

Arvelige perifere nevropatier diagnostisert ved dypsekvensering

BAKGRUNN Dypsekvensering er en genetisk metode som brukes til bestemmelse av nukleotidrekkefølgen i DNA. Metoden har vist seg å være mer effektiv enn den tradisjonelle metoden, Sanger-sekvensering, ved sekvensering av flere gener. Dypsekvensering tas nå i bruk til diagnostikk av tilstander hvor flere gener er involvert. I denne studien ble det undersøkt om dypsekvenseringsteknologien gir flere positive diagnoser enn tradisjonell metode ved genetisk utredning av pasienter der det er mistanke om arvelig perifer nevropati.

MATERIALE OG METODE Studien er en retrospektiv gjennomgang av prøver fra 103 pasienter under utredning for arvelig perifer nevropati mottatt ved Sykehuset Telemark i perioden 2012–14. Etter eksklusjon av duplikasjon/delesjon av *PMP22* ble 96 prøver dypsekvensert ved fysisk anriking av 52 arvelige perifere nevropatigener.

RESULTATER En genetisk årsak ble identifisert hos 35 av pasientene (34 %) med perifer nevropati, hvorav 28 (27 %) var punktmutasjoner identifisert ved dypsekvensering.

FORTOLKNING Av de patogene punktmutasjonene som ble identifisert i studien, ble 12 funnet i gener som tidligere ville ha blitt sekvensert ved Sanger-sekvensering ved vår avdeling, mens 16 ble funnet i gener som tidligere ikke ville ha blitt undersøkt.

DNA-sekvensering brukes til å lese nukleotidsekvensen i hele eller deler av arvematerialet til en organisme. Metoden dypsekvensering (next-generation sequencing) har revolusjonert DNA-sekvenseringens hastighet og kapasitet, slik at det humane genom nå kan sekvenseres i løpet av noen få dager, mens det med tradisjonell sekvenseringsmetodikk (Sanger-sekvensering) tok ti år (1, 2).

Dypsekvensering er en omdiskutert metode. Den brukes allerede utstrakt i forskning, og innføres nå i klinisk genetisk diagnostikk. Det er i hovedsak to varianter som benyttes: eksomsekvensering, som innebærer sekvensering av alle kodende gener (alle eksoner), og genpanelsekvensering, som innebærer sekvensering av utvalgte gener, for eksempel kjente gener for en gitt sykdom.

Tidligere har man benyttet Sanger-sekvensering til å undersøke disse utvalgte genene sekvensielt (2–4). Da innebærer imidlertid metoden en begrensning i antall gener det er praktisk mulig å sekvensere. Siden dypsekvensering har mye større kapasitet, er dette en mer effektiv metode for diagnostikk av genetisk heterogene sykdommer, som arvelige perifere nevropatier, epilepsi og kardiomyopati (4–6).

Charcot-Marie-Tooths sykdom (CMT) er den vanligste arvelige perifere nevropatien, med en prevalens i Norge på 40–80 per 100 000 innbyggere (7, 8). Sykdommen betegnes også som arvelig motorisk og sensorisk nevropati (HMSN).

De kliniske symptomene starter ofte distalt i beina, med motoriske funn som pareser og atrofi og sensoriske funn som følelsestap for

vibrasjon og berøring. Sykdommen utvikler seg gradvis og kan senere i forløpet affisere armene. Utover i sykdomsforløpet utvikler pasientene ofte gangvansker, hulfot (pes cavus) og hammertær. Alder ved symptomdebut og alvorlighetsgrad varierer, men sykdommen er som regel langsomt progredierende (9–11). Arvegangen kan være autosomt dominant, autosomt recessiv eller kjønnsbundet.

Charcot-Marie-Tooths sykdom grupperes videre etter motorisk nerveledningshastighet (NCV) i n. medianus: demyeliniserende sykdom (CMT1): $NCV < 38$ m/s; aksonal sykdom (CMT2): $NCV > 38$ m/s og intermediaer sykdom: $NCV = 25–45$ m/s (10, 11). Charcot-Marie-Tooths sykdom er nær beslektet med flere mindre vanlige perifere nevropatier: distal hereditær motorisk nevropati (dHMN), hereditær sensorisk nevropati (HSN) og hereditær sensorisk og autonomisk nevropati (HSAN). Mellom disse gruppene er det glidende overganger både klinisk og genetisk (fig 1).

Etter ferdigstilling av det humane genomprosjektet og innføring av dypsekvensering har det skjedd en rask økning i antall gener assosiert med Charcot-Marie-Tooths sykdom og andre arvelige perifere nevropatier. I dag er ca. 90 gener forbundet med denne sykdomsgruppen, illustrert i figur 2 (6, 12–14).

Den vanligste årsaken til Charcot-Marie-Tooths sykdom er en duplikasjon (en kopi for mye) av *PMP22*-genet, diagnostisert hos 14 % av pasientene i familier med klinisk sykdom i østre Akershus (7). Utenom duplikasjonen av *PMP22* er punktmutasjoner

Helle Høyer

helle.hoyer@sthf.no

Øyvind L. Busk

Øystein L. Holla

Linda Strand

Seksjon for medisinsk genetikk
Avdeling for laboratoriemedisin
Sykehuset Telemark

Michael B. Russell

Forskningssenteret
Akershus universitetssykehus

Camilla F. Skjelbred

Geir J. Braathen

Seksjon for medisinsk genetikk
Avdeling for laboratoriemedisin
Sykehuset Telemark

> Se lederartikkel side 1812

e-tab 1 finnes i Tidsskriftets elektroniske utgaver



Engelsk oversettelse på www.tidsskriftet.no

HOVEDBUDSKAP

Prøver fra 96 pasienter ble dypsekvensert ut fra mistanke om arvelig perifer nevropati

Punktmutasjoner ble identifisert hos 28 pasienter

Dypsekvensering førte i dette materialet til mer enn en dobling av antall genetiske diagnoser sammenliknet med hva en tidligere anvendt metode ville ha gjort

(enkelbaseendringer i DNA) vanligst ved Charcot-Marie-Tooths sykdom og andre arvelige perifere nevropatier. I tradisjonell klinisk diagnostikk er kandidatgener blitt testet sekvensielt med Sanger-sekvensering. Kandidatgenene er blitt valgt ut etter vurdering av klinisk og nevrofysiologisk manifestasjon og familiemønster (15, 16). Sanger-sekvensering er ressurskrevende, og de fleste kliniske laboratorier har kun hatt kapasitet til å teste et fåtall av genene (9, 12, 17). Dette kompliseres ytterligere av genetisk heterogenitet (én fenotype kan forårsakes av forskjellige genotyper) og variabel ekspressivitet (ett gen kan gi forskjellige fenotyper).

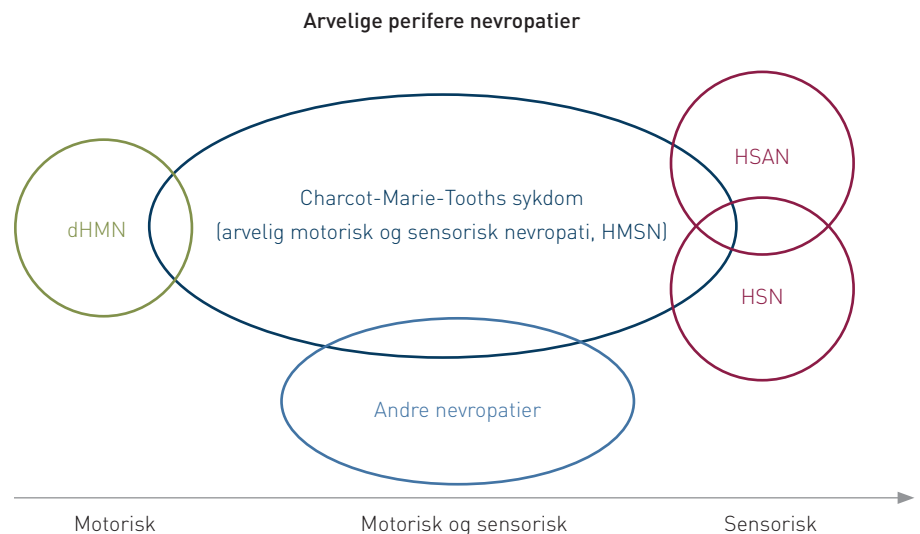
I to norske studier av pasienter med klinisk Charcot-Marie-Tooths sykdom, en av familier i østre Akershus og et klinisk materiale fra Nord-Norge, ble punktmutasjoner undersøkt med Sanger-sekvensering i de henholdsvis seks og sju genene med antatt høyest frekvens (*GJB1*, *MPZ*, *MFN2*, *PMP22*, *LITAF*, *EGR2*, *NEFL*). Punktmutasjoner ble identifisert hos henholdsvis 11 % og 8 % av pasientene (7, 18). Internasjonale studier har vist noe høyere andel av punktmutasjoner i disse genene, 16–20 % (19–21). Vi mener det er behov for en mer effektiv analyse, med kapasitet til å undersøke flere av de aktuelle nevropatigenene. En spesifikk genetisk diagnose kan gi pasienter og pårørende opplysninger om prognose og gjentakelsesrisiko og kan ha betydning for fremtidige genspesifikke behandlingsformer (17, 22).

I en nyere studie ble familiene fra østre Akershus undersøkt for punktmutasjoner i 51 gener forbundet med arvelig nevropati med genpanel-dypsekvensering. Andelen funn av punktmutasjoner økte fra 11 % ved bruk av Sanger-sekvensering i en tidligere studie (7) til 30 % ved bruk av dypsekvensering (6). Internasjonalt tilbyr nå blant annet University College London Hospitals og Aarhus Universitetshospital dypsekvensering av arvelige perifere nevropatier i den kliniske diagnostikken. Foreløpig er det i de fleste forskningsstudier beskrevet enkeltfamilier, det vil si at nytteverdien for pasientgruppen er lite undersøkt i store studier.

Vi har nå gjennomgått resultatene fra genpanel-dypsekvensering av prøver fra de 103 første pasientene analysert i vår klinikk der det var spørsmål om arvelig perifer nevropati. Hensikten var å undersøke om dypsekvenseringsteknologien gir flere positive diagnoser enn tradisjonell metode i en klinisk populasjon av pasienter der det er mistanke om arvelig sykdom.

Materiale og metode

Denne kvalitetssikringsstudien er basert på en retrospektiv gjennomgang av materiale fremskaffet gjennom ordinær praksis ved Seksjon for medisinsk genetik, Sykehuset



Figur 1 Ulike grupper av arvelige perifere nevropatier har overlappende fenotype. dHMN = distal hereditær motorisk nevropati, HSN = hereditær sensorisk og autonomisk nevropati, HSN = hereditær sensorisk nevropati

Telemark. Materialet inkluderer prøver fra alle indekspasienter der det var spørsmål om arvelig perifer nevropati mottatt fra 1.3. 2012 til 1.5. 2014, totalt 103 pasienter.

Prøver ble mottatt etter konsultasjon hos avdelingens genetiker og nevrolog (n = 47) eller tilsendt fra 44 ulike eksterne rekvirenter (n = 56), fordelt som følgende: nevrologisk avdeling (n = 27), privatpraktiserende nevrolog (n = 8), fastlege (n = 8) genetisk avdeling (n = 5), barneavdeling (n = 5), andre (n = 3). For disse pasientene var det spørsmål om CMT1 hos ti, CMT2 hos 16, CMTX (kjønnsbundet) hos tre, ukjent Charcot-Marie-Tooths sykdom hos 44 og nevropati hos 30.

Flesteparten av pasientene hadde bosted på Østlandet, nærmere spesifisert Vestfold (n = 21), Oslo (n = 18), Akershus (n = 12), Buskerud (n = 12), Telemark (n = 12), Østfold (n = 6), Oppland (n = 5) og Hedmark (n = 3). 14 pasienter bodde i andre deler av Norge. Pasienter fra vår tidligere studie (6) kan potensielt være med i materialet, men vi antar at dette i så fall gjelder svært få.

Dataene er anonymisert, og studien er godkjent av Norsk samfunnsvitenskapelig datatjeneste (NSD), som innvilget fritak fra informert samtykke. Metoden har vært standard diagnostisk tilbud ved sykehuset i den aktuelle perioden, det er derfor ikke søkt om godkjenning fra regional etisk komité for denne studien. Pasientene har tilgang på informasjon om metoden via analysesvar sendt til rekvirerende lege og på sykehusets nettsider.

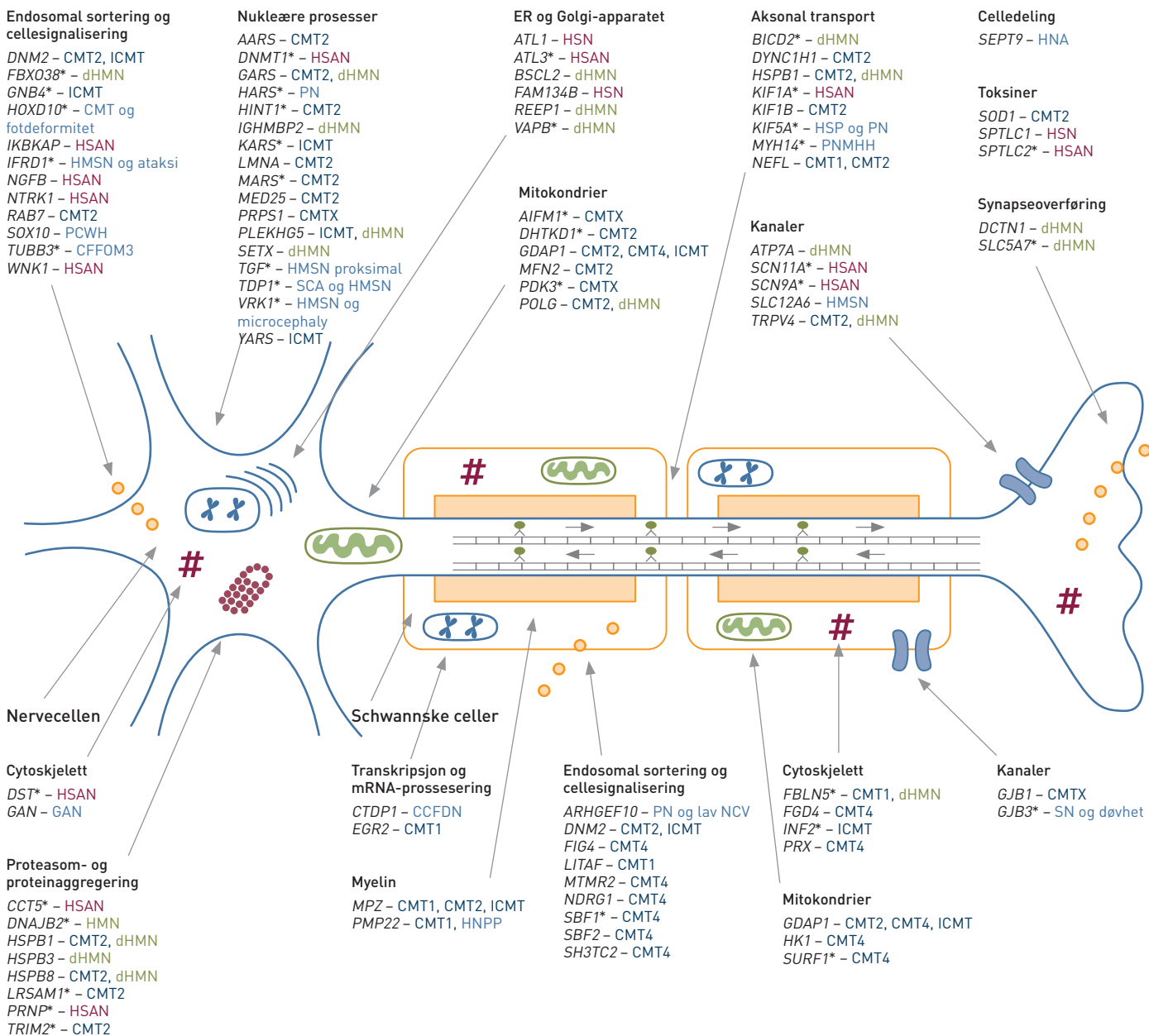
Alle pasienter ble først undersøkt for duplikasjon/deleksjon av *PMP22*, hvis ikke allerede utført, med metoden Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA). Pasienter uten funn ble testet videre med dypsekven-

sering. I forkant av prøveoppbeiringen ble det designet et genpanel for fysisk anriking og dypsekvensering bestående av 52 gener assosiert med perifer nevropati. Genlisten finnes i figur 2. DNA ble ekstrahert fra blodprøver, prøveoppbeiringen ble utført med standard protokoll fra Illumina (Illumina Inc, San Diego, CA). Ytterligere beskrivelse av laboratoriemetoder og bioinformatisk analyse er publisert tidligere (6).

Variantene ble klassifisert som følger: klasse 5 – sikker patogen, klasse 4 – sannsynlig patogen, klasse 3 – usikker betydning, klasse 2 – sannsynlig nøytral variant, klasse 1 – sikker nøytral variant. Klassifiseringen av variantene er en delvis manuell prosess, hvor man undersøker normalfrekvenser, konservering hos andre organismer, data fra interne kontrollpersoner samt tidligere publisert litteratur. Varianter klassifisert i klasse 4 og klasse 5 blir rapportert til pasienten som henholdsvis sannsynlig og sikker patogen. Klasse 3-varianter blir ikke rapportert med full nomenklatur, men som variant av usikker betydning. For klasse 3 blir det ofte etterspurt prøve fra familiemedlemmer for å forsøke å avklare variantens betydning. Pasienter med klasse 3–5-varianter blir anbefalt genetisk veiledning, hvor de kliniske funn hos pasienten vurderes mot de genetiske funnene og usikre varianter blir forsøkt avklart. Klasse 1- og klasse 2-varianter blir ikke rapportert til pasienten.

Klassifisering av sekvensvariantene er delvis basert på skjønn, men som utgangspunkt kreves det for klassifisering i klasse 5 at varianten skal ha blitt rapportert som patogen i minst to uavhengige tilfeller. I tillegg skal funksjonelle studier ha vist effekt på proteinstruktur/-funksjon, og genotype og

Nervecellen



Figur 2 Gener assosiert med arvelig perifer neuropati, deres assosierte fenotyper og antatte patogene mekanismer (6, 12–14). Gener merket med stjerne er ikke inkludert i genpanelet beskrevet i det aktuelle materialet, men ble inkludert i det diagnostiske genpanelet ved vår avdeling fra høsten 2014. Fargekoder for fenotype som i figur 1. DNM2 og GDAP1 er oppført dobbelt ettersom de har funksjon både i nervecellen og i schwannske celler. Forkortelser: CCFDN = kongenital katarakt, ansiktsdysmorfisme og neuropati, CFFOM = fibrose av ekstraokulære muskler, kongenital, CMT = Charcot-Marie-Tooths sykdom, CMTX = Charcot-Marie-Tooths sykdom, kjønnsbundet, dHMN = distal hereditær motorneuropati, ER = endosomalt retikulum, GAN = giant aksonal neuropati, HMSN = hereditær motorisk og sensorisk neuropati, HNA = hereditær nevralgisk amyotrofi, HNPP = hereditær neuropati med trykkbetingede lammelser, HSN = hereditær sensorisk og autonomisk neuropati, HSN = hereditær sensorisk neuropati, HSP = hereditær spastisk paraparese, ICMT = intermediær Charcot-Marie-Tooths sykdom, NCV = nerveledningshastighet, PCWH = perifer demyeliniserende neuropati, sentral dysmyelinering, Waardenburgs syndrom og Hirschsprungs sykdom, PN = perifer neuropati (gjelder gener som ikke er blitt spesifisert i en spesifikk klasse), PNMHH = perifer neuropati, myopati, heshet og hørselstap, SCA = spinocerebellar ataksi, SN = sensorisk neuropati (gjelder gener som ikke er blitt spesifisert i en spesifikk klasse)

fenotype hos pasienten skal være i overensstemmelse med tidligere rapportert litteratur. Varianter klassifisert i klasse 4 er ofte rapportert som patogen i ett tidligere tilfelle eller plassert i nærheten av andre patogene varianter. Flere detaljer finnes i e-tabell 1.

Klassifiseringen er videre basert på veiledende kriterier for klassifisering fra Association for Clinical Genetic Science (23). Ytterligere informasjon om klassifisering av pasientene i materialet kan fås ved henvendelse til forfatterne.

Alle varianter i klasse 4 og klasse 5 ble verifisert ved Sanger-sekvensering. Eventuelle familiemedlemmer ble ofte undersøkt med Sanger-sekvensering for varianter i klasse 3–5.

Metoden er akkreditert etter ISO 15189.

Resultater

Materialet inkluderte 55 kvinner (53 %) og 48 menn (47 %). Gjennomsnittsalderen var 48 år (SD 20) ved prøvemottak.

I forkant av dypsekvenseringen ble sju av pasientene (7%) diagnostisert med en duplikasjon eller delesjon av *PMP22*-genet ved MLPA-metoden. Dypsekvensering av 52 perifer nevropati-gener ble utført for de resterende 96 pasientene. Alle 96 prøver kom innenfor vårt akkrediterte kvalitetsmål. I gjennomsnitt var 99,1 % (SD 0,9) av alle aktuelle nukelotider dekket mer enn 30 ganger.

Av 96 prøver som ble dypsekvensert, klassifiserte vi ni varianter (9%) som sikker patogene, 19 (18%) som sannsynlig patogene og ti varianter (10%) ble tolket til å ha usikker betydning. Pasientene som hadde variantene sikker patogen og sannsynlig patogen fikk beskjed om dette. Totalt fikk altså 35 av pasientene (34%) en genetisk diagnose – fordelt på 15 forskjellige gener, hvorav 28 av disse (27%) var punktmutasjoner identifisert ved dypsekvenseringen (tab 2). En av pasientene hadde patogene varianter i to gener.

Diskusjon

Resultatene fra denne studien viser at en genetisk årsak til mistenkt arvelig perifer nevropati ble funnet hos 35 av de 103 pasientene. Sju hadde duplikasjon/delesjon av *PMP22*, mens 28 pasienter (27%) hadde sikre og sannsynlig patogene punktmutasjoner identifisert ved dypsekvensering. Tilsvarende ville Sanger-sekvensering av sju gener, som tradisjonelt ville ha blitt utført hos oss (begrenset av kapasiteten), gitt en funnprosent av patogene punktmutasjoner på 12% i dette materialet (tab 2). I vår tidligere studie av familier med klinisk Charcot-Marie-Tooths sykdom, utført med samme laboriemetode, var funnandelen av punktmutasjoner 30% (6).

Materialet i denne studien består av personer som er henvist til genetisk utredning og er dermed betydelig selektert. Resultatene må derfor tolkes med forsiktighet. Avdelingens genetiker og nevrolog henviste 46% av pasientenes prøver (n = 47). Prøvene til de øvrige pasientene i studien (n = 56) er rekvirert av 44 ulike rekvirenter. De fleste av disse 86% (n = 48) var rekvirert fra spesialhelse-tjenesten, hvorav 73% (n = 35) var rekvirert av nevrologer. Dette sikrer en populasjon som er grundig utredet på forhånd for å utelukke eventuelle differensialdiagnoser. Pasientene med prøver rekvirert av fastleger hadde i de fleste tilfeller vært til undersøkelse ved en nevrologisk avdeling i forkant, og diagnosen var satt der.

Per i dag er det to sentre i Norge der man undersøker punktmutasjoner i forbindelse med arvelige perifere nevropatier – Universitetssykehuset Nord-Norge og Sykehuset

Tabell 2 Varianter klassifisert som sikker og sannsynlig patogen påvist ved dypsekvensering av prøver sendt til Seksjon for medisinsk genetikk, Sykehuset Telemark, med spørsmål om arvelig perifer nevropati (N = 103). Disse er her sammenstilt med resultater fra andre norske studier. Merk at studiene inkluderer forskjellige populasjoner og har ulike design. For eksempel ble det i de tidligere studiene inkludert pasienter der det var mistanke om Charcot-Marie-Tooths sykdom, mens det i den aktuelle studien er inkludert pasienter der det er mistanke om arvelige perifere nevropatier generelt. Studiene kan derfor ikke sammenliknes direkte. Følgende gener var uten funn av punktmutasjoner og er derfor ikke i tabellen: *ATP7A*, *CTDP1*, *DCTN1*, *EGR2*, *FAM134B*, *FIG4*, *GAN*, *GARS*, *GDAP1*, *HK1*, *HSPB3*, *HSPB8*, *IKBKAP*, *LITAF*, *MED25*, *MTMR2*, *NDRG1*, *NGF*, *NTRK1*, *PLEKHG5*, *PMP22*, *POLG*, *PRPS1*, *PRX*, *RAB7*, *SBF2*, *SEPT9*, *SLC12A6*, *SOX10*, *SPTLC1*, *TRPV4*, *WNK1*, *YARS*

Gennavn	Braathen og medarbeidere 2011 (7) N = 81 Prosent (antall)	Østern og medarbeidere 2013 (18) ¹ N = 435 Prosent (antall)	Høyer og medarbeidere 2014 (6) ^{1,2} N = 81 Prosent (antall)	Denne studien ¹ N = 103 Prosent (antall)
<i>PMP22</i> -duplikasjon ³	14 (11)	6 (26) ⁴	14 (11)	2 (2) ⁴
<i>PMP22</i> -delesjon ³	–	–	–	5 (5)
<i>GJB1</i>	6 (5) ⁵	5 (20)	7 (6)	7 (7)
<i>SH3TC2</i>	–	–	5 (4)	5 (5)
<i>MFN2</i>	4 (3) ⁵	2 (7)	5 (4)	2 (2)
<i>SOD1</i>	–	–	1 (1)	3 (3)
<i>HSPB1</i>	–	–	1 (1)	2 (2)
<i>MPZ</i>	1 (1)	1 (6)	1 (1)	2 (2)
<i>DNM2</i>	–	–	1 (1)	1 (1)
<i>LMNA</i>	–	–	2 (2)	0 (0)
<i>AARS/ATL1</i> ⁶	–	–	0 (0)	1 (1)
<i>ATL1</i>	–	–	0 (0)	1 (1)
<i>ARHGEF10</i>	–	–	1 (1)	0 (0)
<i>BCL2</i>	–	–	0 (0)	1 (1)
<i>DYNC1H1</i>	–	–	1 (1)	0 (0)
<i>FGD4</i>	–	–	0 (0)	1 (1)
<i>IGHMBP2</i>	–	–	0 (0)	1 (1)
<i>KIF1B</i>	–	–	1 (1)	0 (0)
<i>MPZ/MFN2</i> ³	–	0 (1)	1 (1)	0 (0)
<i>NEFL</i>	–	0 (0)	0 (0)	1 (1)
<i>REEP1/SETX</i> ⁶	–	–	1 (1)	0 (0)
Sum mutasjoner	25 (20)	14 (60)	44 (36)	34 (35)
Sum punktmutasjoner	11 (9)	8 (33)	30 (24)	27 (28)

¹ Kun varianter antatt sikker og sannsynlig patogen er oppført

² Studien er basert på samme materiale som Braathen og medarbeidere, 2011

³ Duplikasjon eller delesjon undersøkt med Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA)

⁴ Andelen kan være kunstig lav, da flere pasienter kan ha vært testet for *PMP22*-duplikasjon/delesjon før henvisning og dermed ikke inkludert i materialet

⁵ Antall er endret sammenliknet med originalartikkel etter kommunikasjon med forfatter (G.J. Braathen)

⁶ Patogene varianter funnet i to forskjellige gener

Telemark. Vi kan dermed ikke utelukke at andelen mutasjoner funnet i gener tradisjonelt undersøkt er falskt lav i denne studien (12%). Pasienter kan ha blitt ekskludert ved funn i disse genene tidligere, slik at vi heller har fått tilsendt prøver fra pasienter der tidligere genetisk undersøkelse har vært negativ. Noe som imidlertid taler imot dette, er at punktmutasjoner i de sju genene tradisjonelt undersøkt var høyere (12%) i denne studien enn i studien fra Nord-Norge (8%) (18). Både i denne studien og i studien fra Nord-Norge er pasientene rekruttert fra et klinisk materiale (18). Men i studien fra østre Akershus er pasientene rekruttert fra den generelle befolkningen (6). De studiene der man har utført dypsekvensering, er derfor ikke direkte sammenliknbare.

Gener som tradisjonelt er regnet som sjelden årsak til arvelig perifer nevropati og som dermed ikke er blitt Sanger-sekvensert (f.eks. *SH3TC2*, *HSPB1* og *SOD1*), var relativt vanlige både i dette utvalget og i materialet fra østre Akershus (6), som vist i tabell 2. Andre gener er blitt rutinemessig Sanger-sekvensert (f.eks. *EGR2* og *LITAF*), men det er foreløpig ikke blitt påvist patogene mutasjoner i disse genene – verken i studier i Norge (tab 2) eller i studier Spania (19). Spekteret av involverte gener var stort både i denne og i den tidligere studien (6). Ved undersøkelse av stadig flere pasienter vil det trolig bli påvist mutasjoner i et enda større spekter av gener. Dette øker, slik vi ser det, fordelene ved bruk av dypsekvensering. Sammenliknet med utenlandske studier, der analysene er utført med Sanger-sekvensering (19–21), er funnprosenten i de norske studiene lavere. Årsaken til dette er ikke åpenbar, men muligens er til nå oppdagede gener mer relevante i Skandinavia, eller de utenlandske pasientpopulasjonene kan være mer selektert.

Etter introduksjon av dypsekvensering har antallet gener assosiert med heterogene sykdommer økt raskt. Genpanelet brukt i denne studien har derfor ikke med alle de 90 genene som per dags dato er assosiert med perifere nevropatier. Et genpanel for dypsekvensering kan imidlertid enkelt oppdateres i en nyere versjon.

Den tekniske kvaliteten av dypsekvensering i denne studien, med > 99% dekningsgrad ved 30 gangers dybde, var nesten like god som tidligere rapportert for Sanger-sekvensering (nøyaktighet > 99,9%) (24). Ved sekvensering av mange gener er imidlertid dypsekvensering betraktelig raskere. En annen fordel er, slik vi ser det, at helhetsbildet av flere varianter blir vurdert samtidig slik at man kan oppdage patogene varianter i flere gener. Ved dypsekvensering av et genpanel er det, i motsetning til ved eksom-sekvensering, ikke mulig å gjøre utilsiktede funn, siden man kun undersøker gener som er relevante for sykdommen.

Tidligere har man trodd at rundt 90% av genfeil funnet ved Charcot-Marie-Tooths sykdom finnes i kun fire gener (*PMP22*-duplikasjon/delesjon eller punktmutasjoner i *GJB1*, *MPZ* og *MFN2*) (18–20). Det følger derfor at disse som regel er blitt analysert først dersom ikke andre tilleggsopplysninger er oppgitt, som beskrevet i norske retningslinjer (15, 16). I nyere norske studier, inkludert denne, ser dette bildet ikke ut til å stemme når langt flere av genene assosiert med perifer nevropati undersøkes (6). Dessuten har mutasjoner i gener som har vært ansett som sjeldne årsaker til Charcot-Marie-Tooths sykdom vært mer høyfrekvente enn noen av de antatt vanligste genene. Ettersom populasjonene og seleksjonsmetodene er forskjellige i ulike studier, kan det imidlertid være vanskelig å sammenlikne resultatene og trekke bastante konklusjoner.

Likevel mener vi at det at vi finner såpass mange flere mutasjoner ved å undersøke flere gener, viser at det er behov for å revurdere dagens praksis. Anbefalingene fra internasjonale eksperter på perifere nevropatier enes nå om at den mest lønnsomme teststrategien er dypsekvensering, etter eksklusjon av *PMP22*-duplikasjon/delesjon og eventuelt Sanger-sekvensering av *GJB1* (12, 22).

Vi takker Hilde Tveitan Hilmarson og Anne Signe Bø for verifisering av varianter med Sanger-sekvensering.

Helle Høyer (f. 1981)

er ph.d. og forsker på genetikk, dypsekvensering og arvelig perifer nevropati. Forfatter har fylt ut ICMJE-skjemaet og oppgir ingen interessekonflikter.

Øyvind Løvold Busk (f. 1982)

er ph.d., bioinformatiker og fagansvarlig for bioinformatikk. Forfatter har fylt ut ICMJE-skjemaet og oppgir ingen interessekonflikter.

Øystein Lunde Holla (f. 1978)

er ph.d., overingeniør og fagansvarlig for dypsekvensering. Forfatter har fylt ut ICMJE-skjemaet og oppgir ingen interessekonflikter.

Linda Strand (f. 1968)

er ph.d. og ansvarlig for utvikling og kvalitet. Hun er fagbedømmer hos Norsk Akkreditering. Forfatter har fylt ut ICMJE-skjemaet og oppgir ingen interessekonflikter.

Michael Bjørn Russell (f. 1961)

er ph.d., dr.med., dr.sci., professor, overlege i neurologi og avdelingssjef for Head and Neck Research Group. Forfatter har fylt ut ICMJE-skjemaet og oppgir ingen interessekonflikter.

Camilla Furu Skjelbred (f. 1967)

er ph.d. og seksjonsleder. Forfatter har fylt ut ICMJE-skjemaet og oppgir ingen interessekonflikter.

Geir Julius Braathen (f. 1958)

er ph.d., spesialist i neurologi og i medisinsk genetikk og seksjonsoverlege. Forfatter har fylt ut ICMJE-skjemaet og oppgir ingen interessekonflikter.

Litteratur

1. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004; 431: 931–45.
2. Koboldt DC, Steinberg KM, Larson DE et al. The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell* 2013; 155: 27–38.
3. Singleton AB. Exome sequencing: a transformative technology. *Lancet Neurol* 2011; 10: 942–6.
4. Sikkema-Raddatz B, Johansson LF, de Boer EN et al. Targeted next-generation sequencing can replace Sanger sequencing in clinical diagnostics. *Hum Mutat* 2013; 34: 1035–42.
5. Lemke JR, Riesch E, Scheurenbrand T et al. Targeted next generation sequencing as a diagnostic tool in epileptic disorders. *Epilepsia* 2012; 53: 1387–98.
6. Høyer H, Braathen GJ, Busk ØL et al. Genetic Diagnosis of Charcot-Marie-Tooth Disease in a Population by Next-Generation Sequencing. *BioMed Research International* 2014; 2014: 13.
7. Braathen GJ, Sand JC, Lobato A et al. Genetic epidemiology of Charcot-Marie-Tooth in the general population. *Eur J Neurol* 2011; 18: 39–48.
8. Skre H. Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *Clin Genet* 1974; 6: 98–118.
9. Pareyson D, Marchesi C. Diagnosis, natural history, and management of Charcot-Marie-Tooth disease. *Lancet Neurol* 2009; 8: 654–67.
10. Harding AE, Thomas PK. The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain* 1980; 103: 259–80.
11. Davis CJ, Bradley WG, Madrid R. The peroneal muscular atrophy syndrome: clinical, genetic, electrophysiological and nerve biopsy studies. I. Clinical, genetic and electrophysiological findings and classification. *J Genet Hum* 1978; 26: 311–49.
12. Rossor AM, Polke JM, Houlden H et al. Clinical implications of genetic advances in Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Rev Neurol* 2013; 9: 562–71.
13. Timmerman V, Strickland AV, Züchner S. Genetics of Charcot-Marie-Tooth (CMT) Disease within the Frame of the Human Genome Project Success. *Genes (Basel)* 2014; 5: 13–32.
14. Kaplan JC, Hamroun D. The 2014 version of the gene table of monogenic neuromuscular disorders (nuclear genome). *Neuromuscul Disord* 2013; 23: 1081–111.
15. Senter for medisinsk genetikk og molekylærmedisin, Haukeland universitetssykehus. Norsk portal for medisinsk-genetiske analyser. www.genetikportal.no/default.asp?act=tilst&TglID=1&katID=19&TiID=527 (1.9.2014).
16. Norsk Elektronisk Legehåndbok. Norsk neurologisk forening. *Nevrologiske prosedyrer*. <http://nevro.legehåndboka.no/nevromuskulere-sykdommer/tester/teststrategi-ved-cmt-41917.html> (1.10.2015).
17. Reilly MM, Shy ME. Diagnosis and new treatments in genetic neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009; 80: 1304–14.
18. Østern R, Fagerheim T, Hjellnes H et al. Diagnostic laboratory testing for Charcot Marie Tooth disease (CMT): the spectrum of gene defects in Norwegian patients with CMT and its implications for future genetic test strategies. *BMC Med Genet* 2013; 14: 94.

>>>

19. Saporta AS, Sottile SL, Miller LJ et al. Charcot-Marie-Tooth disease subtypes and genetic testing strategies. *Ann Neurol* 2011; 69: 22–33.
20. Murphy SM, Laura M, Fawcett K et al. Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes and guidelines for genetic testing. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012; 83: 706–10.
21. Sivera R, Sevilla T, Vilchez JJ et al. Charcot-Marie-Tooth disease: genetic and clinical spectrum in a Spanish clinical series. *Neurology* 2013; 81: 1617–25.
22. Harel T, Lupski JR. Charcot-Marie-Tooth disease and pathways to molecular based therapies. *Clin Genet* 2014; 86: 422–31.
23. Wallis J, Payne S, McAnulty C et al. Practice Guidelines for the Evaluation of Pathogenicity and the Reporting of Sequence Variants in Clinical Molecular Genetics, 2013. www.acgs.uk.com/media/774853/evaluation_and_reporting_of_sequence_variants_bpgs_june_2013_-_finalpdf.pdf [1.10.2015].
24. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 1135–45.

Mottatt 5.9. 2014, første revisjon innsendt 17.3. 2015, godkjent 1.10. 2015. Redaktør: Are Brean.