

Heterogenność dziedzicznych neuropatii ruchowo-czuciowych w świetle badań genetycznych



LS 268

H 4029

Rozprawa habilitacyjna
Andrzej Kochański
Zespół badawczo- leczniczy chorób nerwowo-mięśniowych
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego
Polskiej Akademii Nauk

Warszawa 2005

moim Nauczycielom:

*Profesor Irenie Hausmanowej-Petrusewicz oraz Profesor Hannie Jędrzejowskiej
dedykuję.*

Na pracę składają się następujące publikacje autora:

1. A. Kochański , H. Drac , D. Kabzińska , I. Hausmanowa-Petrusewicz The novel mutation, Thr65Ala, in the MPZ gene in the patient with Charcot-Marie-Tooth type 1B with focally folded myelin. *Neuromuscular Disorders*, 2004; 14: 229-232.
2. A. Kochański, M. Kennerson, M. Kawulak, B. Ryniewicz, K. Rowińska Marcińska, G. Walizada, A. Nowakowski, I. Hausmanowa-Petrusewicz, G.A. Nicholson. Mild early onset axonal Charcot-Marie-Tooth disease not linked to other axonal Charcot-Marie-Tooth loci. *Neurology*, 2005; 64(3): 533-535.
3. A. Kochański, H. Drac, D. Kabzińska , B. Ryniewicz , K. Rowińska-Marcińska , A. Nowakowski , I. Hausmanowa-Petrusewicz. A novel MPZ gene mutation in congenital neuropathy with hypomyelination *Neurology* 2004; 62: 2122-2123.
4. A. Kochański, H. Drac, H. Jędrzejowska, I. Hausmanowa-Petrusewicz. „ Focally folded myelin in Charcot-Marie-Tooth type 1B disease is associated with Asn131Lys mutation in Myelin Protein Zero gene. *European Journal of Neurology* 2003; 10: 547-549.
5. A. Kochański , D. Kabzińska . Molecular genetics analysis of the GJB1 gene - study of six mutations. *Journal of Applied Genetics*, 2004 45(1), 95-100.
6. A. Kochański, D. Kabzinska, H. Drac, B. Ryniewicz, K. Rowinska-Marcinska, I. Hausmanowa-Petrusewicz. Early onset Charcot-Marie-Tooth type 1B disease caused by a novel Leu190fs mutation in the Myelin Protein Zero gene. *European Journal of Paediatric Neurology*, 2004; 8(4): 221-224.
7. A. Kochański, D. Kabzinska Two de novo Ser72Leu mutations In the peripheral Myelin Protein 22 gene In two Polish patients. *Acta Biochimica Polonica*, 2004; 51(4): 1047-1050.

Założenia pracy

Praca podejmuje problem badań prowadzonych w ostatnich 8 latach przez autora nad podłożem genetycznym heterogennej grupy chorób kręgu Charcot –Marie-Tooth (CMT).

Problematyka badań nad podłożem genetycznym chorób kręgu CMT jest złożona. Wśród głównych kierunków badań w tej dziedzinie prowadzonych aktualnie na świecie wymienić można mapowanie nowych *loci* i genów, identyfikację mutacji w znanych genach oraz poszukiwanie korelacji genotypowo fenotypowych.

Badania patogenności mutacji, choć posiadają już pewną tradycję, wydają się być marginalizowane w stosunku do innych kierunków badań. Stąd problem ten został potraktowany nieco szerzej w niniejszej pracy. Na koniec omówiono zagadnienie wyboru prawidłowego modelu diagnostyki genetycznej CMT i poradnictwa genetycznego w tej grupie chorób. Stosowany dotychczas model diagnostyczny oparty na badaniu najczęstszej mutacji w CMT tj. duplikacji w regionie 17p11.2-p12 ukształtował się na początku lat 90-tych i wymaga aktualizacji z uwagi na wprowadzenie nowych technik badania DNA jak również znaczne poszerzenie wiedzy o podłożu genetycznym chorób kręgu CMT.

Układ pracy

Praca niejako scala wyniki badań genetycznych nad podłożem molekularnym chorób kręgu CMT w polskich rodzinach, prowadzonych przez autora w latach 1996-2004. Z natury samej heterogenności genetycznej chorób kręgu CMT wynika przedstawiona w pracy różnorodność zagadnień. W istocie jednak praca prezentuje główne kierunki badań w oparciu o badania własne. Wyniki tych badań zostały opublikowane w 7 artykułach. Wydaje się że powtarzanie treści artykułów, w zmienionej- na potrzeby pracy formie -jest niepotrzebne, stąd poszczególne zagadnienia zostały potraktowane jako komentarz do prac im poświęconych.

Spis treści

I. Wstęp

1. Heterogenność chorób kręgu CMT w opisach XIX wiecznych neurologów
2. Główne kierunki badań w chorobach kręgu CMT
3. Heterogenność genetyczna chorób kręgu CMT

II Zagadnienia

1. Nowy typ choroby CMT2 o dziedziczeniu autosomalnym dominującym
2. Mutacje w genie *Cx32*, *NEFL* i *PMP22*- problem patogenności
3. Mutacje w genie *MPZ* i spektrum fenotypowe chorób kręgu CMT
4. Mutacje w genie *LITAF*- czy istnieje fenotyp CMT1C ?
5. Diagnostyka molekularna chorób kręgu CMT- w poszukiwaniu optymalnego modelu
6. Znaczenie badań genetycznych w chorobach kręgu CMT
7. Przyszłość badań w chorobach kręgu CMT.

III. Podsumowanie

1. Heterogenność chorób kręgu CMT w opisach XIX wiecznych neurologów

W 1865 r. opat Grzegorz Mendel z zakonu Augustianów w czeskim Brnie opublikował wyniki badań nad krzyżówkami grochu jadalnego „*Pisum sativum*” pod tytułem „*Über die Pflanzen Hybriden*”.

Zaledwie 21 lat później Profesor Jean Martin Charcot wraz ze swym uczniem Pierre Marie w Paryżu opisali pięcioro chorych u których stwierdzili postępujący zanik mięśni „*D' Atrophie musculaire progressive*”. Już wtedy autorzy pracy zwrócili uwagę na rodzinny charakter choroby „*Ce qui'il y a de particulièrement intéressant dans les deux observations qui précèdent, c'est ce fait que l'affection s'est montrée chez deux frères avec des caracteres parfaitement analogues chez tous deux*” [1].

Już w 1889 r. angielski lekarz Herringham zwrócił uwagę na możliwość istnienia sprzężonej z płcią odmiany choroby, opisanej w 1886 r. przez Charcot i Marie [2].

Co interesujące, przez 102 lata tj. do momentu odkrycia genu *Cx32*, którego mutacje stwierdza się u chorych na sprzężoną z płcią w sposób dominujący odmianę choroby CMT poddawano w wątpliwość istnienie tej formy.

W 1893 r. J. Dejerine i J. Sottas opisali kolejną odmianę choroby opisanej 18 lat wcześniej przez Charcot i Marie, uzasadniając w ten oto sposób odrębność schorzenia:

„*Il est certain que les cas que nous rapportons dans notre travail constituent des exemples d'une affection nouvelle, non encore clasée et qui se distingue ettement au point de vue clinique et anatomo-pathologique des cas étudiés par Eulenburg, Eichhorst, Friedreich, Ormerod, Hammond, Charcot et Marie, Brossard, Tooth, Hoffmann, Debreuilh, etc.*

Ils n'ont de commun, en effet, avec ces derniers, que l'atrophie musculaire et en different, ainsi que nous l'avons indiqué, par toute une série de symptoms donnant un cachet special à l'affection que nous étudions ici, et par la nature même des lésions – absence d'hypertrophie des nerfs” [3].

W 1926 r. Gustav Roussy wraz z Gabrielle Lévy opisali siedmiu chorych w czteropokoleniowej rodzinie, których scharakteryzowali następująco:

”*des troubles de la marche et de la station, l'existence d'un pied bot, d'une aréflexie-tendineuse généralisée et, parfois, d'une légère maladresse des mains, nos partia cliniquement démontrée*” [4].

Istnienie choroby Roussy-Lévy (RLS) jako odrębnej jednostki nozologicznej było kwestionowane aż do 1999 r., kiedy to u chorych pochodzących z rodziny opisanej przez Roussy i Lévy zidentyfikowano mutację *Asn131Lys* w genie *MPZ* [5]. W świetle przedstawionych faktów można zauważyć że różnorodność (heterogenność) form w chorobach kręgu Charcot-Marie-Tooth była już znana XIX- wiecznym neurologom. Nieznane było jednak podłoże genetyczne obserwowanej różnorodności.

Na pierwsze wyjaśnienia trzeba było czekać prawie 100 lat, kiedy to w 1982 r. Bird i wsp. po raz pierwszy ustalili sprzężenie genetyczne jednej z odmian choroby CMT z *locus 1q21-q23* [6].

2. Główne kierunki badań genetycznych w dziedzicznych neuropatiach ruchowo- czuciowych

U podłoża genetycznych neuropatii ruchowo-czuciowych leżą mutacje w 30 genach zmapowanych w chromosomach autosomalnych i na chromosomie X. Pierwszym etapem badań genetycznych nad podłożem molekularnym określonej neuropatii jest wyodrębnienie fenotypu na który składa się zestaw cech klinicznych, elektrofizjologicznych i morfologicznych właściwych określonej formie. Choć na obraz kliniczny i elektrofizjologiczny określonej neuropatii składa się zwykle zestaw podobnych cech (zanik mięśni odsiebnych kończyn górnych i dolnych), to różnice pomiędzy poszczególnymi typami CMT wynikają z natężenia, kolejności wystąpienia czy też wieku, w którym pojawiły się pierwsze objawy choroby.

W niektórych neuropatiach wyodrębnienie fenotypu jest łatwe. Dobrym tego przykładem wydaje się być tzw. neuropatia z olbrzymimi aksonami tj. Giant axonal neuropathy (GAN) [MIM 256850]. GAN rozpoczyna się zwykle około 5 r.ż. Większość dzieci z GAN ma kręcone włosy. Chorzy stają się niesprawni pomiędzy 10 a 30 r.ż. [7]. Najbardziej charakterystyczną cechą GAN, obserwowaną w biopsji nerwu łydkowego, jest obecność tzw. olbrzymich aksonów w których stwierdza się agregaty neurofilamentów [8].

Charakterystyczny fenotyp neuropatii GAN sprawił, że już w 1997 r. określono sprzężenie genetyczne GAN z locus 16q24, a zaledwie trzy lata później zidentyfikowano mutacje w genie *gigaxoniny* [9].

Wyodrębnienie fenotypu neuropatii jako początek badań genetycznych nie jest jednak zawsze tak łatwe jak w przypadku neuropatii GAN.

Inna z neuropatii genetycznie uwarunkowanych, choroba CMT2A (MIM 118210) nie posiada żadnych wyróżników kliniczno- elektrofizjologicznych. Jedynym wyróżnikiem choroby CMT2A jest więc sprzężenie genetyczne z locus 1p35-36 [10]. W 2001 zidentyfikowano mutację Q98L w genie *KIF1Bβ* w jednej z japońskich rodzin w której uprzednio wykazano sprzężenie genetyczne z locus 1p35-p36 [11]. Pomimo intensywnych badań, w okresie od 2001 do 2004 r. nie wykryto jednak żadnej nowej mutacji w genie *KIF1Bβ*. Co więcej, analiza sekwencji 14 genów zlokalizowanych w regionie 1p35-p36 wykazała istnienie mutacji w genie *Mfn2* kodującym białko mitofuzyny 2 [12].

Choć udało się dotychczas zidentyfikować 5 mutacji w genie *Mfn2* nie można jednoznacznie stwierdzić, że jedyną przyczyną choroby CMT2A są mutacje w genie *Mfn2*. Być może choroba CMT2A nie jest homogenna genetycznie i jest spowodowana co najmniej mutacjami w dwóch genach w regionie 1p35-p36? Być może gen *KIF1Bβ* pełni rolę modyfikatora w chorobie CMT2A?

Kontrowersje na temat roli genów *KIF1Bβ* i *Mfn2* w patogenezie choroby CMT2A niejako „odślaniają” problem patogenności mutacji w chorobach kręgu Charcot-Marie-Tooth. Trudno uznać, że jedyna dotychczas wykryta mutacja Q98L w genie *KIF1Bβ* nie jest mutacją patogenną, gdyż spełnia większość znanych kryteriów patogenności mutacji. Mutacja Q98L segreguje z fenotypem choroby CMT2A w badanej rodzinie, mutacji tej nie stwierdza się u zdrowych członków rodziny. Ponadto u myszy transgenicznnych z mutacją Q98L stwierdzono objawy choroby przypominającej CMT2A u człowieka. W badaniach *in vitro* prowadzonych w hodowli komórkowej stwierdzono akumulację uszkodzonego mutacją Q98L białka KIF1Bβ wokół jądra komórkowego [11]. Jednak brak mutacji genu *KIF1Bβ* w rodzinach CMT2A- wobec istnienia mutacji w genie *Mfn2* nie przemawia za patogennym charakterem mutacji Q98L. W

odróżnieniu od dobrze udokumentowanej mutacji Q98L w genie *KIF1B*, efekt większości mutacji w innych genach u chorych z CMT nie został określony w badaniach na zwierzętach transgenicznych. Zaledwie w przypadku nielicznych mutacji w genach *MPZ*, *NEFL* i *Cx32* przeprowadzono analizę funkcjonalną w hodowlach komórkowych. W przypadku innej mutacji Thr118Met w genie *PMP22* wyniki badań funkcjonalnych przemawiających za patogennością tej substytucji pozostają w sprzeczności z występowaniem mutacji Thr118Met u zdrowych ludzi [13]. Znaczenie analizy funkcjonalnej w ocenie patogenności mutacji bywa jednak przeceniane, a jej fałszywie dodatnie wyniki mogą być skutkiem nieprawidłowo dobranego modelu eksperymentalnego lub trudności w rozróżnieniu pomiędzy patologią a wariantem genotypowym [14]. W świetle przedstawionych faktów problem patogenności mutacji w chorobach kręgu Charcot-Marie-Tooth nabiera szczególnego znaczenia.

Jednym z kryteriów oceny patogenności mutacji jest stwierdzenie korelacji pomiędzy genotypem określonej formy choroby CMT a fenotypem. Stwierdzenie, że ta sama mutacja genu koreluje z podobnymi do siebie formami CMT przemawia za patogennością mutacji.

Mutacja Thr124Met w genie *MPZ* została opisana u licznych chorych z aksonalną odmianą choroby CMT2 charakteryzującą się późnym początkiem (6 dekada życia) oraz niedosłuchem [15].

Inna z mutacji, Ser72Leu w genie *PMP22* została opisana u chorych z ciężką wczesnodziecięcą formą choroby CMT1 [16]. Mutacja Asn131Lys w genie *MPZ* została opisana u chorych, których stwierdzono fenotyp tzw. ogniskowo pofałdowanej mieliny [17].

Niestety brak wyników badań dodatkowych w większości mutacji u chorych z fenotypem CMT znacznie utrudnia ocenę ich ewentualnej patogenności.

Opisane powyżej główne kierunki badań genetycznych w CMT znajdują swoje przełożenie na diagnostykę genetyczną tej grupy chorób.

Opracowanie prawidłowego modelu diagnostyki genetycznej wymaga znajomości częstości mutacji w poszczególnych genach, patogenności mutacji oraz znajomości korelacji genotypowo-fenotypowych.

Początkowo zakres diagnostyki genetycznej chorób kręgu CMT obejmował tylko chorobę CMT1A spowodowaną duplikacją w regionie 17p11.2-p12 oraz dziedziczną neuropatię z nadwrażliwości na ucisk (HNPP) wywołaną delecją regionu 17p11.2-p12 [18]. Wraz z odkryciem mutacji w genie *Cx32* diagnostyka chorób kręgu CMT została poszerzona o chorobę CMTX [19]. Obecnie pomimo znajomości mutacji w 30 genach w chorobach kręgu CMT diagnostyka genetyczna w większości krajów obejmuje nadal swym zakresem choroby CMT1A, HNPP, CMTX oraz CMT1B (wywołaną mutacjami w genie *MPZ*).

Wydaje się że na przeszkodzie poszerzeniu diagnostyki genetycznej w CMT o nowe geny stoją ograniczenia natury technicznej (brak możliwości jednoczesnej analizy wielu genów). Choć rozwiązaniem przyszłości zdaje się być zastosowanie technologii mikromacierzy DNA w diagnostyce chorób kręgu CMT, to na obecnym etapie rozwoju wiedzy można przyjąć, że opracowanie poprawnych korelacji genotypowo-fenotypowych może być podstawą do ukierunkowania diagnostyki genetycznej na właściwy gen.

Wydaje się również mało prawdopodobnym aby nowe technologie analizy DNA „wyparły” klasyczną diagnostykę genetyczną CMT opartą na korelacjach genotypowo-fenotypowych. Powodem dla którego koniecznym wydaje się współistnienie dwóch nurtów diagnostyki genetycznej CMT jest możliwość

weryfikacji dużej liczby informacji o podłożu genetycznym CMT uzyskanej poprzez zastosowanie mikromacierzy DNA. To właśnie obraz kliniczny oraz wyniki badań dodatkowych (elektrofizjologicznego i biopsji nerwu) będą stanowiły podstawę do uznania ewentualnej patogenności substytucji aminokwasowej w jednym z genów, którego mutacje stwierdza się w CMT. I wreszcie należy przyjąć, że w niedalekiej przyszłości- lepsze niż obecnie- poznanie heterogenności genetycznej chorób kręgu CMT, mutacji genowych, ich patogenności oraz specyficznych dla poszczególnych form CMT fenotypów będzie stanowiło o powodzeniu terapii genowej w przyszłości.

3. Heterogenność genetyczna chorób kręgu CMT

Choroby kręgu Charcot-Marie-Tooth stanowią heterogenną genetycznie grupę chorób obwodowego układu nerwowego człowieka.

Choroby kręgu CMT dziedziczą się zarówno w sposób autosomalny dominujący oraz recesywny, jak również w sposób sprzężony z płcią (dominujący i recesywny).

Pierwszą mutacją opisaną w chorobach kręgu CMT była submikroskopowa duplikacja regionu 17p11.2- p12 występująca u chorych z demielinizacyjną odmianą choroby CMT nazywaną również (CMT1A) [20, 21]. Oszacowano, że w regionie objętym duplikacją znajduje się około 70 genów, jednakże tylko jednemu z nich tj. *PMP22* przypisuje się podstawowe znaczenie w etiologii choroby CMT1A. Za uznaniem pierwszorzędnej roli genu *PMP22* w etiopatogenezie CMT1A przemawia podobieństwo pomiędzy fenotypem chorych u których wykryto duplikację regionu 17p11.2-p12 z fenotypem chorych u których stwierdza się tylko mutacje punktowe genu *PMP22* [22].

Co interesujące, u większości chorych u których rozpoznano dziedziczną neuropatię z nadwrażliwości na ucisk (HNPP) stwierdza się submikroskopową delecję regionu 17p11.2-p12 będącą niejako „lustrzanym” odbiciem duplikacji wykrywanej u chorych z fenotypem CMT1A [10].

Podobnie jak w chorobie CMT1A, u nielicznych chorych z rozpoznaniem dziedzicznej neuropatii z nadwrażliwości na ucisk opisano mutacje punktowe w genie *PMP22* [23]. Już na 9 lat przed określeniem sprzężenia genetycznego choroby CMT1A, z *locus* 17p11.2-p12 doniesiono o sprzężeniu genetycznym rzadziej spotykanej odmiany demielinizacyjnej postaci choroby CMT nazywanej również CMT1B z *locus* 1q23-q26 [6].

Dopiero w dwa lata po wykryciu mikroduplikacji w regionie 17p11.2-p12 w chorobie CMT1A doniesiono o mutacjach w genie Myelin Protein Zero (MPZ) u części chorych z fenotypem CMT1 [24].

W ostatnich latach wykazano, że mutacje w genie *MPZ* występują nie tylko u chorych z fenotypem choroby CMT1, ale również we wrodzonej neuropatii hipomielinizacyjnej, w neuropatii demielinizacyjnej o wczesnym początku a nawet w neuropatii aksonalnej rozpoczynającej się w 4-tej dekadzie życia [25]. Nazwa kolejnej odmiany CMT1C została wprowadzona dla określenia chorych z demielinizacyjną formą choroby CMT w której nie stwierdzono duplikacji regionu 17p11.2-p12 oraz mutacji w genie *MPZ* natomiast wykryto mutacje w genie *LITAF/SIMPLE*. Jak dotąd nie ustalono biologicznej funkcji białka *LITAF/SIMPLE*. Niektórzy badacze przypisują temu białku rolę czynnika transkrypcyjnego, podczas gdy inni przypisują temu białku udział w procesach degradacji innych białek [26, 27, 28]. Ostatnia z dotychczas poznanych form choroby CMT1 określana jako CMT1D jest wywołana mutacjami w genie kodującym czynnik transkrypcyjny Early growth response gene 2 (*EGR2*). Jak dotychczas opisano 9 mutacji genu *EGR2* u chorych z wrodzoną neuropatią hipomielinizacyjną (2), chorobą Dejerine-Sottas (2), neuropatią demielinizacyjną (4) oraz w chorobie CMT w której nie określono podtypu [29].

Choroba CMT2 o dziedziczeniu dominującym jest również heterogenna genetycznie. Typ CMT2A w którym wykazano sprzężenie genetyczne z *locus* 1q23 jest wywołany mutacjami w genie *MFN2* kodującym mitochondrialny enzym GTP-azę [12].

Jak dotychczas nieznanym jest udział mutacji w genie *KIF1B*, w którym wykryto tylko jedną mutację w jednej rodzinie CMT2A (sprzężenie genetyczne z *locus*

1q23) [11]. Druga z kolei forma CMT2B, której wyróżnikiem klinicznym są owrzodzenia stóp kończące się często autoamputacją palców w przebiegu *osteomyelitis* jest wywołana mutacjami w genie *RAB7*, kodującym enzym GTP-azę [30]. W kolejnej odmianie, chorobie CMT2C, której wyróżnikiem fenotypowym jest porażenie strun głosowych i mięśnia przepony określono sprzężenie z *locus* 12q23. Dotychczasowe próby identyfikacji genu w chorobie CMT2C zakończyły się niepowodzeniem [31]. Choroba CMT2D (rozpoczynająca się zwykle pod koniec pierwszej dekady życia zanikiem pierwszego mięśnia międzykostnego dłoni) jest wywołana mutacjami genu *GARS*, który koduje białko syntetazy aminoacylo tRNA dla glicyny (tRNA^{Gly}) [32]. Choroba CMT2E jest wywołana mutacjami w genie kodującym neurofilamenty o małej masie cząsteczkowej (*NEFL*) [33]. Choć początkowo sądzono, że mutacje w genie *NEFL* są typowe dla aksonalnej odmiany choroby CMT2, to już w kolejnych badaniach okazało się, że niektóre mutacje w genie *NEFL* segregują z demielinizacyjną odmianą choroby CMT [34]. Forma CMT2F, w której wykazano sprzężenie genetyczne z *locus* 7q11-q21 jest spowodowana mutacjami w genie kodującym białko szoku cieplnego *HSPB1* [35]. W 2004 r. opisano dwie nowe odmiany CMT2 oznaczone literami G i L, w których wykazano sprzężenie genetyczne odpowiednio z *loci* 12q12-q13.3 oraz 12q24 [36, 37]. Ostatnio opisano pięciopokoleniową polską rodzinę w której wykluczono sprzężenie genetyczne z wszystkimi dotychczas poznanymi *loci* choroby CMT2 o dziedziczeniu dominującym. Nowa odmiana choroby CMT2 została nazwana łagodnie postępującą formą CMT2 z pierwotnym zajęciem kończyn dolnych [38].

Choroba Charcot-Marie-Tooth sprzężona z płcią

Jak dotychczas opisano trzy odmiany choroby CMT sprzężone z płcią. W 1985 r. po raz pierwszy określono sprzężenie genetyczne choroby CMT z chromosomem X [39]. W 1993 r. doniesiono o pierwszych 7 mutacjach w genie *Cx32* kodującym białko koneksyny o masie cząsteczkowej 32 kDa [19]. Do roku 2004 poznano już ponad 250 różnych mutacji w genie *Cx32*. Szacuje się, że dziedzicząca się w sposób dominujący sprzężony z płcią choroba CMT stanowi około 14% wszystkich przypadków choroby CMT.

Oprócz choroby CMTX dziedziczącej się w sposób dominujący opisano dwie formy choroby CMT sprzężone z płcią dziedziczące się w sposób recesywny. Pierwsza z nich charakteryzuje się upośledzeniem umysłowym oraz głuchotą i została zmapowana w *locus* Xq24-q26 [40].

Druga jak dotąd poznana odmiana choroby CMT o recesywnym sposobie dziedziczenia sprzężona z płcią została zmapowana w *locus* Xq24-q26. [41].

Choroby kręgu CMT dziedziczące się w sposób autosomalny recesywny

Opisano zarówno demielinizacyjne jak i aksonalne odmiany choroby CMT dziedziczącej się w sposób autosomalny recesywny.

Najczęstsza odmiana choroby CMT o dziedziczeniu autosomalnym recesywnym (CMT4A) wywołana jest mutacjami w genie *GDAP1*. Biologiczna funkcja białka *GDAP1* nie została jak dotąd poznana.

Część mutacji w genie *GDAP1* została opisana u chorych z fenotypem neuropatii aksonalnej podczas gdy inne stwierdzono w neuropatii demielinizacyjnej [42, 43]. Niektóre z mutacji w genie *GDAP1* stwierdza się u chorych z neuropatią o cechach mieszanych [44].

Wyróżnikiem kolejnej formy choroby CMT o dziedziczeniu autosomalnym recesywnym t.j. CMT4B1 jest występowanie tzw. ogniskowo pofałdowanej mieliny.

U chorych z fenotypem CMT4B1 zidentyfikowano mutacje w genie *MTMR-2* kodującym białko miotubularyny będące pseudofosfatazą [45].

W kolejnej odmianie choroby CMT o autosomalnym recesywnym sposobie dziedziczenia (CMT4B1) mutacje stwierdza się w genie *MTMR13* [46].

W podtypie CMT4C określono sprzężenie genetyczne z *locus* 5q32 [47].

Ostatnio opisano mutacje w genie *SH3/5PR* u chorych z fenotypem CMT4C [48].

Na odrębną uwagę wśród neuropatii demielinizacyjnych zasługuje choroba CMT wywołana mutacjami w genie *PRX* kodującym periaksynę. Jak dotychczas opisano zaledwie 7 mutacji w genie *PRX* [49].

II. Zagadnienia

1. Nowy typ choroby CMT2 dziedziczącej się w sposób autosomalny dominujący

We wstępie opisano heterogenność genetyczną choroby CMT2. W skrócie należy przypomnieć, że jak dotychczas opisano 11 loci choroby CMT2 o dziedziczeniu autosomalnym dominującym.

W 2002 r. zwrócono uwagę na pięciopokoleniową rodzinę, u której pierwszych członków już w 1982 r. rozpoznano chorobę CMT2. Obraz kliniczny choroby charakteryzuje się wczesnym początkiem. Przebieg choroby jest powolny. W badaniach elektrofizjologicznych wykonanych u 6 chorych na przestrzeni 40 lat zwracają uwagę dwie cechy: prawidłowe wartości amplitudy potencjałów wywołanych w kończynach górnych oraz nieproporcjonalnie niskie wartości amplitudy potencjałów wywołanych w kończynach dolnych.

W trakcie wizyt w domach chorych uzupełniono rodowód rodziny o nowych członków oraz zbadano pozostałych członków rodziny.

W rodowodzie nie występuje dziedziczenie z ojca na syna, stąd nie można było wykluczyć sprzężenia dominującego z płcią. W pierwszej kolejności sekwencjonowano gen *Cx32*, w którym wykluczono mutacje.

Następnie wykluczono mutacje w sekwencji kodującej genu *MPZ* oraz wykluczono sprzężenie genetyczne z *locus* 1q23 w którym zmapowano gen *MPZ*. Wykluczono również sprzężenie z pozostałymi 10 loci znanymi w dziedziczącej się w sposób autosomalny dominujący chorobie CMT2.

W podsumowaniu można stwierdzić, że przedstawiona rodzina najprawdopodobniej nie reprezentuje żadnego z dotychczas poznanych typów choroby CMT2 o dziedziczeniu autosomalnym dominującym [38].

2. Mutacje w genie *Cx32*, *NEFL* i *PMP22*- problem patogenności

Problem patogenności mutacji w chorobach genetycznie uwarunkowanych ma podstawowe znaczenie dla genetyki klinicznej. Trudno wyobrazić sobie konsekwencje medyczne, etyczne i prawne sytuacji w której polimorficzne substytucje aminokwasowe zostaną określone jako mutacje patogenne. Wydaje, że w dobie powszechnej dostępności metod sekwencjonowania DNA nie można pozostać przy klasycznej definicji mutacji, w której istnieją dwa podstawowe kryteria patogenności:

1. Zmiana sekwencji genu w wyniku której dochodzi do substytucji aminokwasowej
2. Brak zmiany sekwencji u co najmniej 50 zdrowych osobników (100 chromosomów)

W przeciwieństwie do definicji klasycznej można zaproponować poszerzony zestaw kryteriów patogenności mutacji, który przedstawiałby się następująco:

1. Związek mutacji ze fenotypem zbliżonym do obserwowanego u innych chorych z identyczną mutacją
2. Wynik analizy funkcjonalnej mutacji wskazujący na jej patogenny charakter
- 3 Brak mutacji w grupie kontrolnej
4. Segregacja mutacji z fenotypem choroby
5. Lokalizacja mutacji w miejscu konserwowanym białka lub w domenie białka o ważnej funkcji biologicznej

Choć wydaje się niemożliwym aby którakolwiek mutacja genu spełniała wszystkie zaproponowane kryteria patogenności mutacji, to jednak nie można zanegować przydatności proponowanego schematu w opisie nowo stwierdzonej mutacji punktowej.

Mutacje w genie *Cx32* to druga po duplikacji w regionie 17p11.2-p12 przyczyna chorób kręgu CMT [50]. Do października 2004 r. zidentyfikowano 277 mutacji w genie *Cx32* [51].

Aż 9% mutacji w genie *Cx32* zamieszczonych w bazie danych nie jest zaopatrzone w charakterystykę fenotypową chorych a ich status określa się jako nieznany. Tylko w przypadku 10% mutacji w genie *Cx32* stwierdzono segregację mutacji z chorobą CMTX. W nielicznych przypadkach mutacji w genie *Cx32* wykonano badanie analizy funkcjonalnej [52].

Po raz pierwszy w Polsce, mutacja w genie *Cx32* została opisana w 2001 r [53]. Mutacja E208G została stwierdzona u 6 chorych z fenotypem CMTX pochodzących z jednej rodziny. Wykazano segregację mutacji E208G z fenotypem CMTX. Jak dotychczas w literaturze nie opisano drugiej rodziny z mutacją E208G. Ze wstępnych wyników badań ekspresji mutantów E208G białka *Cx32* wiadomo, że mutanty E208G nie wykazują ekspresji w błonie cytoplazmatycznej transfekowanych oocytów jak również nie tworzą funkcjonalnych kanałów jonowych (dr Charles Abrams-informacja ustna).

Jak dotychczas w populacji polskiej wykryto 6 różnych mutacji w genie *Cx32*. Wszystkie mutacje w genie *Cx32* w konserwowanych domenach białka *Cx32* [54].

W przypadku wszystkich 6 mutacji w genie *Cx32* obserwowano łagodniejszy przebieg choroby u chorych kobiet w porównaniu z chorymi mężczyznami [55]. Podobnie w badaniu neurograficznym wykonanym u 8

chorych wykazano niższe wartości przewodzenia we włóknach ruchowych n. pośrodkowego u chorych mężczyzn w stosunku do chorych kobiet.

Przedstawione powyżej podobieństwo fenotypów u niespokrewnionych chorych u których stwierdzono 6 różnych mutacji w genie *Cx32* stanowi istotny argument za patogennym charakterem tych mutacji. Wreszcie w jednej z rodzin stwierdzono po raz pierwszy mutację E208K występującą w mozaice u 79 - letniego chorego mężczyzny [56]. Wystąpienie objawów choroby CMTX u chorego u którego mutacja E208K wystąpiła w mozaice jest kolejnym argumentem za patogennym charakterem tej mutacji. W rozważaniach nad patogennością mutacji w chorobach kręgu CMT warto zatrzymać się nad najczęstszą mutacją w CMT t.j. duplikacją w regionie 17p11.2-p12.

Pierwsza w populacji polskiej grupa chorych u których wykryto duplikację w regionie 17p11.2-p12 liczyła 19 chorych, którzy pochodzili z 10 rodzin [57].

U wszystkich chorych, u których stwierdzono duplikację w regionie 17p11.2-p12 początek choroby przypadał na pierwszą dekadę życia a przebieg choroby był stacjonarny lub powoli postępujący. Szybkość przewodzenia we włóknach ruchowych nerwu pośrodkowego (MNCV) wynosiła między 10 a 20 m/s natomiast u dwóch chorych wyniosła odpowiednio 33 i 36 m/s. W badaniach morfologicznych nerwu łydkowego w półcienkich skrawkach eponowych stwierdzano we wszystkich przypadkach ubytek włókien mielinowych, szczególnie o dużej średnicy, rozrost podścieliska oraz obecność struktur cebulowatych [58].

W większej niż polska grupie 61 chorych u których stwierdzono duplikację w regionie 17p11.2-p12 obraz kliniczny CMT1A był mniej homogeny jednakże aż u 75% chorych pierwsze objawy choroby CMT1A wystąpiły w pierwszej dekadzie życia a średnia wartość MNCV wynosiła 19,9m/s a zakres MNCV wahał się od 5 do 34 m/s [59]. W innej, największej jak dotąd badanej grupie 119 chorych u której stwierdzono duplikację w regionie 17p11.2-p12 zaledwie u 50% początek choroby przypadał na pierwszą dekadę życia a średnia wartość przewodzenia w nerwie pośrodkowym wyniosła 20,2±4.9 m/s a zakres MNCV wynosił od 7 do 33 m/s [60]. Zmienność fenotypu choroby CMT1A wywołanej duplikacją w regionie 17p11.2-p12 wzrasta wraz ze wzrostem grupy badanej. I tak obserwujemy homogeny obraz choroby CMT1A w polskiej 19 osobowej grupie, natomiast w grupach 61 i 119 osobowej fenotyp choroby CMT1A traci na homogenności. Jak dotąd nie stwierdzono duplikacji w regionie 17p11.2-p12 u chorych z inną niż demielinizacyjną odmianą choroby CMT. Duplikacji w regionie 17p11.2-p12 nie stwierdzono również jak dotąd u zdrowych ludzi.

Nieco inaczej przedstawia się problem patogenności delecji w regionie 17p11.2-p12, która jest przyczyną około 80% przypadków dziedzicznej neuropatii z nadwrażliwości na ucisk (HNPP). Szacuje się, że co najmniej 11% przypadków choroby HNPP stanowią klinicznie bezobjawowi nosiciele delecji w regionie 17p11.2-p12 [61].

Wg innych badaczy odsetek bezobjawowych nosicieli delecji w regionie 17p11.2-p12 sięga aż 15% [62]. Również w jednej z polskich rodzin stwierdzono delecję w regionie 17p11.2-p12 metodą hybrydyzacji Southerna i analizy krótkich tandemowych sekwencji powtórzonych (STR) u 16 -letniej chorej u której rozpoznano HNPP jak również u matki dziewczynki u której nigdy nie wystąpiły objawy choroby HNPP [63, 64]. Fakt bezobjawowego nosicielstwa delecji w regionie 17p11.2-p12, które stwierdza się aż u 15% bezobjawowych nosicieli

choroby dziedziczącej się w sposób autosomalny dominujący skłania do ustosunkowania się do patogenności tejże mutacji. Choć niewątpliwie delecja w regionie 17p11.2-p12 jest przyczyną choroby HNPP aż w 80% przypadków, to jednak z nieznanymi przyczynami aż 15% osobników, u których stwierdza się delecję w regionie 17p11.2-p12 stanowią zdrowi ludzie. Można więc uznać, że w 15% przypadków wystąpienie delecji w regionie 17p11.2-p12 jest warunkiem koniecznym aczkolwiek niewystarczającym do wystąpienia objawów choroby HNPP. Mutacje punktowe w genie *PMP22* segregują z chorobami CMT1, DSS oraz HNPP. Wśród mutacji genu *PMP22* substytucja Ser72Leu jest najczęstszą mutacją punktową tego genu opisaną u chorych wywodzących się z różnych grup etnicznych. Co interesujące mutacja Ser72Leu została wykryta u chorych z rozpoznaniem choroby CMT1 o wczesnym początku, choroby DSS a nawet neuropatii hipomielinizacyjnej. W dwóch polskich rodzinach wykryto również mutację *de novo* Ser72Leu w genie *PMP22* u dwóch niespokrewnionych chorych z ciężką formą neuropatii demielinizacyjnej [65].

Z uwagi na brak ostrych kryteriów podziału pomiędzy ciężką neuropatią demielinizacyjną, chorobą DSS oraz wrodzoną neuropatią hipomielinizacyjną trudno jednoznacznie stwierdzić czy trzy różne diagnozy u różnych chorych są wyrazem zmienności klinicznej, czy też trudności w interpretacji poszczególnych form choroby CMT1 wynikają z braku ostrych kryteriów podziału.

Trzeci już gen, którego mutacje zostaną omówione w kontekście patogenności mutacji w chorobach kręgu Charcot-Marie-Tooth to gen *NEFL*.

Gen *NEFL* koduje białko neurofilamentów o małej masie cząsteczkowej (68 kDa) [66]. Wraz z neurofilamentami o dużej (NEFH) i średniej (NEFM) masie cząsteczkowej neurofilamenty NEFL stanowią główny składnik cytoszkieletu aksonu.

W chorobach neurodegeneracyjnych t.j. choroba Alzheimera, choroba Parkinsona czy wreszcie stwardnienie zanikowe boczne- w badaniu neuropatologicznym- stwierdza się złogi neurofilamentów [67]. Po raz pierwszy w 1985 r. stwierdzono złogi neurofilamentów w badaniach histopatologicznych nerwów u chorych na aksonalną formę choroby CMT [68]. Pierwsza mutacja w genie *NEFL* została opisana w dużej sześciopokoleniowej rodzinie z neuropatią aksonalną [33]. W ostatnich czterech latach opisano już 11 mutacji w genie *NEFL* u chorych z demielinizacyjną jak i aksonalną formą choroby CMT. Jedna z mutacji stwierdzonych w genie *NEFL* t.j. Glu528del została stwierdzona u chorego, w którego rodzinie wg autorów inni członkowie rodziny chorowali również na chorobę CMT (choć nie podano szczegółów dotyczących przebiegu choroby). Mutacji Glu528del nie stwierdzono również w 65 osobowej grupie kontrolnej [34]. W cztery lata później mutacja Glu528del została opisana ponownie u czterech chorych pochodzących z Japonii. W grupie kontrolnej składającej się z 248 zdrowych osobników stwierdzono występowanie mutacji Glu528del z częstością (f) równą 0.018. Co więcej mutacja Glu528del została wykryta również u chorych na zanik rdzeniowy mięśni ($f=0.016$) i stwardnienie zanikowe boczne ($f=0.031$). [69]. Oznaczało to, że status mutacji Glu528del pozostaje nieznanym. Możliwa patogenność innych mutacji dotychczas stwierdzonych w genie *NEFL* stała się przedmiotem osobnego opracowania autora [70]. W badaniach nad podłożem genetycznym chorób kręgu Charcot-Marie-Tooth w populacji polskiej stwierdzono wystąpienie mutacji Ile214Met w genie *NEFL* u dwóch niespokrewnionych chorych z których jeden chorował na ciężką postać CMT1 podczas gdy przebieg kliniczny choroby CMT1 u drugiego

chorego był łagodny. Mutacji Ile214Met nie wykryto również w 50 -osobowej grupie kontrolnej. Z uwagi na wystąpienie dwóch odmiennych fenotypów choroby CMT u dwóch chorych, u których stwierdzono identyczną mutację w genie *NEFL* wykonanie analizy funkcjonalnej mutacji Ile214Met było uzasadnione.

Badania patogenności mutacji Ile214Met w genie *NEFL* prowadzono w systemie *in vitro* z zastosowaniem hodowli komórkowej czasowo transfekowanej mutantem genu *NEFL* względem mutacji Ile214Met. Wyniki badań nie przyniosły rozstrzygnięcia problemu potencjalnej patogenności mutacji Ile214Met, gdyż zmiany strukturalne neurofilamentów obserwowane w transfekowanych komórkach wydają się zbyt subtelne aby mogły stanowić argument przemawiający za patogennością mutacji w genie *NEFL*, która zmiany te wywoływała [71]. Na koniec rozważań dotyczących patogenności mutacji w genach *Cx32*, *PMP22* i *NEFL* należy stwierdzić, że nawet analiza funkcjonalna mutacji przeprowadzona w nieprawidłowo dobranym układzie doświadczalnym może być źródłem wyników fałszywie dodatnich. Tak właśnie stało się w przypadku mutacji Thr118Met w genie *PMP22*. Pomimo wyników analizy funkcjonalnej świadczących o patogennym charakterze mutacji Thr118Met, substytucja ta stwierdzana jest u osób zdrowych o różnym pochodzeniu etnicznym [72].

3. Mutacje w genie *MPZ* i spektrum fenotypowe chorób kręgu CMT

W 1982 r. po raz pierwszy, w demielinizacyjnej formie choroby CMT określanej później jako CMT1B określono sprzężenie z *locus* grupy krwi Duffy w chromosomie pierwszej pary [6]. Po jedenastu latach od określenia sprzężenia genetycznego ustalono, że przyczyną choroby CMT1B są mutacje w genie *MPZ* [24]. Pierwsze mutacje w genie *MPZ* opisano w rodzinach w której przebieg choroby CMT1 był cięższy niż obserwowany u chorych z postacią CMT1A spowodowaną duplikacją w regionie 17p11.2-p12. Skutkiem tej wstępnej korelacji genotypowo-fenotypowej było zawężenie grupy chorych u których badano gen *MPZ* do neuropatii demielinizacyjnej w której nie stwierdzono duplikacji w regionie 17p11.2-p12.

Już w 1996 r. wykryto mutację Q215X u chorego z wrodzoną neuropatią hipomielinizacyjną (CHN) [73]. Wraz z odkryciem pierwszej mutacji w genie *MPZ* w innej niż CMT1B postaci choroby CMT stało się jasnym, że zawężenie fenotypu do CMT1B w przypadku mutacji *MPZ* było pomyłką. Oprócz mutacji Q215X opisano jeszcze dwie inne mutacje w genie *MPZ* u chorych z CHN. Pierwsza z nich tj. 550-del1552CTAins G została opisana u chorego chorego CHN i ciężką niewydolnością oddechową [74]. Trzecią i jak dotychczas ostatnią z poznanych mutację zmiany sensu w genie *MPZ* opisano u chorego z wrodzoną neuropatią hipomielinizacyjną. Mutacja T124M jest pierwszą jak dotychczas znaną mutacją zmiany sensu w genie *MPZ* stwierdzoną u chorego chorego ciężkim fenotypem CHN [75]. Fenotypem, który stanowi niejako „pomost” pomiędzy wrodzoną neuropatią hipomielinizacyjną a neuropatią demielinizacyjną CMT1B jest tzw. neuropatia demielinizacyjna o wczesnym początku. W 2004 r. opisano nową mutację L190fs w genie *MPZ* u chorej z fenotypem neuropatii demielinizacyjnej o wczesnym początku [76].

Na osobną uwagę zasługują mutacje w genie *MPZ*, które stwierdza się u chorych z tzw. fenotypem ogniskowo pofałdowanej mieliny (FFM). Jak dotychczas w piśmiennictwie opisano zaledwie 4 mutacje w genie *MPZ* opisane u chorych z fenotypem FFM. Wśród nich aż dwie zostały opisane u chorych pochodzących z polskich rodzin [77, 78].

Ostatnim z poznanych fenotypów choroby CMT, w którym stwierdza się mutacje w genie *MPZ* jest neuropatia aksonalna o późnym początku CMT2. Po raz pierwszy mutację S44F w genie *MPZ* opisano u 16 członków wielopokoleniowej rodziny z fenotypem CMT2 pochodzącej z Sardynii [79].

W następnych latach opisano kolejno mutacje: T124M, D61G oraz Y119C w genie *MPZ* z fenotypem CMT2 [80,81]

Również wśród polskich rodzin zidentyfikowano trójpokoleniową rodzinę CMT2, w której wskazaniem do analizy genu *MPZ* był późny przypadający na czwartą dekadę życia początek choroby. U czterech chorych członków rodziny zidentyfikowano w genie *MPZ* nową mutację E56K segregującą z fenotypem choroby CMT2 [82, 83]. Odrębnym zagadnieniem jest próba odpowiedzi na pytanie o przyczynę różnorodności fenotypowej, która charakteryzuje chorych u których stwierdza się mutacje w genie *MPZ*. Kolejna praca poświęcona spektrum fenotypowemu chorób kręgu CMT u chorych, u których stwierdza się mutacje w genie *MPZ* podejmuje ten problem [84].

4. Mutacje w genie *LITAF*- czy istnieje fenotyp choroby CMT1C?

Po raz pierwszy w 2002 określono sprzężenie demielinizacyjnej odmiany choroby CMT, w której nie stwierdzono duplikacji w regionie 17p11.2-p12 (CMT1A), mutacji w genie *MPZ* (CMT1B) oraz mutacji w genie *EGR-2* (CMT1D). Okazało się, że nowa odmiana choroby CMT1 jest sprzężona z *locus* 16p13.3-p12 [26]. Już w 2003 r. opisano trzy mutacje zmiany sensu w obrębie genu *LITAF* u chorych w rodzinach w których wcześniej stwierdzono sprzężenie genetyczne w *locus* 16p13.3-p12 [27]. Pomimo identyfikacji mutacji w nowym genie w czwartym już podtypie neuropatii demielinizacyjnej określenie choroba CMT1C wydaje się mieć tylko sens w odniesieniu do tych chorych u których stwierdzono mutacje w obrębie genu *LITAF*. W przeciwieństwie do wcześniej opisanych podtypów chorób CMT1B czy CMTX nie istnieją wyraźne cechy fenotypowe które pozwoliłyby wyróżnić fenotyp choroby CMT1C. Ostatnio w dużej 192 osobowej grupie niespokrewnionych chorych o różnym pochodzeniu etnicznym wykryto cztery nowe mutacje w genie *LITAF*. W jednej z polskich rodzin w której u chorej wykluczono uprzednio mutacje genu *PMP22*, *MPZ* i *Cx32* zidentyfikowano nową mutację Leu122Val w genie *LITAF*. Jest to dotychczas niepisywana mutacja *de novo*, która została stwierdzona u chorej z łagodną postacią neuropatii demielinizacyjnej w której w biopsji nerwu łydkowego stwierdzono zmiany demielinizacyjne z tworzeniem się struktur cebulopodobnych typowych dla choroby CMT1 [28]. Mutacja Leu122Val w genie *LITAF* nie została jak dotychczas opisana u zdrowych ludzi co przemawiałoby za jej ewentualną patogennością. Z drugiej jednak strony mutacja Leu122Val została opisana jak dotąd tylko u jednej chorej, w genie, którego funkcja biologiczna jest nieznana.

Podobne pytania o patogenność mutacji w genie *LITAF* rodzą się przy próbie klasyfikacji substytucji Ile98Val. Substytucja ta została stwierdzona w jednej z polskich rodzin z łagodną demielinizacyjną formą choroby CMT. Wykazano, że substytucja Ile98Val nie segreguje z fenotypem CMT1 w badanej rodzinie (wyniki niepublikowane). Przy ocenie patogenności mutacji w genie *LITAF* należy wziąć jednak pod uwagę dwa zjawiska: (i) łagodny fenotyp choroby CMT1 wywołanej mutacjami genu *LITAF*, (ii) możliwa funkcja genu *LITAF* jako modyfikatora przebiegu choroby CMT. W tym kontekście trudno orzekać o patogenności substytucji Ile98Val. Być może istnienie mutacji Ile98Val w genie *LITAF* nie jest warunkiem wystarczającym do wystąpienia choroby CMT1 lecz pełni ona funkcję modyfikującą fenotyp choroby CMT1 wywołanej mutacją w innym dotychczas nieznanym genie, którego mutacje wywołują chorobę CMT1.

5. Diagnostyka molekularna w chorobach kręgu Charcot-Marie-Tooth- w poszukiwaniu optymalnego modelu

A. Zakres diagnostyki molekularnej

Po odkryciu duplikacji w regionie 17p11.2-p12 zapoczątkowano diagnostykę molekularną w chorobie CMT typu 1. Wg danych z 1996 r. aż u 70.7% chorych, u których ustalono rozpoznanie choroby CMT1 w Europie stwierdza się duplikację w regionie 17p11.2-p12. Należy jednak zwrócić uwagę, że w poszczególnych krajach Europy różnice w częstości duplikacji w regionie 17p11.2-p12 w grupie chorych z rozpoznaniem choroby CMT1 są znaczne. I tak wg danych pochodzących z Barcelony zaledwie u 34.3% chorych z rozpoznaniem choroby CMT1 stwierdzono duplikację w regionie 17p11.2-p12, wśród próbek badanych w Antwerpii (Belgia) w 69.7% wykryto duplikację w regionie 17p11.2-p12 [85]. W Szwecji zaledwie u 37,5% chorych z fenotypem CMT1 stwierdzono duplikację w regionie 17p11.2-p12. Tak niski odsetek duplikacji w regionie 17p11.2-p12 może być wywołany większym niż w innych krajach udziałem form recesywnych [86]. Interesujących wyników dostarczają badania genetyczne przeprowadzone w grupie 153 nespokrewnionych chorych, z których większość (141) chorowała na CMT1. Okazało się, że zaledwie u 51,5% chorych wykryto duplikację w regionie 17p11.2-p12, u 7% chorych stwierdzono mutacje w genie *Cx32*, u 6,6% chorych stwierdzono mutacje w genach *MPZ* i *PMP22*, natomiast zaledwie u 1,95% chorych stwierdzono mutacje w genach *EGR-2*, *PRX* i *NEFL*. Aż u 32,7% chorych nie udało się ustalić mutacji w żadnym z badanych 8 *loci* [87]. Interesujące ujęcie zaproponował ostatnio Dubourg i wsp. Dokonał on podziału grupy badanej wg kryteriów elektrofizjologicznych tj. neuropatia demielinizacyjna (MNCV<30m/chorych), neuropatia pośrednia (MNCV w zakresie od 30 do 40 m/s) oraz neuropatia aksonalna MNCV>40m). W grupie 1-szej przeważała duplikacja w regionie 17p11.2-p12, natomiast w grupie 2-giej aż odsetek mutacji w genie *Cx32* wynosił aż 24%. Zaledwie u 5% i 6% chorych odpowiednio z demielinizacyjną i aksonalną formą choroby CMT stwierdzono mutacje w genie *Cx32* [88]. W oparciu o dane o częstości mutacji w poszczególnych genach Pouget zaproponował model diagnostyki molekularnej chorób kręgu CMT obejmujący region 17p11.2-p12 oraz geny *Cx32*, *MPZ* i *PMP22*. W modelu tym decydującym kryterium jest wartość MNCV [89].

B. Metody stosowane w diagnostyce molekularnej chorób kręgu CMT

Hybrydyzacja Southern była pierwszą metodą którą zastosowano do identyfikacji duplikacji w regionie 17p11.2-p12 u chorych u których rozpoznano chorobę CMT1. Interpretacja wyników opierała się na ocenie różnic gęstości densytometrycznej pomiędzy dwoma allelami RFLP lub rzadziej wykrywano trzy allele RFLP świadczące o duplikacji w regionie 17p11.2-p12 [20]. Metoda ta przez lata była stosowana w laboratoriach genetycznych w Europie, jednakże obecnie „wypierana” jest przez inne techniki.

Hybrydyzacja Southern z uwagi na czaso- i pracochłonność jak również konieczność zastosowania izotopów promieniotwórczych obecnie nie jest już tak powszechnie stosowana.

Istotną wadą tej metody jest brak możliwości ustalenia duplikacji występującej w mozaice jak również możliwość uzyskania wyników fałszywie ujemnych przy duplikacjach o nietypowej wielkości.

Problem mozaikowości zarówno w przypadku duplikacji jak i delecji w regionie 17p11.2-p12 został rozwiązany wraz z wprowadzeniem do diagnostyki choroby CMT1 i HNPP metody FISH. Interpretacja wyników w badaniu FISH polega na detekcji trzech zamiast dwóch sygnałów sondy molekularnej w przypadku duplikacji lub jednego zamiast dwóch sygnałów w przypadku delecji w HNPP [90].

W niektórych laboratoriach rutynową metodą analizy regionu 17p11.2-p12 jest badanie krótkich mikrosatelitarnych sekwencji powtórzonych (STR). Zaletą tej metody jest szybkość oraz niewielka ilość DNA konieczna do wykonania reakcji PCR.

Wadą metody analizy STR jest konieczność zastosowania kilku markerów mikrosatelitarnych z uwagi na często występującą homozygotyczność alleli STR, która prowadzi do wyników nieinformatywnych [91].

Na osobną uwagę zasługuje półilościowa reakcja PCR (Sq-PCR), która opiera się na półilościowej ocenie ilości kopii genu *PMP22*. Metoda ta pozwala na jednoczesną detekcję duplikacji lub delecji genu *PMP22*. W przeciwieństwie do poprzednio opisanych technik metodą Sq-PCR można ocenić ilość kopii genu *PMP22* bez konieczności badania regionu 17p11.2-p12 [92]. Kolejną metodą stosowaną do detekcji duplikacji w regionie 17p11.2-p12 jest technika oparta na reakcji PCR-RFLP. Istotą tej metody jest identyfikacja fragmentu łączącego, który powstaje na skutek duplikacji w regionie 17p11.2-p12.

Wadą techniki opartej na RFLP-PCR jest możliwość wykrycia zaledwie 70% przypadków duplikacji w których powstaje typowy fragment łączący.

W przypadku nietypowych miejsc pęknięcia w obrębie sekwencji repetytywnych flankujących region 17p11.2-p12 technika ta jest bezużyteczna [93].

W podsumowaniu stwierdzić należy że wybór techniki analizy regionu 17p11.2-p12 jest wypadkową dostępności aparatury, przydatności poszczególnych metod i dotychczasowych doświadczeń.

C. Znaczenie badań genetycznych w chorobach kręgu CMT

Pomimo licznych odkryć dokonanych w ostatnich latach badania genetyczne w chorobach kręgu Charcot-Marie-Tooth (CMT) wymagają wciąż umiejscowienia w diagnostyce tej grupy chorób. Szczegółowo zagadnienia te zostały

przedstawione w pracy poświęconej znaczeniu badań genetycznych w diagnostyce dziedzicznych neuropatii ruchowo-czuciowych [94].

Badania genetyczne w chorobach kręgu CMT pozwalają odpowiedzieć często na podstawowe pytanie o nabytą lub genetycznie uwarunkowaną przyczynę choroby [95].

Badanie genetyczne w dziedzicznych neuropatiach ruchowo-czuciowych ma również znaczenie w kontekście ustalenia rozpoznania, które może stanowić podstawę poradnictwa genetycznego.

Choć rozpoznanie wrodzonej neuropatii hipomielinizacyjnej opiera się na wyniku badania histopatologicznego nerwu, to z uwagi na heterogenność genetyczną wrodzonej neuropatii hipomielinizacyjnej dopiero rozpoznanie kliniczne zaopatrzone w wynik badania genetycznego pozwala ustalić poradę genetyczną. Odrębnym problemem w diagnostyce dziedzicznych neuropatii ruchowo-czuciowych jest wysoki odsetek przypadków sporadycznych.

Analiza rodowodu w przypadkach sporadycznych nie dostarcza informacji koniecznych do udzielenia porady genetycznej, stąd znów na plan pierwszy wysuwają się badania genetyczne.

W przypadku stwierdzenia u pojedynczego chorego mutacji, która została już opisana w innych rodzinach udzielenie porady genetycznej jest możliwe.

Trudno jednak z uwagi na omawiane wcześniej zjawisko patogenności mutacji ustosunkować się do wyniku nowej, dotychczas nieopisywanej mutacji, która została stwierdzona tylko u jednego chorego.

Analiza rodowodu u chorych z dziedzicznymi neuropatiami ruchowo-czuciowymi ma również ograniczone znaczenie z uwagi na zjawiska mozaikowości i ograniczonej penetracji niektórych mutacji.

Opisano mutację Glu71X w genie *MPZ* u 36-letniej chorej z objawami neuropatii z nadwrażliwości na ucisk jak również u jej 62-letniego zdrowego ojca [96].

Podobnie do choroby CMT1B bezobjawowych nosicieli mutacji w genie *Cx32* spotyka się również u chłopców [97].

Częstość zjawiska mozaikowości w chorobach kręgu Charcot-Marie-Tooth nie jest znana.

Opisano przypadek rodziny CMT1A, w której łagodny przebieg choroby związany był z wystąpieniem duplikacji w regionie 17p11.2-p12 zaledwie w 47% limfocytów analizowanych metodą FISH [98].

Bardzo interesujący przypadek mozaikowości opisano w chorobie CMT1B, w której pozornie recesywny sposób dziedziczenia uwidocznił w rodowodzie wynikał z faktu wystąpienia mutacji Gly74Glu zaledwie w 20% limfocytów i w 30% komórek wywodzących się z ektodermy u zdrowej matki dwóch chorych córek [99].

Ostatnio w jednej z polskich rodzin CMTX stwierdzono po raz pierwszy mozaikowość mutacji E208K w genie *Cx32* u 79-letniego mężczyzny. Oznacza to, że w niektórych przypadkach choroby CMTX chory mężczyzna nie przekazuje choroby wszystkim córkom i co więcej stwierdzenie płci żeńskiej u płodu, którego ojciec choruje na CMTX nie jest jednoznaczne z rozpoznaniem choroby CMTX [56].

W podsumowaniu należy stwierdzić, że badania genetyczne w chorobach kręgu Charcot-Marie-Tooth mają duże znaczenie w kontekście rozpoznania, określenia sposobu dziedziczenia i wreszcie poradnictwa genetycznego. Nie należy jednak zapominać, że wyniki badań genetycznych podobnie jak innych badań

dodatkowych powinny być rozpatrywane w kontekście obrazu klinicznego neuropatii i wyników innych badań dodatkowych.

Przeszłość badań genetycznych w chorobach kręgu CMT

W ostatnich 14 latach badań nad podłożem chorób kręgu CMT byliśmy świadkami znacznego postępu. Wystarczy tylko zaznaczyć, że w 1991 r. jedyną znaną mutacją w chorobach kręgu CMT była duplikacja w regionie 17p11.2-p12, a już w 2004 r. znano 30 genów, w których opisano mutacje u chorych z różnymi odmianami CMT.

Trudno więc było w 1991 r. określić główne kierunki badań genetycznych w chorobach kręgu CMT. Podobnie i dzisiaj trudno jest przewidzieć główne kierunki badań w przyszłych latach.

Wydaje się, że tradycyjnie utrzymane będą badania nad nowymi mutacjami w poznanych już genach. W przypadku tych form CMT, w których poznano dotychczas tylko sprzężenie genetyczne można spodziewać się lokalizacji nowych genów. Szybki rozwój technik mapowania genów oraz rosnące możliwości technologiczne sprawiają, że w przypadku nowoodkrytych genów *LITAF*, *GDAP1* oraz innych nieznana wciąż pozostaje funkcja białek kodowanych przez te geny. Brak znajomości funkcji białek *LITAF* oraz *GDAP1* utrudnia poznanie patologii molekularnej chorób CMT1C i CMT4A. Wydaje się więc, że jednym z kierunków badań molekularnych w CMT będzie określenie zaburzeń biochemicznych na poziomie komórkowym, tkankowym oraz narządowym. Być może znajomość patologii molekularnej CMT na poziomie białka pozwoli rozwiązać podstawowe problemy terapii genowej? Badania nad zwierzętami transgenicznymi w CMT będą stanowiły z pewnością ważny kierunek badawczy.

W diagnostyce genetycznej chorób kręgu CMT należy spodziewać się w niedalekiej już przyszłości poszerzenia zakresu badanych genów oraz wzrostu dostępności badań genetycznych.

Być może zastosowanie techniki mikromacierzy DNA pozwoli na ocenę zmian ekspresji innych genów powstałych na skutek wystąpienia mutacji w jednym z genów CMT? Farmakologiczna próba modyfikacji ekspresji tychże genów może być również jedną z form leczenia CMT w przyszłości.

Jako że kolejne, nieznanne odkrycia z pewnością ukierunkują rozwój badań nad podłożem genetycznym chorób kręgu CMT powyższe przewidywania mogą okazać się chybione.

Nie ma jednak wątpliwości co do kolejnego etapu badań nad CMT. Po przełomie diagnostycznym jaki dokonał się w latach 90-tych należy oczekiwać przełomu terapeutycznego, choć niewykluczone, że tym razem czas oczekiwania może okazać się znacznie dłuższy.

III. Podsumowanie

W pracy omówiono główne kierunki badań genetycznych nad podłożem molekularnym chorób kręgu Charcot-Marie-Tooth w oparciu o wyniki badań prowadzonych przez autora w latach 1996-2004.

Zarówno mapowanie nowych *loci* jak i próba oceny patogenności mutacji w genach *NEFL*, *Cx32* i *PMP22*, choć pozornie odległe od siebie, znajdują swój „wspólny mianownik” w identyfikacji mutacji patogennej o której można powiedzieć, że wywołuje określoną formę choroby CMT.

Identyfikacja mutacji patogennej jest niezwykle utrudniona jeśli nie istnieją przesłanki za badaniem jednego lub kilku z 30 znanych w chorobach kręgu CMT genów. Podjęty w pracy problem korelacji pomiędzy obrazem morfologicznym a określoną mutacją w genie *MPZ* jest jednym ze sposobów ukierunkowania badań genetycznych na określony gen z uwagi na możliwą swoistość zmian

morfologicznych towarzyszących określonym mutacjom. Zagadnienie postulowanej w pracy w swoistości zmian morfologicznych względem określonej mutacji zostanie zweryfikowane w kolejnych latach przez opisy kolejnych chorych u których stwierdzono identyczne z opisanymi w pracy mutacje w genie *MPZ*.

Pomimo identyfikacji mutacji aż w 30 genach w chorobach kręgu CMT, diagnostyka molekularna dotyczy wciąż tylko choroby CMT1A. Dzieje się tak z wielu przyczyn. Pierwsza z nich to brak technologii umożliwiającej jednocześnie badanie licznych genów, druga nie mniej ważna, to wciąż wysoki koszt badań genetycznych i ich ograniczona dostępność.

W świetle tych faktów wypracowanie modelu diagnostyki genetycznej chorób kręgu CMT w oparciu o korelacje genotypowo-fenotypowe staje się koniecznością. I wreszcie należy stwierdzić, że pomimo rosnącej roli badań genetycznych w chorobach kręgu CMT wykonanie badań w licznych rodzinach jest ciągle niemożliwe. Nawet w zamożnych państwach ograniczeniem jest nieznajomość wszystkich genów „zaangażowanych” w patologię CMT.

W wielu przypadkach nie można ustosunkować się do patogenności zmian stwierdzanych w DNA. Dlatego też wyniki badań genetycznych nie powinny być rozpatrywane niejako „w oderwaniu” od kliniki i innych badań dodatkowych.

To właśnie dzięki wnikliwym obserwacjom klinicznym, badaniom elektrofizjologicznym i neuropatologicznym badania nad podłożem genetycznym chorób kręgu CMT są nie tylko częścią współczesnej biologii lecz nade wszystko mają znaczenie dla medycyny.

Piśmiennictwo

1. Charcot, J-M., and Marie P. Sur une forme particuliere d'atrophie musculaire progressive souvent familiale debutant par les pieds et les jambs et atteignant plus tard les mains. *Rev. Med.* 1886; 6: 97-138.
2. Herringham WP. Muscular atrophy of the peroneal type affecting many members of a family. *Brain* 1889; 11: 230-236.
3. Dejerine MM, Sottas J. Sur la nevrite interstitielle, hypertrophique et progressive de l'enfance. *Memoire lu a la Societe de Biologie, Paris* 1893; 63-96
4. Roussy G, Levy G. Sept cas d'une maladie familiale particuliere. *Rev Neurolog.* 1926; 1: 429-450.
5. Plante-Bordeneuve V, Guiochon-Mantel A, Lacroix C, i wsp. The Roussy-Levy family: from the original description to the gene. *Ann Neurol* 1999; 46(5): 770-773.
6. Bird TD, Ott J, Giblett ER. Genetic linkage evidence for heterogeneity in Charcot-Marie-Tooth neuropathy (HMSN type I). *Am J Hum Genet* 1982; 34: 388-394.
7. Ouvrier RA. Gigant axonal neuropathy: neuropaty review. *Brain Dev* 1989; 11: 207-214.
8. Treiber-Held S, Budjarjo-Welim H, Reimann D, i wsp. Giant axonal neuropathy: a generalized disorder of intermediate filaments with longitudinal grooves in the hair. *Neuropediatrics* 1994; 25: 89-93.
9. Bomont P, Cavalier L, Blondeau F, i wsp. The gene encoding gigaxonin, a new member of the cytoskeletal BTB/kelch repeat family, is mutated in giant axonal neuropathy. *Nat Genet* 2000; 26: 370-374.
10. Othmane KB, Middleton LT, Loprest LJ, i wsp. Localization of a gene (CMT2A) for autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2 to chromosome 1p and evidence of genetic heterogeneity. *Genomics* 1993; 17: 370-375.
11. Zhao Ch, Takita J, Tanaka Y, i wsp. Charcot-Marie-Tooth type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bβ. *Cell* 2001; 105: 587-597.
12. Zuchner S, Mersyanova IV, Muglia M, i wsp. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause CMT neuropathy type 2A. *Nat Genet* 2004; 36(5): 449-451.
13. Fabbretti E, Edomi P, Brancolini C, Schneider C. Apoptotic phenotype induced by overexpression of wild-type gas3/PMP22: its relation to the demyelinating peripheral neuropathy CMT1A. *Genes Dev* 1995; 9: 1846-1856 .
14. Lehmann-Horn F. Disease-causing mutations or functional polymorphisms ? *Acta Myologica* 2004; 23(2): 85-89.
15. De Jonghe P, Timmerman V, Ceuterick C, i wsp. The Thr124Met substitution in the peripheral myelin protein zero (MPZ) gene is associated with a clinically distinct Charcot-Marie-Tooth phenotype. *Brain* 1999; 122: 281-290.
16. Roa BB, Garcia CA, Pentao L, i wsp. Evidence for a recessive PMP22 point mutation in Charcot-Marie-Tooth type 1A disease. *Nat Genet* 1993; 5: 189-194.
17. Kochański A, Drac H, Jędrzejowska H, Hausmanowa-Petrusewicz I. Focally folded myelin in Charcot-Marie-Tooth type 1B disease is associated with Asn131Lys mutation In Myelin Protein Zero gene. *Eur J Neurol* 2003; 10: 547-549 .
18. Chance PF, Alderson MK, Leppig KA, i wsp. DNA deletion associated with hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Cell* 1993; 72: 143-151.
19. Bergoffen J, Scherer SS, Wang S, i wsp. Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* 1993; 262: 2039-2042.
20. Raeymaekers P, Timmerman V, Nelis E, i wsp. Duplication in chromosome 17p11.2 in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a (CMT1a). *Neuromusc Disord* 1991; 1, 93-97.
21. Lupski JR, Montes de Oca-Luna R, Slaugenhaupt S, i wsp.: DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell* 1991; 66, 219-232.

22. Roa B R., Garcia C A., Suter U., i wsp. Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. Association with a spontaneous point mutation in the *PMP22* gene. *N. Engl. J. Med.* 1993; 329: 96-101.
23. Nicholson GA, Valentijn LJ, Cherryson AK, i wsp. A frame shift mutation in the *PMP22* gene in hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Nat Genet* 1994; 6: 263-266.
24. Hayasaka K, Himoro M, Sato W, i wsp.: Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1B is associated with mutations of the myelin *P0* gene. *Nat. Genet.* 1993; 5: 31-34.
25. Kočański A. Mutations in the Myelin Protein Zero result in a spectrum of Charcot-Marie-Tooth phenotypes. *Acta Myologica* 2004; XXIII: 6-9.
26. Street VA, Goldy JD, Golden AS, i wsp. Mapping of Charcot-Marie-Tooth disease type 1C to chromosome 16p identifies a novel locus for demyelinating neuropathies. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 244-250.
27. Street VA, Bennett CL, Goldy JD, i wsp. Mutation of a putative protein degradation gene *LITAF/SIMPLE* in Charcot-Marie-Tooth disease 1C. *Neurology* 2003; 60: 22-26.
28. Saifi GM, Szigeti K, Wiszniewski W, Shy ME, Krajewski K, Hausmanowa-Petrusewicz I, Kočański A, Reeser S, Lupski JR. *SIMPLE/LITAF* mutations in Charcot-Marie-Tooth disease and the potential role of the protein products in peripheral nerve transcriptional regulation and protein degradation *Human Mutation* 2005; 25: 372-383.
29. Warner LE, Mancias P, Butler IJ i wsp. Mutations in the early growth response 2 (*EGR2*) gene are associated with hereditary myelinopathies. *Nat Genet* 1998; 18: 382-384
30. Verhoeven K, De Jonghe P, Coen K. Mutations in the small GTP-ase late endosomal protein *RAB7* cause Charcot-Marie-Tooth type 2B neuropathy *Am J Hum Genet* 2003; 72: 722-727.
31. Klein CJ, Cunningham JM, Atkinson EJ, i wsp. The gene for *HMSN2c* maps to 12q23-24. A region of neuromuscular disorders. *Neurology* 2003; 60: 1151-115610.
32. Antonellis A, Ellsworth RE, Sambuughin N, i wsp. Glycyl tRNA synthetase mutations in Charcot-Marie-Tooth disease type 2D and distal spinal muscular atrophy type V. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 1293-9.
33. Mersyanova I, Perepelov A, Polyakov A, i wsp. A new variant of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 is probably the result of a mutation in the Neurofilament-light gene. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 37-46.
34. Jordanova A, De Jonghe P, Boerkoel C, i wsp. Mutations in the neurofilament light chain gene (*NEFL*) cause early onset severe Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain* 2003; 126: 590-597.
35. Ismailov SM, Fedotov VP, Dadali EL, i wsp. A new locus for autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2 (*CMT2F*) maps to chromosome 7q11-q21. *Eur J Hum Genet* 2001; 9: 645-650.
36. Nelis E, Berciano J, Verpoorten N, i wsp. Autosomal dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease type 2 (*CMT2G*) maps to chromosome 12q12-q13.3. *J Med Genet* 2004; 41(3): 193-197.
37. Tang B, Luo W, Xiao J, i wsp. A new locus for autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2 (*CMT2L*) maps to chromosome 12q24. *Hum Genet* 2004; 114: 527-533.
38. A. Kočański, M. Kennerson, M. Kawulak, i wsp. A mild early onset axonal Charcot-Marie-Tooth disease with primarily lower limb involvement and slow progression. Clinical characteristics and exclusion study of seven axonal CMT loci. *Neurology* 2005; 64(3): 533-535.
39. Gal A, Mucke J, Theile H, Wieacker PF, i wsp. X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease: suggestion of linkage with a cloned DNA sequence from the proximal Xq. *Hum Genet* 1985; 70: 38-42.

40. Priest J.M, Fischbeck KH, Nouri N, i wsp. A locus for axonal motor –sensory neuropathy with deafness and mental retardation maps to Xq24-q26. *Genomics* 1995; 29: 409-412.
41. Ionaescu VV, Trofatter J, Haines JL, i wsp. X-linked recessive Charcot-Marie-Tooth neuropathy: clinical and genetic study. *Muscle Nerve* 1992; 15(3): 368-373.
42. Cuesta A, Pedrola L, Sevilla T, i wsp. The gene encoding ganglioside-induced differentiation protein-1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nat Genet* 2001; 30: 22-25.
43. Baxter RV, Ben Othmane K, Rochelle JM, i wsp. Ganglioside-induced differentiation – associated protein-1 is mutated in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nat Genet* 2002; 30: 21-22
44. Kabzińska D, Kochański A, Drac H, i wsp. A novel Met116Thr mutation in the GDAP1 gene in Polish family with the axonal recessive form of Charcot-Marie-Tooth type 4 disease. *Journal of Neurological Sciences*, w druku.
45. Bolino A, Muglia M, Conforti FL, i wsp. Charcot-Marie-Tooth type 4B is caused by mutation in the gene encoding myotubularin-related protein-2. *Nat Genet* 2000; 25: 17-19.
46. Azzedine H, Bolino A, Taieb T, i wsp. Mutations in the MTMR13, a new pseudophosphatase homologue of MTMR2 and Sbf1, in two families with autosomal recessive demyelinating form of CMT associated with early-onset-glaucoma. *Am J Hum Genet* 2003, May; 72(5): 1141-1153.
47. Gabreels-Festen A, Van Beersen S, Eshuis L, i wsp. Study on the gene and phenotypical characterization of autosomal recessive demyelinating neuropathy (Charcot-Marie-Tooth disease) with a gene locus on chromosome 5q23-q33. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999; May; 66 (5): 569-574.
48. Senderek J, Bergmann C, Stendel C, i wsp. Mutations in a gene encoding a novel SH3/TPR Domain Protein cause autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth type 4C neuropathy *Am J Hum Genet* 2003; 73(6): 1106-1119.
49. Boerkoel CF, Takashima H, Stankiewicz P, i wsp. Periaxin mutations cause recessive Dejerine Sottas neuropathy. *Am J Hum Genet* 2001; 68(2): 325-333.
50. Ionaescu VV, Searby C, Ionaescu R, Neuhaus IM, Werner R (1996) Mutations of the noncoding region of the connexin32 gene in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth neuropathy *Neurology* 47:541-544.
- 51-Baza danych (www.molgen.ua.ac.be)
52. Martin P E M, Mambetisaeva E T, Archer D A, i wsp. Analysis of gap junction assembly using mutated connexins detected in charcot-Marie-Tooth X-linked disease. *J Neurochem* 2000; 74: 711-720.
53. Kochański A, Lofgren A, H. Jędrzejowska, i wsp. A novel connexin 32 missense mutation (E208G) causing Charcot-Marie-Tooth disease *Hum Mut* 17: 157
54. Kochański A, Kabzińska D. Molecular genetic analysis of the GJB1 gene: a study of six mutations. *J Appl Genet* 2004; 45(1), 95-100.
55. Kochański A, Ryniewicz B, Jędrzejowska H, Kabzińska D. Choroba Charcot-Marie-Tooth typu X- charakterystyka kliniczno-genetyczna jedenastu chorych. *Neurol Neurochir Pol* 2002; T36(LII), Nr 6, 1087-1094.
56. Kochański A, Nowakowski A, Kawulak M, i wsp. Somatic mosaicism in Charcot-Marie-Tooth type X disease. *Neurology* 2004; 62, 2: 336-337.
57. Kochański A, Timmerman V, Jędrzejowska H, i wsp. Mutation screening of Charcot-Marie-Tooth patients in Poland. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 883: 493-497.
58. Ryniewicz B, Jędrzejowska H, Kochański A. Korelacja genotypowo-fenotypowa w dziedzicznej neuropatii ruchowo-czuciowej typu IA związanej z duplikacją w chromosomie 17p11.2-p12. *Neurol Neurochir Pol* 2000; T. 34 (L), 6: 1145-1153.

59. Thomas P.K., Marques W, Davis M.B., i wsp. The phenotypic manifestations of chromosome 17p11.2 duplication. *Brain* 1997; 120: 465-478.
60. Birouk N, Gouider R, Le Guern E, i wsp. Charcot-Marie-Tooth disease type 1A with 17p11.2 duplication *Brain* 1997; 120: 813-823.
61. Gouider R, Le Guern E, Gugenheim M, i wsp. Clinical, electrophysiologic and molecular correlations in 13 families with hereditary neuropathy with liability to pressure palsies and chromosome 17p11.2 deletion. *Neurology* 1995; 45: 2018-2023.
62. Cruz-Martinez A, Bort S, Arpa J i wsp. Clinical, genetic and electrophysiologic correlation in hereditary neuropathy with liability to pressure palsies with involvement of PMP22 gene at chromosome 17p11.2. *Eur J Neurol* 1997; 4: 274-286.
63. Kochański A, Lofgren A, Timmerman V, i wsp. Molecular genetic diagnosis of the 1.5Mb deletion causing hereditary neuropathy with liability to pressure palsies (HNPP) in a Polish family. *J Appl Genet* 1999; 40(3): 249-255.
64. Jędrzejowska H, Fidziańska A, Kochański A. Uncompacted myelin in hereditary neuropathy with liability to pressure palsies with the 17p11.2 deletion. *Folia Neuropathologica* 1999; 37, 4: 220-226.
65. Kochański A, Kabzińska D. Two de novo Ser72Leu mutations In the peripheral Myelin Protein 22 gene in two Polish patients. *Acta Biochimica Polonica*, 2004; 51(4): 1047-1050.
66. Hoffman PN, Lasek RJ. The slow component of axonal transport: identification of the major structural polypeptides of the axon and their generality among mammalian neurons. *J Cell Biol* 1975; 66: 351-366.
67. Julien JP, Couillard –Despres S, Meier J. Transgenic mice in the study of ALS: The role of neurofilaments. *Brain Pathol* 1998; 8: 759-769.
68. Vogel P, Gabriel M, Goebel HH, i wsp. Hereditary motor sensory neuropathy type II with neurofilament accumulation: new finding or new disorder? *Ann Neurol* 1985; 17: 455-461.
69. Yamamoto M, Yoshihara T, Hattori N, Sobue G. Glu528del in NEFL is a polymorphic variant rather than a disease –causing mutation for Charcot-Marie-Tooth disease in Japan. *Neurogenetics* 2004; 5: 75-77.
70. Kochański A. Mutations in the neurofilament light chain gene (NEFL)- a study of a possible pathogenous effect. *Folia Neuropathologica* 2004; 42: 187-190.
71. Kabzińska D, Kochański A, Perez-Olle R, Goryunov D, Drac H, Ryniewicz B, Hausmanowa-Petrusewicz I, Liem R. A novel Ile214Met substitution in the NEFL gene In two patients with Charcot-Marie-Tooth disease, mutation or polymorphism, *Neuroscience Letters*, praca wysłana do redakcji.
72. Nelis E, Holmberg B, Adolfsson R, Holmgren G, Van Broeckhoven Ch. PMP22 Thr(118)Met: recessive CMT1 mutation or polymorphism? *Nat Genet* 1997; 15: 13-14.
73. Warner LE, Hilz MJ, Appel SH i wsp. Clinical phenotypes of different MPZ (P0) mutations may include Charcot-Marie-Tooth type 1B, Dejerine-Sottas, and congenital hypomyelination. *Neuron* 1996; 17: 451-460.
74. Sziget K, Saifi MG, Armstrong D i wsp. Disturbance of muscle fiber differentiation in congenital hypomyelinating neuropathy caused by a novel myelin protein zero mutation. *Ann Neurol* 2003; 54: 398-402.
75. Kochański A, Drac H, Kabzińska D i wsp. A novel MPZ gene mutation in congenital neuropathy with hypomyelination. *Neurology* 2004; 62: 2122-2123.
76. Kochański A, Kabzińska D, Drac H, i wsp. Early onset Charcot-Marie-Tooth type 1B disease caused by a novel Leu190fs mutation in the Myelin Protein Zero gene. *European Journal of Paediatric Neurology*, 2004, Vol 8(4); 221-224.
77. Kochański A, H. Drac, H. Jędrzejowska, i wsp. „ Focally folded myelin in Charcot-Marie-Tooth type 1B disease is associated with Asn131Lys mutation In Myelin Protein Zero gene-short report. *European Journal of Neurology* 2003, 10: 547-549

96. Lagueny A, Latour A, Vital A i wsp. Mild recurrent neuropathy in CMT1B with a novel nonsense mutation in the extracellular domain of the *MPZ* gene. *J Neurol Neurosurg Psych* 2001; 70: 232-235.
97. Birouk N, Le Guern E, Maisonobe T, i wsp. X-linked Charcot-Marie-Tooth disease with connexin 32 mutations. Clinical and electrophysiologic study. *Neurology* 1998; 50: 1074-1082.
98. Sorour E, Thompson P, MacMillan J, i wsp. Inheritance of CMT1A duplication from mosaic father. *J Med Genet* 1995; 32: 483-485.
99. Fabrizi G.M., Ferrarini M, Cavallaro T i wsp. Somatic and germline mosaic mutation in *MPZ/P0* mimics recessive inheritance of CMT1B. *Neurology* 2001; 57: 101-105.

Mild early onset axonal Charcot-Marie-Tooth disease not linked to other axonal Charcot-Marie-Tooth loci

Abstract—Autosomal dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease type 2 (CMT2) is a heterogeneous group of disorders with seven chromosomal loci mapped in the uncomplicated forms of CMT2. The authors report clinical, electrophysiologic, and genetic analysis of a Polish CMT2 family. Nine known CMT2 gene loci and one MPZ gene locus have been excluded. The authors' findings suggest that this family represents a novel form of CMT2 disease.

NEUROLOGY 2005;64:533–535

A. Kochański, MD, PhD; M. Kennerson, PhD; M. Kawulak; B. Ryniewicz, MD, PhD; K. Rowińska-Marcińska, MD, PhD; G. Walizada, BSc; A. Nowakowski, BSc; I. Hausmanowa-Petrusewicz, MD, PhD; and G.A. Nicholson, MD, PhD

Charcot-Marie-Tooth disease type 2 (CMT2) is a genetically heterogeneous group of disorders with both autosomal dominant and recessive forms. The autosomal dominant form of CMT2 is also heterogeneous. The CMT2A locus (MIM 118210) was mapped to chromosome 1p35-p36.¹ The CMT2B locus (MIM 600882), with a phenotype characterized by severe sensory loss and ulcerations of the distal part of the lower limbs, was mapped to chromosome 3q13-q22.² CMT2D (MIM 601472) was mapped to chromosome 7p14 in a family with predominant muscle weakness and atrophy in the hands, with an age at onset in the second or third decade.³

CMT2C (MIM 606071) was mapped to the 12q23-24 region.⁴ In CMT2E (MIM 607684) on chromosome 8p12, six mutations in the neurofilament light chain gene (*NEFL*) have been reported.⁵ The sixth CMT2 locus was mapped in a multigenerational Russian family to chromosome 7q11-q21 and was designated as CMT2F (MIM 606595).⁶

Recently, CMT2G (MIM 608591) and L (MIM 608673) subtypes have been mapped to 12q12-q13.3⁷ and 12q24 chromosomes.⁸ In the past 2 years, three loci have been mapped for intermediate types of autosomal dominant CMT. These disorders have both axonal and demyelinating features. Dominant intermediate CMT type 2B (DI-CMTB, MIM 606482) was mapped to a 19p12-13.2 locus,⁹ and DI-CMTA (MIM 606483) was mapped to a 10q24.1-25.1 locus.¹⁰ A new form of intermediate CMT has also been reported (DI-CMTJ), mapping to 1p34-35.¹¹

In this paper, we report the clinical characteristics of a five-generation CMT2 family that excludes linkage to loci for CMT2, DI-CMTA, and DI-CMTB. Our study indicates that this family has a novel form of CMT2.

Clinical features. The pedigree shows probable autosomal dominant inheritance, although no male-to-male inheritance was seen (figure 1). Twelve members of the family were examined. Their motor milestones were normal. Asymptomatic members of the youngest generation (V) were not examined because of their age. The age at onset ranged between 6 (IV:4) and 14 (III:4) years (table 1). Neurologic examination was performed in patients aged 12 to 56 years. Patients III:4, III:8, IV:9, and IV:11 had atrophy of the forearm muscles and the thenar eminence muscles. No distal wasting in the upper limbs was observed in patients IV:4 and V:4. Deep tendon reflexes in the upper limbs were preserved in all patients except IV:11. Distal muscle atrophy in the lower limbs and pes cavus deformity were observed in all patients (figure 2). The knee reflexes were preserved in all patients. Achilles tendon reflexes were retained only in V:4. Touch and pain senses were impaired distally in both the upper and lower limbs in all examined patients.

A sural nerve biopsy specimen was not available from any affected member of the CMT2 family.

Electrophysiologic features. Electrophysiologic studies were performed in six members of the family (aged 7 to 36 years) (table 2). Median motor conduction velocities and compound motor action potentials were normal. In two clinically affected patients (III:8 and IV:11), there was no response to stimulation of the peroneal nerve. In the other examined patients except IV:6, the distal latency in the peroneal nerve was prolonged. Median sensory conduction velocity was reduced in two patients (IV:6 and IV:4, the latter had a markedly reduced amplitude). The slightly prolonged distal latencies and reduced median sensory conduction velocities most probably were observed as a secondary phenomenon to the axonal loss.

The amplitudes of the compound motor action potential in the lower limbs were markedly reduced, except in patient IV:6. The sensory nerve action po-

From the Neuromuscular Unit (Dr. Kochański, M. Kawulak, Dr. Rowińska-Marcińska, A. Nowakowski, and Dr. Hausmanowa-Petrusewicz), Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland; University of Sydney Neurobiology Laboratory (Dr. Kennerson, G. Walizada, and Dr. Nicholson), Inzac Research Institute, Concord Hospital, New South Wales, Australia; and Department of Neurology (Drs. Ryniewicz and Rowińska-Marcińska), Medical University, Warsaw, Poland.

Supported by grant no. 2P05B from the Polish State Committee for Scientific Research and grant no. 153895 from the National Health and Medical Research Council of Australia (G.A.N. and M.K.).

Received April 6, 2004. Accepted in final form September 16, 2004.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Andrzej Kochański, Neuromuscular Unit, Polish Academy of Sciences, Medical Research Centre, Pawińskiego 5, 02-106 Warsaw, Poland; e-mail: andko@emdik.pan.pl

Table 1 Clinical data of the patients, classified according to their generation number

Patient	Age, y	Age at onset, y	Distal wasting in legs	Distal wasting in upper limbs	Tendon reflexes			Sensory disturbances
					Upper limbs	Knee	Ankle	
IV:4	19	6	+	0	+	+	0	+
III:4	51	14	+	+	+	+	0	+
V:4	12	10	+	0	+	+	+	+
IV:11	32	7	+	+	0	+	0	+
III:8	56	11	+	+	+	+	0	+
IV:9	32	8	+	+	+	+	0	+

+ = present; 0 = absent.

potential amplitudes in the sural nerve were reduced in four patients and absent in one patient (V:4).

DNA analysis. DNA analysis was performed at the Neurobiology Laboratory, ANZAC Research Institute. DNA was extracted from 13 family members (seven affected, six healthy individuals). Informed consent was obtained according to the Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences protocol. Short tandem repeat genotype analysis was performed for nine known CMT2 loci. Short tandem repeat analysis and two-point linkage studies were performed. The *Cx32* gene was sequenced, and no abnormalities were found.

The *MPZ* gene was excluded by linkage analysis. A negative score (< -2) was obtained for at least one marker at each locus, indicating that linkage to all the above loci are excluded in this family.

Discussion. The patients described in this study suffer from a slowly progressive motor and sensory neuropathy that was shown to be a novel genetic entity by exclusion of seven known loci for autosomal dominant forms of CMT2. Although no male-to-male inheritance was found, the clinical severity was equal in males and females and no connexin32 mutations were found. Similarly, no significant differences in the results of electrophysiologic examination were observed between CMT affected females and males.

There are two clinical hallmarks of CMT observed in this family that may be helpful to separate it from other CMT2 phenotypes with an autosomal dominant inheritance.

First, CMT2 in the family reported begins at the end of the first decade (IV:4, IV:10, IV:11) or in the second decade (III:2, III:4). The apparent earlier age

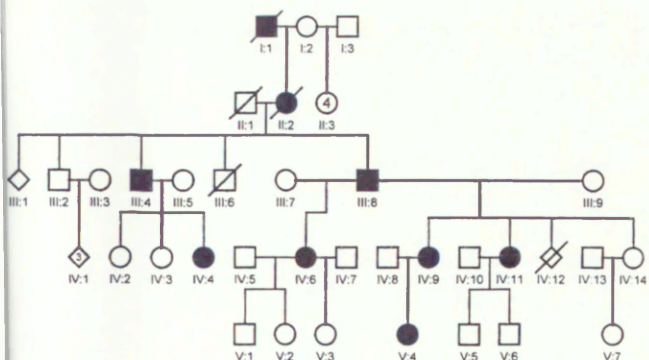


Figure 1. Pedigree of a Polish family with Charcot-Marie-Tooth disease type 2 neuropathy. Squares = males; circles = females; slashed symbols = deceased; filled symbols = definitely affected; empty symbols = unaffected.



Figure 2. Pes cavus and severe atrophy of the calves of patient IV:9.

Table 2 Electrophysiologic studies of seven members of the CMT2 family

Patient	Age at time of examination, y	Median nerve					Peroneal nerve			Sural nerve	
		MNCV, m/s	DL	CMAP, mV	SNCV, m/s	SNAP, μ V	MNCV, m/s	DL	CMAP, mV	SNCV, m/s	SNAP, μ V
IV:4	7	53.7	3.3	9.0	54.1	9.0	37.6	5.5	0.15	42.8	1.0
V:4	12	56.6	3.0	13.2	62.5	3.7	46.0	5.0	0.81	NR	NR
IV:11	11	50.0	2.8	14.0	68.0	11.0	NR	—	—	18.7	1.25
III:8	36	59.4	3.3	14.0	58.3	12.0	NR	—	—	21.3	5.0
IV:9	20	63.7	4.0	15.0	45.3	15	42.1	7.6	0.16	31.0	2.5
IV:6	17	46.0	4.0	18.0	35.1	9.0	62.7	4.5	7.0	43.3	30.0
Range of normal values		59.11 \pm 4.08	3.42 \pm 0.39	8.8 \pm 2.91	62.37 \pm 7.3	12.29 \pm 7.05	50.24 \pm 5.85	3.9 \pm 0.6	6.1 \pm 2.59	53.2 \pm 4.19	17.46 \pm 5.44

MNCV = motor nerve conduction velocity; DL = distal latency; CMAP = distal compound motor action potential amplitude; SNCV = sensory nerve conduction velocity; SNAP = sensory nerve action potential amplitude; NR = no response.

at onset in the fourth generation may reflect intrafamilial variability or may be associated with earlier recognition of the first symptoms of CMT.

Second, CMT2 reported in this study is a slowly progressive neuropathy without any additional features seen in other types of CMT2. The diagnosis of CMT disease reported in this study should be considered in CMT2 families who do not have vocal cord paresis (CMT2C), foot ulceration (CMT2B), or selective wasting of the first interosseus muscles (CMT2D).^{2,4}

CMT2E is characterized by early infancy onset, but, contrary to the CMT reported in this study, CMT2E is clinically more severe with markedly slowed nerve conduction velocities.⁵

Although we excluded linkage of CMT2 reported in this study to the CMT2A G and L loci on chromosomes 1p35-p36, 12q12-q13.3, and 12q24, the clinical picture of CMT2 reported here is similar to that previously reported in CMT2A G and L.^{1,7,8}

At the electrophysiologic level, the most indicative hallmark of CMT2 reported in this study seems to be a disproportionate distribution of the motor and sensory nerve involvement between the upper (normal values) and lower (reduced values) limbs.

References

- Othmane K, Middleton LT, Loprest LJ, et al. Localization of a gene (CMT2A) for autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2 to chromosome 1p and evidence of genetic heterogeneity. *Genomics* 1993;17:370-375.
- Kwon JM, Elliot JL, Yee WC, et al. Assignment of a second Charcot-Marie-Tooth type II locus to chromosome 3q. *Am J Hum Genet* 1995;57:853-858.
- Ionasescu V, Searby C, Sheffield VC, et al. Autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth axonal neuropathy mapped on chromosome 7p (CMT2D). *Hum Mol Genet* 1996;5:1373-1375.
- Klein CJ, Cunningham JM, Atkinson EJ, et al. The gene for HMSN2c maps to 12q23-24. A region of neuromuscular disorders. *Neurology* 2003;60:1151-1156.
- Jordanova A, De Jonghe P, Boerkoel C, et al. Mutations in the neurofilament light chain gene (NEFL) cause early onset severe Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain* 2003;126:590-597.
- Ismailov SM, Fedotov VP, Dadali EL, et al. A new locus for autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2 (CMT2F) maps to chromosome 7q11-q21. *Eur J Hum Genet* 2001;9:645-650.
- Nelis E, Berciano J, Verpoorten N, et al. Autosomal dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease type 2 (CMT2G) maps to chromosome 12q12-q13.3. *J Med Genet* 2004;41:193-197.
- Tang B, Luo W, Xiao J, et al. A new locus for autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2 (CMT2L) maps to chromosome 12q24. *Hum Genet* 2004;114:527-533.
- Kennerson ML, Zhu D, Gardner RJ, et al. Dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth neuropathy maps to chromosome 19p12-p13.2. *Am J Hum Genet* 2001;69:883-888.
- Verhoeven K, Villanova M, Rossi A, et al. Localization of the gene for the intermediate form of Charcot-Marie-Tooth to chromosome 10q24.1-q25.1. *Am J Hum Genet* 2001;69:889-894.
- Jordanova A, Thomas FP, Guergueltcheva V, et al. Dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth type C maps to chromosome 1p34-p35. *Am J Hum Genet* 2003;73:1423-1430.

Communication

***De novo* Ser72Leu mutation in the peripheral myelin protein 22 in two Polish patients with a severe form of Charcot-Marie-Tooth disease²**

Andrzej Kochański^{2*} and Dagmara Kabzińska

Neuromuscular Unit, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Warszawa, Poland

Received: 26 February, 2004; revised: 23 June, 2004; 30 August, 2004

Key words: *PMP22* gene mutations, S72L mutation

To date, 12 cases of heterozygous Ser72Leu mutations in the peripheral myelin protein 22 have been reported in patients suffering from severe demyelinating form of Charcot-Marie-Tooth disease (CMT1) and congenital hypomyelinating neuropathy (CHN) [MM# 605253]. In the present study we report two cases of *de novo* S72L mutations in the *PMP22* gene detected in patients of Polish origin suffering from CMT1 disease.

Charcot-Marie-Tooth disease (CMT) is the most common inherited neuromuscular disorder in man, with an overall prevalence of 1 in 2500 (Skre, 1974). CMT is an extremely heterogeneous group of disorders. In general, it is characterized by progressive weakness and atrophy of distal muscles, absence of

deep tendon reflexes, and sensory abnormalities (Harding & Thomas, 1980).

Between 1991 and 2004, thirty three genes have been shown to be mutated in different forms of CMT disease. The biological functions of the proteins encoded by the genes mutated in CMT cover a wide spectrum en-

²The study was supported by grant No. 6P05E05820.

*Correspondence to: Andrzej Kochański, Neuromuscular Unit, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, A. Pawińskiego 5, 02-106 Warsaw, Poland; fax: (18 22) 658 4501, e-mail: andko@cmdik.pan.pl

Abbreviations: CMT, Charcot-Marie-Tooth disease; HNPP, hereditary neuropathy with liability of pressure palsies; SSCP, single-stranded conformation polymorphism.

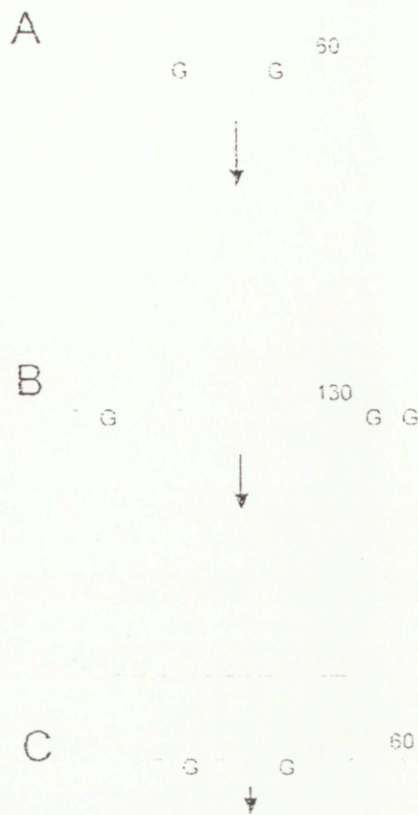


Figure 1. Fluorograms from direct sequencing of the *PMP22* gene exon 3.

A. Arrow indicates the C/T (sense strand) heterozygosity at the nucleotide position 264 (codon 72). B. Arrow indicates the G/A (antisense strand) heterozygosity at the nucleotide position 261 (codon 72). C. Wild type sequence in a healthy individual.

ples from the parents revealed a normal, wild-type sequence.

Our study is the first ones to document the presence of a heterozygous S72L mutation in patients originating from Poland.

Since its first description in 1993, the S72L mutation has been reported in 12 patients originating from America, Europe and Asia (Ionasescu *et al.*, 1996; Marques *et al.*, 1998; Numakura *et al.*, 2002). Only in one case was

the S72L mutation reported to be transmitted from a mother to the child (Roa *et al.*, 1993).

The S72L mutation has been reported only in the heterozygous state. It is possible that homozygous S72L mutation may be lethal.

Whether the Ser72Leu substitution alters the structural or regulatory function of the PMP22 protein remains unknown.

Loss-of-function mutations in the *PMP22* gene are associated with the phenotype of HNPP [MIM #162500]. HNPP was previously reported to result from a deletion of one *PMP22* gene allele (Chance *et al.*, 1993). Although heterozygous Val30Met and Ala67Thr mutations do not result in deletion of the *PMP22* gene, they are associated with the HNPP phenotype (Sahenk *et al.*, 1998; Nodera *et al.*, 2003). Thus, the Val30Met and Ala67Thr mutations may be classified as loss-of-function substitutions. Recently, a Cys109stop mutation was reported in the *PMP22* gene in CMT1 affected patients. The heterozygous Cys109stop mutation, although classified as a loss-of-function, did not result in the HNPP phenotype. Thus, the identification of the Cys109stop mutation in the *PMP22* gene segregating with CMT1 phenotype suggests that the relationship between the type of mutation and the phenotype is not as straightforward as previously reported (Abe *et al.*, 2004).

In contrast to the loss-of-function mutations, the heterozygous S72L substitution in the PMP22 protein results in the severe phenotype of the Charcot-Marie-Tooth disease.

On the basis of the relatively high rate of S72L mutations in the *PMP22* gene, the Ser72Leu was designed as a possible "hot spot" in the PMP22 gene. The S72L mutation is located in a CpG rich region of the *PMP22* gene which is a hypermutable region (Marques *et al.*, 1998).

The molecular basis of the dominant negative effect of this mutation remains unknown. Further *in vitro* studies using cells transfected with the S72L mutated gene or transgenic animals are required to shed light on

compassing small ion channels (*Cx32*) and transcription factors (*EGR-2*) (Reilly, 2000).

The first gene mutation detected in CMT disease (Raeymaekers *et al.*, 1991) was duplication of the peripheral myelin protein gene (*PMP22*).

Peripheral myelin protein of 22 kDa (*PMP22*) [MIM # 601097] is a myelin molecule associated with Schwann cells of peripheral nerves. *PMP22* is produced in a glycosylated form that appears to be generated from an 18 kDa precursor (Pareek *et al.*, 1993). The protein is associated structurally with Schwann cell membranes and similarly to other proteins of compact myelin it is produced when myelin is being formed. The role of the *PMP22* protein in the peripheral nervous system is still unknown and two functions have been postulated so far. The *PMP22* gene was shown to be associated with the regulation of the cell cycle and myelin structure in the peripheral nervous system.

The *PMP22* mRNA is identical to growth arrest-specific-3 mRNA (*Gas-3*; Welcher *et al.*, 1991). The *Gas-3* gene has been shown to be associated with cellular growth arrest in the G0 phase of the cell cycle (Schneider *et al.*, 1988). On the other hand, the autosomal dominant point mutations in the *PMP22* gene were found in the trembler (*Tr*) and trembler-J (*Tr^J*) mice (Suter *et al.*, 1992a; 1992b). Those mice mutants show limb paralysis, tremor, seizures and severe hypomyelination of peripheral nerves.

In humans, *PMP22* gene duplication was shown to segregate with the most common inherited peripheral neuropathy, i.e. Charcot-Marie-Tooth type 1A disease (CMT1A) [MIM# 118220] (Timmerman *et al.*, 1992). Eleven mutations in the *PMP22* gene have been shown to segregate with hereditary neuropathy with liability to pressure palsies (HNPP). In patients suffering from Dejerine-Sottas disease, 19 mutations in the *PMP22* gene have been reported (Web site). Only one mutation, i.e. S72L, was reported in the congeni-

tal hypomyelinating neuropathy (CHN) (Roa *et al.*, 1993).

In this study we report on two unrelated patients of Polish origin harboring *de novo* S72L substitutions in the *PMP22*. Until now, the S72L substitution in the *PMP22* has not been reported in Polish patients.

MATERIAL AND METHODS

Genomic DNA was extracted from white blood cells of two patients and their parents. In the two patients, a diagnosis of congenital hypomyelinating neuropathy was established (Dr. H. Drac). Four exons of the peripheral myelin protein 22 gene (*PMP22*) were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using previously published primers (Roa *et al.*, 1993). For mutation screening, single stranded conformation polymorphism analysis (SSCP) was performed in the probands and their healthy parents as previously described. Amplification products of exon 3 of the *PMP22* gene were sequenced using Big Dye Terminator Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems). Samples were run and analyzed on an ABI PRISM 373 fluorescent DNA sequencer (Applied Biosystems).

RESULTS AND DISCUSSION

An altered SSCP pattern of exon 3 of the *PMP22* gene was found in the two patients.

Direct DNA sequencing of exon 3 performed in the two patients revealed a heterozygous missense mutation at codon 72 (TCG to TTG) resulting in the serine to leucine amino acid change (Fig. 1). SSCP analysis of the *PMP22* gene in the patients healthy parents did not show any abnormality, suggesting that the *PMP22* gene was most likely not mutated.

In addition, DNA sequencing of exon 3 of the *PMP22* gene performed on the DNA sam-

the nature of the dominant negative effect of the S72L mutation in humans.

The authors wish to thank Prof. Irena Hausmanowa-Petrusewicz for critical reading of this manuscript. We thank Mrs. Jadwiga Kedzierska for technical assistance.

REFERENCES

- Abe KT, Lino AM, Hirata MT, Pavaneilo RC, Brotto MW, Marchiori PE, Zatz M. (2004) *Neuromuscl Disord.*; 14: 313-20.
- Chance PF, Alderson MK, Leppig KA, Lensch MW, Matsunami N, Smith B, Swanson PD, Odeberg SJ, Distèche CM, Bird TD. (1993) *Cell.*; 72: 143-51.
- Harding AE, Thomas PK. (1980) *Brain.*; 103: 259-80.
- Ionasescu VV, Searby C, Greenberg SA. (1996) *J Med Genet.*; 33: 1048-9.
- Marques W Jr, Thomas PK, Sweeney MG, Carr L, Wood NW. (1998) *Ann Neurol.*; 43: 680-3.
- Nodera H, Nishimura M, Logigian EL. (2003) *Neurology.*; 60: 1863-4.
- Numakura C, Lin C, Ikegami T, Guldborg P, Hayasaka H. (2002) *Hum Mutat.*; 20: 392-8.
- Pareek S, Suter U, Snipes J, Welcher AA, Shooter EM, Murphy RA. (1993) *J Biol Chem.*; 14: 10372-9.
- Raeymaekers P, Timmerman V, Nelis E, De Jonghe P, Hoogendijk JE, Baas F, Barker DF, Martin JJ, De Visser M, Bolhuis PA et al. (1991) *Neuromuscl Disord.*; 1: 93-7.
- Reilly MM. (2000) *Curr Opin Neurol.*; 13: 561-4.
- Roa BB, Dyck PJ, Marks HG, Chance PF, Lupski JR. (1993) *Nat Genet.*; 5: 269-73.
- Sahenk Z, Chen L, Freimer M. (1998) *Neurology.*; 51: 702-7.
- Schneider C, King R, Philipson L. (1988) *Cell.*; 54: 787-93.
- Simonati A, Fabrizi GM, Pasquinelli A, Taioli F, Cavallaro T, Morbin M, Marcon G, Pupini M, Rizzuto N. (1999) *Neuromuscl Disord.*; 9: 257-61.
- Skre H. (1974) *Clin Genet.*; 6: 98-118.
- Suter U, Welcher A, Ozcelik T, Ozcelik T, Snipes GJ, Kosaras B, Francke V, Billings-Gagliardi S, Sidman RC, Shooter EM. (1992a) *Nature.*; 356: 241-4.
- Suter U, Moskov J, Welcher A, Snipes GJ, Kosaras B, Sidman RL, Buchbental A, Shooter EM. (1992b) *Proc Natl Acad Sci USA.*; 89: 4382-6.
- Timmerman V, Nelis E, Van Hul W, Nieuwhijisen BW, Chen KL, Wang S, Ben Othmane K, Cullen B, Leach RJ, Hanemann CO. (1992) *Nat Genet.*; 1: 171-5.
- Welcher A, Suter U, De Leon M, Snipes G, Shooter EM. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA.*; 88: 7195-9.

Molecular genetic analysis of the *GJB1* gene: a study of six mutations

Andrzej KOCHAŃSKI, Dagmara KABZIŃSKA

Neuromuscular Unit, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Warszawa, Poland

Abstract: Charcot-Marie-Tooth type X1 disease (CMTX1) is an X-dominant peripheral neuropathy caused by mutations in the *GJB1* gene. Molecular genetic analysis of the *GJB1* gene is crucial for CMTX1 diagnosis and for genetic counselling. To date, molecular genetic analysis of the *GJB1* gene revealed 264 mutations in the *GJB1* gene. In spite of the rising number of *GJB1* gene mutations, family history was documented in only a few CMTX1 cases. The aim of this study was a molecular genetic analysis of the *GJB1* gene in 7 families, performed in 19 CMTX1-affected patients and 13 healthy family members. Moreover, we attempted to report evidence of effects of 6 amino-acid substitutions described in this study. To the best of our knowledge, the G110D, V152D and K167E mutations are novel substitutions, which have not been reported so far.

Key words: *GJB1* gene, CMTX1 disease.

Introduction

Charcot-Marie-Tooth disease (CMT) affects about 1/3000 individuals (SKRE 1974). CMT is characterized by progressive sensory-motor neuropathy, distal muscle weakness and atrophy, sensory loss, and decreased or absent deep tendon reflexes. In 10-20% of CMT patients, an X-chromosome-linked type (CMTX) may be diagnosed (IONASESCU et al. 1996). The X-dominant form of CMTX1 (MIM # 304040) accounts for 90% of all CMTX cases. The *CMTX1* locus has been assigned to the proximal long arm of the X-chromosome (GAL et al. 1985). In 1993, six different point mutations were detected in the *GJB1* gene in CMTX1-affected families (BERGOFFEN et al. 1993). In the period between 1993 and 2003, over 260 mutations were reported in CMTX1 disease

Received: October 8, 2003. Accepted: November 13, 2003.

Correspondence: A. KOCHAŃSKI, Neuromuscular Unit, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, ul. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa, Poland, e-mail: andko@cmdik.pan.pl

(Website-database). However, the number of mutations in the *GJB1* gene is still rising, and 23 of them (9%) are designated as 'status unknown' due to lack of sufficient clinical descriptions. For only 26 mutations (10%) in the *GJB1* gene, family history of CMTX1 disease is documented. Molecular genetic analysis of the *GJB1* gene is crucial for CMTX1 diagnosis and genetic counselling for probands and their relatives. Even amino-acid changing substitutions found in the *GJB1* gene may represent silent mutations not associated with the CMTX phenotype. Some mutations in the *GJB1* gene were detected in many CMTX1 patients or families, but many CMTX1-causing mutations were reported in one CMTX1 patient without any familial history. The aim of this study was to analyse 6 mutations in the *GJB1* gene found in 19 CMTX1-affected patients.

Material and methods

The clinical and electrophysiological characteristics of CMTX-affected patients were reported previously by us (KOCHAŃSKI et al. 2002). DNA was isolated from white blood cells from 19 CMTX-affected patients and 13 healthy family members from 7 families. The coding sequence of the *GJB1* gene was amplified with previously published primers (BERGOFFEN et al. 1993). For single-strand conformation polymorphism analysis (SSCP), 4 μ L of the PCR products were mixed with an equal volume of formamide sample buffer (95% formamide, 20 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanole) and heated to 95°C for 5 min. After rapid cooling on ice, samples were subjected to non-denaturing gel electrophoresis with the use of 6% acrylamide gel (acrylamide: bis-acrylamide 99 : 1) at 7 W for 20 h. After electrophoresis the gels were silver-stained. The PCR products revealing abnormal SSCP migration pattern were directly sequenced on an ABI PRISM 377 automated fluorescent DNA sequencer (Applied Biosystems). Restriction enzyme analysis was performed in 30 μ L of total volume. Ten microlitres of PCR products were mixed with 3 μ L of 10 \times digestion buffer (as supplied by the manufacturer) and 5 U of respective enzyme. Reactions with TaqI, AclI, and BsuRI were incubated overnight at 37°C. Digested fragments were separated on 3% agarose gel at 50 V for 3 h and visualised with ethidium bromide in UV light.

Results

In family JAN1 an altered SSCP analysis was not performed. Direct sequencing of *GJB1* part 2 revealed a c.329G > A base change causing a G110D substitution. The G110D mutation was found in heterozygous form in the proband's mother and as a hemizygote in the proband. The transition at position 329 destroys

the endonuclease restriction site *Bsu* RI, resulting in presence of an additional 165 bp allele in the hemizygous proband and his heterozygous mother.

Sequencing performed in family JUM2 revealed a heterozygous c.455T > A base change replacing Val by Asp (V152D) at codon 152 in the CMTX1-affected proband's mother (heterozygote) and two her sons (hemizygotes). The sequence of the proband's father was not changed at codon 152. The SSCP analysis performed in the proband of the KT5 family revealed an aberrant shift suggesting a mutation in the second part of the *GJB1* gene. Sequencing of the *GJB1* gene performed in the proband and his mother disclosed a c.499A > G transition, which results in the K167E substitution. In family NIM3, a SSCP analysis of part 2 of the *GJB1* gene revealed an altered migration pattern in the proband and his mother, suggesting that this part of the *GJB1* gene is most probably mutated. A sequencing analysis revealed a c.548G > A base change resulting in the R183H mutation. In family BK4, SSCP analysis showed an altered pattern in the proband and his mother. No altered pattern was found in his father and grandfather. Again, the sequencing analysis detected a heterozygous c.548G > A substitution resulting in the R183H mutation in the proband and his mother. SSCP analysis in family SB6 revealed an altered migration pattern in 5 CMTX-affected family members and a normal pattern in 4 healthy individuals. Direct sequencing of part 2 of the *GJB1* gene showed a hemizygous (three affected males) and heterozygous (two affected females) c.623A > G mutation resulting in an E208G substitution. In the last family MA7, SSCP revealed an altered migration pattern of the PCR product corresponding to part 2 of the *GJB1* gene in the proband, his mother and grandfather. No altered migration pattern was detected in the proband's healthy sister, his father, and 2 negative controls. The automated DNA sequencing revealed a hemizygous c.622G > A substitution resulting in the E208K amino acid change in the proband and his brother and a heterozygous E208K mutation in the proband's mother and grandfather.

Discussion

The mutations in the Cx32 protein were found in intracellular, second extracellular parts, and at the boundary between the transmembrane part and C-terminus of the Cx32 protein (Figure 1).

The E208G substitution was the first Cx32 mutation found in the Polish population (KOCHANOSKI et al. 2001). In a large group of healthy controls and DNA samples of CMT-affected patients analysed in our laboratory, no E208G substitution was found.

In contrast to the E208G mutation, the E208K substitution found in 4 members of family MA7 was previously reported in other CMTX families from Russia, Spain and Great Britain (FAIRWEATHER et al. 1994, HAITES et al. 1998, HAHN et al. 1999, MERSIYANOVA et al. 2000).

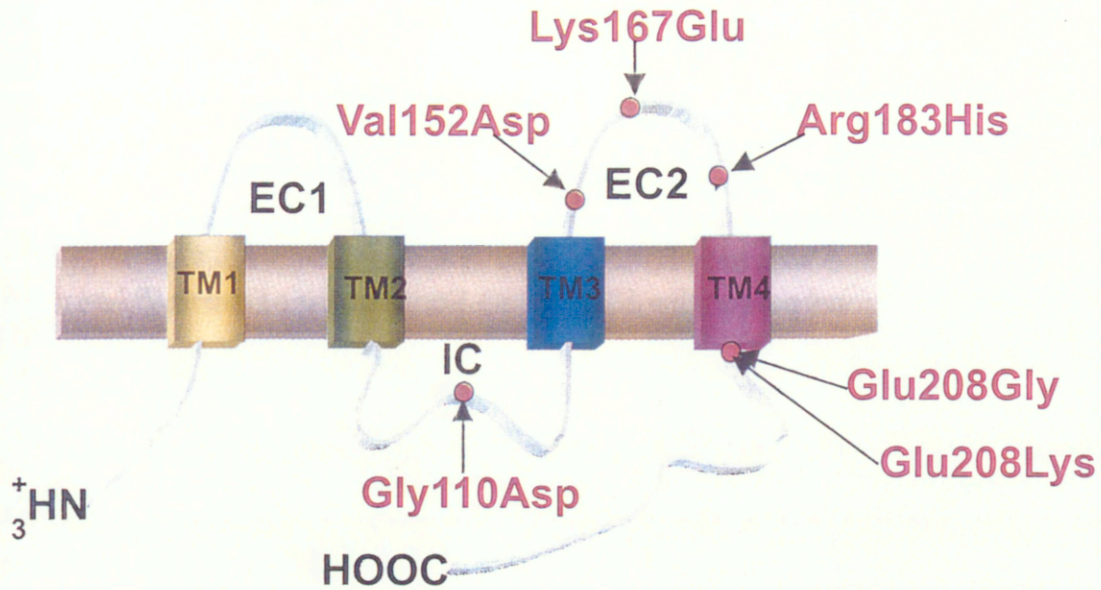


Figure 1. Model of connexin 32 in the cell plasma membrane. The red closed circles represent mutations found in this study. The TM1-4 show the transmembrane regions, IC represents intracellular region, and EC1-2 are the two extracellular domains.

The E208K and E208G substitutions are located in codon 208 of the *Cx32* gene, which is highly conserved, suggesting a critical function in gap junction assembly or functionality (Figure 2). The E208K mutant protein's ability to oligomerise into connexons was studied by using a cell-free translation system. The E208K mutant oligomerisation efficiency was similar to that of wild-type *Cx32*, but its trafficking to the plasma membrane was restricted (MARTIN et al. 2000). The E208K substitution detected in family MA7 fulfils 4 criteria of pathogenic mutation: (i) presence in other CMTX families, (ii) segregation with

	100		120		140		160	
Homo sapiens	:	hgghiekkmirie	ghgdpthieevkrhkhvhisgtlw	wtyvisvvrllifeavfmy	fyillypgyamvrivkcdvypcpntvdc	179		
Mus musculus	:	hgghiekkmirie	ghgdpthieevkrhkhvhisgtlw	wtyvisvvrllifeavfmy	fyillypgyamvrivkceafpcpntvdc	179		
Rattus norvegicus	:	hgghiekkmirie	ghgdpthieevkrhkhvhisgtlw	wtyvisvvrllifeavfmy	fyillypgyamvrivkceafpcpntvdc	179		
Bos taurus	:	hgghiekkmirie	ghgdpthieevkrhkhvhisgtlw	wtyvisvvrllifeaafmy	fyillypgyamvrivkcdaypcpntvdc	179		
Cavia porcellus	:	hgghiekkmirie	ghgdpthieevkrhkhvhisgtlw	wtyvisvvrllifeavfmy	fyillypgyamvrivkceahpcpntvdc	179		
Cricetulus griseus	:	hgghiekkmirie	ghgdpthieevkrhkhvhisgtlw	wtyvisvvrllifeavfmy	fyillypgyamvrivkceaypcpntvdc	179		
Ovis aries	:	hgghiekkmirie	ghgdpthieevkrhkhvhisgtlw	wtyvisvvrllifeaafmy	fyillypgyamvrivkcdaypc	163		
Equus caballus	:	hgghiekkmirie	ghgdpthieevkrhkhvhisgtlw	wtyvisvvrllifeaafmy	fyillypgyamvrivkcday	161		
	180		200		220			
							G110D	
							V152D	
							L167E	
							R183H	
							E208G	E208K

Figure 2. Amino-acid sequence comparison of gap junction protein *Cx32* of 9 species. The arrows indicate mutated codons reported in this study. All the mutations are conserved within 8 species.

a CMTX trait, (iii) localization in the highly conserved Cx32 protein residue, and (iiii) aberrant Cx32 function shown in functional studies. The R183H and R183S mutants were retained in the Golgi body and only part of the mutant Cx32 protein was expressed in the cell membrane. The R183H mutations were described in families coming from China, Spain, Italy, and Russia, suggesting that codon 183 of the *Cx32* gene is frequently mutated (BONE et al. 1997, BORT et al. 1997, MOSTACCIUOLO et al. 1999, HAHN et al. 2001). The G110D, V152D and K167E substitutions were found in JUN1, JUM2 and KT5 families, respectively. Those mutations were found in CMTX-affected individuals and were not observed in healthy family members. The SSCP analysis of the 50 healthy controls did not reveal the altered migration pattern, suggesting that G110D, V152D and K167E substitutions are not polymorphisms. Up to now no mutations have been found in codons 110, 152, and 167 of the *Cx32* gene. The V152D substitution is located in codon 152 of the *Cx32* gene, which is conserved in 8 species (Figure 2). The K167E substitution is located close to the cysteine residue at codon 168, which forms a disulphide bond between the two opposite extracellular loops of the Cx32 protein (DAHL et al. 1992). Due to the Cx32 protein misfolding caused by the K167E mutation, the formation of the disulphide bonds may be disturbed. The R183H mutation was found in two families.

For G110D, V152D and K167E mutations, further functional studies are needed to understand their pathogenicity.

Acknowledgments. This work was supported by the Polish State Committee for Scientific Research, Project No. 6 P05E 05820.

REFERENCES

- BERGOFFEN J., SCHERER S.S., WANG S., ORONZI SCOTT M., BONE L.J., PAUL D.L., CHEN K., LENSCH M.W., CHANCE P.F., FISCHBECK K.H. (1993). Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* 262: 2039-2042.
- BONE L.J., DESCHENES S.M., BALIA-GORDON R.J., FISCHBECK K.H., SCHERER S.S. (1997). Connexin32 and X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurobiol. Dis.* 4: 222-230.
- BORT S., NELIS E., TIMMERMAN V., SEVILLA T., CRUZ-MARTINEZ F., MILLAN J.M., ARPA J., VILCHEZ J.J., PRIETO F., VAN BROECKHOVEN C., PALAU F. (1997). Mutational analysis of the MPZ, PMP22 and *Cx32* genes in patients of Spanish ancestry with Charcot-Marie-Tooth disease and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Hum. Genet.* 99: 745-754.
- FAIRWEATHER N., BELL Ch. COCHRANE S., CHELLY J., WANG S., MOSTACCIUOLO M., MONACO A., HAITES N.E. (1994). Mutations in the connexin 32 gene in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMTX1). *Hum. Mol. Genet.* 3: 29-34.
- GAL A., MUCKE J., THEILE H., WIEACKER P.F., ROPERS H.H., WIENKER T.F. (1985). X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease: suggestion of linkage with a cloned DNA sequence from the proximal Xq. *Hum. Genet.* 70: 38-42.

- Hahn A.F., Bolton C.F., White C.M., Brown W.F., Tucke S.E., Tan C.T., Ainsworth P.J. (1999). Genotype/phenotype correlations in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease. *Ann. N. York Acad. Sci.* 883: 366-382.
- Haites N.E., Nelis E., Van Broeckhoven C. (1998). The third workshop of the European CMT consortium: 54th ENMC international workshop on genotype/phenotype correlations in Charcot-Marie-Tooth type 1 neuropathy and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies, November 28-30, 1997, Naarden, The Netherlands. *Neuromusc. Disord.* 8: 591-60.
- Ionasescu V.V., Searby C., Ionasescu R., Neuhaus I.M., Werner R. (1996). Mutations of the noncoding region of the connexin 32 gene in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Neurology* 47: 541-544.
- Kočański A., Lofgren A., Jędrzejowska H., Ryniewicz B., Czarny-Ratajczak M., Barciszewska A., Samoćko J., Hausmanowa-Petrusewicz I., De-Jonghe P., Timmerman V., Latos-Bieleńska A. (2001). A novel connexin 32 missense mutation (E208G) causing Charcot-Marie-Tooth disease. *Hum. Mut.* 17: 157.
- Kočański A., Ryniewicz B., Jędrzejowska H., Kabzińska D. (2002). Choroba Charcot-Marie-Tooth typu X charakterystyka kliniczno-genetyczna jedenastu chorych [Charcot-Marie-Tooth X-linked disease: clinical-genetic characteristics of 11 patients]. *Neurol. Neurochir. Pol. (Pol. J. Neurol. Neurosurg.)* 6: 1087-1094.
- Martin P.E.M., Mambetisaeva E.T., Archer D.A., George C.H., Evans W.H. (2000). Analysis of gap junction assembly using mutated connexins detected in Charcot-Marie-Tooth X-linked disease. *J. Neurochem.* 74: 711-720.
- Mersiyanova I.V., Ismailov S.M., Polyakov A.V., Dadali E.L., Fedorov V.P., Nelis E., Lofgren A., Timmerman V., Van Broeckhoven C., Evgrafov O.V. (2000). Screening for mutations in the peripheral myelin genes PMP22, MPZ and Cx32 in Russian Charcot-Marie-Tooth neuropathy patients. *Hum. Mut.* 15: 340-347.
- Mostacciulo M.L., Fabrizi G.M., Borello V., Cavallaro T., Schiavon F., Pimroli C., Rizzuto N. (1999). Description of mutations in Cx32 in Italian families with diagnosis of CMT1 and CMT2. *J. Periph. Nerv. Syst.* 4: 246-247.
- Skre H. (1974). Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *Clin. Genet.* 6: 98-118.
- Yum S.W., Kleopa K.A., Shumas S., Scherer S.S. (2002). Diverse trafficking abnormalities of connexin32 mutants causing CMTX. *Neurobiol. Dis.* 11: 43-52.

A novel *MPZ* gene mutation in congenital neuropathy with hypomyelination

A. Kochanski, MD, PhD; H. Drac, MD, PhD; D. Kabzińska, MSc; B. Ryniewicz, MD, PhD; K. Rowińska-Marcińska, MD, PhD; A. Nowakowski, BSc; and I. Hausmanowa-Petrusewicz, MD, PhD

Abstract—Congenital hypomyelinating neuropathy (CHN; MIM# 605253) is a severe neuropathy with early infancy onset inherited as an autosomal dominant or recessive trait. Sural nerve biopsy shows a characteristic picture of nonmyelinated and poorly myelinated axons with basal lamina onion bulbs and lack of myelin breakdown products. Several mutations in the *MTMR2*, *PMP22*, *EGR2*, and *MPZ* genes have been found in patients with CHN. The authors describe the clinical and morphologic features of a patient with CHN and the identification of a novel Thr124Lys mutation in the *MPZ* gene.

NEUROLOGY 2004;62:2122–2123

Congenital hypomyelinating neuropathies (CHNs; MIM# 605253) are a rare group of disorders with early onset, usually disabling clinical course of disease, and markedly reduced nerve conduction velocity on electrophysiologic examination. The morphologic picture of CHN varies from amyelination to various degree of hypomyelination.¹ Molecular genetics indicated that CHN segregates with point mutations in four genes coding for peripheral myelin proteins (i.e., *MTMR2*, *EGR2*, *PMP22*, and *MPZ*).^{2–4}

The *MPZ* gene codes for the most abundant protein of the peripheral myelin. More than 80 mutations in the *MPZ* gene were found in patients with various forms of hereditary motor and sensory neuropathies (HMSNs). To our knowledge, the Q215X mutation in the *MPZ* gene has been shown to segregate with CHN. Two patients with CHN and the Q215X mutation have been described thus far.^{4,5} They represent an early-onset, rapidly progressive neuropathy with markedly reduced nerve conduction velocity and hypomyelination features. Recently, the E138R and 550–552delCTAinsG mutations in the transmembrane domain of the *MPZ* protein were reported in patients with CHN.^{6,7}

In this study we report on a novel missense Thr124Lys mutation in the *MPZ* gene in a patient with congenital neuropathy and features of delayed myelination present in morphologic examination.

Case study. The patient was born from a twin pregnancy with an Apgar score of 9. He was a floppy infant with delayed motor milestones. His brother was normal, and family history was negative.

We first evaluated the patient at age 7 years. The neurologic examination showed distal weakness and mild atrophy of muscles in upper extremities. More pronounced muscle atrophy and generalized weakness, much more marked distally than proximally, and

areflexia were visible in lower extremities. He walked with support on broad base with foot drop. Skeletal abnormalities (marked scoliosis and chest deformation) and pes equinovarus were visible. Cranial nerves, sensation, and intellect were normal. Palpated nerves were not thickened. CSF protein level was 113 mg%. Ancillary studies done at age 7 years revealed the following: motor nerve conduction velocity (MCV) in the right median nerve, 3.0 m/s; distal latency (DL), 30 ms; amplitudes of evoked potentials, 150 μ V; MCV in the right peroneal nerve, 7 m/s; DL, 25.2 ms, and amplitude of evoked potentials, 7 μ V. Sensory conduction velocity (SCV) in the right sural nerve was unrecordable. Conduction time in the left facial nerve was 4 ms/cm, and amplitude of evoked potentials was 50 μ V. Sural nerve biopsy on light microscopy revealed profound loss of myelinated fibers on semithin epon cross-section. Most of visible fibers possessed thin myelin sheath, large myelinated fibers were totally absent. In addition, differentiated, but mostly small, onion bulb formations were present (figure 1). On electron microscopy, nonmyelinated or poorly myelinated large axons and different types of onion bulb formations were found. The last ones were basal lamina onion bulbs, classic and “mixed” (i.e., composed of double-layered Schwann cell basement membrane plus thin Schwann cell processes). In one fiber, myelin debris was present, featuring demyelination. At age 12 years, he stopped walking. During neurologic examination at age 14 years, all of the before-mentioned abnormalities were much more pronounced.

Molecular genetics analysis. DNA was extracted from the patient and his parents. Exons 2 and 3 of the *MPZ* gene were amplified in PCR. Single-stranded conformation polymorphism (SSCP) analysis and conformation sensitive gel electrophoresis (CSGE) were performed in the proband and his parents as previously described. Exon 3 of the *MPZ* gene was sequenced. The SSCP analysis of exon 3 of the *MPZ* gene revealed an altered mobility pattern in the proband. The sequence analysis in this patient disclosed a C>A base change at position 704, resulting in an amino acid substitution of Thr to Lys at codon 124 (figure 2). SSCP analysis performed in the proband's parents was normal. Paternity testing was performed by PCR analysis of DNA from parents and proband using 15 single locus markers, which provides a combined average power of exclusion of 99.999938%.

Discussion. We report a patient with sensorimotor congenital neuropathy born as a floppy infant and with a severe course of the disorder who became

From the Neuromuscular Unit (Drs. Kochanski, Drac, Rowińska-Marcińska, and Hausmanowa-Petrusewicz, D. Kabzińska and A. Nowakowski), Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland; and Department of Neurology (Drs. Drac, Ryniewicz, and Rowińska-Marcińska), Medical University, Warsaw, Poland.

Supported by the Polish State Committee for Scientific Research by grant 6-P05E05820.

Received September 16, 2003. Accepted in final form January 29, 2004.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Andrzej Kochanski, Neuromuscular Unit, Polish Academy of Sciences, Medical Research Centre, Pawińskiego 5, 02-106 Warsaw, Poland; e-mail: andko@cmdik.pan.pl

2122 Copyright © 2004 by AAN Enterprises, Inc.



Figure 1. Sural nerve biopsy taken at age 7 years from the proband. Epon cross-section showing nonmyelinated and poorly myelinated axons enclosed by onion bulb formations.

wheelchair bound at age 12 years. Electrophysiologic examination was consistent with generalized abnormality of myelination (very low conduction velocity in the nerves, much prolonged distal latencies, and lack of evoked responses in sural nerve).

Despite sporadically encountered myelin debris on electron microscopic examination and small classic and "mixed" onion bulb formations, we are inclined to include our case in a group of CHNs. The reason is because of the presence of numerous large nonmyeli-

nated axons, lack of normally myelinated fibers, and basal lamina onion bulbs.

A novel Thr124Lys mutation in the *MPZ* gene was found in our patient with CHN. Contrary to the majority of the *MPZ* gene mutations detected thus far in patients with the demyelinating form of Charcot-Marie-Tooth disease (CMT1B), the Thr124Lys mutation is associated with a more severe phenotype of CHN. The Q215X mutation is located in the intracellular domain of the *MPZ* protein, which was previously shown to participate in the electrostatic interactions of the opposing anionic lipid bilayer that forms the major dense line in myelin.⁸ The truncation of the carboxy terminus of the *MPZ* gene caused by the Q215X mutation results in CHN. The mechanism of Thr124Lys mutation occurring in a heterozygous state in a patient with CHN remains unclear. It is of interest that the Thr124Met mutation in the *MPZ* gene segregates with an axonal form of CMT disease.⁹ Two different phenotypes associated with two mutations at the same position may suggest a primary role of an amino acid change. The presence of the Thr124Lys mutation in our patient with CHN suggests that a mutated allele of the *MPZ* gene has a dominant-negative effect. Recent expression studies show a role of the *MPZ* protein not only in myelination but also in the early embryonic development. *MPZ* protein is expressed in early neural crest cultures, preceding the expression of glial and neuronal differentiation markers.¹⁰ Further functional studies are needed to understand the dominant-negative effect of the Thr124Lys mutation.

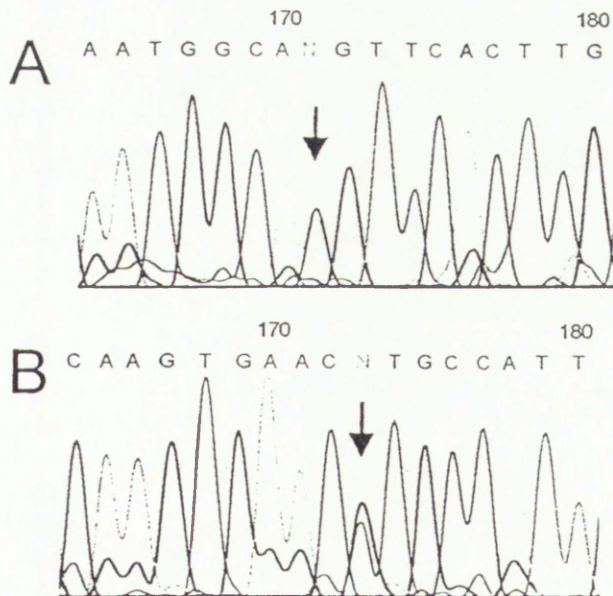


Figure 2. The Thr124Lys mutation in the *MPZ* gene. The arrows indicate the C/A (sense strand) and G/T (antisense strand) heterozygosity at the nucleotide position 371 (codon 124).

References

- Lyon G. Ultrastructural study of nerve biopsy from a case of early infantile chronic neuropathy. *Acta Neuropathol (Berl)* 1969;13:131-142.
- Bolino A, Lonie LJ, Zimmer M, et al. Denaturing high performance liquid chromatography of the myotubularin-related 2 gene (*MTMR2*) in unrelated patients with Charcot-Marie-Tooth disease suggests a low frequency of mutation in inherited neuropathy. *Neurogenetics* 2001;3:107-109.
- Warner LE, Mancias P, Butler IJ, et al. Mutations in the early growth response (*EGR2*) gene are associated with hereditary myelinopathies. *Nat Genet* 1998;18:382-384.
- Mandich P, Mancardi G, Varese A, et al. Congenital hypomyelination due to Myelin Protein Zero Q215X Mutation. *Ann Neurol* 1999;45:676-678.
- Warner LE, Hilz MJ, Appel SH, et al. Clinical phenotypes of different *MPZ* (P0) mutations may include Charcot-Marie-Tooth type 1B, Dejerine-Sottas, and congenital hypomyelination. *Neuron* 1996;17:451-460.
- Simonati A, Fabrizi G, Taioli F, et al. Dejerine-Sottas neuropathy with multiple nerve roots enlargement and hypomyelination associated with a missense mutation of the transmembrane domain of *MPZ/P0*. *J Peripher Nerv Syst* 2003;8:128-133.
- Szigeti K, Saifi GM, Armstrong D, et al. Disturbance of muscle fiber differentiation in congenital hypomyelinating neuropathy caused by a novel Myelin Protein Zero mutation. *Ann Neurol* 2003;54:398-402.
- Ding Y, Brunden KR. The cytoplasmic domain of myelin glycoprotein P0 interacts with negatively charged phospholipids bilayers. *J Biol Chem* 1994;269:10764-10770.
- Schiavon F, Rampazzo A, Merlini L, et al. Mutations of the same sequence of the myelin P0 gene causing two different phenotypes. *Hum Mut* 1998;(suppl 1):217-219.
- Hagedorn L, Suter U, Sommer L. P0 and PMP22 mark a multipotent neural crest-derived cell type that displays community effects in response to TGF- β family factors. *Development* 1999;126:3781-3794.



ELSEVIER



www.elsevier.com/locate/ejpn

CASE STUDY

Early onset Charcot-Marie-Tooth type 1B disease caused by a novel Leu190fs mutation in the myelin protein zero gene

Andrzej Kochoński^{a,*}, Dagmara Kabzińska^{1,a}, Hanna Drac^{a,b},
Barbara Ryniewicz^b, Katarzyna Rowińska-Marcińska^{a,b},
Irena Hausmanowa-Petrusewicz^a

^aNeuromuscular Unit, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences,
Pawinskiego 5, 02-106 Warsaw, Poland

^bDepartment of Neurology, Medical University, Warsaw, Poland

Received 9 February 2004; accepted 5 April 2004

KEYWORDS

Charcot-Marie-Tooth
type 1 disease; Frame-
shift mutation in the MPZ
gene

Summary The spectrum of Charcot-Marie-Tooth (CMT) phenotypes segregating with mutations in the Myelin Protein Zero (MPZ) gene is wide and ranges from congenital hypomyelinating neuropathy (CHN) through demyelinating form of CMT to the axonal type of CMT disease. Within 94 MPZ gene mutations reported up to now, only a few were identified in the exon 4 of the MPZ gene. In this study we have identified a novel Leu190fs mutation in the MPZ gene. The Leu190fs mutation was found in a 14-year-old girl suffering from Charcot-Marie-Tooth type 1 disease (CMT1) with onset in early infancy. Similarly to the other MPZ gene frame-shift mutations reported as far the Leu190fs seems to have a dominant negative effect.

© 2004 European Paediatric Neurology Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Charcot-Marie-Tooth type 1 disease (CMT1) is characterized by demyelinating changes at nerve biopsy and reduced (<38 m/s) motor nerve conduction velocity in the median nerve.¹ The most common CMT1A subtype is caused by

the 17p11.2-p12 duplication or point mutations in the Peripheral Myelin Protein 22 gene (PMP22).^{2,3}

Charcot-Marie-Tooth type 1B disease (MIM #118200) is an autosomal dominant demyelinating neuropathy caused by the point mutations in the Myelin Protein Zero gene (MPZ).⁴ So far over sixty mutations in the MPZ gene have been reported in the CMT1B affected patients and were collected in the Inherited Peripheral Neuropathies Mutation Database.⁵ The majority (70%) of MPZ gene mutations are located in the exons 2 and 3 of

*Corresponding author. Fax: +48-22-658-45-01.

E-mail address: andko@cmdik.pan.pl

¹ Those authors contributed equally to this study.

the *MPZ* gene, which corresponds with an extracellular portion of the MPZ protein. This part of MPZ is thought to be crucial for adhesive properties of this protein.⁶ Only 10 mutations were identified in the exon 4 of the *MPZ* gene. Exon 4 of the *MPZ* gene corresponds to the intracellular part of the MPZ protein, which was shown to stabilize the major dense line of myelin by interactions with the negatively charged phospholipids of the opposite myelin layer.⁷

In this report we describe a 14 years old patient suffering from early onset Charcot-Marie-Tooth disease caused by a novel Leu190fs mutation in the *MPZ* gene.

Case report

The patient, a 4-year-old girl was sent for medical attention for the first time at the age of 2 years because of joint floppiness. She was born to a 25-year-old healthy mother.

The pregnancy was reported to be normal with normal fetal movements. The mother was not exposed to any known teratogens or medications during pregnancy.

The motor milestones of the girl were delayed. She sat at the age of 1 year, and walked at the age of 2.5 years.

The first neurological examination performed at the age of 4 years revealed: normal cranial nerves except the occasional tongue fibrillation; in the upper extremities: hyperextension of joints at the elbow, hypotonia was present, tendon jerks were diminished, there was no obvious weakness and atrophy of muscles. In the lower extremities: hyperextension at knee joints, hypotonia and areflexia were found. She sat up and get up climbing using the Gower's manoeuvre; her gait was clumsy with lumbar hyperlordosis, she could not walk on her heels, thoracic scoliosis was observed.

After 2 years (at the age of 6 years) she still displayed hypotony, but no severe weakness neither in the upper nor in the lower limbs was observed. The deep tendon reflexes in the upper limbs were preserved. In the lower limbs knee and ankle jerks reflexes were absent. She was able to walk on her toes and poorly on her heels. No pes cavus deformity was observed.

At the age of 14 years, i.e. after 10 years duration of overt polyneuropathy, she presented slight atrophy and weakness of small hand muscles as well as finger tremor. In the lower limbs proximal and distal muscle weakness was observed. Deep tendon reflexes were absent. She had short, high

arched feet. From the age of 11 years she has been developing a severe thoraco-lumbar scoliosis.

Ancillary studies

Electrophysiological examination revealed: in the right median nerve: motor conduction velocity (MCV) of 9.6 m/s, distal latency (DL) of 6.2 ms, amplitude of evoked muscle response of 150 μ V; in right peroneal nerve: MCV-4.3 m/s, DL-39.2 ms, amplitude of evoked muscle response – 50 μ V; in facial nerve-conduction time – 2.85 ms/cm, DL-31.4 ms, amplitude of evoked muscle response 50 μ V. There was no response for stimulation of sensory fibers in median and sural nerve.

In anterior tibial muscle: occasional fibrillation potentials at rest were visible.

Sural nerve biopsy revealed mild loss of myelinated fibers, numerous typical small onion bulb structures with normally and poorly myelinated fibers (Fig. 1). Teased fibers possessed extensive demyelinated areas. CSF was normal. All above mentioned studies were performed at the age of 4 years.

Molecular genetics analysis

DNA was isolated from white blood cells from the proband and her healthy mother. DNA from the father was not obtainable. Five exons of the Myelin Protein Zero gene (*MPZ*) and five exons of the Peripheral Myelin Protein 22 (*PMP22*) were amplified in the Polymerase Chain Reaction (PCR).

For mutation screening single stranded conformation polymorphism analysis (SSCP) of PCR products was performed using DNA from the proband and her mother as previously described. Amplification products of the exon 4 of the *MPZ* gene were sequenced using Big Dye Terminator Sequencing

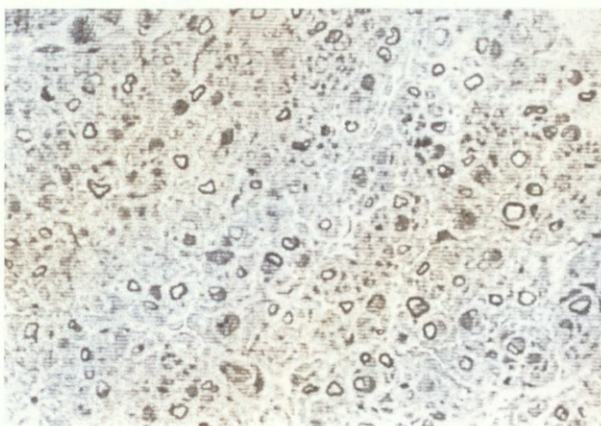


Figure 1 Sural nerve biopsy. Small onion bulb structures normal for age and poorly myelinated fibers.

Ready Reaction Kit (Applied Biosystems). Samples were run and analysed on an ABI PRISM 373 fluorescent DNA sequencer (Applied Biosystems). In the proband the SSCP analysis of the exon 4 of the MPZ gene revealed an altered mobility of the corresponding PCR fragment suggesting that this part of the MPZ gene was most probably mutated. The automated sequence analysis in this patient disclosed a heterozygous one nucleotide G deletion at position 571 resulting in the frame shift Leu190fs mutation with a stop codon at the codon 251 (Fig. 2). The SSCP analysis performed in proband's mother did not reveal any differences in mobility of PCR fragment indicating the absence of the Leu190fs mutation.

No altered mobility pattern was observed in the coding sequence of the PMP22 gene in proband and her healthy mother.

Discussion

In this study we reported on an early onset, relatively mild Charcot-Marie-Tooth type 1 disease

caused by a novel Leu190fs mutation in the Myelin Protein Zero gene. The diagnosis was established upon the basis of clinical, electrophysiological and morphological findings.

The majority of mutations found in the MPZ gene are located in the exons 2 and 3 corresponding to the extracellular portion of the MPZ protein. The extracellular part of the MPZ protein was shown previously to be responsible for the adhesive properties of the MPZ protein.⁶

Recently the Glu71stop mutation in the MPZ gene was reported in a 36 year old woman suffering from the very mild recurrent neuropathy coexisting with uncompacted myelin lamellae seen on ultrastructural examination. Similar morphological features were found in the MPZ \pm transgenic mice.^{8,9} Due to the similarity of morphological effect, the Glu71stop mutation, truncating the MPZ protein was classified as loss of function.

Contrary to the very mild CMT1 phenotype associated with MPZ loss-of-function mutation, the Leu190fs mutation in our case is associated with early onset, relatively mild CMT1 phenotype suggesting an additional dominant negative effect. Although the role of the intracellular portion of the MPZ gene has been intensively investigated in the recent years, the mechanism of mutations located in exon 4 of the MPZ gene remains unclear. The intracellular part of the MPZ gene protein was shown previously to stabilize the major dense line of myelin by interactions with the negatively charged phospholipids of the opposite myelin layer.

In addition the truncation of the intracellular part of the MPZ protein was shown to have a dominant negative effect on the wild type protein.¹⁰ Moreover the functional studies on MPZ showed that frame-shift mutations in the intracellular domain of the MPZ protein may affect the RSTK (arginine-serine-threonine-lysine) motif which is a target motif for the protein kinase C.¹¹

The crucial role of the intracellular domain of the MPZ gene was shown by detection of the intracellular frame-shift mutations located in this part of the MPZ gene in patients suffering from a severe form of the CMT1 disease, Dejerine-Sottas syndrome or even congenital hypomyelination neuropathy.¹² Contrary to the previously reported loss of function mutations in the MPZ gene, the Leu190fs mutation seems to have a dominant negative effect.

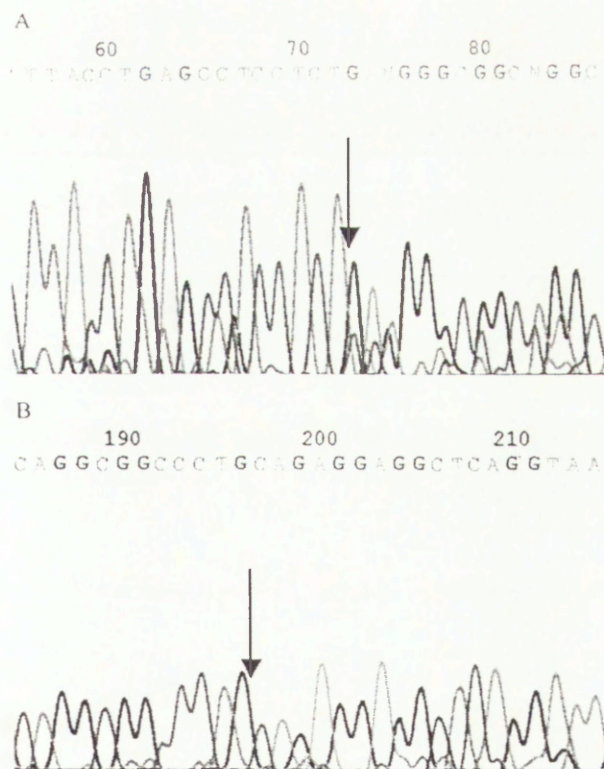


Figure 2 Sequencing fluorogram showing mutated (A) and wild type alleles (B). The arrows indicate the one nucleotide G deletion at position 571 of MPZ gene resulting in the Leu190fs mutation with a stop codon at the nucleotide 251 (A) and homozygosity of G at position 571 in the wild allele (B).

Acknowledgements

The study was supported by the grant N° 6 P05E05820 of the Polish State Committee for Scientific Research.

References

1. Harding AE, Thomas PK. The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy type I and II. *Brain* 1980;103: 259–80.
2. Lupski JR, Montes de Oca-Luna R, Slaugenhaupt S, et al. DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell* 1991;66:219–32.
3. Raeymaekers P, Timmerman V, Nelis E, et al. Duplication in chromosome 17p11.2 in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a (CMT1a). *Neuromusc Disord* 1991;1:93–7.
4. Hayasaka K, Himoro S, Sato W, et al. Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1B is associated with mutations of the P0 gene. *Nat Genet* 1993;5:31–4.
5. Database: molgen-www.uia.ac.be/ CMT Mutations.
6. Filbin MT, Walsh FS, Trapp BD, et al. Role of myelin P0 protein as a homophilic adhesion molecule. *Nature* 1990; 344:871–2.
7. Ding Y, Brunden KJ. The cytoplasmic domain of myelin glycoprotein P0 interacts with negatively charged phospholipid bilayers. *Biol Chem* 1994;14:10764–70.
8. Lagueny A, Latour P, Vital A, et al. Mild recurrent neuropathy in CMT1B with a novel nonsense mutation in the extracellular domain of the MPZ gene. *J Neurol Neurosurg Psych* 2001;70: 232–5.
9. Giese KP, Martini R, Lemke G, et al. Mouse P0 gene disruption leads to hypomyelination, abnormal expression of recognition molecules, and degeneration of myelin and axons. *Cell* 1992;71:565–76.
10. Wong H, Filbin M. Dominant-negative effect on adhesion by myelin P0 protein truncated in its cytoplasmic domain. *Man—J Cell Biol* 1996;134(6):1531–41.
11. Xu W, Shy M, Kamholz J, et al. Mutations in the cytoplasmic domain of P0 reveal a role for PKC-mediated phosphorylation in adhesion and myelination. *J Cell Biol* 2001;155:439–45.
12. Szigeti K, Saifi GM, Armstrong D, et al. Disturbance of muscle fiber differentiation in congenital hypomyelinating neuropathy caused by a novel myelin protein zero mutation. *Ann Neurol* 2003;54(9):398–402.

Focally folded myelin in Charcot–Marie–Tooth type 1B disease is associated with Asn131Lys mutation in myelin protein zero gene: short report

A. Kochański^a, H. Drac^{a,b}, H. Jędrzejowska^a and I. Hausmanowa-Petrusewicz^a

^aNeuromuscular Unit, Medical Research Center, Polish Academy of Sciences; and ^bDepartment of Neurology, Medical University, Warsaw, Poland

Keywords:

Charcot–Marie–Tooth neuropathy type 1B, focally folded myelin, myelin protein zero

Charcot–Marie–Tooth disease type 1B (CMT1B) is a demyelinating neuropathy inherited as an autosomal dominant trait. The majority of CMT1B cases are caused by mutations in the myelin protein zero (P₀) gene (*MPZ*). Only a few mutations in *MPZ* gene have been reported to be associated with focally folded myelin sheaths. We have studied five patients from one family with five generations, affected by CMT1B disease. The morphological studies of sural nerve biopsy performed in the proband revealed fibers with focally folded myelin. DNA sequencing analysis showed the Asn131Lys mutation in the *MPZ* gene in three members of the affected family.

Received 5 November 2002

Accepted 7 April 2003

Introduction

Charcot–Marie–Tooth disease with mutations in *MPZ* gene was classified as CMT1B (Bird *et al.*, 1982; Lebo *et al.*, 1991; Hayasaka *et al.*, 1993). Nerve morphology in most of the CMT1B patients is characterized by a hypertrophic, demyelinating neuropathy (Gabreëls-Festen *et al.*, 1996). Up to now, only a few different mutations in *MPZ* gene have been shown to segregate with focally folded myelin sheaths (Thomas *et al.*, 1994; Gabreëls-Festen *et al.*, 1996; Tachi *et al.*, 1997; Nakagawa *et al.*, 1999; Fabrizi *et al.*, 2000).

This study describes a CMT1 family in which CMT1B disease is associated with the Asn131Lys mutation in *MPZ* gene and at the same time is associated with focally folded myelin phenotype.

Family report

The CMT1 family pedigree, spans five generations (Fig. 1).

The proband's (V:1) early motor milestones were delayed. He began to walk unaided at 2 years of age and his gait was characterized by bilateral footdrop. At 5 years examination of the upper limbs revealed: tremor of fingers, mild weakness of distal muscles, all reflexes were present and all sensory modalities preserved; in the lower limbs: pes cavus, bilateral moderate distal muscle wasting and weakness, tendon jerks absent, plantar normal and sensory modalities

preserved. He continued to walk with foot drop. The palpated nerves were not thickened. Electrophysiological investigations revealed: median nerve: motor conduction velocity of 3.8 m/s, distal latency of 57 ms, amplitude of evoked muscle response of 250 μ V; peroneal nerve: motor conduction velocity of 1.4 m/s, distal latency of 86 ms and amplitude of evoked muscle potential of 30 μ V. The F wave in both nerves was absent. Facial nerve conduction time was 1.4 ms/cm. No sural nerve sensory potentials were evoked. In electromyograph (EMG) fibrillation, potentials were observed in anterior tibial muscle.

The proband's father (IV:2) displayed finger tremors, bilateral pes cavus deformity and areflexia in upper and lower limbs at 34 years of age.

The proband's cousin (V:5) was brought to medical attention at 19 months. She too had delayed in attaining her motor milestones. She sat at 9 months, stood at 13 months and walked with support at 18 months. She was floppy, had poorly coordinated movements and postural tremor. Deep tendon reflexes were absent in the lower and upper limbs. Her gait was clumsy and unsteady. She displayed a bilateral pes cavus deformity. Motor nerve conduction velocity was 5.5 m/s in the left median nerve, and 14 m/s in the left tibial nerve.

Similar clinical and electrophysiological features were found in other CMT1 affected members of this family. The proband had sural nerve biopsy performed at 5 years of age. Both light and electron microscopy studies were performed. On semi-thin epon sections loss of myelinated fibers, numerous poorly or abnormally myelinated fibers were visible. In teased fibers, all fibers exhibited extensive lack of myelin, or very thin myelin sheaths as well as thickening of myelin of varying size and number (Fig. 2). Electron microscope

Correspondence: Andrzej Kochański MD PhD, Neuromuscular Unit, Medical Research Center, Polish Academy of Sciences, ul. Banacha 1a, 02-097 Warsaw, Poland (fax: +4822 658 45 01; e-mail: neurmyol@cmdik.pan.pl).

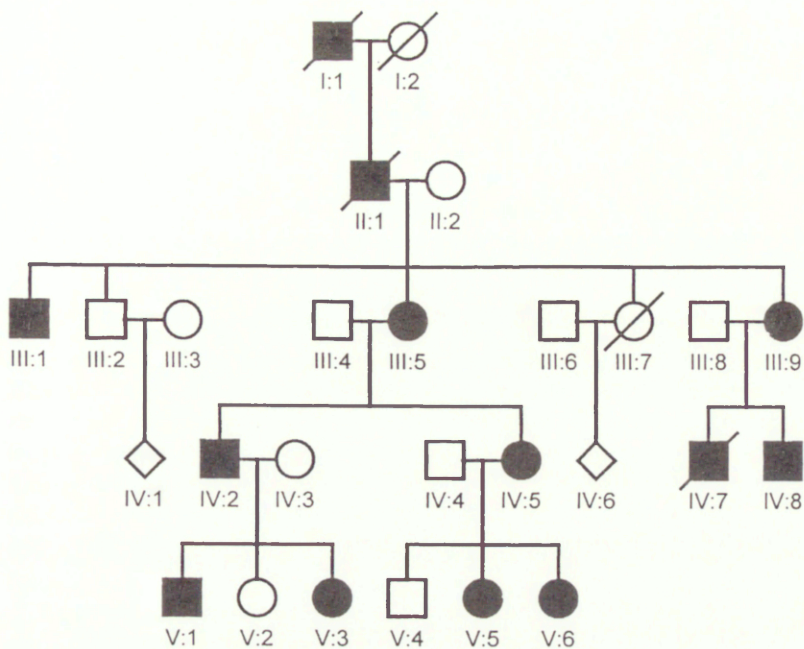


Figure 1 Pedigree of Charcot-Marie-Tooth type 1B family. In patients IV:5, V:5 and V:6 the Asn131Lys substitution in third exon of *MPZ* gene was found. Circles, females; squares, males; open symbols, unaffected; solid symbols, affected; slashed symbols, deceased.

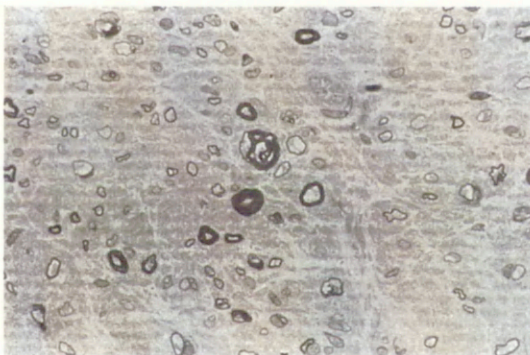


Figure 2 Loss of myelinated fibers, numerous poorly and abnormally myelinated fibers on cross epon section. Magnification 480 \times .



Figure 3 Fiber with excessive myelin outfolding exhibiting degenerative changes. Electronogram, magnification 6000 \times .

examination revealed: fibers with disproportionately thick myelin relative to axonal caliber as a result of numerous and complex foldings of myelin; fibers with abnormally arranged myelin sheath with abundant loops of myelin; degenerative changes within abnormally arranged myelin loops (Fig. 3); occasional small onion bulbs formations and a few demyelinated fibers. Information regarding Asn131Lys mutation in the *MPZ* gene in three members of the family (IV:2, V:1 and V:3) living in the USA was obtained from Hospital for Joint Diseases (New York).

The DNA sequencing of exons 2 and 3 of *MPZ* gene was performed in three affected and two unaffected members of the family living in Poland. The sequencing analysis revealed a heterozygous C \rightarrow A transition at position 727 in the third exon of the *MPZ* gene, resulting in an Asn to Lys substitution at codon 131 (N131K) in three affected family members, i.e. IV:5, V:5 and V:6.

Discussion

The morphological picture in the proband differed from that observed in classical CMT1 and was consistent with morphology of focally folded neuropathy. For the first time such morphology was described as 'globular neuropathy' by Dayan *et al.* (1969) and later it was called hypo- and hyper-myelinating neuropathy (Vallat *et al.*, 1987). Onishi *et al.* (1989) mentioned a new variant of hereditary motor and sensory neuropathy (HMSN) of the hypertrophic type characterized by the presence of excessive myelin outfoldings in the sural nerve.

Some authors pointed out the above-mentioned morphological features in autosomal recessive, dominant and sporadic cases of CMT1 (Norborg *et al.*, 1984; Drac, 1991).

Based upon clinical, morphological and genetic studies, Gabreëls-Festen *et al.* (1990) introduced the term of focally folded demyelinating motor and sensory neuropathy in cases morphologically similar to ours.

In our family we have demonstrated that Asn131Lys mutation in the *MPZ* gene is associated with focally folded myelin. The mutations in *MPZ* gene associated with focally folded myelin are located in the extracellular domain of P₀ protein which is thought to be responsible for its adhesive properties (Fabrizi *et al.*, 2000). Two different *MPZ* mutations, i.e. Lys130Arg and Asn131Lys segregate with a similar clinical, electrophysiological and morphological phenotype. The different nature of Lys130Arg and Asn131Lys mutations and their similar localization suggest the primary role of the mutation site in the formation of focally folded myelin phenotype.

The recent study of *MPZ* protein expression in patients with Lys130Arg revealed that the mutated *MPZ* protein was of normal molecular weight, but was expressed in significantly reduced amount. Because of the reduction in the total amount of *MPZ* protein in peripheral nerve, the Lys130Arg substitution was classified as loss-of-function mutation (Tachi *et al.*, 2001). Proximity of localization to Lys130Arg mutation, suggests that Asn131Lys mutation may also result in loss-of-function mechanism.

In order to address that and other questions, further studies of pattern of expression of *MPZ* protein in patients with Asn131Lys mutation are needed.

Acknowledgements

The study was supported by the Polish State Committee for Scientific Research, grant no. 6 P05E05820.

References

Bird TD, Ott J, Giblett ER (1982). Genetic linkage evidence for heterogeneity Charcot-Marie-Tooth neuropathy (HMSN I). *Am J Hum Genet* 34:388-394.

- Dayan A, Graveson G, Robinson P *et al.* (1969). Globular neuropathy. A disorder of axons and Schwann cells. *J Neurol Neurosurg Psych* 31:552-560.
- Drac H (1991). Morphology of peripheral nerve in some cases of congenital demyelinating polyneuropathy. *Neuropatol Pol* 29:133-146.
- Fabrizi GM, Taioli F, Cavallaro T *et al.* (2000). Focally folded myelin in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1B with Ser49Leu in the myelin protein zero. *Acta Neuropathol (Berl)* 100:299-304.
- Gabreëls-Festen A, Joosten E, Gabreëls F *et al.* (1990). Congenital demyelinating motor and sensory neuropathy with focally folded myelin sheaths. *Brain* 113:1629-1643.
- Gabreëls-Festen A, Hoogendijk J, Meijerink P *et al.* (1996). Two divergent types of nerve pathology in patients with different P₀ mutations in Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology* 47:761-765.
- Hayasaka K, Himoro M, Sato W *et al.* (1993). Charcot-Marie-Tooth neuropathy 1B is associated with mutations of the myelin P₀ gene. *Nat Genet* 5:31-34.
- Lebo RV, Chance PF, Dyck PJ *et al.* (1991). Chromosome 1 Charcot-Marie-Tooth disease (CMT1B) locus in the Fc receptor gene region. *Hum Genet* 88:1-12.
- Nakagawa M, Suehara M, Saito A *et al.* (1999). A novel *MPZ* gene mutation in dominantly inherited neuropathy with focally folded myelin sheaths. *Neurology* 52:1271-1275.
- Norborg C, Conradi N, Sourander P *et al.* (1984). Hereditary motor and sensory neuropathy of demyelinating and remyelinating type in children: ultrastructural and morphometric studies on sural nerve biopsy specimens from sporadic cases. *Acta Neuropath (Berl)* 65:1-9.
- Onishi A, Murai I, Ikeda M *et al.* (1989). Autosomal recessive motor and sensory neuropathy with excessive myelin unfolding. *Muscle Nerve* 12:568-575.
- Tachi N, Kozuka N, Ohya K *et al.* (1997). Tomaculous neuropathy in Charcot-Marie-Tooth disease with myelin protein zero gene mutation. *J Neurol Sci* 153:106-109.
- Tachi N, Kozuka N, Ohya K *et al.* (2001). Expression of peripheral myelin protein zero in sural nerve of patients with Charcot-Marie-Tooth disease 1B. *Pediatr Neurol* 24:33-35.
- Thomas F, Lebo R, Rosoklija G *et al.* (1994). Tomaculous neuropathy in chromosome 1 Charcot-Marie-Tooth syndrome. *Acta Neuropathol (Berl)* 87:91-97.
- Vallat JM, Gil R, Leboutet MS *et al.* (1987). Congenital hypo- and hypermyelination neuropathy. *Acta Neuropathol (Berl)* 74:197-201.



A novel mutation, Thr65Ala, in the *MPZ* gene in a patient with Charcot-Marie-Tooth type 1B disease with focally folded myelin

A. Kochanski^{a,*}, H. Drac^{a,b}, D. Kabzińska^a, I. Hausmanowa-Petrusewicz^a

^aNeuromuscular Unit, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Banacha 1a, Warsaw 02-098, Poland

^bDepartment of Neurology, Medical University, Warsaw, Poland

Received 19 June 2003; received in revised form 13 November 2003; accepted 1 December 2003

Abstract

Charcot-Marie-Tooth type 1B disease is a demyelinating neuropathy caused by mutations in the Myelin Protein Zero gene. It is inherited in an autosomal dominant fashion. So far only a few patients with a focally folded myelin phenotype on nerve biopsy have been shown to have mutations in the Myelin Protein Zero gene. In this report we describe a Polish patient with Charcot-Marie-Tooth type 1B disease. Sural nerve biopsy demonstrated focally folded myelin. Molecular genetic analysis of the coding region of the Myelin Protein Zero gene revealed a novel mutation, Thr65Ala, in exon 2 of the Myelin Protein Zero gene.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Charcot-Marie-Tooth type 1B disease; Myelin protein zero

1. Introduction

Charcot-Marie-Tooth type 1B disease (MIM #118200) is an autosomal dominant demyelinating neuropathy caused by point mutations in the Myelin Protein Zero gene (MPZ). CMT1B is characterized by an early onset, distal muscle weakness with atrophy and frequent involvement of proximal leg muscles. Some CMT1B families display intrafamilial clinical variability. Nerve conduction velocity (NCV) in CMT1B patients is markedly slowed [1]. Sural nerve biopsy in CMT1B patients shows at least two different morphologic features: (i) disturbed compaction of myelin and (ii) focal foldings of myelin [2]. Linkage analysis indicates that CMT1B disease is linked to the Iq21.3-q23 locus comprising the MPZ gene [3]. So far 63 mutations in the *MPZ* gene have been associated with the CMT1 phenotype and included in the Inherited Peripheral Neuropathies Mutation Database [4]. The majority of *MPZ* mutations are located in exons 2 and 3, which correspond to an extracellular portion of the MPZ protein. This part of the MPZ protein is thought to be crucial for the adhesive

properties of this protein [5]. In this report we describe a CMT1 patient with a novel Thr65Ala mutation in the MPZ gene with focally folded myelin sheaths in sural nerve biopsy.

2. Case description

The patient is a 39 year-old male teacher (Fig. 1A and B). His developmental motor milestones were normal. At the age of 8 polyneuropathy was diagnosed after the patient presented with paresthesias and pain in the lower extremities. Before the age of 30 he noticed progressive weakness and wasting of hands (he stopped playing guitar at the age of 33). At the same time he started to complain of an unsteady gait when walking in the dark. Family history was negative. Neurological examination of the patient at the age of 39 showed: finger tremor, marked symmetrical muscle atrophy, hand weakness, absent radial and ulnar jerks and impairment of all sensory modalities distally in the upper extremities. Pes equinovarus and very mild atrophy of distal muscles were observed in the lower extremities; all tendon reflexes were absent and all sensory modalities were impaired up to knee level. Romberg sign was present. Cranial nerves were normal, and palpated nerves were not

* Corresponding author. Tel.: +48-22-658-45-01; fax: +48-22-658-45-01.

E-mail address: andko@cmdik.pan.pl (A. Kochanski).

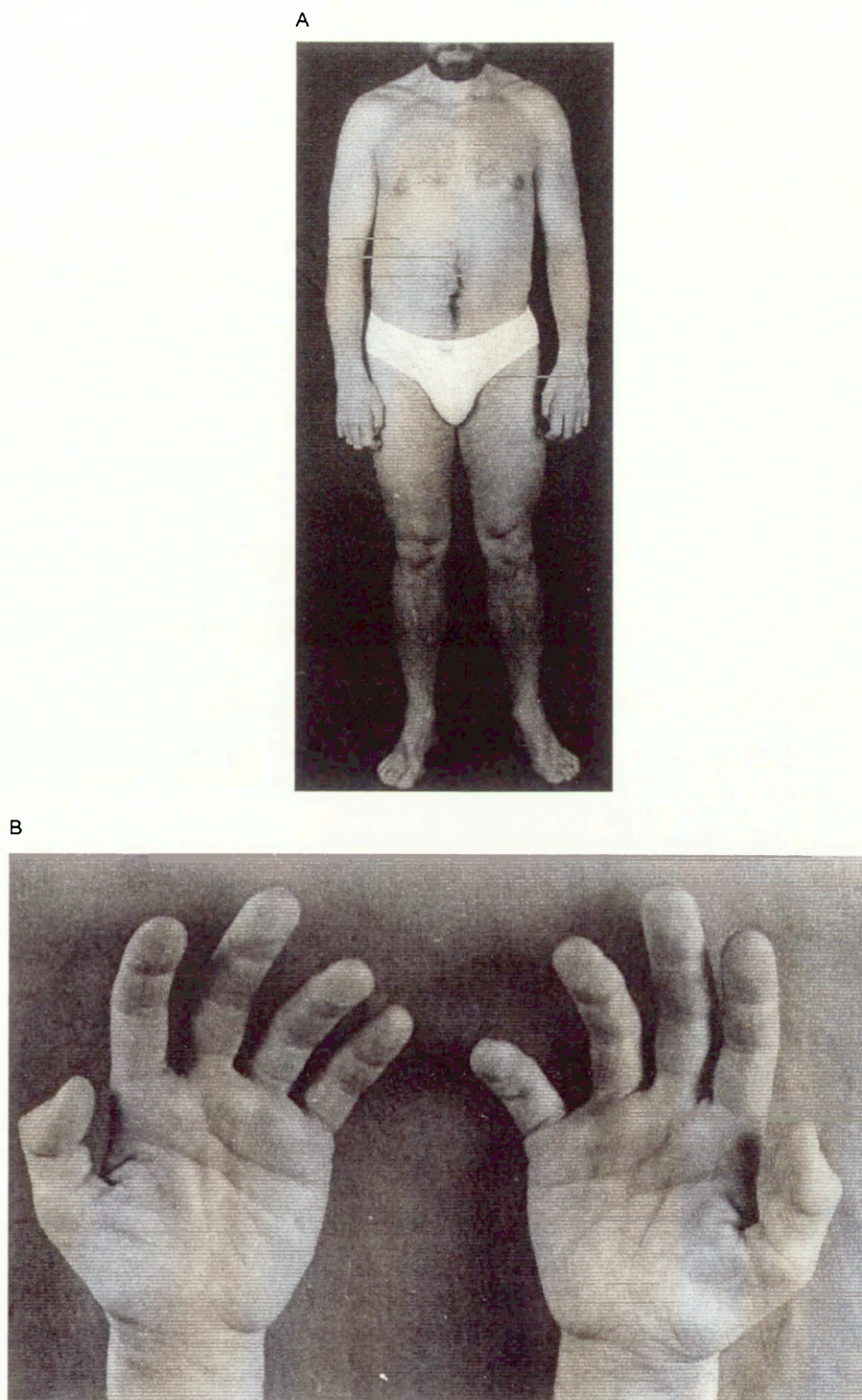


Fig. 1. (A) The patient at the age of 39. Note the pes cavus deformity and very mild muscle atrophy in the distal part of lower limbs. (B) Wasting of thenar eminence and small hand muscles.

thickened. Nerve conduction velocities (NCV) were markedly reduced: in the ulnar nerve the motor NCV was 10 m/s, distal latency was 10.7 ms, and compound motor action potential amplitude was 0.7 mV. Motor NCV in the median and peroneal nerves and sensory NCV in the sural nerve

could not be evoked. (The examinations were performed by Dr J. Slawek.)

At the age of 34 years, a sural nerve biopsy was taken. Semithin sections (stained with thionine and acridine orange), teased fibers and ultrathin sections (stained with

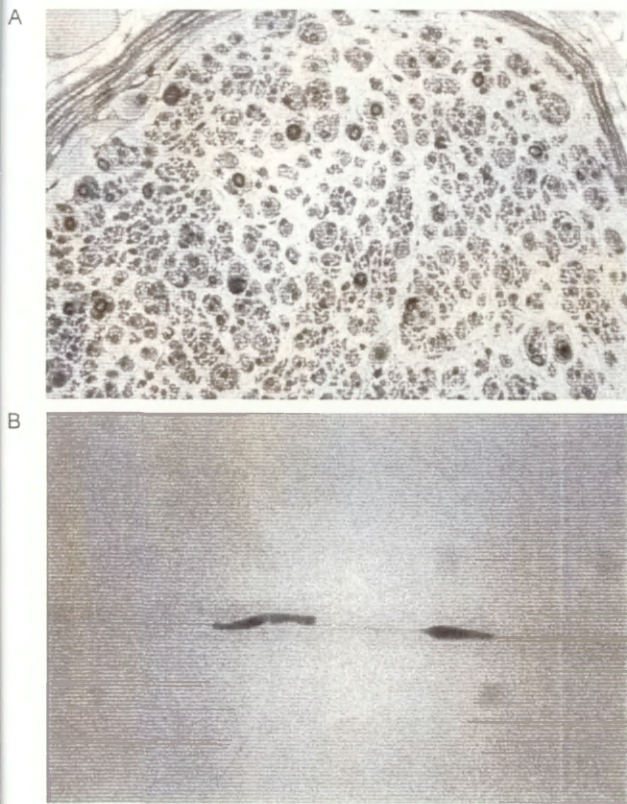


Fig. 2. (A) Semithin cross epon sections: severe loss of myelinated fibers, abnormally myelinated fibers, and small onion bulb formations. (B) Demyelination, remyelination and focal thickenings of myelin.

nyl acetate and lead citrate) were examined. Severe loss of myelinated fibers, fibers with abnormally thickened myelin and small onion bulbs were visible on semithin cross epon sections (Fig. 2A). All teased fibers showed hypomyelinated and demyelinated segments and focal thickenings of myelin (Fig. 2B). Electron microscopy revealed complex myelin foldings: outfoldings (Fig. 3) and infoldings in most visible fibers and typical small onion bulbs surrounding

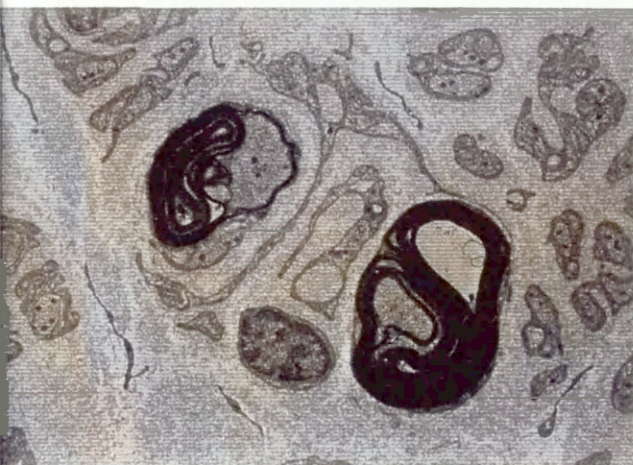


Fig. 3. Two fibers with excessive myelin outfoldings. Electronogram, magnification 10000x.

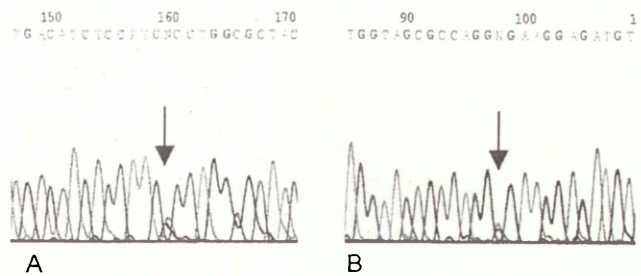


Fig. 4. Sense strand sequence of the *MPZ* exon 2 region containing (A) A → G (forward) and (B) T → C (reverse) transition at the position 193 of the *MPZ* gene resulting in an Thr65Ala mutation (arrows).

remyelinating, demyelinated fibers and fibers with focally folded myelin were visible. Occasional myelin degradation products were present. Neurological examination of the proband's daughter did not show any abnormality.

We screened DNA from the proband, his wife and his daughter for point mutations in exons 2 and 3 of the *MPZ* gene. An altered single stranded conformation polymorphism (SSCP) pattern was detected in the patient, suggesting that the exon 2 is most probably mutated. Direct DNA sequencing of the *MPZ* exon 2 revealed T → C transition (sense strand) and A → G transition (antisense strand) at codon 65 (Fig. 4). The transition resulted in an amino acid change from Thr to Ala. The Thr65Ala substitution creates a novel *Hph* I restriction site and was therefore detected by restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP). In a control group (100 chromosomes) screened by SSCP we did not find any alteration of migration pattern corresponding to the band shift identified in our patient.

3. Discussion

We present a 39-year-old man suffering from motor and sensory polyneuropathy with the onset of symptoms during the first decade of life. In the patient moderate weakness and atrophy of hand muscles and impairment of all sensory modalities in upper and lower extremities were found. Sural nerve biopsy at the age of 34 showed focally folded myelin sheaths. The molecular genetic analysis revealed a novel Thr65Ala mutation in the exon 2 of the *MPZ* gene. Recently a Thr65Ile mutation in the *MPZ* gene in CMT1 affected patient was described [6].

MPZ is the major structural component of peripheral nerve myelin, expressed exclusively by myelinating Schwann cells. This protein has one extracellular immunoglobulin-like domain, and smaller intracellular and membrane-spanning domains [7]. The compaction of the intraperiod line of peripheral myelin is determined by the glycosylated extracellular domain of the *MPZ* protein [5]. The extracellular domain of the *MPZ* protein corresponds to exons 2 and 3 of the *MPZ* gene. *MPZ* mutations cause a spectrum of peripheral neuropathies ranging from severe

congenital hypomyelinating neuropathy to typical CMT1. The majority of point mutations in the *MPZ* gene have been shown to segregate with CMT1 disease. Gabreels-Festen et al. [2] distinguished at least two morphological phenotypes in CMT1B patients: (i) mutations resulting in disturbed compaction of myelin and (ii) mutations resulting in *focally foldings of myelin* [2]. Only a few mutations in the *MPZ* gene were found in patients with focally folded myelin phenotype [2,8–13]. The reason why some mutations in the *MPZ* gene produce the phenotype of focally folded myelin remains unclear. We postulate that Thr65Ala mutation in a patient with CMT1 produces a focally folded myelin phenotype through the reduction in the amount of MPZ protein, with insufficient quantity for normal myelin maintenance. The heterozygous *MPZ* ± knockout mice between 4 and 10 weeks of age show normal myelination. At the age of 4 months the *MPZ* ± mice show demyelination and onion bulb formations similar to those found in patients with CMT1. A study in knockout mice suggested that half the normal amount of the MPZ protein is sufficient to initiate myelination, but stable myelin maintenance requires a normal amount of the MPZ protein [14].

The effect of the *MPZ* gene mutation on a dose of the MPZ protein was demonstrated in a CMT1 patient with a heterozygous Lys130Arg mutation in the *MPZ* gene. The immunostaining study performed in the Lys130Arg mutated patient showed reduced expression of the MPZ protein in myelinated fibers. The protein had a normal molecular weight but was present in reduced amounts in the immunoblot analysis [15]. Similarly to the Lys130Arg mutation, the Thr65Ala substitution found in our CMT1 patient might produce a loss-of-function allele, which would reduce the amount of the MPZ protein by 50%. In order to address the issue of the effect of Thr65Ala on focally folded phenotype, further studies to assess the pattern of expression of the MPZ protein in patients with *MPZ* gene mutations are needed.

Acknowledgements

The study was supported by the grant of the Polish State Committee for Scientific Research No. 6P05E 05820.

References

- [1] Bird TD, Kraft GH, Lipe HP, et al. Clinical and pathological phenotype of the original family with Charcot-Marie-Tooth type 1B: A 20-year study. *Ann Neurol* 1997;41:463–9.
- [2] Gabreels-Festen AAWM, Hoogendijk JE, Meijerink PHS, et al. Two divergent types of nerve pathology in patients with different P0 mutations in Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology* 1996;47:761–5.
- [3] Bird TD, Ott J, Giblett ER. Evidence for linkage of Charcot-Marie-Tooth neuropathy to the Duffy locus on chromosome 1. *Am J Hum Genet* 1982;34:388–94.
- [4] Database: molgen-www.uia.ac.be/CMT Mutations.
- [5] Filbin MT, Walsh FS, Trapp BD, Pizzey JA, Tennekoon GI. Role of myelin P0 protein as a homophilic adhesion molecule. *Nature* 1990;344:871–2.
- [6] Numakura C, Lin C, Ikegami T, Guldborg P, Hayasaka K, et al. Molecular analysis in Japanese patients with Charcot-Marie-Tooth disease: DGGE analysis for PMP22, *MPZ* and *Cx32/GJB1* mutations. *Hum Mut* 2002;20(5):392–8.
- [7] Lemke G, Lamar E, Patterson J. Isolation and analysis of the gene encoding peripheral myelin protein zero. *Neuron* 1988;1:73–83.
- [8] Tachi N, Kozuka N, Ohya K, et al. Tomaculous neuropathy in Charcot-Marie-Tooth disease with myelin protein zero gene mutation. *J Neurol Sci* 1997;153:106–9.
- [9] Thomas FP, Lebo RV, Rosoklija G, et al. Tomaculous neuropathy in chromosome 1 Charcot-Marie-Tooth syndrome. *Acta Neuropathol* 1994;87:91–7.
- [10] Warner LE, Hiltz MJ, Appel SH, et al. Clinical phenotypes of different (P0) mutations may include Charcot-Marie-Tooth type 1B, Dejerine-Sottas, and Congenital hypomyelination. *Neuron* 1996;17:451–60.
- [11] Kochański A, Drac H, Jędrzejowska H, Hausmanowa-Petrusewicz I. Focally folded myelin in Charcot-Marie-Tooth type 1B disease is associated with Asn131Lys mutation in Myelin Protein Zero gene. *Eur J Neurology* 2003;10:547–9.
- [12] Fabrizi GM, Taioli F, Cavallaro T, et al. Focally folded myelin in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1B with Ser49Leu in the myelin protein zero. *Acta Neuropathol (Berl)* 2000;100:299–304.
- [13] Nakagawa M, Suehara M, Saito A, et al. A novel *MPZ* gene mutation in dominantly inherited neuropathy with focally folded myelin sheaths. *Neurology* 1999;52:1271–5.
- [14] Martini R, Zielasek J, Toyka KV, Giese KP, Schachner M. Protein zero (P0)-deficient mice show myelin degeneration in peripheral nerves characteristic of inherited human neuropathies. *Nat Genet* 1995;11:281–6.
- [15] Tachi N, Kozuka N, Ohya K, et al. Expression of peripheral myelin protein zero in sural nerve of patients with Charcot-Marie-Tooth disease 1B. *Pediatr Neurol* 2001;24:33–5.