 2010. 837s.
21. Group 14 Nerve Cells (Schwann cells) [Internett]. WolfWikis: North Carolina State University; 2009 [hentet: 2011.11.21]. Tilgjengelig fra: [http://wikis.lib.ncsu.edu/index.php/Group_14_Nerve_Cells_\(Schwann_cells\)](http://wikis.lib.ncsu.edu/index.php/Group_14_Nerve_Cells_(Schwann_cells)).
22. Harding AE, Thomas PK. The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain*. 1980 Jun;103(2):259-280.
23. Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 2 [Internett]. GeneReviews: University of Washington, Seattle; 2011 Des [hentet 2012-01-23]. Tilgjengelig fra: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1285/>.
24. Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 1 [Internett]. GeneReviews: University of Washington, Seattle; 2011 Aug [hentet 2012-01-23]. Tilgjengelig fra: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301384>.
25. Kennerson ML, Zhu D, Gardner RJM, Storey E, Merory J, Robertson SP, Nicholson GA. Dominant Intermediate Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Maps to Chromosome 19p12-p13.2. *AJHG*. 2011 okt.; 69(4):883-8.
26. Verhoeven K, Claeys KG, Züchner S, et al. *MFN2* mutation distribution and genotype/phenotype correlation in Charcot-Marie-Tooth type 2. *Brain*. 2006 mai;129(8): 2093-2102.
27. Gonzaga-Jauregui C, Zhang F, Towne CF, et al. *GJB1/Connexin 32* whole gene deletions in patients with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurogenetics*. 2010 Jun;11:465-470.
28. Mones S, Bordignon B, Fontes M. Connexin 32 is involved in mitosis. *GLIA*. 2012 Mars;60(3):457-464.
29. *DNM2*-Related Intermediate Charcot-Marie-Tooth Neuropathy [Internett]. GeneReviews: University of Washington, Seattle; 2010 juli [hentet 2012-01-23]. Tilgjengelig fra: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK45014/>.
30. Payerson D, Scaioli V, Laura M. Clinical and electrophysiological aspects of Charcot-Marie-Tooth disease. *NMM*. 2006;8(1-2)3-22.
31. Mechanisms of Disease: a molecular genetic update on hereditary axonal neuropathies. *NCPN*. 2006 Jan;2(1):45-53.

32. Saporta A, Sottile S, Miller L. Charcot Marie Tooth (CMT) Subtypes and Genetic Testing Strategies. *Ann. Neur.* 2011 Jan;69(1):22-23.
33. Mandich P, Fossa P, Capponi S, et.al. Clinical features and molecular modelling of novel MPZ mutations in demyelinating and axonal neuropathies. *EJHG.* 2009 Mars;17:1129-34.
34. Jordanova A, De Jonghe P, Boerkoel CF, et al. Mutation in the neurofilament light gene (NEFL) cause early onset severe Charvot-Marie-Tooth disease. *Brain.* 2003 Mar;126(3):590-597.
35. Tahir M, Azzedine H, Assami S, et.al. Phenotypic variability in autosomal recessive axonal Charcot–Marie–Tooth disease due to the R298C mutation in lamin A/C. *Brain* 2004;127(1):154-163.
36. Kohlenbäumer G, Hullmann J, Appenzeller S. Novel genomic techniques open new avenues in the analysis of monogenetic diseases. *Hum. Mut.* 2011 Feb;32(2):144-151.
37. Charcot-Marie-Tooth disease [Internett]. Genetic Home Reference: A service of the U.S National Library of Medicine®; 2011 [hentet: 2011.11.26]. Tilgjengelig fra: <http://ghr.nlm.nih.gov/condition=charcot-marie-tooth-disease>.
38. Inherited Peripheral Neuropathies [Internett]. Inherited Peripheral Neuropathies Mutation Database; [hentet 2012.02.27]. Tilgjengelig fra: <http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/Home/IPN.cfm>.
39. Brown TA. *Genomes 3.* 3. utg. New York: Taylor & Francis Inc; 2006. 736 s.
40. Parniewski P, Staczek P. Molecular Mechanisms of TRS Instability. *AEMB.* 2002;516:1-25.
41. Jakupciak JP, Wells RD. Genetic instabilities of triplet repeat sequences by recombination. *IUBMB.* 2000 Des;50(6):355-359.
42. *An Introduction to Genetic Analysis.* 7th edition. Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, et al. New York: W. H. Freeman; 2000.
43. Griffiths AJF, Gelbart WM, Miller JH, et al. *Modern Genetic Analysis.* New York: W. H. Freeman Company. 1998. 686 s.
44. *Genetic For Dummies.* Robinson TR. Wiley Publishing Inc. Indianapolis, Indiana. 2005.
45. Genetic Linkage [Internett]. Wikipedia, the free encyclopedia; 2011 [hentet: 2011.12.01]. Tilgjengelig fra: http://en.wikipedia.org/wiki/Genetic_linkage.
46. *Molecular Cell Biology.* 4th edition. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. New York: W. H. Freeman; 2000. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21505/>
47. *The Cell: A Molecular Approach.* 2nd edition. Cooper GM. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.

48. DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis [Internett]. Applied BioSystems [hentet 2012-02-06]. Tilgjengelig fra: http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041003.pdf.
49. Meldrum C, Doyle MA, Tothill RW. Next-Generation Sequencing for Cancer Diagnostics: a Practical Perspective. *CBR*. 2011 Nov;32(4):177-195.
50. Zhang J, Chiodini R, Badr A, et al. The impact of next-generation sequencing on genomics. *JGG*. 2011 Mars;38(3):95-109.
51. Illumina sequencing [Internett]. UPPmax NExt generation sequencing Cluster & Storage: Uppsala Universitet, Uppsala; 2010 okt [hentet 12.02.29]. Tilgjengelig fra: <https://www.uppnex.uu.se/uppnex-book/technologies/solexa-sequencing>.
52. Tech Summary: Illumina's Solexa Sequencing Technology [Internett]. SEQanswers – the next generation sequencing community, USA; 2007 mars [hentet 12.02.29]. Tilgjengelig fra: <http://seqanswers.com/forums/showthread.php?t=21>.
53. Introduction [Internett]. Burrows-Wheeler Aligner; 10.02.28 [hentet 12.07.26]. Tilgjengelig fra: <http://bio-bwa.sourceforge.net/>.
54. What is the GATK? [Internett]. Broad Institute of MIT and Harvard, USA; 12.07.23 [hentet 12.07.26]. Tilgjengelig fra: <http://www.broadinstitute.org/gatk/about>.
55. ANNOVAR [Internett]. ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. Tilgjengelig fra: <http://www.openbioinformatics.org/annovar/>.
56. Sy S, Kasberger J, Baranzini S, et al. Detection of identity by descent using next-generation whole genome sequencing data. *BMC Bioinformatics*. 2012 Jun;6(13):121.
57. Dib C, Fauré S, Fizames C, et al. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nat*. 1996 Mar;380(6570):152-154.
58. Microsatellite genotyping [Internett]. Source BioScience [hentet 2012-02-06]. Tilgjengelig fra: <http://lifesciences.sourcebioscience.com/genomic-services/faq/microsatellite-genotyping.aspx>.
59. ABI PRISM®, Linkage Mapping Set v.2.5, User Guide.
60. Abecasis GR, Cherny SS, Cookson WO, et al. Merlin—rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow tree. *Nat. Genet*. 2002 jan.;30(1):97-101.
61. Statistical Genetics. Gene Mapping Through Linkage and Association. Neale BM, Ferreira M, Medland S, Posthuma D. Taylor and Francis Group. New York. 2009.
62. How It Works [Internett]. Covaris; 2011 [hentet 2011-11-08]. Tilgjengelig fra: http://www.covarisinc.com/how_it_works.htm.

63. LightCycler® 480 Instrument Operator's Manual, Software Version 1.5 [Internett]. Institute of Cellular and Organismic Biologi; [hentet 2011.11.09]. Tilgjengelig fra: http://icob.sinica.edu.tw/pubweb/Core%20Facilities/Data/R401-core/LightCycler480%20II_Manual_V1.5.pdf
64. cBot™ User Guide, Illumina, Part # 15006165 Rev. G, Oktober 2011.
65. Benedetti S, Bertini E, Iannaccone S, et al. Dominant LMNA mutations can cause combined muscular dystrophy and peripheral neuropathy. *JNNP*. 2005;(76):1019-1021.
66. Gal J, Strom A, Winter DM, et al. Sequestosome 1/p62 links familial ALS mutant SOD1 to LC3 via an ubiquitin-independent mechanism. *J Neurochem*. 2009 Nov;111(4):1062-1073
67. Program, DE XXIII. Nevrodager 2010 [Internett]. Legeforeningen [hentet 12.07.03] Tilgjengelig fra: <http://legeforeningen.no/PageFiles/41385/Program%20Nevrodagene%202010.pdf>
68. Østern R, Fagerheim T, Ørstavik K. Hereditary motor neuron disease in a large Norwegian family with "H46R" substitution in the superoxide dismutase 1 gene. *ND*. 2012 Jun;22(6):511-521.
69. Abe K, Aoki M, Ikeda M, et al. Clinical Characteristics of familial amyotrophic lateral sclerosis with Cu/Zn superoxide dismutase gene mutation. *JNS*. 136(1996):108-116.
70. Koyama S, Arawaka S, Chang-Hong R, et al. Alteration of familial ALS-linked mutant SOD1 solubility with disease progression: Its modulation by the proteasome and Hsp70. *BBRC*. 2006 Mars 343(2006):719-730.
71. Karch CM, Borchelt DR. Aggregation modulating elements in mutant human superoxide dismutase 1. *ABB*. Aug 503(2006):175-182.
72. Schults DW, Klein ML, Humpert AJ, et al. Analysis of the ARMD1 locus: evidence that a mutation in HEMICENTIN-1 is associated with age-related macular degeneration in a large family. *HMG*. 2003 Des 15;12(24):3315-3323.
73. A Deep Catalog of Human Genetic Variation [Internett]. 1000 Genomes [hentet 12.07.08]. Tilgjengelig fra: <http://www.1000genomes.org/>
74. Gokhin DS, Fowler VM. Tropomodulin Capping of Actin Filaments in Striated Muscle Development and Physiology. *JBB*. 2011 Aug;2011:103069.
75. Worman HJ. Nuclear lamins and laminopathies. *J Pathol*. 2012 Jan;226(2):316-325.
76. Sieprath T, Darwiche R, De Vos DH. Lamins as mediators of oxidative stress. *BBRC*. 2012 Mai;421(4):635-639.
77. Lašuthová P, Baránková L, Haberlová L, et al. Mutations in the LMNA gene do not cause axonal CMT in Czech patients. *JHG*. 2009 Juni;54(6):365-368.
78. Bouhouche A, Benomar A, Birouk A, et al. A locus for an axonal form of autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease maps to chromosome 1q21.2-q21.3. *AJHG*. 1999 sept.;65(3):722-727.

79. Chaouch M, Allal Y, De Sandre-Giovannoli A, et al. The phenotypic manifestations of autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth due to a mutation in Lamin A/C gene. *ND*. 2003 Jan;13(1):60-67.
80. Hamadouche T, Poitelon Y, Genin E, et al. Founder effect and estimation of the age of the c.892C>T (p.Arg298Cys) mutation in LMNA associated to Charcot-Marie –Tooth subtype CMT2B1 in families from North Western Africa. *AHG*. 2008 Sept.;72(5):590-597.
81. Goizet C, Yaou RB, Demay L, et al. A new mutation of the lamin A/C gene leading to autosomal dominant axonal neuropathy, muscular dystrophy, cardiac disease, and leuconychia. *JMG*. 2004 Mars;41(3)e29.
82. Song SJ, Zhang YZ, Chen B, et al. No mutation was detected in the LMNA gene among sporadic Charcot-Marie-Tooth patients. *BDXXB*. 2006 Feb;38(1):78-79.
83. Aoki M, Ogasawara M, Matsubara Y. Mild ALS in Japan associated with novel SOD mutation. *Nat.Gen*. 1993 Dec;5(4):323-324.
84. Holmøy T, Bjørgo K, Roos PM, et al. Slowly Progressing Amyotrophic Lateral Sclerosis Caused by H46R SOD1 Mutation. *EN*. 2007 58(1):57-58.
85. Rabe M, Felbecker A, Waibel S, et al. The epidemiology of CuZn-SOD mutations in Germany: a study of 217 families. *JN*. 2010 257:1298-1302.
86. Cudkovicz ME, McKenna-Yasek D, Sapp PE. Epidemiology of mutations in superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *AN*. 1997 Feb;41(2):210-221.
87. Yamashita S, Kimura E, Yamamoto F, et al. Flexor-dominant myopathic phenotype in patients with His46Arg substitution in the Cu/Zn superoxide dismutase gene. *JNS*. 2009 Jun;281(1-2):6-10.
88. Okado-Matsumoto A, Fridovich I. Subcellular Distribution of Superoxide Dismutases (SOD) in Rat Liver. *JBC*. 2001 Aug 27;42(19):38388-38393.
89. Shibata N, Hirano A, Kobayashi M, et al. Intense superoxide dismutase-1 immunoreactivity in intracytoplasmic hyaline inclusions of familial amyotrophic lateral sclerosis with posterior column involvement. *JNEN*. 1996 Apr;55(4):481-490.
90. The 1000 Genomes Project Consortium. A map of human genome variation from population scale sequencing. *Nature*. 2010 Okt;467(7319):1061-1073.
91. Liu Z, Wang Y, Yedidi RS. Crystal structure of the extracellular domain of the human myelin protein zero. *Proteins*. 2012 Jan;80(1):307-313.
92. Greenfield S, Brostoff S, Eylar EH. Protein composition of myelin of the peripheral nervous system. *J Neurochem*. 1973 April;20(4):1207-1216.
93. Shy ME, Jáni A, Krajewski K. Phenotyping clustering in MPZ mutations. *Brain*. 2004 127(2):371-384.
94. Antonellis A, Dennis MY, Burzynski G. A Rare Myelin Protein Zero (MPZ) Variant Alters Enhancer Activity *In Vitro* and *In Vivo*. *PLoS One*. 2010 Dec;5(12):143-146.

95. Jang SW, Svaren J. Induction of myelin protein zero by early growth response 2 through upstream and intragenetic elements. *JBC*. 2009 Jul;284(30):20111-20120.
96. Wrabetz L, D'Antonio M, Pennuto M. Different intracellular pathomechanisms produce diverse Myelin Protein Zero neuropathies in transgenic mice. *JN*. 2006 Feb;26(8):2358-2368.
97. Hermann H, Strelkov SV, Burkhard P, et al. Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity. *J Clin. Invest.* 2009 Juli;119(7):1772-1783.
98. Eriksson JE, Dechat T, Grin B, et al. Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *J Clin. Invest.* 2009 Jul;119(7):1763-1771.
99. Shin JS, Chung KW, CHO SY, et al. NEFL Pro22Arg mutation in Charcot-Marie-Tooth disease type 1. *J Hum. Gen.* 2008;53(10):936-40.
100. Georgiou DM, Zidar J, Korošec, et al. A novel NF-L mutation Pro22Ser is associated with CMT2 in a large Slovenian family. *Neurogenetics*. 2002 Okt;4(2):93-96.
101. Mersiyanova IV, Perepelov AV, Polyakov PA, et al. A new variant of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 is probably the result of a mutation in the neurofilament-light gene. *AJHG*. 2000 Jul;67(1):37-46.
102. Wang N. Methodologies in cancer cytogenetic and molecular cytogenetics. *AJMG*. 2002 Okt;115(3):118-124.
103. Solinas-Tolodo S, Lampel S, Stilgenbauer S. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *GCC*. 1997 Des;20(4):399-407.
104. Wong KK, deLeeuw RJ, Dosanjh NS. A comprehensive Analysis of common Copy-Number Variations in the Human Genome. *AJHG*. 2007 Jan;80(1):91-104.
105. Xie C, Tammi M. CNV-seq, a new method to detect copy number variation using high throughput sequencing. *BMC Bioinf.* 2009 Mar;6;10:80.
106. Nb SB, Turner EH, Robertson PD. Target capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature*. 2009 Sept;461(7261):272-276.
107. Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, et al. Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nature*. 2010 Jan;42(1):30-35.
108. Stenson PD, Mort M, Ball EV, et al. The Human Gene Mutation Database: 2008 Update. *Genome Med.* 2009 Jan; 1(1):13
109. Cooper DN, Krawczak M, Antonorakis SE. The nature and mechanisms of human gene mutation. In: Scriver C, Beaudet al., Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 7th Ed. New York: McGraw-Hill; 1995. pp. 259–291.
110. Ahituv N, Zhu Y, Visel A, et al. Deletion of ultraconserved elements yields viable mice. *PloS Biol.* 2007 Sept;5(9):e234.

111. Chen CT, Wang JC, Choen BA. The strength of selection on ultraconserved elements in the human genome. *AJHG*. 2007 Apr;80(4):692-704.
112. Sobreira NL, Cirulli ET, Avramopoulos D, et al. Whole-Genome Sequencing of a Single Proband Together with Linkage Analysis identifies Mendelian Disease Gene. *PLoS Genet*. 2010 Jun;6(6):e1000991.
113. Shendure J, Henlee J. Next-generation DNA sequencing. *Nat. Biotechnol*. 2008 Okt;26(10):1135-45.
114. Huang X, Madan A. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res*. 1999 Sept;9(9):868-877.
115. Choi M, Scholl UI, Ji W, et al. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *PNAS USA*. 2009 Nov;106(45):19096-19101.
116. Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD. Next-Generation Sequencing: From Basic Research to Diagnostics. *Clin. Chem*. 2009 Apr;55(4):641:658.
117. Kircher M, Stenzel U, Kelso J. Improved base calling for the Illumina Genome Analyzer using machine learning strategies. *Genome Biol*. 2009 Aug;10(8):R83.
118. Sunyaev S, Ramensky V, Bork P. Towards a structural basis of human non-synonymous single nucleotide polymorphisms. *Trends Genet*. 2000 Mai;16(5):198-200.
119. Sunayev S, Ramensky V, Koch I, et al. Prediction of deleterious human alleles. *HMG*. 2001 Mar;10(6):591-597.
120. Furtugno P, Grosso F, Zambruno G. A synonymous mutation in SPINK5 exon 11 causes Netherton syndrome by alternative exonic splicing regulatory elements. *JHG*. 2012 Mai;57(5):311-315.
121. Goymer P. Genetic Variation: Synonymous mutations break their silence. *Nature* 2007 Feb;92(8):92-92
122. Ku CS, Naidoo N, Pawitan Y. Revisiting Mendelian disorders through exome sequencing. *Hum. Gen*. 2011 Apr;129(4):351-370.
123. Musumeci L, Arthur JW, Cheung FSG, et al. Single nucleotide differences (SNDs) in the dbSNP Database May Lead to Errors in Genotyping and Haplotyping Studies. *Hum. Mut*. 2010 Jan;31(1):67-73.
124. Robertson JA. The \$1000 genome: ethical and legal issues in whole genome sequencing and individual. *Am. J. Bioeth*. 2003 3(3):35-42.
125. MacGuire AL, Caulfield T, Chi MK. Research ethics and the challenge of whole genome sequencing. *Nat. Rev. Genet*. 2008 Feb;9(2):152-156.
126. Gentesting [Internett]. Bioteknologinemda [Hentet 2012.07.17]. Tilgjengelig fra: <http://www.bion.no/temaer/gentesting/>.

VEDLEGG 1

Tabell 10: Tabellen viser en oversikt over ulike CMT-fenotyper og tilhørende egenskaper som arvegang, locus-lokalisering og gen (38).

| Type CMT | Arvegang | Demyeliniserende/ Aksonal | Locus | Gen | Produkt |
|----------|----------|------------------------------|---------------|---------------|---|
| CMT1A | AD | Demyeliniserende | 17p11.2 | PMP22 | Peripheral myelin protein 32 |
| CMT1B | AD | Demyeliniserende | 1q22 | MPZ | Myelin protein zero |
| CMT1C | AD | Demyeliniserende | 16p13.1-p12.3 | SIMPLE/LITAF | Lipopolysakkarid-indusert TNF α |
| CMT1D | AD | Demyeliniserende | 10q21.1-q22.1 | EGR2 | Early growth response protein 2 |
| CMT1E | AD | Demyeliniserende | 17p11.2 | PMP22 | Peripheral myelin protein 22 |
| CMT1F | AD | Demyeliniserende | 8p21 | NEFL | Neurofilament triplet L protein |
| CMT2A1 | AD | Aksonal | 1p36.2 | KIF1B β | Kinesin familiemedlem 1B |
| CMT2A2 | AD | Aksonal | 1p36.2 | MFN2 | Mitofusin 2 |
| CMT2B | AD | Aksonal | 3q21.3 | RAB7 | Medlem RAS oncogen familien |
| CMT2B1 | AR | Aksonal | 1q22 | LMNA | Lamin A/C |
| CMT2B2 | AR | Aksonal | 19q13.33 | MED25 | Mediator kompleks subenhet 25 |
| CMT2C | AD | Aksonal | 12q24.11 | TRPV4 | Transient reseptor potensial kationkanal subfamilie V, medlem 4 |
| CMT2H | AR | Aksonal | 8q21.11 | GDAP1 | Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 |
| CMT2D | AD | Aksonal | 7p14.3 | GARS | Glysyl-tRNA syntetase |
| CMT2E | AD | Aksonal | 8p21 | NEFL | Neurofilament triplet L protein |
| CMT2F | AD | Aksonal | 7q11.23 | HSPB1 | Heat shock 27kDa protein 1 |
| CMT2I | AD | Aksonal | 1q22 | MPZ | Myelin protein zero |
| CMT2J | AD | Aksonal | 1q22 | MPZ | Myelin protein zero |
| CMT2K | AD | Aksonal | 8q21.11 | GDAP1 | Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 |
| CMT2L | AD | Aksonal | 12q24.23 | HSPB8 | Heat shock 22kDa protein 8 |
| CMT2N | AD | Aksonal | 16q21.1 | AARS | Alanyl-tRNA syntetas |
| CMT4A | AR | Demyeliniserende | 8q21.11 | GDAP1 | Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 |
| CMT4B1 | AR | Demyeliniserende | 11q21 | MTMR2 | Myotubularin related protein 2 |
| CMT4B2 | AR | Demyeliniserende | 11p15.4 | SBF2 | SET-bindende faktor 2 |
| CMT4C | AR | Demyeliniserende | 5q32 | SH3TC2 | SH3 domain and tetratricopeptide repeats 2 |
| CMT4D | AR | Demyeliniserende | 8q24.22 | NDRG1 | N-myc downstream regulated 1 |
| CMT4E | AR | Demyeliniserende | 10q21.1-q22.1 | EGR2 | Early growth response protein 2 |
| CMT4F | AR | Demyeliniserende | 19q13.2 | PRX | Periaxin |
| CMT4G | AR | Demyeliniserende | 1q22.1 | HK1 | Heksokinase 1 |
| CMT4H | AR | Demyeliniserende | 12p11.21 | FGD4 | FYVE, RhoGEF og PH domene inneholdende 4 |
| CMT4J | AR | Demyeliniserende | 6q21 | FIG4 | SAC1 lipid fosfatase-domene inneholdende |
| IDCMTB | AD | Begge | 19p13.2 | DNM2 | Dynamain 2 |
| IDCMTC | AD | Begge | 1p35.1 | YARS | Tyrosyl-tRNA syntetase |
| IDCMTD | AD | Begge | 1q22 | MPZ | Myelin protein zero |
| CMT1X | XL | Begge | Xq13.1 | GJB1/Cx32 | Gap junction β -1 protein, connexin 32 |
| CMTX5 | XL | Begge | Xq22.3 | PRPS1 | Fosforibosyl pyrofosfat syntetase 1 |

AD=autosomal dominant, AR= autosomal recessiv, XL=X-koblet

VEDLEGG 2

Tabell 11: Reaksjonskomponenter og volum benyttet i PCR av familie 1 og 2 i koblingsanalysen.

| Reaksjons- komponenter | Konsentrasjon i bruksløsning | Antall μL per prøve | Konsentrasjon i PCR- reaksjon |
|---------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| DNA-templat | 50 ng/ μL | 0.64 | 4.0 ng/ μL |
| Primerpar | 10.0 μM | 0.54 | 0,7 μM |
| dH ₂ O | - | 2.10 | |
| True Allele Premiks | | 4.90 | |
| Totalt | | 8.18 | |

Tabell 12: PCR-program i koblingsanalyse av familie 1 og 2.

| Reaksjon | Temperatur | Tid | Antall sykluser |
|----------------|------------|--------|-----------------|
| Denaturering | 95°C | 12 min | 1 |
| Denaturering | 94°C | 15 sek | 10 |
| Hybridisering | 55°C | 15 sek | 10 |
| Polymerisering | 72°C | 30 sek | 10 |
| Denaturering | 89°C | 15 sek | 20 |
| Hybridisering | 55°C | 15 sek | 20 |
| Polymerisering | 72°C | 30 sek | 20 |
| Polymerisering | 72 °C | 10 min | 1 |

Til slutt avkjøles PCR produktene ved 4 °C i ubestemt tid.

Tabell 13: Reagensoppsett til kapillærelektroforese av familie 1 og 2 på 3130XL.

| Reagenser | Antall μL per prøve |
|------------------------------|--------------------------------|
| Sammenlått PCR-produkt | 1.50 |
| HiDi Formamid | 9.80 |
| 500 Liz (størrelsesstandard) | 0.20 |
| Totalt | 11.50 |

VEDLEGG 3

Tabell 14: Konsentrasjonsmålinger av DNA-templater fra individene CMT0040, CMT0147 og CMT0139 fra familie 1, og måling av forurensing av proteiner (aromatiske) basert på optisk tetthet (OD).

| Pasient ID | Kons. [ng/ μ L] | OD _{260/280} * | V _{gDNA} [μ L] | V _{RSB} [μ L] | Totalvolum [μ L] |
|------------|---------------------|-------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| CMT0040 | 55 | 1,74 | 47,5 | 82,5 | 130** |
| CMT0147 | 44 | 1,82 | 59,0 | 71,0 | 130** |
| CMT0139 | 50 | 1,82 | 52,0 | 78,0 | 130** |

gDNA = genomisk DNA, RSB = Resuspensjonsbuffer. *Bør være mellom en faktor på 1,8-2,0. **I følge protokollen skal det benyttes en konsentrasjon på 20ng/ μ L i 55 μ L, men siden det ble benyttet Covaris-rør i stedet for AFA-plater ble det benyttet en konsentrasjon på 20ng/ μ L i 130 μ L i stedet.

Tabell 15: Innstillinger på Covaris S220, slik at det ble generert fragmenter på 200-300 bp fra genomisk DNA.

| | |
|-----------------------|--------------------|
| Driftssyklus: | 10 % |
| Intensitet: | 5.0 |
| Sykluser per utbrudd: | 200 |
| Varighet: | 2 x 60 sekunder |
| Modus: | Frequency sweeping |
| Temperatur: | 5.5° til 6°C |

Tabell 16: Oversikt over DNA-templater som ble dypsekvensert fra familie 1, og hvilken indeks som ble påsatt templatet under tillaging av DNA-bibliotek. Hver av pasientenes DNA har fått påsatt en unik indekssekvens som muliggjør sammenslåing av prøver fra ulike pasienter under dypsekvenseringen uten at prøvene blir forvekslet. Indekssekvensene påsettes under DNA-bibliotek tillaging.

| Pasient ID: | Indeks nr: | Indekssekvens | Slekt ID: | Diagnose |
|-------------|------------|---------------|-----------|-----------------------|
| CMT0040 | 6 | GCCAAT | 1 | CMT (ukjent mutasjon) |
| CMT0147 | 7 | CAGATC | 1 | CMT (ukjent mutasjon) |
| CMT0139 | 12 | CTTGTA | 1 | CMT (ukjent mutasjon) |

Tabell 17: Reaksjonskomponenter og volum, benyttet i endereparering av 3`- og 5`overheng etter den tilfeldige fragmenteringen med Covaris. Totalt 50 μ L tilsettes hver brønn med fragmentert DNA. Blandingen inkuberes i 30 minutter ved 30 °C i en termosyklar.

| Reagenser | Volum μ L |
|--------------------|---------------|
| End repair control | 10 μ L |
| End Reapir mix | 40 μ L |
| Totalt | 50 μ L |

Tabell 18: Reaksjonskomponenter og volum, benyttet i PCR av “enriched” DNA-bibliotek som benyttes til dypsekvensering.

| Reaksjonskomponenter | Volum per prøve [μL] |
|----------------------|-----------------------------------|
| DNA-templat | 20 |
| PCR Master Mix | 25 |
| PCR Primer Cocktail | 5 |
| Total volum | 50 |

Tabell 19: PCR-program for amplifisering av “enriched” DNA-bibliotek som benyttes til dypsekvensering.

| Temperatur | Tid | Antall sykluser |
|------------|-------------|-----------------|
| 98°C | 30 sekunder | 1 |
| 98°C | 10 sekunder | 10 |
| 60°C | 30 sekunder | 10 |
| 72°C | 30 sekunder | 10 |
| 72°C | 5 minutter | 10 |

Til slutt avkjøles PCR produktene ved 10 °C i ubestemt tid.

Tabell 20: QPCR-oppsett for kvantitering av DNA-bibliotek benyttet til dypsekvensering.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|----------|---------------------|---------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| A | 10 pM Standard | 10 pM Standard | Prøve 1 1/100.000 | Prøve 1 1/100.000 | Prøve 5 1/100.000 | Prøve 5 1/100.000 | Prøve 9 1/100.000 | Prøve 9 1/100.000 |
| B | 1 pM Standard | 1 pM Standard | Prøve 1 1/1.000.000 | Prøve 1 1/1.000.000 | Prøve 5 1/1.000.000 | Prøve 5 1/1.000.000 | Prøve 9 1/1.000.000 | Prøve 9 1/1.000.000 |
| C | 0,1 pM Standard | 0,1 pM Standard | Prøve 2 1/100.000 | Prøve 2 1/100.000 | Prøve 6 1/100.000 | Prøve 6 1/100.000 | Prøve 10 1/100.000 | Prøve 10 1/100.000 |
| D | 0,01 pM Standard | 0,01 pM Standard | Prøve 2 1/1.000.000 | Prøve 2 1/1.000.000 | Prøve 6 1/1.000.000 | Prøve 6 1/1.000.000 | Prøve 10 1/1.000.000 | Prøve 10 1/1.000.000 |
| E | 0,001 pM Std | 0,001 pM Std | Prøve 3 1/100.000 | Prøve 3 1/100.000 | Prøve 7 1/100.000 | Prøve 7 1/100.000 | Prøve 11 1/100.000 | Prøve 11 1/100.000 |
| F | NTC | NTC | Prøve 3 1/1.000.000 | Prøve 3 1/1.000.000 | Prøve 7 1/1.000.000 | Prøve 7 1/1.000.000 | Prøve 11 1/1.000.000 | Prøve 11 1/1.000.000 |
| G | | | Prøve 4 1/100.000 | Prøve 4 1/100.000 | Prøve 8 1/100.000 | Prøve 8 1/100.000 | Prøve 12 1/100.000 | Prøve 12 1/100.000 |
| H | | | Prøve 4 1/1.000.000 | Prøve 4 1/1.000.000 | Prøve 8 1/1.000.000 | Prøve 8 1/1.000.000 | Prøve 12 1/1.000.000 | Prøve 12 1/1.000.000 |

VEDLEGG 4

Tabell 21: Tabellen viser en oversikt over primere som er benyttet til sekvensering av genene *LMNA*, *SOD1*, *TMOD4* og *HMCN1*.

| Navn på primer | Orientering | 5'-3' sekvens | Gen/område/referansesekvens |
|---------------------|-------------|-----------------------|-----------------------------|
| LMNA Exon 9 F | F | TGACCCTCTCCCTTGCTTTG | LMNA, Chr 1q22 NC000001.10 |
| LMNA Exon 9 R | R | GAGTTCTTCGAGCTGGCAGG | LMNA, Chr 1q22 NC000001.10 |
| LMNA Exon 9 F | F | GAAGCTTGAGCCTCACGCAG | LMNA, Chr 1q22 NC000001.10 |
| LMNA Exon 9 R | R | AGCTTGGGCAAAGCTAGCAC | LMNA, Chr 1q22 NC000001.10 |
| LMNA Exon 15 F | F | GACATGTGGGCCATGAGCTT | LMNA, Chr 1q22 NC000001.10 |
| LMNA Exon 15 R | R | CCATTGGCAGCCAAATTAGG | LMNA, Chr 1q22 NC000001.10 |
| LMNA Exon 15 F | F | CAGAGGCAAGCAGATGCAAA | LMNA, Chr 1q22 NC000001.10 |
| LMNA Exon 15 R | R | CTGGAGTGCAGTGGCATGAT | LMNA, Chr 1q22 NC000001.10 |
| LMNA Exon 16 F | F | TGCCAGAGAAGGGAGTCCTG | LMNA, Chr 1q22 NC000001.10 |
| LMNA Exon 16 R | R | CTGTCCACTAGGGCAAGGGA | LMNA, Chr 1q22 NC000001.10 |
| LMNA Exon 16 F | F | ACCCAGGCTGGAGTGCAGTA | LMNA, Chr 1q22 NC000001.10 |
| LMNA Exon 16 R | R | AGGGTTGGAGGAAGGACACA | LMNA, Chr 1q22 NC000001.10 |
| LMNA Exon 17 F | F | GCTTCCTCACAGCTTGAGGC | LMNA, Chr 1q22 NC000001.10 |
| LMNA Exon 17 R | R | TTGGGCATCACTGCTACAGC | LMNA, Chr 1q22 NC000001.10 |
| LMNA Exon 17 F | F | GGGCTGGGTGATGACAGACT | LMNA, Chr 1q22 NC000001.10 |
| LMNA Exon 17 R | R | TCTAGGCCCTGGAGAGAGG | LMNA, Chr 1q22 NC000001.10 |
| LMNA Exon 18 F | F | ATTCTGCCAAGGTGCTTGCT | LMNA, Chr 1q22 NC000001.10 |
| LMNA Exon 18 R | R | GCGACCCTTCTCTGTGGTTG | LMNA, Chr 1q22 NC000001.10 |
| LMNA Exon 18 F | F | TTGGCAGCCCTACCCTTACC | LMNA, Chr 1q22 NC000001.10 |
| LMNA Exon 18 R | R | AATGGGAAAACCAAAGCCCT | LMNA, Chr 1q22 NC000001.10 |
| LMNA Exon 19 + 20 F | F | CCCACAACCACAGAGAAGGG | LMNA, Chr 1q22 NC000001.10 |
| LMNA Exon 19 + 20 R | R | TGAGGGCAAGGATGTTCCCTC | LMNA, Chr 1q22 NC000001.10 |
| LMNA Exon 19 + 20 F | F | GCCAGGTGTCTCCTACACCG | LMNA, Chr 1q22 NC000001.10 |
| LMNA Exon 19 + 20 R | R | GGACACATACGCAGCACCAG | LMNA, Chr 1q22 NC000001.10 |
| LMNA Exon 20 F | F | CCTGGCTCCTGGACTCTTTG | LMNA, Chr 1q22 NC000001.10 |
| LMNA Exon 20 R | R | TGTCAAGCTCTCCGGGTAGG | LMNA, Chr 1q22 NC000001.10 |
| LMNA Exon 20 F | F | CCTGGTGCTGCGTATGTGTC | LMNA, Chr 1q22 NC000001.10 |
| LMNA Exon 20 R | R | TGGAGAAGTCTGGAGCCTGC | LMNA, Chr 1q22 NC000001.10 |
| LMNA Exon 21 F | F | CTCCTACCCGAGAGCTTGA | LMNA, Chr 1q22 NC000001.10 |
| LMNA Exon 21 R | R | GAGAGAAGAAAGGCCAGGCC | LMNA, Chr 1q22 NC000001.10 |
| LMNA Exon 21 F | F | AGTAAGCAGCAGGCCGGAC | LMNA, Chr 1q22 NC000001.10 |
| LMNA Exon 21 R | R | CACCTGGGTTCCCTGTTCAA | LMNA, Chr 1q22 NC000001.10 |
| LMNA Exon 21 + 22 F | F | GCTCTGGTTCTCTGTCCCA | LMNA, Chr 1q22 NC000001.10 |

| | | | |
|---------------------|---|------------------------|--------------------------------|
| LMNA Exon 21 + 22 R | R | GGAAGCAGGGAAAAGGAAGG | LMNA, Chr 1q22 NC000001.10 |
| SOD1 Exon 1 F | F | CGGGATTGAGGTGTAGCGAC | SOD1, Chr 21q22.11. NC000021.8 |
| SOD1 Exon 1 R | R | CCCTCAGGAACGAGAACACG | SOD1, Chr 21q22.11. NC000021.8 |
| SOD1 Exon 1 R | R | CCGGTGACTCAGCACTTGG | SOD1, Chr 21q22.11. NC000021.8 |
| SOD1 Exon 3 F | F | ATCATGAAGCCTGGCCACAG | SOD1, Chr 21q22.11. NC000021.8 |
| SOD1 Exon 3 R | R | GCGACAGAGCAAGACCCTTT | SOD1, Chr 21q22.11. NC000021.8 |
| SOD1 Exon 3 F | F | AGTGGTCAGCCTGGGATTTG | SOD1, Chr 21q22.11. NC000021.8 |
| SOD1 Exon 3 R | R | TGAGGATCAATGGAGCCTGG | SOD1, Chr 21q22.11. NC000021.8 |
| SOD1 Exon 4 F | F | GCCAGGCTGGTCTCAAATCTC | SOD1, Chr 21q22.11. NC000021.8 |
| SOD1 Exon 4 R | R | AGCATTCCAGCATTTGGGAG | SOD1, Chr 21q22.11. NC000021.8 |
| SOD1 Exon 4 F | F | TCGTGATGCAGGTCAGCACT | SOD1, Chr 21q22.11. NC000021.8 |
| SOD1 Exon 4 R | R | GCTATGTCCCAAGGCCTCTG | SOD1, Chr 21q22.11. NC000021.8 |
| SOD1 Exon 5 F | F | CAGAGGCCTTGGGACATAGC | SOD1, Chr 21q22.11. NC000021.8 |
| SOD1 Exon 5 R | R | ACCCAATCCTGGCAAGAAAA | SOD1, Chr 21q22.11. NC000021.8 |
| SOD1 Exon 5 F | F | AGGTGCAGCCCCATCTTTCT | SOD1, Chr 21q22.11. NC000021.8 |
| SOD1 Exon 5 R | R | CAGATGCAGTTCCCCAGGAT | SOD1, Chr 21q22.11. NC000021.8 |
| SOD1 Exon 6 F | F | CCGTCATTCATTTGGCATGA | SOD1, Chr 21q22.11. NC000021.8 |
| SOD1 Exon 6 R | R | TGCCAGCGTCTACCCTTGA | SOD1, Chr 21q22.11. NC000021.8 |
| SOD1 Exon 6 F | F | AGGGTAGCGTGTGGTGGTCTA | SOD1, Chr 21q22.11. NC000021.8 |
| TMOD4 M332V F1 | F | CAGCCCAGAGAGGGTGACTG | TMOD4, Chr1 NM_013353 |
| TMOD4 M332V R1 | R | TTCCAGCTCCTGCTTTCTGC | TMOD4, Chr1 NM_013354 |
| TMOD4 M332V F2 | F | CAGCTTTTGCCCTCCCTCC | TMOD4, Chr1 NM_013355 |
| TMOD4 M332V R2 | R | TCTTTTGCTGGCGACCTGTA | TMOD4, Chr1 NM_013356 |
| HMCN1 N1851S F1 | F | ATCCCTCTCCCCCTTCCTT | HMNC1, Chr1 NM_031938 |
| HMCN1 N1851S R1 | R | GGTTTCCTTGGCAGTGTTTC | HMNC1, Chr1 NM_031939 |
| HMCN1 N1851S F2 | F | TTCCCTCTCCCCCTTCCTTA | HMNC1, Chr1 NM_031940 |
| HMCN1 N1851S R2 | R | TCTGCAAAATCTGTCCAACAGG | HMNC1, Chr1 NM_031941 |

VEDLEGG 5

Tabell 22: Reaksjonskomponenter og volum, benyttet i PCR av genene *SOD1*, *LMNA*, *TMOD4* og *HMCN1*.

| Reagenser | Konsentrasjon i bruksløsning | Antall μL per prøve | Kons. i reaksjonen |
|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| DNA-templat | $\approx 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ | 1 | $\approx 4 \text{ ng } \mu\text{L}$ |
| Primer F+R | $2 + 2 \mu\text{M}$ | 2,26 | $0,18 + 0,18 \mu\text{M}$ |
| dH ₂ O | | 7,54 | |
| 10x AccuePrime buffer II | | 1,25 | 1 x |
| AccuePrime | $2 \text{ U}/\mu\text{L}$ | 0,25 | $0,50 \text{ U/reaksjon}$ |
| Totalt: | | 11,30 | Per brønn |

Tabell 23: PCR-program benyttet for PCR av genene *SOD1*, *LMNA*, *TMOD4* og *HMCN1*.

| Temperatur | Tid | Antall sykluser |
|------------|-------------|-----------------|
| 95°C | 2 minutter | 1 |
| 95°C | 30 sekunder | 35 |
| 61°C | 30 sekunder | 35 |
| 72°C | 1 minutter | 35 |
| 72°C | 10 minutter | 10 |

Til slutt avkjøles PCR-produktene ved 4 °C i ubestemt tid.

Tabell 24: Reaksjonskomponentene og volum, benyttet i sykel-sekvensering av PCR-produktene fra PCR-reaksjonen. Dette er sykel-sekvenseringsoppsett benyttet for både forward- og reversprimere, i to ulike reaksjoner for genene *SOD1*, *LMNA*, *TMOD4* og *HMCN1*.

| Reaksjonskomponenter | Konsentrasjon i bruksløsning | Antall μL per prøve | Konsentrasjon i sekvenseringsreaks. |
|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--|
| Renset PCR-produkt | $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ | 1,50 | $7,50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ |
| Primer R* eller F** | $1,0 \mu\text{M}$ | 1,60 | $0,16 \mu\text{M}$ |
| Nukleasefritt dH ₂ O | - | 4,75 | |
| BigDye v. 3.1 | 2,5x | 0,50 | $0,125x$ |
| Sekvenseringsbuffer | 5x | 1,75 | $0,875x$ |
| Totalt: | | 10,10 | } Summert = 1x |

*R=Reversprimer, **F=forwardprimer

Tabell 25: Reaksjonskomponenter og volum av løsninger fra BigDye® XTerminator™ Purification kit, som benyttes til rensing av sekvenseringsprodukter.

| Reagenser | Antall μL per prøve |
|---------------------|--------------------------------|
| SAM™-løsning | 41,5 |
| BigDye® Xterminator | 8,5 |
| Totalt | 50 |