

Polska Akademia Nauk

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego  
Zespół Nerwowo-Mięśniowy w Zakładzie Badawczo-Lecznym Neurochirurgii

Katarzyna Kotruchow

**Badanie genu mitofuzyny 2 u polskich pacjentów  
z aksonalną postacią choroby Charcot-Marie-Tooth**

Rozprawa doktorska

Promotor: prof. dr hab. med. Andrzej Kochański

Warszawa 2014

Badania finansowano z następujących projektów badawczych, na które środki przyznało

Narodowe Centrum Nauki:

4746/B/P01/2011/40

2012/07/B/N24/01748

*Serdeczne podziękowania*

*dla promotora pracy, Pana prof. dr hab. n. med. Andrzeja Kochańskiego za cenne uwagi i pomoc w przygotowaniu pracy,*

*dla Pani prof. dr hab. med. Ireny Hausmanowej-Petrusewicz za wsparcie w prowadzeniu badań i udostępnienie cennego materiału badawczego.*

*Szczególne podziękowania*

*dla Pani dr n. med. Marii Jędrzejowskiej, Pani dr n. med. Dagmary Kabzińskiej i Pani dr Małgorzaty Beręsewicz za wsparcie merytoryczne, techniczne i możliwość konsultacji.*

## SPIS TREŚCI

Streszczenie.....	6
Abstract.....	10
Wykaz skrótów.....	13
1. Wstęp.....	16
1.1. Kalendarium.....	16
1.2. Fenotyp choroby CMT2.....	19
1.3. Gen mitofuzyny 2 – obecny stan badań.....	20
1.4. Rozmieszczenie mutacji w genie mitofuzyny 2.....	22
1.5. Białko mitofuzyny 2 – lokalizacja komórkowa i funkcje.....	25
2. Cel pracy.....	29
3. Materiał.....	30
3.1. Chorzy.....	30
3.2. Grupa kontrolna.....	35
4. Metody.....	36
4.1. Izolacja genomowego DNA z limfocytów krwi obwodowej pacjentów.....	36
4.2. Izolacja całkowitego RNA z limfocytów krwi obwodowej pacjentów.....	36
4.3. Pomiar stężenia kwasów nukleinowych.....	36
4.4. Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (quantitative real-time PCR).....	36
4.5. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR).....	38
4.6. Rozdział elektroforetyczny fragmentów amplifikowanych za pomocą reakcji PCR.....	41
4.7. Analiza SSCP.....	41
4.8. Oczyszczanie próbek po reakcji PCR.....	41
4.9. Reakcja sekwencjonowania.....	42
4.10. Odwrotna transkrypcja.....	42
4.11. Gene Scan.....	42
4.12. RFLP-PCR.....	43
4.13. MLPA.....	43
4.14. Zastosowane programy bioinformatyczne.....	43

5. Wyniki.....	44
5.1. Gen <i>PMP22</i> .....	44
5.2. Gen <i>KIF1B</i> .....	44
5.3. Gen mitofuzyny 2 ( <i>MFN2</i> ).....	44
5.3.1. Promotor genu <i>MFN2</i> .....	44
5.3.2. Region genu <i>MFN2</i> ulegający transkrypcji.....	45
5.3.2.1. Mutacje patogenne.....	45
5.3.2.1.1. Mutacja c.281G>A (p.Arg94Gln).....	45
5.3.2.1.2. Mutacja c.821C>T (p.Arg274Trp).....	46
5.3.2.1.3. Mutacja c.311+1G>T.....	47
5.3.2.2. Warianty sekwencji o nieznanym statusie patogenności.....	49
5.3.2.3. Rzadkie warianty sekwencji genu mitofuzyny 2.....	51
5.3.2.4. Częste warianty sekwencji genu mitofuzyny 2.....	52
6. Dyskusja.....	53
6.1. Mutacja c.281G>A (p.Arg94Gln).....	53
6.2. Mutacja c.821C>T (p.Arg274Trp).....	54
6.3. Mutacja c.311+1G>T.....	55
6.4. Warianty o nieokreślonym statusie patogenności.....	56
6.5. Patogeny mechanizm działania mutacji w genie mitofuzyny 2.....	59
6.6. Penetracja mutacji w genie mitofuzyny 2 w rodzinnych przypadkach HMSN II.....	60
6.7. Analiza regionu promotorowego genu mitofuzyny 2.....	61
6.8. Wykorzystanie przesiewowej metody SSCP.....	63
6.9. Analiza MLPA.....	64
6.10. Częstości występowania mutacji w genie mitofuzyny 2 w populacji polskich pacjentów z chorobą Charcot-Marie-Tooth typu 2.....	64
6.11. Polimorficzność genu mitofuzyny 2 wśród pacjentów z chorobami kręgu Charcot-Marie-Tooth typu 2 w populacji polskiej.....	66
7. Podsumowanie i Wnioski.....	67
Suplement.....	69
Piśmiennictwo.....	75

## Streszczenie

Choroba Charcot-Marie-Tooth (CMT) jest genetycznie uwarunkowaną neuropatią ruchowo-czuciową. Na podstawie badań klinicznych i elektrofizjologicznych wyróżniono dwa typy polineuropatii – typ demielinizacyjny (CMT1, o obniżonej szybkości przewodzenia w nerwach ruchowych <38 m/s) i typ aksonalny (CMT2, o prawidłowej lub w niewielkim stopniu obniżonej szybkości przewodzenia w nerwach ruchowych >38 m/s), gdzie pierwotnemu uszkodzeniu ulegają aksony.

W 2001 roku w japońskiej rodzinie z CMT typu 2 (typ aksonalny) stwierdzono obecność mutacji Gln98Leu w genie *KIF1B*, kodującym białko motoryczne – kinezyne. W pracy wykluczono obecność tej mutacji w genie *KIF1B* w grupie 34 osób za pomocą analizy SSCP. Dodatkowo stwierdzono występowanie wariantu sekwencji c.537C>G (p.Ala95Ala) o numerze identyfikacyjnym w bazie danych NCBI rs12402052 u 13 osób.

W 2004 roku odkryto, że mutacje w genie mitofuzyny 2 (*MFN2*) powodują wystąpienie choroby Charcot-Marie-Tooth typu 2. Wkrótce uznano je za najczęstszą przyczynę zachorowania na CMT2 ze wszystkich innych genów związanych z neuropatiami aksonalnymi.

Białko mitofuzyny 2 jest białkiem zewnętrznej błony mitochondrialnej i jest kodowane przez genom jądrowy. Białko to odpowiada za fuzję błon mitochondrialnych, uczestnicząc w zachowaniu równowagi dynamicznej sieci mitochondrialnej, bierze udział w transporcie aksonalnym mitochondriów wzdłuż mikrotubul i w połączeniu mitochondriów z siateczką śródplazmatyczną, zapewniając odpowiedni przepływ jonów wapnia między tymi organellami.

W genie mitofuzyny 2 zarejestrowano około 100 mutacji patogennych. Większość z nich znajduje się w regionie genu kodującym domenę GTPazową białka mitofuzyny 2, która odpowiada za hydrolizę GTP, co jest niezbędne do fuzji zewnętrznych błon mitochondrialnych.

Mutacje w genie mitofuzyny 2 dziedziczą się zarówno w sposób autosomalny dominujący, jak również znane są przypadki dziedziczenia autosomalnego recesywnego, gdzie chorzy mieli mutacje w genie *MFN2* w układzie homozygotycznym lub heterozygoty złożonej.

Obraz kliniczny chorych z mutacjami w genie mitofuzyny 2 jest bardzo różnorodny. Obejmuje on klasyczny fenotyp obwodowej neuropatii aksonalnej z osłabieniem i zanikiem mięśni odsiebnych kończyn dolnych, rzadziej górnych i wydrążeniem stóp. Początek choroby najczęściej przypada na pierwszą dekadę życia, jednak są znane przypadki o późniejszym oraz bardzo późnym początku, po 50-tym roku życia. Przebieg choroby CMT2 może być bardzo szybko postępujący i ciężki, prowadzący do unieruchomienia, lub łagodny, wolno postępujący, korelujący najczęściej z późnym początkiem.

Celem badań było poszukiwanie mutacji w genie mitofuzyny 2 wśród pacjentów z polineuropatią aksonalną, które według obecnego stanu wiedzy stanowią główną przyczynę choroby CMT2.

Badania molekularne przeprowadzono w grupie 69 osób ze zdiagnozowaną chorobą CMT. Do badań włączono chorych o różnorodnym fenotypie choroby, obejmującym klasyczną postać neuropatii aksonalnej ruchowo-czuciowej, neuropatię ruchową, neuropatię czuciową, neuropatię ruchowo-czuciową z objawami dodatkowymi, jak skolioza, zanik nerwu wzrokowego, objawy piramidowe, czy zmiany demielinizacyjne w ośrodkowym układzie nerwowym. Grupa badana obejmowała zarówno przypadki sporadyczne, jak i rodzinne, o dziedziczeniu i dominującym i recesywnym.

Zidentyfikowano trzy mutacje patogenne genu mitofuzyny 2. Jedna z nich jest mutacją opisywaną w literaturze i znajdującą się w pozycji *hot spot* genu. Jest to mutacja p.Arg94Gln, którą zidentyfikowano u pacjenta o wczesnym początku choroby i ciężkim przebiegu. Mutacja ta nie występuje u zdrowych rodziców chorego.

Druga mutacja (p.Arg274Trp) nie była do tej pory opisywana, chociaż w danej pozycji znana jest mutacja zamieniająca argininę na inny aminokwas – glutaminę. Powtórzenie się mutacji u chorych o różnym pochodzeniu etnicznym sugeruje jej patogenność. Pacjent wykazuje ciężki przebieg choroby CMT2 oraz upośledzenie umysłowe w stopniu lekkim. Mutacji nie wykryto u zdrowych rodziców pacjenta.

Trzecią mutację zidentyfikowano u pacjentki o późnym początku zachorowania (po 50-tym roku życia) i łagodnym przebiegu choroby CMT2. Wykryta mutacja c.311+1G>T jest mutacją splicingową, powodującą nieprawidłowe wycinanie intronów i wycięcie eksonu 4, co skutkuje przesunięciem ramki odczytu i powstaniem krótkiego, 66-aminokwasowego białka ( prawidłowe białko liczy 757 aminokwasów).

Wśród pacjentów z grupy badanej zidentyfikowano również 3 warianty o nieokreślonym statusie patogenności. Pierwszy z nich nie był dotychczas opisywany w bazach danych ani w literaturze. Wariant c.1287+50G>T stwierdzono u jednej pacjentki. W toku badań okazało się, że pacjentka ma również mutację w genie *LMNA*, odpowiedzialną za dystrofię mięśniową typu Emery-Dreifussa. Nie jest jasne, czy wariant c.1287+50G>T może być odpowiedzialny za wystąpienie komponenty neuropatii u pacjentki, czy stanowi modyfikator przebiegu choroby.

Drugim wariantem o nieokreślonym statusie patogenności jest wariant p.Val705Ile, który stwierdzono u dwóch osób w grupie badanej. Wariant ten był szeroko opisywany w literaturze. Najpierw uważano go za mutację patogenną, następnie za nieszkodliwy polimorfizm, a w końcu za możliwy modyfikator przebiegu choroby u pacjentów z mutacją w genie *GDAP1*.

Kolejnym wariantem o nieokreślonym statusie patogenności jest wariant p.Val573Ile. Wariant ten znajduje się w bazie danych NCBI, jednak nie są dostępne dane populacyjne dotyczące częstości jego występowania.

U pacjentów stwierdzono również dużą liczbę polimorfizmów. W grupie badanej zidentyfikowano 6 częstych polimorfizmów i 9 rzadkich polimorfizmów, przy czym są przypadki w grupie badanej, że u pojedynczego pacjenta stwierdzono aż 9 różnych polimorfizmów.

U 34 osób z grupy badanej analizie poddano również region promotorowy genu *MFN2*, w którym zidentyfikowano jeden wariant opisany w bazie danych o numerze identyfikacyjnym rs2236053 oraz jeden nieznan do tej pory wariant c.-9891delT. Znany wariant opisano, jako nieszkodliwy polimorfizm, natomiast drugi wariant stwierdzono u 7 osób i nie ma pewności, czy nie jest to wynik poślizgu polimerazy, czy rzeczywisty nowy wariant sekwencji genu *MFN2*.

Częstość występowania mutacji patogennych genu *MFN2* wśród pacjentów CMT z populacji polskiej jest niska (poniżej 5%), co pozostaje w zgodzie z ostatnimi doniesieniami, np. z Federacji Rosyjskiej, czy Norwegii. Inne badania populacyjne na świecie wskazują dużo wyższe częstości występowania mutacji w genie *MFN2* u pacjentów z CMT2, np. w populacji włoskiej. Większość omawianych w literaturze przypadków choroby CMT2 dotyczy przypadków rodzinnych czystej aksonalnej postaci CMT. Do niniejszych badań



włączono pacjentów z szerokim spektrum fenotypu choroby CMT, wykraczającym poza aksonalną postać CMT. Mutacje stwierdzono jedynie u pacjentów z czystą postacią aksonalnej choroby CMT. Ze względu na dużą liczbę polimorfizmów u pojedynczego pacjenta, nie można wykluczyć ich kumulującego się wpływu na pojawienie się lub przebieg choroby CMT.

Uzyskane wyniki wskazują, że gen mitofuzyny 2 powinien być niewątpliwie włączony do diagnostyki CMT, jednak przede wszystkim w przypadkach klasycznej postaci CMT2. Nie można jednak jednoznacznie określić pozycji genu mitofuzyny 2 w algorytmie diagnostycznym CMT z powodu niższej niż oczekiwana częstości mutacji w badanej grupie.

## Abstract

Charcot-Marie-Tooth disease is a hereditary motor-sensory neuropathy. Based on the clinical and electrophysiological findings, two types of polyneuropathy are distinguished – demyelinating (CMT1 with a reduced motor neuron conduction velocity <38 m/s) and axonal (CMT2 with normal or slightly reduced motor neuron conduction velocity >38 m/s), where the axons are primarily impaired.

In 2001, a novel p.Gln98Leu mutation was identified in the *KIF1B* gene in a Japanese CMT2 family, encoding the motor protein – kinesine. In this work, the mutation in the *KIF1B* gene was excluded in a group of 34 patients. Additionally, a sequence variant c.567C>G (p.Ala95Ala) was found in 13 patients with the identification number in the NCBI database rs12402052.

In 2004, it was discovered that mutations in the mitofusin 2 gene caused the Charcot-Marie-Tooth disease type 2. Afterwards, this gene was considered as the most frequently mutated gene in the CMT2 disease.

Mitofusin 2 protein is the mitochondrial outer membrane protein encoded by the nuclear genome. It is responsible for the mitochondrial membranes fusion, taking part in the maintenance of the dynamic mitochondrial network balance, and is involved in axonal transport of mitochondria along microtubules, and in tethering of mitochondria and endoplasmic reticulum, providing an appropriate flow of calcium ions between these organelles.

In the mitofusin 2 gene there are about 100 pathogenic mutations. Most of them localize in the region encoding the GTP-ase domain of the mitofusin 2 protein, which is responsible for the GTP hydrolysis necessary for the outer mitochondrial membranes fusion.

Mutations in the mitofusin 2 gene are inherited in the autosomal dominant manner, as well as autosomal recessive, where patients had homozygous or compound heterozygous mutations in the mitofusin 2 gene.

The patients with mitofusin 2 mutations have a wide spectrum of phenotypes. It includes the classical phenotype of peripheral axonal neuropathy with weakness and atrophy of distal muscles in the lower and, sometimes, in the upper limbs and with pes cavus. Onset of

the disease is mostly in the first decade of life, but there are known cases with late and very late (over 50 years of life) onset. Clinical course of CMT2 disease can be fast-progressing and severe, even with the dependence on the wheelchair, and moderate or mild, slowly progressing, which is the most frequent in case of the late onset of the disease.

The aim of this work is to study the mitofusin 2 mutations' profile in Polish patients with CMT2 as the most common cause of CMT2 disease.

The study material was DNA of 69 patients with diagnosed CMT. The study included patients with a wide spectrum of disease phenotypes: classical form of the axonal motor-sensory neuropathy, motor neuropathy, sensory neuropathy, motor-sensory neuropathy with additional symptoms as scoliosis, optic atrophy, pyramidal signs or demyelinating lesions in central nervous system. The group includes sporadic cases and familial cases of CMT disease with dominant and recessive inheritance.

Three pathogenic mutations have been identified in the study. One of them is a recurrent mutation in the hot spot position. It is a p.Arg94Gln mutation in a patient with early onset of the disease and severe clinical course. The mutation is absent in the parents of the patient.

The second mutation (p.Arg274Trp) is novel, although there is known mutation in the same codon, which changes arginine to glutamine. The recurrence of the mutation in the same codon in patients with different ethnical background indicates the pathogenicity of the mutation. The patient exhibits severe clinical course of the disease with mild mental retardation. The mutation was not found in the healthy parents of the patient.

The third mutation was found in a patient with late onset (over 50-year old) and mild clinical course of CMT2 disease. The c.311+1G>T mutation impairs splicing and causes skipping of the exon 4, which results in the frameshift and generation of the shorter 66 amino acid protein, in contrast to the native 757 amino acid protein, due to the premature codon stop.

Three sequence variants with an unknown status of pathogenicity have also been identified. The first one has not been described before in databases and literature. The c.1287+50G>T sequence variant was found in one patient. During the study, it was found that the patient also has a mutation in the LMNA gene, which is a causative mutation for Emery-Dreifuss muscle dystrophy. That is why it is not clear if the c.1287+50G>T sequence variant

could be responsible for the occurrence of the neuropathy component in this patient, or it is a possible modifier of the course of the disease.

The second variant with an unknown status of pathogenicity is variant p.Val705Ile which was found in two patients of the group. It was widely described in the literature, where it was first considered as a pathogenic mutation, than a benign polymorphism, and finally as a possible modifier of the course of the disease in patients with the mutation in the *GDAP1* gene.

The next variant with an unknown status of pathogenicity is variant p.Val573Ile. It is shown in the NCBI database, however there are no population data on its frequency.

Among the patients, there are identified a large number of polymorphisms, including 6 common and 9 rare polymorphisms, wherein there are cases with nine different polymorphisms in a single patient.

In 34 patients from the group, was analyzed the promoter region of the mitofusin 2 gene, where was identified one known sequence variant rs2236053 and one novel sequence variant c.-9891delT. The known rs2236053 variant is described as a benign polymorphism, whereas the second variant was identified in seven patients, and it is not clear if it is a result of polymerase sliding or an actual novel *MFN2* gene sequence variant.

It appears that the frequency of pathogenic mutations among CMT patients in the Polish population is low (below 5%) and is consistent with the recent reports, e.g. from the Russian Federation and Norway. However, other worldwide studies indicate a higher frequency of mutations in the *MFN2* gene among CMT2 patients, as for example in the Spanish or Italian populations. Most of the described cases of CMT2 disease is related to the familial cases of pure axonal CMT. The analysis included a wide spectrum of phenotypes of the CMT disease beyond the pure axonal CMT disease. Due to the large number of polymorphisms in the single patient, there cannot be excluded their cumulative effect on the occurrence or the course of CMT disease.

Obtained results indicate that the mitofusin 2 gene should remain included in the CMT diagnostics, but first of all in cases of the classical form of axonal CMT2 disease. However, it is impossible to determine the position of the mitofusin 2 gene in the CMT diagnostics due to the lower-than-expected mutation frequency in patients.

## WYKAZ SKRÓTÓW

AD - dziedziczenie autosomalne dominujące

AR - dziedziczenie autosomalne recesywne

Arg - arginina

Bax/Bak - BCL2-associated X protein/ BCL2-antagonist/killer 1 – białka proapoptotyczne

Bcl-2 - B-cell CLL/lymphoma 2 – białko antyapoptotyczne

Bid - BH3 interacting domain death agonist – oddziałująca domena BH3 agonisty śmierci komórkowej, białko proapoptotyczne

CC - domena coiled coil

CLCN6 - chloride channel, voltage-sensitive 6 – kanał chlorkowy 6, wrażliwy na napięcie

CMT - Charcot-Marie-Tooth

CMT 1 - Charcot-Marie-Tooth typu 1

CMT 2 - Charcot-Marie-Tooth typu 2

CMT 2A - Charcot-Marie-Tooth typu 2A

DRG - dorsal root ganglion - zwój korzenia grzbietowego

EDMD - dystrofia mięśniowa typu Emery-Dreifussa

EDTA - kwas etylenodiaminotetraoctowy

ER – endoplasmic reticulum – siateczka śródplazmatyczna

FBXO2 - F-box protein 2 – białko z domeną F-box, pośredniczy w ubikwitynacji białek przeznaczonych do degradacji w proteasomach

FBXO30 - F-box protein 30 – białko z domeną F-box, pośredniczy w ubikwitynacji białek przeznaczonych do degradacji w proteasomach

FBXO6 - F-box protein 6 – białko z domeną F-box, pośredniczy w ubikwitynacji białek przeznaczonych do degradacji w proteasomach

FRAP1 - FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1 – białko 1 związane z rapamycyną-białko 12 wiążące FK506

GDAP1 - ganglioside induced differentiation associated protein 1 – białko 1 związane z różnicowaniem indukowanym gangliozydem, bierze udział w podziale mitochondriów

GJB1 - gap junction protein, beta 1 – białko koneksyny 32

Gln - glutamina

GTP - guanozotrifosforan

His - histydyna

HMN - hereditary motor neuropathy – dziedziczna neuropatia ruchowa

HMSN - hereditary motor-sensory neuropathy – dziedziczna neuropatia ruchowo-czuciowa

HMSN II – hereditary motor-sensory neuropathy – dziedziczna neuropatia ruchowo-czuciowa typu aksonalnego

HMSN V - dziedziczna neuropatia ruchowo-czuciowa z objawami piramidowymi

HMSN VI - dziedziczna neuropatia ruchowo-czuciowa z zanikiem nerwu wzrokowego

HNPP - hereditary neuropathy with liability to pressure palsy – dziedziczna neuropatia z nadwrażliwością na ucisk

HR - domain heptad repeats – domena powtórzeń siedmiu hydrofobowych aminokwasów

HSN - hereditary sensory neuropathy – dziedziczna neuropatia czuciowa

Ile - izoleucyna

KIF1B - kinesin family member 1B – białko 1B należące do rodziny kinezyn

Leu - leucyna

MAM - mitochondria associated membranes – błony związane z mitochondriami

MFN2 - mitofuzyna 2

MLPA - Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification – metoda polegająca na amplifikacji sond zależnej od multipleksowej ligacji

MRI - *magnetic resonance imaging* - obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego

NCBI - National Center for Biotechnology Information - Narodowe Centrum Informatyki Biotechnologicznej

NPPA - natriuretic peptide A - peptyd natriuretyczny A

NPPB - natriuretic peptide B - peptyd natriuretyczny B

OPA1 - optic atrophy 1 - białko zaniku nerwu wzrokowego 1

OXPHOS - fosforylacja oksydacyjna

PEX14 - peroxisomal biogenesis factor 14 - czynnik 14 biogenezy peroksysomów

PMSCL2 - polymyositis/scleroderma autoantigen 2 - autoantygen 2 zapalenia wielomięśniowego/twardziny skóry

RFLP - Restriction Fragments Length Polymorphism - polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych

TARDBP - transactive response DNA binding protein - białko wiążące TAR DNA

Thr - treonina

TM - domena przezbłonowa

TNFRSF8 - tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8 - nadrodzina receptora czynnika martwicy nowotworu, element 8

Trp - tryptofan

Tyr - tyrozyna

UBE4B - ubiquitination factor E4B - czynnik ubikwitynacji E4B

Val - walina

VPS13D - vacuolar protein sorting 13 homolog D - homolog D wakuolarnego białka sortującego

X - kodon stop

XD - dziedziczenie dominujące sprzężone z chromosomem X

## 1. WSTĘP

### 1.1 Kalendarium

Niemal dwieście lat temu (XIX w.) Jean-Martin Charcot, Pierre Marie i Howard Tooth po raz pierwszy opisali chorobę – polineuropatię, określaną potem mianem choroby Charcot-Marie-Tooth (CMT) lub dziedziczną polineuropatią ruchowo-czuciową (HMSN) (1).

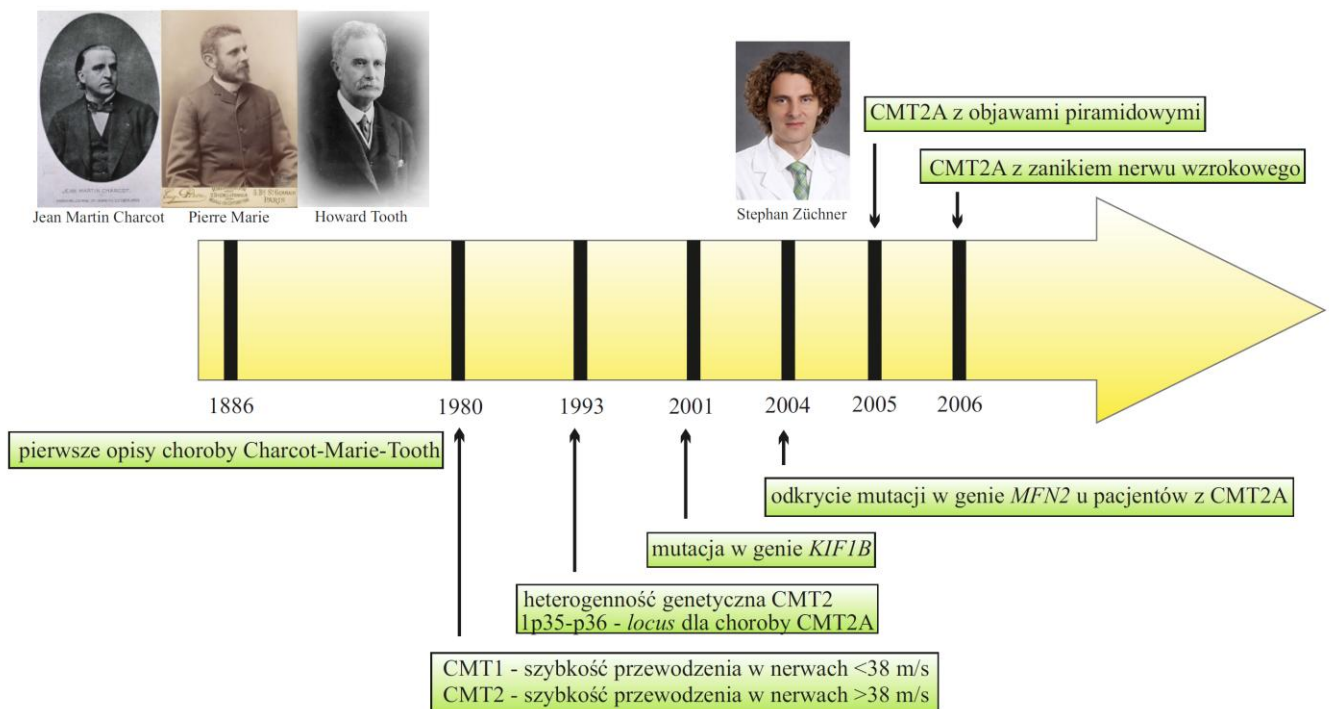
Wiedza o molekularnym podłożu dziedzicznych polineuropatii ruchowo-czuciowych wciąż się zwiększa (Ryc. 1). Odkrycia nowych genów odpowiadających za patogenezę tej grupy chorób ułatwiły ich diagnostykę i dostępność do poradnictwa genetycznego.

Na podstawie badań klinicznych i elektrofizjologicznych wyróżniono dwa typy polineuropatii – typ demielinizacyjny (CMT1, o obniżonej szybkości przewodzenia w nerwach ruchowych  $<38$  m/s) i typ aksonalny (CMT2, o normalnej lub w niewielkim stopniu obniżonej szybkości przewodzenia w nerwach ruchowych  $>38$  m/s) (2, 3). W oparciu o wyniki badań molekularnych i rodzaj dziedziczenia w obrębie każdej z dwóch grup głównych wyodrębniono podtypy, numerowane kolejnymi literami alfabetu (np. CMT1A, CMT2M). Za każdy podtyp odpowiadają mutacje innego genu. Niektóre formy CMT mają swoje charakterystyczne cechy fenotypowe.

W latach 90-tych ubiegłego wieku stwierdzono, że podłoże genetyczne choroby CMT1 jest heterogenne. Droga do odkrycia genu odpowiadającego za polineuropatię aksonalną czuciowo-ruchową (chorobę Charcot-Marie-Tooth typu 2), będącą przedmiotem zainteresowania niniejszej pracy, w sposób niejednoznaczny doprowadziła do oczekiwanego wyniku. Hentati i wsp. (1992) badali podobieństwo podłoża genetycznego obu typów choroby – CMT1 i CMT2 – za pomocą analizy sprzężeń w rodzinach z dziedziczną polineuropatią aksonalną. Okazało się jednak, że taki związek nie istniał. Wykluczono sprzężenie genetyczne choroby CMT2 ze znanymi wówczas *loci* dla choroby CMT1 (4). Również Loprest i wsp. w tym samym roku stwierdzili, że oba typy choroby mają inne podłoże genetyczne (5). W 1993 roku Ben Othmane zauważył heterogenność genetyczną CMT2. Stwierdzono, że choroba CMT charakteryzująca się pierwotnym uszkodzeniem aksonów wiąże się z co najmniej dwoma genami – różnymi od genów związanych z CMT1. Wtedy po raz pierwszy okazało się, że *locus* choroby, w którym mutacje są odpowiedzialne za zachorowanie, znajduje się na krótkim ramieniu chromosomu 1 (1p35-p36) i określono, jako CMT2A (6).



W 1997 roku Saito i wsp. za pomocą analizy sprzężeń zidentyfikowali w dwóch japońskich rodzinach region sprzężony z chorobą CMT2A również w *locus* (1p35-p36) (7). W 2001 roku ta sama grupa badaczy zidentyfikowała gen, w którym stwierdzono mutacje u chorych w jednej z uprzednio opisywanych japońskich rodzin. Gen ten koduje białko motoryczne kinezynę KIF1B i znajduje się w opisywanym wcześniej regionie (1p35-p36) (8). Funkcje biologiczne białka KIF1B wskazują, że mutacje występujące w genie kodującym to białko mogłyby odpowiadać za patogenezę choroby CMT2A.



**Rycina 1.** Kalendarium – schematyczne przedstawienie najważniejszych odkryć prowadzących do obecnego stanu wiedzy na temat mutacji w genie *MFN2*, powodujących chorobę CMT2, wraz z datami.

Badania na modelu mysim wykazały, że białko KIF1B, izoforma KIF1B $\beta$  kodowana przez wariant genu, powstały w wyniku alternatywnego splicingu, specyficznie wiąże się z pęcherzykami zawierającymi białka pęcherzyka synaptycznego, takie jak synaptogamina, synaptofizyna i SV2 (8). Jest to białko motoryczne poruszające się wzdłuż mikrotubul w kierunku (+) (9). KIF1B transportuje prekursor pęcherzyka synaptycznego w aksonie od ciała komórki do synapsy (10). Analiza modelu mysiego pozbawionego genu *kif1b* wykazała, że zwierzęta umierały przy urodzeniu z powodu bezdechu pojawiającego się

w wyniku uszkodzeń układu nerwowego. U zwierząt tych stwierdzono mniej synaps i pęcherzyków synaptycznych, co potwierdza hipotezę, że nieprawidłowe białko KIF1B u ludzi może powodować chorobę związaną z uszkodzeniami aksonów. Myszy z heterozygotyczną delecją genu *kif1b* wykazywały postępującą neuropatię o podobnych objawach, jakie występują u ludzi z polineuropatią (8).

Zhao i wsp. stwierdzili występowanie mutacji w genie *KIF1B* (p.Gln98Leu) w japońskiej rodzinie, w której stwierdzono chorobę CMT2. Tezę, że mutacja ta odpowiada za pojawienie się choroby, popierają szerokie badania funkcjonalne wykonane na hodowlach komórkowych i modelu zwierzęcym.

Odkrycie związku genu *KIF1B* z chorobą CMT2 spowodowało, że badania nad podłożem genetycznym tej polineuropatii skupiły się na badaniu wspomnianego genu, zatrzymując w ten sposób dalsze poszukiwania. Oprócz wymienianej japońskiej grupy nikomu, jak dotąd, nie udało się zidentyfikować mutacji w genie *KIF1B* u chorych na CMT2. Pojawiały się prace sugerujące zaangażowanie innego genu w występowanie choroby CMT2 (11). Dodatkowo z ustnych przekazów wiadomo, że po dziś dzień nie udostępniono DNA rodziny japońskiej innym grupom badawczym.

W 2004 roku zespół Stephana Züchnera podjął się zbadania aż siedmiu wielopokoleniowych rodzin, w których zdiagnozowano chorobę CMT2A. W żadnej z nich nie stwierdzono mutacji w genie kodującym kinezynę KIF1B. Wykluczono również występowanie mutacji w 14 innych genach, znajdujących się w obrębie regionu chromosomu związanego z CMT2A, o których wiadomo, że ulegają ekspresji w układzie nerwowym (*UBE4B*, *PEX14*, *TARDBP*, *PMSCL2*, *FRAP1*, *KIAA1337*, *FBXO2*, *FBX30*, *FBXO6*, *CLCN6*, *NPPA*, *NPPB*, *TNFRSF8* i *VPS13D*) (12). We wszystkich siedmiu rodzinach zidentyfikowano natomiast mutacje zmiany sensu (ang. missense) w genie kodującym białko zewnętrznej błony mitochondrialnej – mitofuzynę 2 (*MFN2*). Dr Vance, jeden z najwybitniejszych znawców genetycznie uwarunkowanych polineuropatii, miał nawet powiedzieć: „No-one has really looked at this gene in people and certainly not in the nervous system so this was an unexpected finding” (w *The Lancet Neurology*, tom 3 czerwiec 2004, w artykule autorstwa Jane Bradbury). Poza tym w 36 rodzinach, w których występowała polineuropatia genetycznie uwarunkowana, zidentyfikowano dodatkowych siedmiu chorych z mutacjami w genie *MFN2*. Autorzy postulowali wtedy, że to mutacje w genie mitofuzyny 2 są pierwotną przyczyną zachorowania na CMT2A, i że wiedza ta pozwoli na poznanie patofizjologii

choroby. Praca grupy Züchnera była przełomowa dla badań nad CMT2, ponieważ mimo wiedzy na temat tej choroby, dopiero od jej ukazania się możliwe było podjęcie diagnostyki genetycznej chorych, a zatem także określenie fenotypu tej choroby. Od tamtego czasu wciąż pojawiają się nowe doniesienia o mutacjach w genie kodującym białko mitofuzyny 2 i nadal rozszerza się zakres fenotypów z nimi związanych.

## 1.2 Fenotyp choroby CMT2

Choroba Charcot-Marie-Tooth (CMT) jest polineuropatią obwodową, w której rozróżniono dwa typy ze względu na typ uszkodzenia. Wyróżnia się demielinizacyjny typ choroby określanej mianem choroby Charcot-Marie-Tooth typu 1, gdzie pierwotnemu uszkodzeniu ulega osłonka mielinowa komórki nerwowej i aksonalny typ choroby określanej mianem choroby Charcot-Marie-Tooth typu 2, gdzie pierwotnym uszkodzeniem jest zanik aksonów. Choroby kręgu Charcot-Marie-Tooth zaliczają się do dziedzicznych neuropatii ruchowo-czuciowych – HMSN (ang. hereditary motor-sensory neuropathy), które to pojęcie w niniejszej pracy jest stosowane zamiennie z pojęciem choroby CMT. HMSN II oznacza chorobę HMSN z pierwotnym uszkodzeniem aksonów, odpowiadającą pojęciu choroby CMT2. Fenotyp charakterystyczny dla aksonalnej postaci choroby Charcot-Marie-Tooth 2A jest klasycznym fenotypem CMT2. Do głównych objawów zalicza się zanik i osłabienie odsiebnych mięśni kończyn dolnych, rzadziej górnych. U chorych występują również zaburzenia czucia.

U większości chorych początek choroby przypada na pierwszą lub drugą dekadę życia. Przebieg choroby w tej formie CMT zwykle jest ciężki lub umiarkowany i koreluje z wiekiem wystąpienia pierwszych objawów. Wczesny początek zwykle łączy się z większym nasileniem objawów klinicznych i szybszym postępowaniem choroby (13). Z kolei późny początek obserwowany jest raczej u chorych z łagodnym przebiegiem i wolną progresją objawów. Wśród chorych z CMT2A dominuje jednak cięższy fenotyp. W literaturze opisano bardzo niewielu pacjentów z CMT2 ze stwierdzonymi mutacjami mitofuzyny 2 z późnym początkiem objawów, przypadającym w piątej lub szóstej dekadzie życia (14).

Wśród pacjentów z CMT2 ze zidentyfikowanymi mutacjami w genie mitofuzyny 2 są również chorzy z objawami nietypowymi dla CMT, jak objawy piramidowe (HMSN V) w przypadku mutacji c.493C>G (15) i zanik nerwu wzrokowego (HMSN VI) w przypadku

mutacji c.280C>T (p.Arg94Trp), c.617C>T (p.Thr206Ile), c.827A>G (p.Gln276Arg, c.1081C>T (p.His361Tyr), c.1090C>T (p.Arg364Trp) i c.1252C>T (p.Arg418X) (16). Znane są również przypadki, w których mutacje w genie mitofuzyny 2 odpowiadają za neuropatię aksonalną z niedosłuchem (mutacja c.617C>T; p.Thr206Ile) (16). Dodatkowo wraz z CMT2 i mutacjami w genie *MFN2* stwierdzano takie objawy dodatkowe, jak chrypka, skolioza, drżenie. U niektórych chorych stwierdzono zmiany demielinizacyjne (MRI) w ośrodkowym układzie nerwowym (17).

W większości przypadków choroba dziedziczy się w sposób autosomalny dominujący. Istnieją jednak nieliczne rodziny, gdzie stwierdzono dziedziczenie autosomalne recesywne oraz równoczesne występowanie mutacji w genie mitofuzyny 2 w dwóch *loci* oraz innym genie, jak gen *GDAP1* i *OPAI* (18-20).

### 1.3 Gen mitofuzyny 2 – obecny stan badań

Od odkrycia Stephana Züchnera (12) kilka ośrodków na świecie zajęło się badaniem genu mitofuzyny 2 wśród pacjentów z dziedziczną neuropatią czuciowo-ruchową (Ryc. 2). W ostatnich latach ukazały się prace omawiające badania populacyjne dotyczące mutacji w genie kodującym mitofuzynę 2 wśród pacjentów z CMT2. Już w 2006 roku pojawiło się opracowanie dotyczące dystrybucji mutacji w genie kodującym białko mitofuzyny 2 oparte o badania rodzin o różnym pochodzeniu etnicznym. Praca powstała we współpracy z ośrodkami z Niemiec, Belgii, Bułgarii, Czech, Austrii, Izraela, Serbii, Portugalii, Panamy, Stanów Zjednoczonych i Polski (13). To w tej pracy przedstawiono badania pilotażowe poszukiwania mutacji w genie kodującym białko mitofuzyny 2 wśród polskich pacjentów z chorobą CMT2 prowadzone przez Zespół Nerwowo-Mięśniowy Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie. W grupie 20 chorych stwierdzono 2 mutacje w genie *MFN2* u pacjentów z jednej rodziny, co było obiecującym wynikiem dla późniejszych badań populacyjnych i stało się przyczyną dalszych badań omawianych w niniejszym opracowaniu.



**Rycina 2.** Mapa konturowa świata z zaznaczonymi na czerwono ośrodkami naukowymi zajmującymi się badaniem genu mitofuzyny 2 u pacjentów z chorobą Charcot-Marie-Tooth.

W 2010 roku ukazała się praca przedstawiająca częstość mutacji w genie *MFN2* w norweskiej populacji pacjentów o szerokim fenotypie polineuropatii. Mutacje w genie mitofuzyny 2 stwierdzono u pacjentów z demielinizacyjną formą CMT (CMT1), CMT2, pośrednią demielinizacyjno-aksonalną formą CMT oraz z czystą ruchową neuropatią (dHMN), co dało ogólną częstość występowania mutacji w genie *MFN2* równą 3,4% (21).

W 2011 roku Lin i wsp. podjęli badania grupy 36 pacjentów z CMT2 wśród Chińczyków Han na Tajwanie, uzyskując 13,9% częstość występowania mutacji w genie *MFN2* (22).

Kolejne doniesienia o badaniach populacyjnych wśród pacjentów z chorobami kręgu Charcot-Marie-Tooth pojawiły się w 2013 roku. Badania z Niemiec wykazały 8% częstość występowania mutacji w genie *MFN2* wśród pacjentów z CMT2 (23), badania hiszpańskie wykazały bardzo niską częstość mutacji w genie *MFN2* w populacji chorych, równą 2,5% (24). Najbardziej interesujące wyniki, ze względu na położenie geograficzne na wschodzie Europy, pochodzą z Czech – 7,2% mutacji u pacjentów z chorobą CMT2 (25) oraz z Rosji – 3% mutacji u pacjentów z chorobą CMT2 (26).

W 2014 roku pojawiło się obszerne opracowanie badań populacyjnych wśród włoskich pacjentów, gdzie stwierdzono aż 28,9% częstość występowania mutacji w genie

*MFN2* u pacjentów z chorobą CMT2 (27). Podobnie wysoką częstość występowania mutacji w genie *MFN2* u pacjentów z CMT2 zanotowano w Korei (28).

#### **1.4 Rozmieszczenie mutacji w genie mitofuzyny 2**

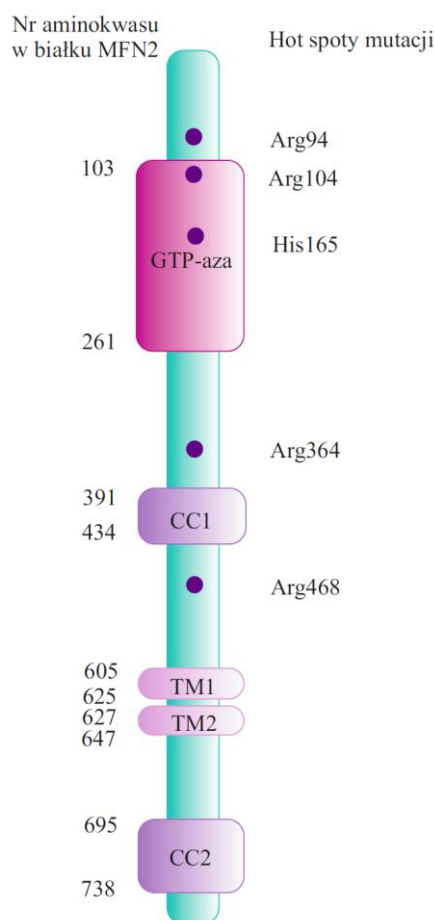
Większość mutacji w genie kodującym białko mitofuzyny 2 u pacjentów z dziedziczną neuropatią czuciowo-ruchową to mutacje typu zmiany sensu (ang. missense), nieliczne to delecje nukleotydów, których wg Bergamin (2014) jest 9 (13, 18, 22, 27, 29, 29-32), mutacje wprowadzające przedwczesny kodon stop, których wg Bergamin (2014) jest 5 (13, 18, 33, 34) i 6 mutacji splicingowych (14, 35-39). W literaturze do tej pory opisano tylko jedną rodzinę z delecją całego eksonu 7 i 8 genu mitofuzyny 2 (18).

Z ponad stu mutacji zidentyfikowanych w genie kodującym białko mitofuzyny 2 aż około 40 znajduje się w domenie GTPazowej, a ponad 30 lokalizuje się w regionie międzydomenowym białka, między domeną GTPazową i domeną CC1 (Ryc. 3).

Wśród pozycji, w jakich stwierdzono mutacje w genie mitofuzyny 2 można wyróżnić takie, które można uznać za tzw. gorące miejsca mutacji (ang. hotspot). Takie gorące regiony mutacji (ang. hotspot mutation region) według słownika w Genetic Home Reference [<http://ghr.nlm.nih.gov/glossary=hotspotmutationregion> z dn. 25.06.2014] oznaczają regiony o wysokiej podatności na mutacje, gdzie mutacje występują z wyższą częstością, ze względu na pewną niestabilność, tendencję do nierównomiernego crossing-over lub szczególną predyspozycję chemiczną do podstawień nukleotydów. Najbardziej prawdopodobnym hotspotem w genie mitofuzyny 2 jest kodon 94, w którym stwierdzono aż 37 przypadków podstawień nukleotydów, powodujących zmianę aminokwasu argininy na tryptofan, glutaminę, glicynę, prolinę, w zależności od danego podstawienia nukleotydowego. Pozycja ta lokalizuje się tuż przed domeną GTPazową białka mitofuzyny 2, na jego N-końcu.

Kolejną bardzo często ulegającą mutacjom pozycją w genie kodującym białko mitofuzyny 2 jest kodon 364 w białku, gdzie aminokwas argininy zmienia się na tryptofan, prolinę i glutaminę, w zależności od podstawienia nukleotydowego. Takich przypadków w literaturze zanotowano aż 26. Pozycja ta lokalizuje się w regionie międzydomenowym, między domeną GTPazową i domeną CC1.

Dość dużą podatnością na mutacje charakteryzuje się również kodon 468 w regionie międzydomenowym, między domeną CC1 i domeną przezbłonową (TM), gdzie aż w 11 przypadkach na świecie, w wyniku mutacji, w miejsce argininy wstawiana jest histydyna. Podobnie w pozycji 104 w domenie GTPazowej białka mitofuzyny, argininę w wyniku mutacji aż w 10 przypadkach zastępuje tryptofan. W tej domenie również w 9 przypadkach stwierdzono podstawienia nukleotydów, powodujące zamianę histydyny 165 na kwas asparaginowy, tyrozynę, argininę (najczęściej, bo 6 razy) i leucynę.



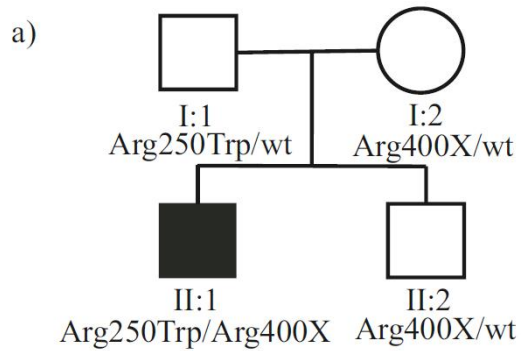
**Rycina 3.** Schematyczne przedstawienie białka mitofuzyny 2 wraz z domenami (GTP-aza – domena hydrolizująca GTP, CC1 i CC2 – domeny coiled coil 1 i 2, TM1 i TM2, podzielona na dwie części domena przezbłonowa (ang. transmembrane domain)) i zaznaczonymi pozycjami aminokwasowymi, w których znajdują się tzw. gorące miejsca mutacji (ang. hot spot) w odpowiednich nukleotydach genu *MFN2*. Numerację aminokwasów odpowiadających poszczególnym domenom białka zaczerpnięto ze strony [www.uniprot.org/uniprot/O95140](http://www.uniprot.org/uniprot/O95140) (stan z dn. 17.11.2014).

Oprócz bardzo dużej liczby mutacji stwierdzonych w genie mitofuzyny 2 powodujących genetycznie uwarunkowane neuropatie czuciowo-ruchowe, w genie

kodującym białko mitofuzyny 2 znajduje się również około 1000 wariantów sekwencyjnych [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>], wśród których obecne są zarówno częste polimorfizmy, jak i rzadkie, oraz warianty o nieznanym statusie patogenności. Wyniki badań populacyjnych załączanych do bazy danych NCBI uzyskano w większości poprzez poddanie analizie różnych grup etnicznych, co pozwala na obserwację różnic w częstościach występowania poszczególnych wariantów sekwencji genu *MFN2* w zależności od pochodzenia etnicznego. Na uwagę zasługują warianty sekwencji genu *MFN2* o nieokreślonym statusie patogenności. Status patogenności wariantu jest trudny do określenia, gdy nie przeprowadzono badań populacyjnych i nie wiadomo, czy dany wariant występuje w grupie osób zdrowych i z jaką częstością.

Szczególnością trudność dla genetyków stanowią takie właśnie warianty o nieokreślonej patogenności. Problem z odniesieniem się do wariantu, jako do mutacji patogenicznej, jest ważny w kontekście poradnictwa genetycznego i opracowywania testów diagnostycznych dla konkretnej jednostki chorobowej. Przypadek genu mitofuzyny 2 jest szczególny z tego względu, że liczba wariantów sekwencji jest bardzo duża i u poszczególnych pacjentów występują zestawy wariantów. Problem stanowią także warianty, które uchodzą za mutacje patogeniczne, jednak nie wywołują objawów choroby. Tak było w przypadku polskiej rodziny z pierwszych w Polsce badań nad genem mitofuzyny 2, w której wykryto mutacje heterozygotyczne p.Arg250Trp u ojca probanta i p.Arg400X u matki probanta, przy czym oboje rodzice są zdrowi. Choroba ujawniła się u syna, który odziedziczył oba zmutowane allele genu *MFN2* (13), (Ryc. 4).





**Rycina 4.** Rycina przedstawia uproszczony rodowód rodziny polskiej z badań pilotażowych (13), w której zidentyfikowano mutacje w genie *MFN2* (a); widoczny zanik mięśni kończyn dolnych u chorego chłopca z rodziny (II:1) (b).

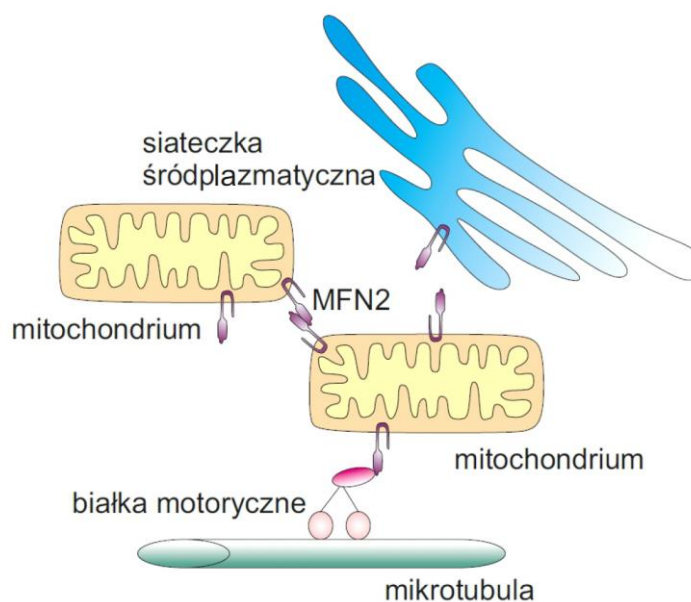
### 1.5 Białko mitofuzyny 2 – lokalizacja komórkowa i funkcje

Gen mitofuzyny 2 lokalizuje się na krótkim ramieniu chromosomu 1 w *locus* 1p36.22 i składa się z 19 eksonów, z czego 17 jest kodujących. Gen ten koduje białko mitofuzyny 2 (MFN2), które zakotwiczone jest w zewnętrznej błonie mitochondrialnej. U ssaków białko MFN2 liczy 757 aminokwasów. Oba końce białka mitofuzyny 2, zarówno N-końiec, jak i C-końiec, zwrócone są do cytoplazmy. Jest to białko o aktywności GTP-azy, a więc posiada domenę GTP-azową, dwie domeny coiled-coil (CC1 i CC2, nazywane też domenami heptad repeats, odpowiednio, HR1 i HR2, złożonymi z powtórzeń siedmiu aminokwasów hydrofobowych) i jedną dwuczęściową domenę przezbłonową, która kotwiczony białko w dwuwarstwie lipidowej. Domena GTP-azowa odpowiada za hydrolizę GTP, co jest niezbędne do fuzji zewnętrznych błon mitochondrialnych (40). Mitofuzyna 2 może tworzyć homodimery, tj. łączyć się z drugim białkiem mitofuzyny 2 lub tworzy heterodimery z białkiem mitofuzyny 1. Dimeryzacja mitofuzyn pozwala na fuzję błon mitochondrialnych.

W ten sposób białko mitofuzyny 2 jest częścią mechanizmu utrzymującego dynamikę błon mitochondrialnych, czyli równowagę między podziałami a fuzją tych organelli.

Domeny coiled coil (inaczej, heptad repeats) odpowiadają za tworzenie kompleksów między mitofuzynami 1 i 2 (kompleksy heterotypowe białka mitofuzyny 1 i mitofuzyny 2) i między dwoma białkami mitofuzyny 2 (kompleksy homotypowe dwóch białek mitofuzyny 2) (41).

Okazało się, że białko mitofuzyny 2, oprócz udziału w kontroli dynamiki sieci mitochondrialnej w komórce, pełni jeszcze inne role (Ryc. 5). Mianowicie, białko mitofuzyny 2 lokalizuje się również w błonie siateczki śródplazmatycznej (ER, ang. endoplasmic reticulum) i jest go wyraźnie więcej w błonach związanych z mitochondriami (MAM, ang. mitochondria associated membranes), gdzie doprowadza do kontaktu ER i mitochondrium, kontrolując w ten sposób przepływ jonów wapnia. Ponadto białko MFN2 wpływa na prawidłową morfologię ER. Jak dowiedziono poprzez doświadczenia na hodowlach mysich fibroblastów embrjonalnych, komórki pozbawione białka mitofuzyny 2 wykazywały nienormalnie napęczniałą siateczkę śródplazmatyczną w formie agregatów (42).



**Rycina 5.** Schematyczne przedstawienie podstawowych funkcji białka mitofuzyny 2 w komórce (rycina opublikowana w Kotruchow et al. (2011) *Postępy Biochemii* 57:283-93)

Mitofuzyna 2 ma również swój udział w regulacji apoptozy. Wyciszenie genu *MFN2* w komórkach HeLa powodowało przyspieszenie uwalniania cytochromu c indukowanego rekombinowanym białkiem Bid, które jest proapoptocycznym członkiem rodziny Bcl-2

i aktywuje białka Bax/Bak. Brak ekspresji genu mitofuzyny 2, a zatem zaburzenie równowagi podziału i fuzji mitochondriów, powoduje podwyższoną czułość na bodźce proapoptotyczne. Dokonano także obserwacji, że brak ekspresji genu *MFN2* powoduje fragmentację mitochondriów (43, 44).

Stwierdzono również, że niezależną od fuzji błon mitochondrialnych funkcją białka mitofuzyny 2 jest regulacja metabolizmu mitochondrialnego. Zaburzenia w białku mitofuzyny 2 typu „loss-of-function” powodują w komórkach mięśniowych zmniejszenie aktywności łańcucha transportu elektronów oraz zmianę ekspresji genów kodujących podjednostki układu OXPHOS, które są częścią kompleksu I, II, III i V, co prowadzi do zmniejszonej aktywności pewnych składników wspomnianego układu, podczas gdy nadekspresja genu *MFN2* powodowała aktywację metabolizmu mitochondrialnego i zwiększenie ekspresji podjednostek układu OXPHOS (45).

W pracy Misko i wsp. (46) przedstawiono dowody, że białko mitofuzyny 2 jest częścią cząsteczkowego kompleksu łączącego mitochondria z białkami motorycznymi – kinezynami. Oznacza to, że białko mitofuzyny 2 bierze czynny udział w transporcie mitochondriów w aksonach wzdłuż mikrotubul. Dzieje się tak, poprzez oddziaływanie białka mitofuzyny 2 z białkami Miro i OIP106/GRIF1 (46). I chociaż białka Miro są ściśle związane z transportem za pomocą kinezyn, to, podobnie jak przedstawiały się badania nad *Drosophila melanogaster*, utrata białka MFN2 lub Miro2 wpływa na transport mitochondriów, w którym pośredniczą zarówno kinezyny, jak i dyneiny, czyli wpływa na wewnątrzkomórkowy transport organelli w kierunku końca (+) oraz w kierunku końca (-) mikrotubul (47). Badania mutantów p.Leu76Pro, p.Arg94Gln, p.Pro251Ala i p.Arg280His białka mitofuzyny 2 pokazały, że zmutowane białko powoduje agregację mitochondriów w hodowlach neuronów DRG (48). Jednak zaburzenia transportu powodowane mutacjami w genie *MFN2*, prowadzącymi do polineuropatii obwodowej nie uniemożliwiają powstania kompleksu MFN2-Miro-OIP106, ale najprawdopodobniej działają poprzez zmianę regulacji całego aparatu transportu za pomocą kinezyn poprzez wpływ na wydajność i przyłączanie do mikrotubul (46).

Zatem biorąc pod uwagę różnorodność funkcji pełnionych przez białko mitofuzyny 2 w komórkach, możliwych jest kilka hipotez dotyczących patogenezy dziedzicznej neuropatii czuciowo-ruchowej. Misko i wsp. postulują, że to raczej zaburzenia w transporcie mitochondrialnym odpowiadają za patogenezę CMT2A, a nie zaburzenia fuzji błon

mitochondrialnych (46). Jednak zaburzenia w fuzji błon mitochondrialnych łączą się z zaburzeniem całej równowagi sieci mitochondrialnych w komórce, ich nienaturalną fragmentacją i zmianą potencjału błonowego. Niezależnie od tego zaburzony metabolizm energetyczny komórek i nieprawidłowości w budowie łańcucha oddechowego mogą mieć wpływ na rozwinięcie choroby, ponieważ zaatakowane w danej chorobie komórki (układu nerwowego i tkanki mięśniowej) mają szczególnie aktywny metabolizm komórkowy, którego jakakolwiek zmiana może powodować zaburzenia chorobotwórcze (45). Również zaburzenia w przepływie jonów wapnia między siateczką śródplazmatyczną i mitochondrium mają negatywny wpływ na funkcjonowanie komórki. Dzieje się tak ze względu na to, że naruszałoby to tworzenie tzw. mikrodomen wysokiego stężenia  $Ca^{2+}$ , co jest kluczowe dla pobierania jonów wapnia przez mitochondria (49, 50). Prawidłowy przepływ jonów wapnia jest konieczny ze względu na to, że wapń reguluje aktywność enzymów mitochondrialnych, aktywność enzymów kwasów trikarboksylowych, jak dehydrogenaz  $\alpha$ -ketoglutaranowej, izocytrynianowej i pirogronianowej oraz reguluje aktywność łańcucha transportu elektronów (51).

Jednak żadna z wymienionych powyżej hipotez nie została udowodniona, jako źródło patogenezy dla choroby CMT2A i jest wysoce prawdopodobne, że mutacje w genie mitofuzyny 2 mogą jednocześnie wpływać na więcej niż jedną z funkcji białka i powodować uszkodzenia aksonów poprzez kumulację efektów danego zaburzenia.

## 2. CEL PRACY

Celem pracy było określenie profilu mutacji w genie mitofuzyny 2 wśród pacjentów z genetycznie uwarunkowaną polineuropatią aksonalną. W pracy podjęto próbę określenia częstości mutacji w genie mitofuzyny 2 u pacjentów z CMT2 w populacji polskiej i identyfikacji wariantów sekwencji genu mitofuzyny 2 u poszczególnych pacjentów. Podjęto również próbę odpowiedzi na pytanie, jaki fenotyp chorych z CMT powinno poddawać się badaniu genu *MFN2* w pierwszej kolejności.

Szczegółowym celem pracy była analiza regionu kodującego genu mitofuzyny 2, złączy intron-ekson oraz analiza regionu promotorowego genu mitofuzyny 2 i określenie występowania delecji lub duplikacji fragmentów genu mitofuzyny 2.

Sprawdzono również występowanie pierwszej zidentyfikowanej w regionie 1p35-p36 mutacji w rodzinie CMT2 w genie *KIF1B* (p.Gln98Leu).

### 3. MATERIAŁ

#### 3.1 Chorzy

Badaniami objęto 69 osób, u których na podstawie obrazu klinicznego i badania elektroneurograficznego rozpoznano jedną z następujących chorób: aksonalną neuropatię czuciowo-ruchową, obwodową neuropatię ruchową, neuropatię czuciową lub pośrednią neuropatię demielinizacyjno-aksonalną (Tabela 1). Wszyscy chorzy byli konsultowani w Zespole Nerwowo-Mięśniowym w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN przez konsylium lekarskie pod kier. Prof. Ireny Hausmanowej-Petrusewicz, składające się z lekarzy specjalistów w dziedzinie: neurologii, genetyki klinicznej i laboratoryjnej oraz internisty. Kilku chorych zostało skierowanych na badania genetyczne z poradni genetycznych. Wszyscy konsultowani chorzy podpisali świadomą zgodę na przeprowadzenie badań genetycznych. W badanych rodzinach zebrano wywiad i wykreślono kilkupokoleniowe drzewa rodzinne. Chorym wydano wyniki badania genetycznego na piśmie. Chorym i członkom rodzin udzielono porady genetycznej. W wyjątkowych i uzasadnionych przypadkach (obłożna choroba, koszty podróży) wynik badania genetycznego przesłano choremu listem poleconym po uprzednim uzyskaniu pisemnej prośby chorego, zaw. uzasadnienie rezygnacji z przyjazdu na konsultację. Rodowody zawarte w pracy uległy nieznacznej zmianie (zachowanie anonimowości bez uszczerbku dla wartości naukowej). Zdjęcia zamieszczone w pracy uniemożliwiają identyfikację chorych.

**Tabela 1.**

#### **Charakterystyka grupy badanej**

Rodzina	Chory /inicjały/	Sposób dziedziczenia	Rozpoznanie wstępne	Wiek zachorowania w latach	Przebieg kliniczny choroby	Objawy dodatkowe
R1	GT	sporadyczny	HMSN II	13	umiarkowany	-
R2	SM	AD	HMSN V	dzieciństwo	ciężki	-
R3	BK	sporadyczny	HMSN II	6	umiarkowany	skolioza
R4	CP	sporadyczny	HMSN II	wrodzona	ciężki	ataksja, zmiany demielinizacyjne w OUN w badaniach obrazowych
R5	CD	AD	HMSN II	10	umiarkowany	dysmorfia twarzy
R5	CO	AD	HMSN II	11	umiarkowany	-
R6	SP	sporadyczny	HMSN II	15	łagodny	biopsja nerwu łydkowego: łagodna przewlekła polineuropatia

						mieszana
R7	PN	AD/XD	CMT 1/2	4	łagodny	-
R8	FA	AD	EDMD/HMSN II	2-ga dekada życia	łagodny	EDMD wywołana mutacją c.1130G>A (p.Arg377His) w genie <i>LMNA</i>
R9	GJ	sporadyczny	HMN	4-ta dekada życia	ciężki	niedosłuch, zajęcie mięśni proksymalnych
R10	PW	sporadyczny	HMN	21	umiarkowany, szybko postępujący	cechy miopatii widoczne w EMG, zajęcie mięśni proksymalnych
R11	KM	Sporadyczny	HMSN II	b.d.	łagodny	żywe odruchy kolanowe
R12	NM	AD/XD	HMSN II	b.d.	łagodny	dysmorfia twarzy
R13	MK	AR	HMSN II	wrodzona	ciężki	skolioza, przykurcze w stawach międzypaliczkowych
R14	WR	sporadyczny	HMN	42	zbyt krótki czas trwania choroby, aby określić przebieg kliniczny	niedowład mięśni proksymalnych
R15	RP	AD	HMSN II	b.d.	umiarkowany	skolioza
R16	KK	sporadyczny	HMSN II	dzieciństwo	ciężki	skolioza, chód spastyczny, niepełnosprawność intelektualna
R17	SM	sporadyczny	HMSN II	33	umiarkowany	żywe odruchy głębokie w kończynach górnych i dolnych
R18	PT	sporadyczny	HMSN II	5	ciężki	ogniska demielinizacji w OUN w badaniach obrazowych, niepełnosprawność intelektualna
R19	GM	sporadyczny	HMSN II	15	ciężki	drżenie posturalne rąk, nadwzroczność, niepełnosprawność intelektualna w stopniu lekkim
R20	KN	sporadyczny	HMN	6	łagodny	drżenie posturalne rąk
R21	OL	sporadyczny	CMT 1/2	50	łagodny	-
R22	PK	sporadyczny	HNPP	23	łagodny	choroba Hashimoto
R23	MD	AR	HMSN II	wrodzona	ciężki	-
R24	WM	sporadyczny	HMN	15	łagodny	-
R25	RM	sporadyczny	HMSN II	8	ciężki	niepełnosprawność intelektualna
R26	KM	sporadyczny	HMSN II	20	łagodny	łuszczycza
R27	CA	AR/AD	HMSN VI	27	ciężki	-
R27	GK	AR/AD	HMSN V/HMS VI	b.d.	ciężki	-
R28	SJ	AD	HMN	b.d.	b.d.	b.d.
R29	CM	AD/XD	HMN	27	b.d.	b.d.
R30	WA	sporadyczny	HMSN II	9	trudny do określenia	żywe odruchy, objaw Babińskiego
R31	MJ	sporadyczny	podejrzenie cytopatii mitochondrialnej (rozpoznanie	15 miesiąc życia	b.d.	b.d.

			trudne do weryfikacji-braki w dokumentacji)			
R32	MM	AD/XD	CMT 1/2	5	trudny do określenia	-
R33	RJ	sporadyczny	CMT 1/2	wczesne dzieciństwo	ciężki	-
R34	TK	sporadyczny	HMSN II	wrodzona	ciężki – uzależniona od wózka inwalidzkiego	liczne wady kostne
R35	KK	sporadyczny	HMSN II	wrodzona	ciężki	makrocefalia, zanik korowy w okolicy czołowej
R36	MM	sporadyczny	HMSN II	dzieciństwo	trudny do określenia	zanik prawego nerwu wzrokowego, padaczka
R37	ŻH	AD	HMSN II	50	łagodny	-
R38	PM	AR	HSN	b.d.	b.d.	zespół mózdkowy
R39	BS	AD	HMSN II	dzieciństwo	łagodny	cukrzyca
R40	CK	AD/XD	HMSN II	13	umiarkowany	-
R41	RT	AD	HMSN II	3-cia dekada życia	łagodny	-
R42	SD	sporadyczny	HSN	wczesne dzieciństwo	Trudny do określenia	niepełnosprawność intelektualna
R43	CL	AD	HMSN V z żywymi odruchami	17	ciężki	wady kostne
R44	OJ	AD/XD	HMSN II	15	umiarkowany	-
R45	MM	AD	HMSN II	dzieciństwo	ciężki	-
R46	WZ	AD	HMSN II	7	łagodny	-
R47	SG	sporadyczny	HMSN II	33	ciężki, korzysta z wózka	-
R48	SK	sporadyczny	HMSN II	4	trudny do określenia	makrocefalia
R49	RB	AD/XD	HMSN II	50	łagodny	-
R50	WM	sporadyczny	HMSN II	24	umiarkowany	-
R51	PP	sporadyczny	HMSN II	20	łagodny	drżenie palców
R52	WA	sporadyczny	HMSN II	b.d.	umiarkowany	- *
R53	BK	AD	HMSN II	13	łagodny	-
R54	BG	AD	HMSN II	39	łagodny	trombocytopenia
R55	SN	AD	HMN	40	łagodny	drżenie palców
R56	SK	sporadyczny	HMSN II	4	ciężki	nadwzroczność
R57	WR	AD	HMSN II	35	łagodny	-
R57	WJ	AD	HMSN II	b.d.	b.d.	b.d.
R58	SA	sporadyczny	HMSN II	35	trudny do określenia	skolioza, zaburzenia depresyjne
R59	PT	AR	HMSN II	b.d.	b.d.	b.d.
R60	GK	sporadyczny	HMSN II	9	umiarkowany	-
R61	KD	sporadyczny	HMSN II	4	b.d.	b.d.
R62	KW	sporadyczny	HMSN II	b.d.	łagodny	cukrzyca typu II
R63	LM	AD	CMT 1/2	25	łagodny	-
R64	LB	sporadyczny	HMSN II	dzieciństwo	łagodny	dysmorfia niepełnosprawność intelektualna w stopniu lekkim
R65	RZ	sporadyczny	HMN	14	łagodny	-
R66	HB	AD/XD	HMN	39	łagodny	-

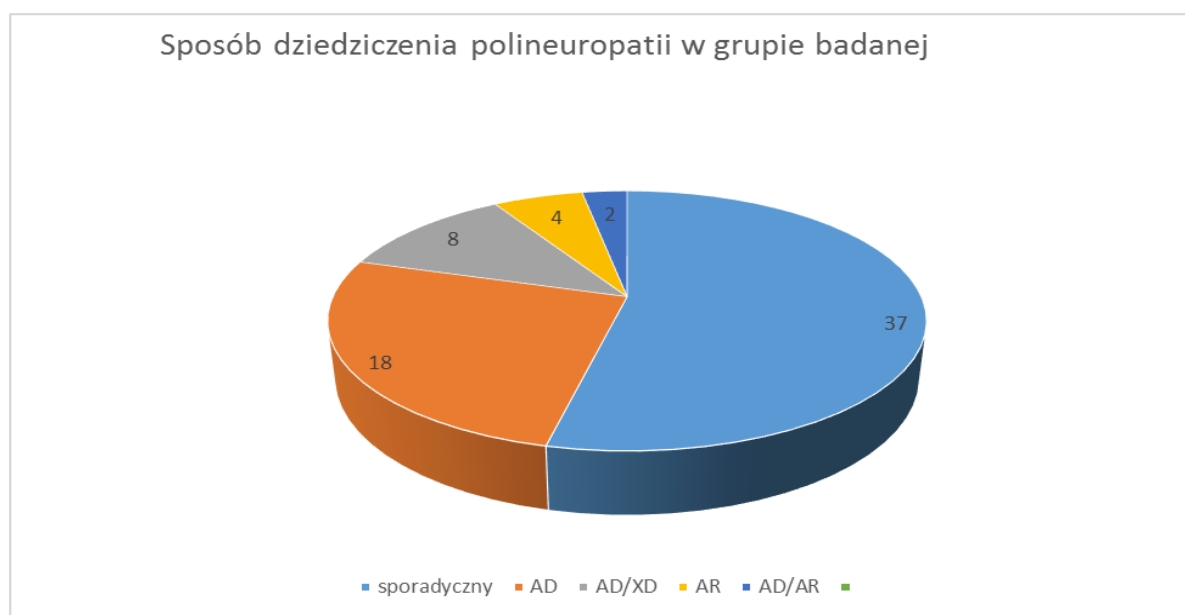
\* W trakcie badań wykryto mutację w genie *GDAP1* (dane niepublikowane)



W Tabeli zastosowano następujące skróty: AD-dziedziczenie autosomalne dominujące, AD/XD – dziedziczenie autosomalne dominujące, bez możliwości wykluczenia na podstawie rodowodu dziedziczenia dominującego sprzężonego z płcią, AR – dziedziczenie autosomalne recesywne, AR/AD – dziedziczenie autosomalne recesywne lub autosomalne dominujące, HMSN II – dziedziczna neuropatia ruchowo-czuciowa typu II (ang. hereditary motor-sensory neuropathy type II), HMN – dziedziczna neuropatia ruchowa (ang. hereditary motor neuropathy), HSN – dziedziczna neuropatia czuciowa (ang. hereditary sensory neuropathy), HNPP – dziedziczna neuropatia z nadwrażliwością na ucisk (ang. hereditary neuropathy with liability to pressure palsy), CMT 1/2 – choroba Charcot-Marie-Tooth typu pośredniego demielinizacyjno-aksonalna, EDMD – dystrofia mięśniowa typu Emery-Dreifussa (ang. Emery-Dreifuss muscular dystrophy), b.d. – brak danych

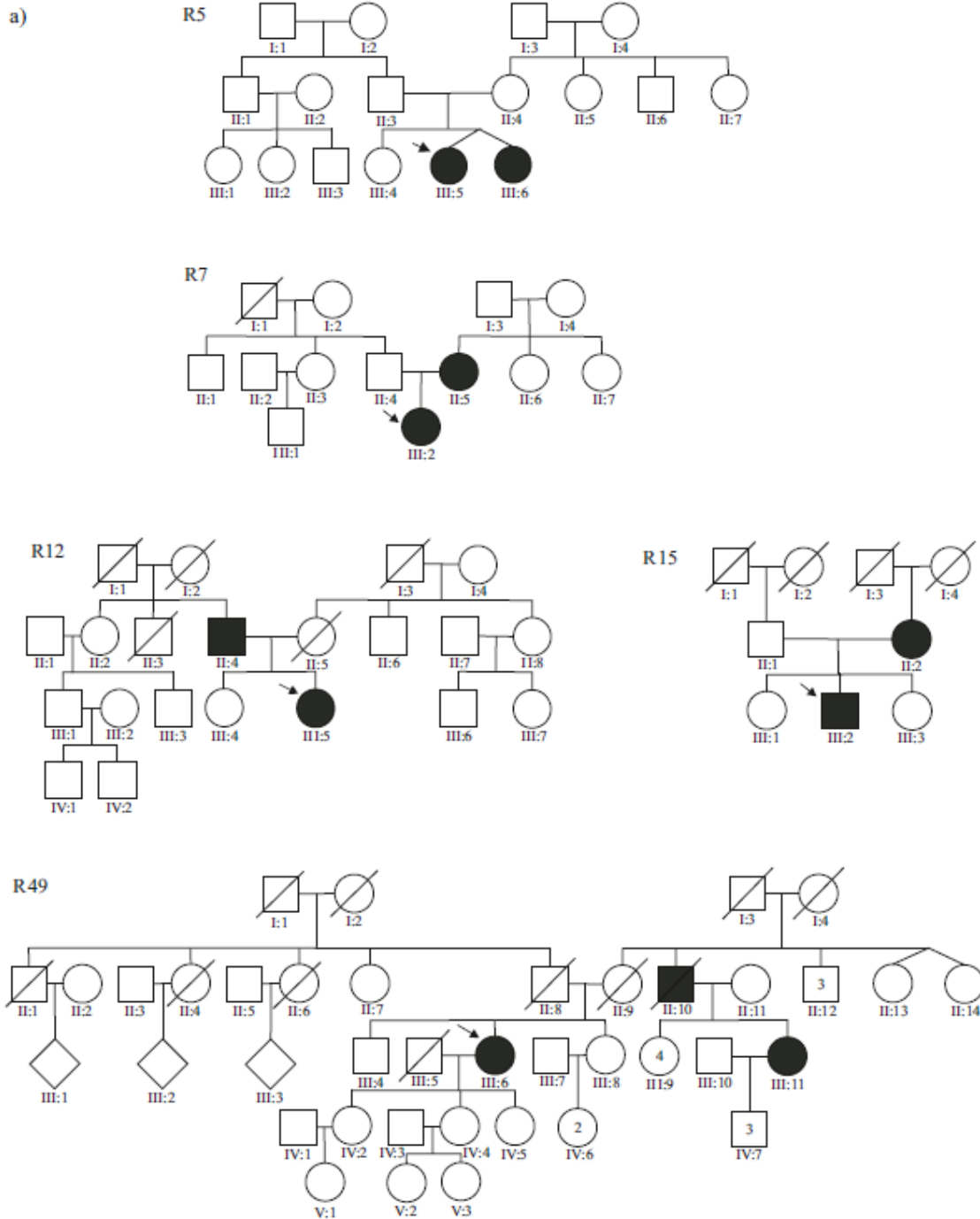
Wśród chorych znajduje się 30 przypadków rodzinnych i 37 przypadków sporadycznych. Dla dwóch pacjentów nie był dostępny wywiad rodzinny dotyczący chorób nerwowo-mięśniowych. Rodowody wykreślono łącznie dla 67 osób (Ryc. 7). Wśród chorych z pozytywnym wywiadem rodzinnym, dotyczącym chorób nerwowo-mięśniowych, znajdują się przypadki o autosomalnym dominującym sposobie dziedziczenia (AD), o autosomalnym recesywnym sposobie dziedziczenia (AR), o dominującym sposobie dziedziczenia, w przypadku którego nie można było wykluczyć sprzężenia z chromosomem X. W dwóch przypadkach (rodzina R27) wywiad rodzinny nie dostarczył informacji, czy ojciec probantów chorował na neuropatię, dlatego sposób dziedziczenia nie został ustalony i jest albo autosomalny dominujący, albo autosomalny recesywny, w zależności od tego, czy odpowiednio, ojciec probantów choruje.

Liczbę chorych z rodzin o określonym sposobie dziedziczenia przedstawiono na rycinie 6.

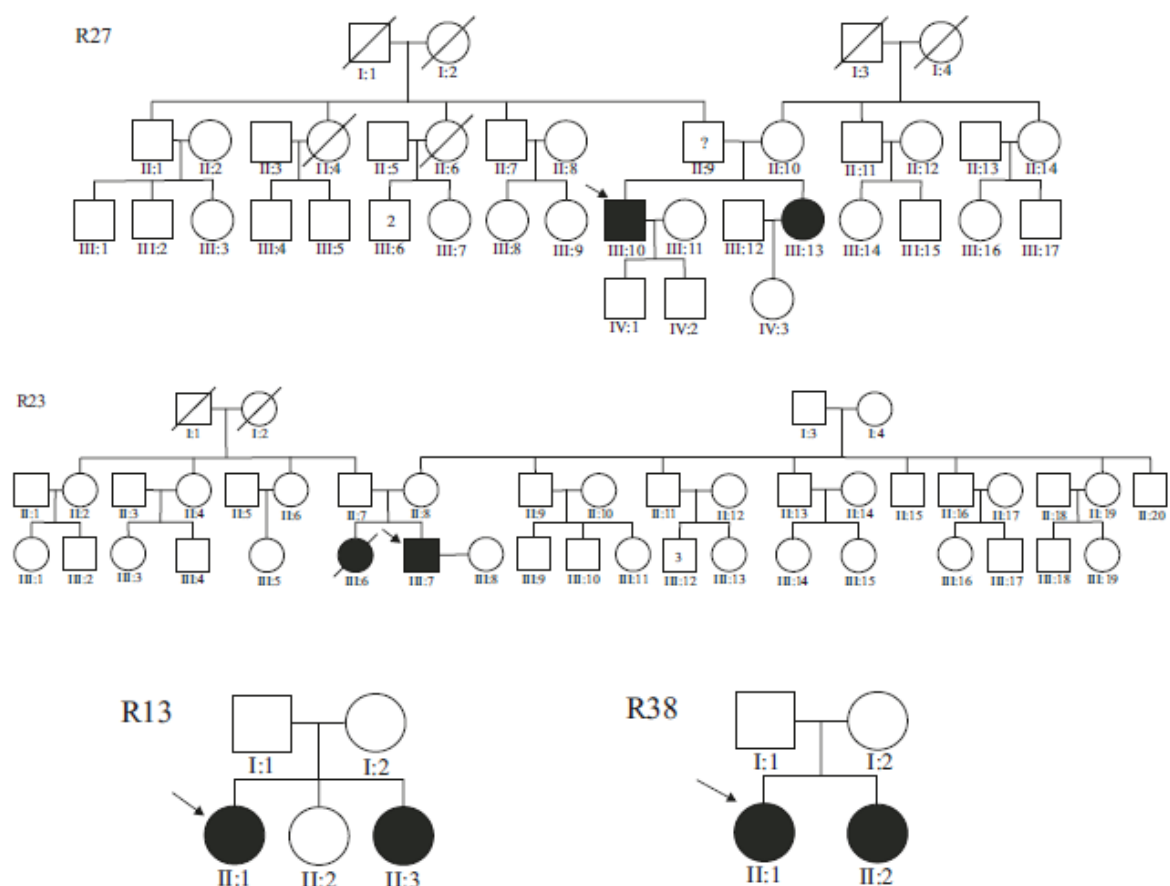


**Rycina 6.** Sposoby dziedziczenia choroby wśród badanych pacjentów. Zastosowano następujące skróty: AD-dziedziczenie autosomalne dominujące, AD/XD – dziedziczenie autosomalne dominujące,

bez możliwości wykluczenia na podstawie rodowodu dziedziczenia dominującego sprzężonego z płcią, AR – dziedziczenie autosomalne recesywne, AR/AD – dziedziczenie autosomalne recesywne lub autosomalne dominujące.



b)



**Rycina 7.** Rycina przedstawia wybór rodowodów z grupy badanej o dziedziczeniu dominującym (a) i recesywnym (b). Kółkami oznaczono kobiety, kwadratami oznaczono mężczyzn, przekreślony symbol oznacza zmarłego, czarne symbole oznaczają chorych, strzałka wskazuje probanta. Powyższe oznaczenia dotyczą wszystkich rodowodów zamieszczonych w pracy.

### 3.2 Grupa kontrolna

Grupę kontrolną stanowiło DNA od 100 zdrowych osób (50 kobiet i 50 mężczyzn) między 20 i 50 rokiem życia. Próbkę DNA zdrowych, anonimowych osób uzyskano z Zakładu Genetyki Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (Kierownik Zakładu: prof. Rafał Płoski).

## 4. METODY

### 4.1 Izolacja genomowego DNA z limfocytów krwi obwodowej pacjentów

Krew od pacjentów pobierano za pomocą strzykawek z EDTA. Izolację genomowego DNA z limfocytów krwi obwodowej pacjentów przeprowadzono metodą wysalania (52), polegającą na odwodnieniu i wytrąceniu białek komórkowych nasyconym roztworem NaCl. Wyizolowane DNA zawieszano w buforze TE o pH 8,0 (1M TRIS pH 8,0; 0,5M EDTA pH 8,0; woda).

### 4.2 Izolacja całkowitego RNA z limfocytów krwi obwodowej pacjentów

Krew od pacjentów pobierano za pomocą strzykawek z EDTA. Izolację RNA z limfocytów obwodowej krwi pacjentów przeprowadzono według metody Chomczyńskiego (53) z zastosowaniem ekstrakcji odczynnikami TRIZOL, zawierającym tiocyjanian guanidyny-fenol-chloroform. Wszystkie procedury wykonywano zgodnie z zasadami pracy z RNA.

### 4.3 Pomiar stężenia kwasów nukleinowych

Stężenie kwasów nukleinowych mierzono za pomocą urządzenia Nano Drop, a następnie rozcieńczano do stężenia 20 ng/μl do dalszych badań.

### 4.4 Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (quantitative Real-time PCR)

Za pomocą qRT-PCR wykluczono w grupie badanej duplikację/delecję fragmentu genu *PMP22* (17p11.2-p12.). Zastosowano specyficzne względem sekwencji genu *PMP22* sondy TaqMan i jako gen referencyjny zastosowano gen kodujący białko albuminę surowicy ludzkiej (*HSA*). Jako kontrole posłużyły osoby zdrowe (2 próbki o prawidłowej liczbie fragmentów genu *PMP22*), 3 kontrole pozytywne (2 próbki z duplikacją i 1 próbka z delecją fragmentu genu *PMP22*) oraz próbę ślepą (woda). Startery i warunki reakcji opublikowali Aarskog i Vedeler (54). W niniejszej pracy zastosowano je z modyfikacjami wg Kabizńskiej i wsp. (55). Startery zastosowane w reakcji przedstawiono w poniższej Tabeli 2:

**Tabela 2.****Startery zastosowane w reakcji real-time PCR.**

Starter	Sekwencja (5' → 3')
PMP22_ekson 3_F	TCTGTCCAGGCCACCATGA
PMP22_ekson 3_R	GAAGAGTTGGCAGAAGAACAGGA
HSA_ekson 22_F	TGTTGCATGAGAAAACGCCA
HSA_ekson 22_R	GTCGCCTGTTACCAAGGAT

W przypadku sondy dla genu *PMP22* zastosowano barwnik fluorescencyjny FAM, a w przypadku sondy dla genu *HSA* zastosowano barwnik fluorescencyjny VIC. W przypadku sond dla obu genów zastosowano wygaszacz TAMRA.

Sekwencje sond TaqMan zastosowanych w reakcji Real-time PCR przedstawiono w poniższej Tabeli 3:

**Tabela 3:****Sekwencje sond TaqMan zastosowanych w reakcji real-time PCR.**

Sonda	Sekwencja (5' → 3')
Sonda PMP22_ekson 3	FAM-CCTGTGTCGATCATCTTCAGCATTCTGTCTCT-TAMRA
Sonda HSA_ekson 12	VIC-AAGTGACAGAGTCACCAAATGCTGCACAG-TAMRA

Reakcje dla obu fragmentów genów *PMP22* i *HSA* przeprowadzono w jednej próbówce stosując metodę multipleks PCR. Badany DNA stosowano w stężeniu wynoszącym 20ng/μl. Przyłączanie starterów przeprowadzono w temperaturze 60°C. Na podstawie krzywych topnienia produktów reakcji real-time PCR określono wartości  $C_T$  wskazujące numer cyklu w reakcji, w którym ilość produktu przekroczy wyznaczoną wartość progową. Z wartości  $C_T$  obliczono współczynnik  $\Delta\Delta C_T$  określający względną liczbę kopii genu *PMP22*. Wartości ustanowione w naszym laboratorium dla populacji polskiej (55) wynoszą: 0,700-1,090 dla prawidłowej liczby kopii fragmentu genu *PMP22*, 1,176-2,324 dla duplikacji fragmentu genu *PMP22* i 0,359-0,595 dla delecji fragmentu genu *PMP22*.

#### 4.5 Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)

Reakcję PCR o poniższym składzie przeprowadzano w objętości 12,5  $\mu\text{l}$  (Tabela 4):

**Tabela 4.**

##### **Skład mieszaniny reakcyjnej do reakcji PCR.**

DNA genomowe	2 $\mu\text{l}$
Bufor do polimerazy <i>Taq</i> z $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bez $\text{Mg}^{2+}$	1,25 $\mu\text{l}$
$\text{MgCl}_2$	0,75 $\mu\text{l}$
Mieszanina dNTP (każdy o stężeniu 10 pmoli)	0,25 $\mu\text{l}$
Starter F (lewy) (10pmoli)	0,20 $\mu\text{l}$
Starter R (prawy) (10 pmoli)	0,20 $\mu\text{l}$
Polimeraza <i>Taq</i>	0,1 $\mu\text{l}$
$\text{H}_2\text{O}$	7,75 $\mu\text{l}$

Reakcję PCR przeprowadzano w następujących warunkach temperatury:

**Tabela 5.**

##### **Warunki temperaturowe reakcji PCR.**

Wstępna denaturacja	95°C	2 min.	} X 35
Denaturacja	95°C	45 sek.	
Przyłączanie starterów	56-66°C w zależności od pary starterów	45 sek.	
Wydłużanie	72°C	1 min.	
Końcowe wydłużanie	72°C	7 min.	
Schłodzenie	10°C	20 h	

Startery zastosowane do amplifikacji fragmentów genu mitofuzyny 2 oraz temperatury i przyłączania do matrycy podczas reakcji PCR przedstawiono w poniższej Tabeli 6:

**Tabela 6.**

Wykaz sekwencji starterów dla genu *MFN2* oraz temperatury przyłączenia do matrycowego DNA podczas reakcji PCR.

Startery do reakcji PCR	Sekwencja (5' → 3')	Temperatura przyłączenia [°C]	
3F	GGATTGAGTGAGAGCAAGAGAGA	60	Lawson et al., 2005
3R	CAGCCAGAAGCTAGGCAAAGG	60	Lawson et al., 2005
4F	GCTCTGGCCCTTCCAGACTTGG	62	***
4R	CTTGCACAAAGTGCCTCCCTCCC	62	
5F	ATGTCAGAGGTTTGGGCCT	62	
5R	TATGAGGAACAGCAGGGTCC	62	
6F	AGGGTGATATCCGGGAAAGA	60	
6R	CCAGAGGAAAGCCAAGAGG	60	
7-8F	AAACACTTTGCCTTGGCTTG	62	Lawson et al., 2005
7-8R	AGAACATCCCTCCTGGCTCT	62	Lawson et al., 2005
9-11F	CGTGGTAGGTGTCTACAAGAAGC	63	Lawson et al., 2005
9R	CAGAAACAAGCTTGGCAGCAG	63	
9F*	CTCAAGTGATCCACCTGCCT		
10-11F	GCATGCCTGAAGGAGGTAAT	62	
10-11R	TCACCAGGCTGTCTATGTGG	62	
12F	GGGTCCTCTTCTTACCTGGG	60	
12R	CTGTGGAGGTCCAGAGGAAA	60	
13-14F	TAGAGGAGCTGAGGAGGCTG	66	
13RN	AAATTCCCTTCAGGCCACAT	66	
14FN	TGATTCAACCCTGTTGGTC	56	
13/14R	CCAGAACCTGAAGGTATCGAGT	56	
15F	TGAGGCATGCTCAGTCTCAC	60	
12-14R	ACAGCTGCTGACCTTAGGGA	60	Lawson et al., 2005
16F	GAAGAGCCACTCTGTGTCCCC	62	
16R	CAGTGGACTGTGGAGTGTGG	62	
17F	AGATGGCCCTGGTAGTGATG	63	

17R	ACGATGCTTAGGACCCAGTG	63	
18F	AGCTTGGGCTGTGGATGTAG	65	Lawson et al., 2005
18R	GGTCCAAAGAGTGGCAGGTA	65	Lawson et al., 2005
19F	ATGGATCAGAGGGTGTTCAGC	64	Lawson et al., 2005
19R	GCAAAGCAGGATGGAACAGT	64	Lawson et al., 2005
c.2/3F**	CCTTCCTTGAAGACACGTA	65	
c.6R**	CATTGCTCGTCCGGCCAAA	65	

\*Starter zastosowany tylko w reakcji sekwencjonowania

\*\*Startery zaprojektowane do sekwencji kodującej genu mitofuzyny 2 na złączu eksonu 2 i 3 (starter prawy) oraz w eksonie 6 (starter lewy)

\*\*\*Puste miejsca w tabeli oznaczają startery zaprojektowane za pomocą programu Primer3, nie zaczerpnięte z publikacji

Startery zastosowane do amplifikacji fragmentu regionu promotorowego genu mitofuzyny 2 oraz temperatury przyłączania do matrycy podczas reakcji PCR przedstawiono w poniższej tabeli (Tabela 7):

#### **Tabela 7.**

##### **Wykaz sekwencji starterów do regionu promotorowego genu *MFN2*.**

Startery do reakcji PCR	Sekwencja (5' → 3')	Temperatura przyłączania [°C]
1F	GCTACTTGGGAGGCTGAGTG	70 (-0,5°C na cykl)
1R	GGTGGCTCAAGCCTGTAATTC	70 (-0,5°C na cykl)
2F	TTCCTCCCGAGTGC ACTATC	58
2R	CCAGTGACTGAACTGCGTCT	58
3F	GGTGATCTGGGTAACCATGTG	58
3R	GACGCAGAGGCTCGGACT	58

Startery zastosowane do amplifikacji eksonu 3 genu *KIF1B* oraz temperaturę przyłączania do matrycy podczas reakcji PCR przedstawiono w poniższej Tabeli 8:



**Tabela 8.**

**Startery do fragmentu genu *KIF1B* wraz z temperaturą przyłączania do matrycowego DNA podczas reakcji PCR**

Startery do reakcji PCR	Sekwencja (5' → 3')	Temperatura przyłączania [°C]
F	CGAAGATCCCTGTTTTGCAT	57
R	CCCGCATAAATGTTCGCCA	57

Wszystkie startery, o ile nie zaznaczono inaczej, zaprojektowano z zastosowaniem programu Primer3 [<http://primer3.ut.ee/>].

Wszystkie startery syntetyzowano w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN.

**4.6 Rozdział elektroforetyczny fragmentów amplifikowanych za pomocą reakcji PCR**

Amplifikowane fragmenty genu mitofuzyny 2 poddano rozdzielowi elektroforetycznemu w 1% żelu agarozowym w buforze TBE (0,5 x TBE). DNA w żelu wizualizowano za pomocą bromku etydyny interkalującego do dwuniciowego DNA w świetle UV.

**4.7 Analiza SSCP**

Za pomocą analizy SSCP badano wzory migracji dla fragmentów regionu promotorowego genu mitofuzyny 2 oraz fragmentu genu *KIF1B*. Badanie to polega na denaturacji produktów PCR i schłodzeniu w celu zapobieżenia renaturacji cząsteczek DNA oraz rozdziale w 6% żelu poliakrylamidowym. Wizualizację produktów PCR dokonuje się za pomocą barwienia DNA azotanem srebra.

**4.8 Oczyszczanie próbek po reakcji PCR**

Po reakcji PCR produkty oczyszczano za pomocą enzymów egzonukleazy Exo I (Thermoscientific) usuwającej z mieszaniny kwasów nukleinowych jednoniciowy DNA, posiadający grupę hydroksylową na końcu 3' (degradacja DNA w kierunku 3'→5') i fosfatazy alkalicznej FastAP (Thermoscientific), degradującej nukleotydy poprzez

katalizowanie uwalniania 3' i 5' grup fosforanowych w DNA, RNA i nukleotydach. Enzymy zastosowano według zaleceń producenta.

Próbki następnie oczyszczono metodą kolumnkową na złożu Sephadex G-50.

#### **4.9 Reakcja sekwencjonowania**

Reakcję sekwencjonowania przeprowadzono przy użyciu zestawu Big-Dye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems) oraz Bright-Dye (Nimagen) według zaleceń producentów.

Reakcje przeprowadzono w następujących warunkach temperatury (Tabela 9):

**Tabela 9.**

#### **Warunki temperatury dla reakcji sekwencjonowania.**

	Temperatura	Czas
Wstępna denaturacja	96°C	1 min.
Denaturacja	96°C	10 sek.
Przyłączanie startera	50°C	5 sek.
Wydłużanie	60°C	4 min.

} x 25

Rozdziału fragmentów uzyskanych po reakcji sekwencjonowanie dokonywano na urządzeniu ABI Prism 373 w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN.

#### **4.10 Odwrotna transkrypcja**

Odwrotną transkrypcję przeprowadzono za pomocą zestawu RevertAid First Strand Synthesis Kit (dawniej Fermentas, obecnie ThermoScientific) z zastosowaniem starterów oligo(d)T na matrycy RNA według zaleceń producenta.

#### **4.11 Gene Scan**

Analizę Gene Scan wykorzystano w celu dokładnego określenia fragmentu genu mitofuzyny 2 amplifikowanego za pomocą reakcji PCR przy użyciu starterów przedstawionych w poniższej tabeli wraz z temperaturą ich przyłączania do matrycy podczas reakcji PCR (Tabela 10):

**Tabela 10.**

**Sekwencje starterów zastosowanych w analizie Gene Scan**

Starter	Sekwencja (5' → 3')	Temperatura przyłączenia
11F	Fam-CATCTCCCAGTCTGCAGTGA	58°C
14R	CATGTTTCGACCCAGTCCTT	58°C

Starter 11F znakowano barwnikiem FAM. Rozdział fragmentów przeprowadzono na urządzeniu ABI Prism 3010 w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN.

#### **4.12 RFLP-PCR**

Wśród 100 osób zdrowych (200 chromosomów) wykonano badanie przesiewowe w kierunku wariantów c.311+1G>T i c.14569+50G>T za pomocą enzymów restrykcyjnych, odpowiednio, *Mse I* i *Sch I*. U 34 pacjentów i 63 osób zdrowych wykonano analizę występowania wariantu rs2236054 (c.-431A>G) z zastosowaniem enzymu restrykcyjnego *Kas I*. Reakcje wykonano według zaleceń producenta.

#### **4.13 MLPA**

W celu wykrycia lub wykluczenia duplikacji i delecji fragmentów genu mitofuzyny 2, niewykrywalnych przy pomocy sekwencjonowania metodą Sangera, u 10 pacjentów z grupy badanej zastosowano zestaw do reakcji MLPA, SALSA MLPA probemix P143-B1 MFN2-MPZ od MRC-Holland. Otrzymane fragmenty analizowano na urządzeniu ABI Prism 3010.

#### **4.14 Zastosowane programy bioinformatyczne**

Primer3 – projektowanie starterów

FinchTV – analiza chromatogramów po rozdziale sekwencjonowanych fragmentów

BLAST – porównanie otrzymanej sekwencji z sekwencją referencyjną

ESEfinder, Human Splicing Finder – poszukiwanie i analiza regionów sekwencji regulujących proces wycinania intronów

Coffalyser.Net – analiza wyników badania za pomocą MLPA

## 5. WYNIKI

### 5.1 Gen *PMP22*

We wszystkich próbkach DNA (69 chorych osób) wykluczono duplikację/delecję fragmentu genu *PMP22*.

### 5.2 Gen *KIF1B*

U 27 pacjentów (z rodzin R1-R26) oraz u 63 zdrowych osób z grupy kontrolnej wykluczono występowanie mutacji Gln98Leu w genie *KIF1B*. Dodatkowo stwierdzono występowanie wariantu sekwencji c.537C>G (p.Ala95Ala) o numerze identyfikacyjnym w bazie danych NCBI rs12402052 u 13 osób (11 w układzie heterozygotycznym i 2 w układzie homozygotycznym), co daje blisko 50% częstość występowania danego wariantu w grupie badanej. W grupie kontrolnej (63 osoby) stwierdzono występowanie wariantu u 31 osób (26 w układzie heterozygotycznym i 5 w układzie homozygotycznym), co również daje blisko 50% częstość występowania wariantu rs12402052 w grupie kontrolnej.

### 5.3 Gen mitofuzyny 2 (*MFN2*)

#### 5.3.1 Promotor genu *MFN2*

U 34 pacjentów (z rodzin R1-R32) zanalizowano region promotorowy genu *MFN2*. Promotor genu *MFN2* podzielono na 3 fragmenty (pierwszy fragment od c.-10032 do c.-9650, drugi fragment od c.-9795 do c.-9307 i trzeci fragment od c.-9417 do c.-8957). W przypadku pierwszego fragmentu stwierdzono 4 wzory migracji prążków w żelu poliakrylamidowym, w przypadku drugiego fragmentu stwierdzono tylko jeden wzór migracji, a w przypadku trzeciego fragmentu stwierdzono dwa wzory migracji prążków w żelu poliakrylamidowym wśród grupy badanej.

Analiza SSCP okazała się nie być wiarygodna dla wszystkich fragmentów promotora genu *MFN2*. W grupie 34 badanych pacjentów o różnych wzorach migracji prążków pierwszego fragmentu promotora genu *MFN2* w żelu poliakrylamidowym, u 7 osób stwierdzono wariant sekwencji c.-9891 htz del T, nieobecny w bazie NCBI.

Drugi fragment promotora genu *MFN2* w analizie SSCP wykazuje tylko jeden wzór migracji w żelu poliakrylamidowym. Zgodność wśród całej grupy 34 pacjentów potwierdzono bezpośrednim sekwencjonowaniem, gdzie nie stwierdzono żadnych wariantów sekwencyjnych odbiegających od sekwencji referencyjnej.

W trzecim fragmencie promotora genu mitofuzyny 2 stwierdzono dwa różne wzory migracji prążków w żelu poliakrylamidowym. Analiza bezpośrednia sekwencji czterech pierwszych pacjentów z listy nie wykazała związku między wzorem migracji prążków i występowaniem konkretnych wariantów sekwencyjnych. U danych chorych stwierdzono występowanie znanego wariantu sekwencji genu *MFN2*. U trzech osób stwierdzono występowanie wariantu rs2236053 (c.-9023A>G) w układzie heterozygotycznym.

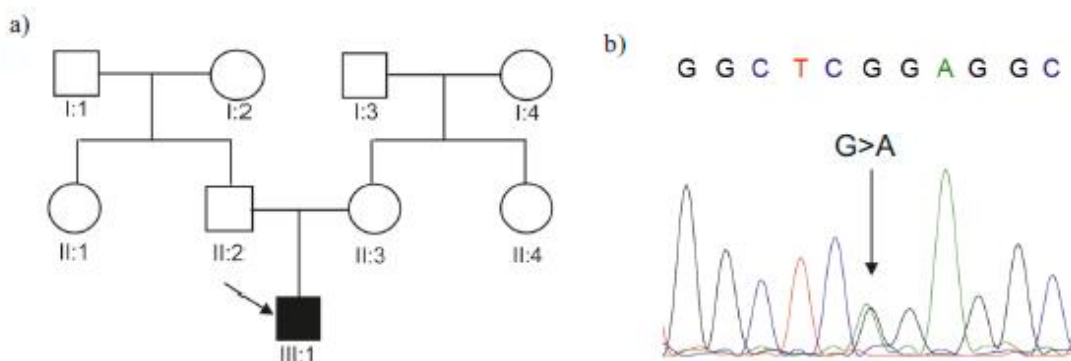
### 5.3.2 Region genu *MFN2* ulegający transkrypcji

W pracy sekwencjonowano i przeanalizowano ponad 1000 fragmentów DNA lokalizujących się między złączeniem intronu 2 i eksonu 3 a regionem 3'UTR w eksonie 19 genu mitofuzyny 2. U 10 osób, u których zastosowano metodę MLPA, nie wykryto duplikacji ani delecji fragmentów genu *MFN2*.

#### 5.3.2.1 Mutacje patogene

##### 5.3.2.1.1 Mutacja c.281G>A (p.Arg94Gln)

Mutację c.281G>A zidentyfikowano u pacjenta, u którego w wieku 4 lat postawiono diagnozę genetycznie uwarunkowanej neuropatii czuciowo-ruchowej. Przebieg choroby u pacjenta jest ciężki, chory wykazuje objaw dodatkowy względem choroby HMSN II, jakim jest nadwzroczność (Tabela 1, R56). Zidentyfikowana mutacja jest mutacją typu zmiany sensu (ang. missense) i zmienia aminokwas argininę w pozycji 94 białka na glutaminę (p.Arg94Gln). Chromatogram i rodowód chorego przedstawiono na rycinie 8.



**Rycina 8.** a) rodowód chorego (R56), oznaczenia zastosowano, jak na rycinie 7, b) chromatogram przedstawiający zmianę nukleotydową c.281G>A.

Mutacji c.281G>A nie zidentyfikowano u zdrowych rodziców chorego, co sugeruje, że jest to mutacja powstała *de novo*. Liczne doniesienia o występowaniu mutacji c.281G>A

wśród pacjentów chorych na HMSN II wskazują, że jest to mutacja patogenna, w związku z czym nie ma potrzeby przeprowadzania badań występowania mutacji w grupie kontrolnej.

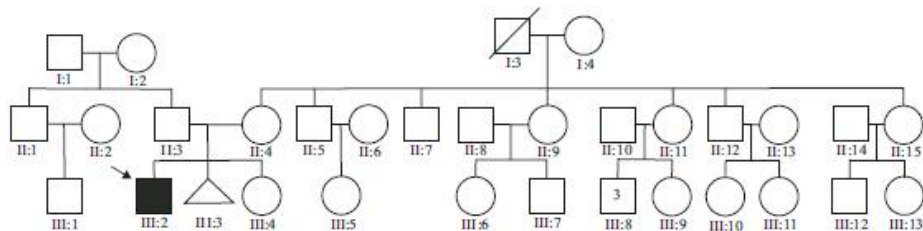
### 5.3.2.1.2 Mutacja c.821C>T (p.Arg274Trp)

Mutację c.821C>T zidentyfikowano u pacjenta, u którego rozpoznano HMSN II w 15 roku życia. Choroba u badanego pacjenta charakteryzuje się ciężkim przebiegiem oraz objawami dodatkowymi w stosunku do HMSN II - drżeniem posturalnym rąk, nadwzrocznością i niepełnosprawnością intelektualną w stopniu lekkim (Tabela 1, R19). Zidentyfikowana mutacja jest mutacją typu zmiany sensu i zmienia aminokwas argininę w pozycji 274 białka mitofuzyny 2 na aminokwas tryptofan (p.Arg274Trp). Chromatogram, zdjęcia i rodowód chorego przedstawiono na rycinie 9.

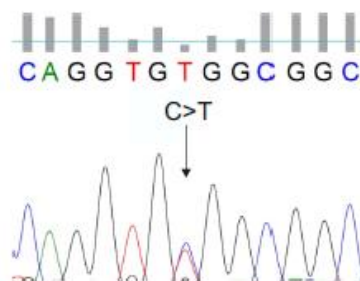
a)



b)



c)

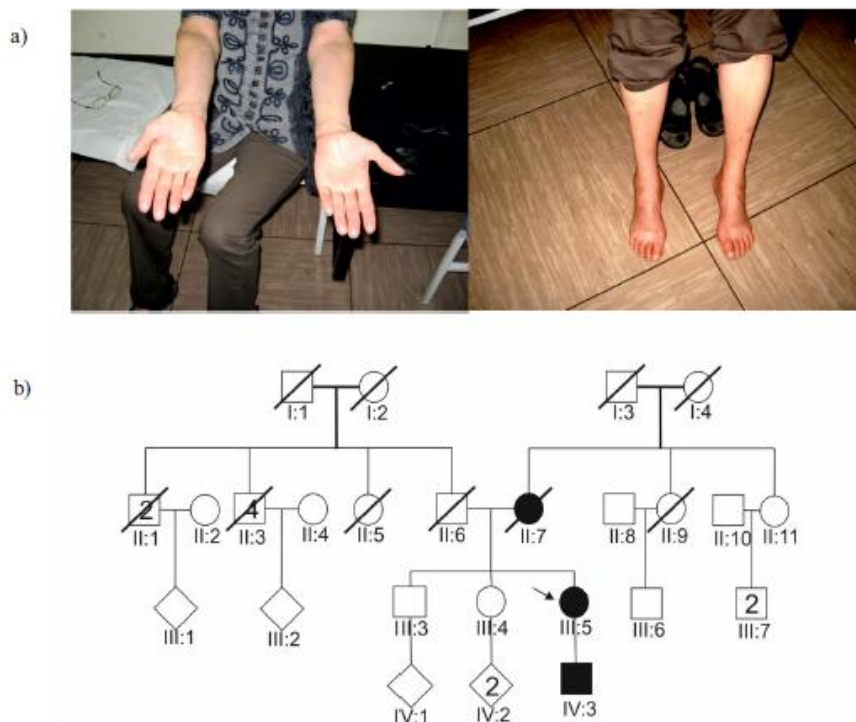


**Rycina 9.** a) zdjęcia chorego – widoczne zeszczuplenie i zaniki w obrębie dystalnych części kończyn dolnych i górnych, b) rodowód chorego (R19), zastosowano oznaczenia, jak dla ryciny 7, trójkąt oznacza poronienie, c) chromatogram przedstawiający zmianę nukleotydową c.821C>T.

Mutacja c.821C>T najprawdopodobniej jest mutacją *de novo*, ponieważ nie zidentyfikowano u rodziców chorego. W literaturze istnieje już doniesienie o mutacji w danej pozycji białka (kodon 274) (12), jednak podstawienie nukleotydu powoduje zmianę aminokwasu argininy na aminokwas glutaminę. Mutacja zidentyfikowana w trakcie badań w ramach niniejszej pracy do tej pory nie została opublikowana przez inne grupy badawcze na świecie. Według programu PolyPhen zmiana argininy 274 na tryptofan jest najprawdopodobniej mutacją patogenną.

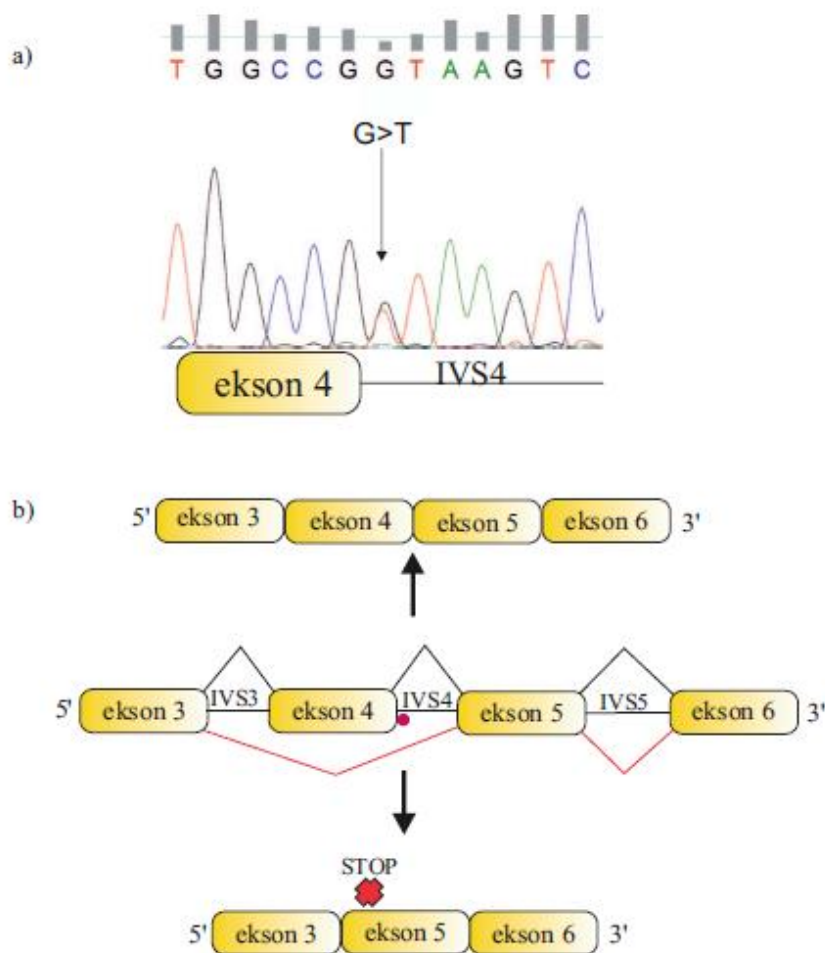
### 5.3.2.1.3 Mutacja c.311+1G>T

Mutację c.311+1G>T zidentyfikowano u pacjentki z bardzo późnym początkiem choroby HMSN II. Pierwsze objawy pod postacią opadania stóp pojawiły się około 50-tego roku życia. Przebieg choroby w tym przypadku jest powolny i łagodny. W wieku 61 lat główne zgłaszane przez pacjentkę dolegliwości dotyczą niestabilności chodu. W badaniu zwraca uwagę wyraźne zeszczuplenie odsiebnych części kończyn dolnych, klasyczne dla HMSN II (Ryc. 10). Chora nie wykazuje żadnych objawów dodatkowych względem klasycznej choroby HMSN II (Tabela 1, R37).



**Rycina 10.** a) Zdjęcie odsiebnej części kończyn dolnych i górnych pacjentki (61 lat) (R37). Widoczne wyraźne wyszczuplenie nóg i rąk, świadczące o zaniku mięśni oraz wydrążenie stóp; b) rodowód chorej; zastosowano oznaczenia, jak na rycinie 7.

Zidentyfikowana mutacja jest tzw. mutacją splicingową, ponieważ narusza ona miejsce splicingowe za eksonem 4 w genie mitofuzyny 2. Analiza cDNA z zastosowaniem starterów na złączu eksonu 2 i 3 (starter prawy) i w eksonie 6 (lewy) wykazała obecność dodatkowego prążka na żelu agarozowym, odpowiadającego skróconemu transkryptowi. Sekwencjonowanie obu wyizolowanych z żelu fragmentów cDNA wykazało, że krótszy transkrypt jest pozbawiony eksonu 4 (Ryc. 11). W wyniku przesunięcia ramki odczytu, po wycięciu eksonu 4-tego, powstaje białko o długości 66 aminokwasów.



**Rycina 11.** a) chromatogram przedstawiający zmianę nukleotydową c.311+1G>T z zaznaczonym końcem eksonu 4, b) schematyczne przedstawienie skutków mutacji c.311+1G>T. W górnym panelu przedstawiono schemat prawidłowo wyciętych intronów, w środkowym panelu przedstawiono eksony i introny, czarne linie symbolizują prawidłowe wycinanie intronów, czerwone linie symbolizują nieprawidłowe wycinanie intronów, czerwoną kropką zaznaczono mutację, w dolnym panelu przedstawiono skutek nieprawidłowego wycinania intronów, tzw. exon skipping, czego skutkiem jest wycięcie eksonu 4tego, czerwonym krzyżykiem zaznaczono nowo powstały przedwczesny kodon stop. Schemat wykonano na podstawie ryciny opublikowanej w Kotruchow et al., Acta Myol. 2013 Dec;32(3):166-9



Zidentyfikowana mutacja nie występuje w grupie kontrolnej składającej się ze 100 zdrowych osób (200 chromosomów).

### 5.3.2.2 Warianty sekwencji o nieznanym statusie patogenności

W Tabeli 11 przedstawiono warianty sekwencji genu mitofuzyny 2, których status patogenności pozostaje niewyjaśniony.

**Tabela 11.**

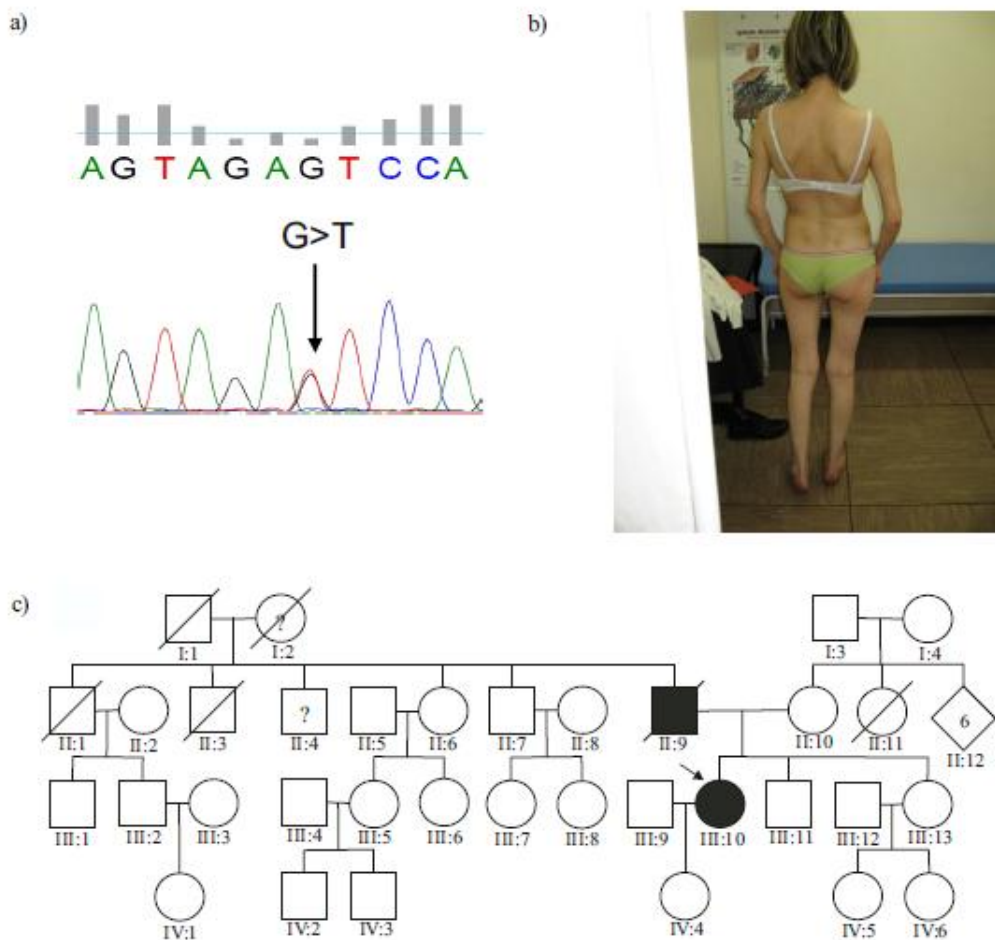
#### Warianty sekwencji o nieokreślonym statusie patogenności

L.p.	Nr identyfikacyjny wg bazy NCBI	Pozycja w sekwencji kodującej	Średnia heterozygotyczność	Liczba pacjentów w grupie badanej z daną zmianą
1	-	c.1287+50G>T	-	1
2	rs142271930	c.2113G>A (p.Val705Ile)	0,005	2
3	rs370335693	c.1717G>A (p.Val573Ile)	b.d.	1

Pierwszy wariant sekwencji genu *MFN2* zidentyfikowano u pacjentki, u której w trakcie badań stwierdzono również mutację c.1130G>A w genie *LMNA* i zdiagnozowano dystrofię mięśniową Emery-Dreifussa. Zidentyfikowany wariant sekwencji genu mitofuzyny 2 jest zlokalizowany 50 nukleotydów za końcem eksonu 12. Za pomocą programu ESEfinder stwierdzono, że wariant znajduje się między potencjalnymi miejscami wzmacniającymi proces wycinania intronów. Program Human Splicing Finder (56) wykazał następujące zmiany dla sekwencji z wariantem 1287+50G>T w stosunku do sekwencji referencyjnej:

- zanik jednego z motywów wiążących białko SC35 w sekwencji genu mitofuzyny 2,
- zanik jednego i pojawienie się innego nowego przewidywanego oktameru PESE (ang. putative exonic splicing enhancer) (57),
- zanik dwóch motywów wyciszających,
- pojawienie się nowego miejsca IIE (ang. intron-identity element),
- pojawienie się nowego miejsca regulacyjnego wycinania intronów (ang. exonic splicing regulatory sequence).

W związku z danymi uzyskanymi z analizy *in silico*, zbadano długość fragmentu transkryptu obejmującego daną zmianę. Analiza w żelu agarozowym nie wykazała żadnych zmian długości cDNA, dlatego w celu dokładnego określenia długości wykonano analizę Gene Scan, która również nie wykazała różnic długości fragmentu cDNA obejmującego zmianę u pacjentki w porównaniu z cDNA trzech osób zdrowych zastosowanych jako kontrole. Pacjentka wykazuje bardzo lekką komponentę polineuropatii obwodowej (Ryc. 12), dlatego pozostaje pytanie czy zidentyfikowany wariant może być za nią odpowiedzialny.



**Rycina 12.** a) chromatogram przedstawiający zmianę nukleotydową c.1287+50G>T, b) zdjęcie chorej, c) rodowód chorej (R8), oznaczenia zastosowano, jak na rycinie 7.

Drugi wariant sekwencji genu mitofuzyny 2 c.2113G>A (rs142271930) powoduje zamianę aminokwasu waliny w pozycji 705 białka mitofuzyny 2 na aminokwas izoleucynę (p.Val705Ile). Zidentyfikowano go u dwóch osób z grupy badanej: u chorego ze sporadyczną chorobą HMSN II z makrocefalią oraz u chorej z łagodną, również sporadyczną, neuropatią ruchową. Wariant ten opisywano już w literaturze i w bazie danych NCBI podano średnią

heterozygotyczność dla tego wariantu sekwencji wynoszącą 0,005. W niniejszej pracy uznano tę zmianę za wariant o nieznanym statusie patogenności ze względu na różny status wariantu opisany w literaturze (od mutacji patogenicznej, przez czynnik modulujący chorobę po częsty polimorfizm). Według programu PolyPhen dany wariant sekwencji jest wariantem łagodnym, niepatogennym.

Trzeci wariant sekwencji genu mitofuzyny 2 c.1717G>A (rs370335693) powoduje zamianę aminokwasu waliny w pozycji 573 na aminokwas izoleucynę (p.Val573Ile). Zidentyfikowano go u jednej osoby w grupie badanej. Nie istnieją dane populacyjne dotyczące częstości występowania wariantu wśród osób zdrowych. Według programu PolyPhen wariant ten nie jest patogenny, jest całkowicie nieszkodliwy.

### 5.3.2.3 Rzadkie warianty sekwencji genu mitofuzyny 2

W grupie badanej zidentyfikowano szereg rzadkich wariantów sekwencji genu mitofuzyny 2. Za rzadkie warianty w niniejszej pracy uznano warianty sekwencyjne o wartości średniej heterozygotyczności mniejszej lub równej 0,1. Zestawienie rzadkich wariantów sekwencyjnych przedstawiono w Tabeli 12. Cztery z wariantów nie były do tej pory publikowane i nie znajdują się w bazie danych NCBI.

**Tabela 12.**

**Zestawienie rzadkich wariantów sekwencji genu mitofuzyny 2 zidentyfikowanych w grupie badanej**

L.p.	Nr identyfikacyjny wg bazy NCBI	Pozycja w sekwencji kodującej	Średnia heterozygotyczność	Liczba pacjentów w grupie badanej z daną zmianą
1	rs41278624	c.600-116G>A	b.d.	2
2	rs6680984	c.1039-22T>C	0,02	5
3	rs1042837	c.1569C>T; p.Ser523	0,095	7
4	rs2273295	c.1872+63T>C	0,03	6
5	-	c.311+101G>A*	-	1
6	-	c.1160+45A>G*	-	1
7	rs181445368	c.1495+184G>T	b.d.	1
8	-	c.1495+186A>G*	-	1
9	-	c.2204+15T>C*	-	1

\* Warianty sekwencji mitofuzyny 2 nie publikowane do tej pory i nieobecne w bazie danych NCBI

#### 5.3.2.4 Częste warianty sekwencji genu mitofuzyny 2

W grupie badanej zidentyfikowano częste warianty sekwencji o wartości średniej heterozygotyczności wynoszącej powyżej 0,1. Zestawienie częstych wariantów przedstawiono w Tabeli 13.

**Tabela 13.**

#### Zestawienie częstych wariantów sekwencji genu mitofuzyny 2

L.p.	Nr identyfikacyjny wg bazy NCBI	Pozycja w sekwencji kodującej	Średnia heterozygotyczność	Liczba pacjentów w grupie badanej z daną zmianą
1	rs2236056	c.474+65C>T	0,47	46
2	rs41278626	c.600-25T>C	0,15	5
3	rs2236057	c.1160+45A>G	0,45	35
4	rs11586204	c.2069+82C>T	0,5	5
5	rs77262016	c.2024+15T>C	0,24	6
6	rs1042842	c.*58A>G	0,47	37

## 6. DYSKUSJA

W pracy przedstawiono analizę genu kodującego białko mitofuzyny 2. W toku badań zidentyfikowano trzy mutacje odpowiedzialne za rozwinięcie choroby HMSN II, sześć częstych wariantów sekwencji genu mitofuzyny 2 o średniej heterozygotyczności wynoszącej powyżej 0,1, dziewięć rzadkich wariantów sekwencji genu mitofuzyny 2 o średniej heterozygotyczności wynoszącej poniżej 0,1 i trzy warianty sekwencji genu mitofuzyny 2 o nieokreślonym statusie patogenności oraz dwa warianty w regionie promotorowym genu mitofuzyny 2, z których jeden nie był do tej pory opisywany.

Celem pracy było objęcie badaniami grupy pacjentów o szerokim spektrum fenotypów neuropatii aksonalnej. W rzeczywistości włączono pacjentów począwszy od fenotypu genetycznie uwarunkowanej neuropatii ruchowej (HMN), przez pośrednią aksonalno-demielinizacyjną postać genetycznie uwarunkowanej polineuropatii aksonalnej (CMT 1/2) i czystej genetycznie uwarunkowanej ruchowo-czuciowej neuropatii aksonalnej, aż po genetycznie uwarunkowaną neuropatię czuciową (HSN). Ponadto do grupy badanej włączono również pacjentów z wrodzoną neuropatią aksonalną. Grupę badaną poszerzono o fenotypy niecharakterystyczne dla występowania mutacji w genie *MFN2* z uwagi na ich identyfikację u pacjentów prezentujących wymienione obrazy kliniczne w innym ośrodku badawczym (21). Ze względu na to, że we wcześniejszych badaniach mutacje w genie *MFN2* zidentyfikowano również w przypadku polineuropatii aksonalnej z zanikiem nerwu wzrokowego (HMSN VI) (16) i z objawami piramidowymi (HMSN V) (15), takich pacjentów również włączono w zakres badań.

### 6.1 Mutacja c.281G>A (p.Arg94Gln)

W pracy zidentyfikowano mutację c.281G>A (p.Arg94Gln) u 4-letniego pacjenta z HMSN II. Mutacji nie stwierdzono u rodziców probanta.

Opublikowano ponad 30 mutacji w kodonie 94 białka mitofuzyny 2 (27), zmieniających aminokwas argininę na tryptofan (13, 16, 17, 21, 33, 36, 58-62), na glutaminę (12, 13, 21, 33, 60, 62-65), na glicynę (33) i na prolinę (27). Mutacje te występowały rodzinie jak i sporadycznie. Łączyły się zwykle z ciężkim przebiegiem klinicznym choroby. Wśród chorych z mutacją w kodonie 94 *MFN2* opisywano również fenotyp polineuropatii

aksonalnej z zanikiem nerwu wzrokowego. Taki obraz kliniczny zaobserwowano np. u pacjenta z mutacją typu zmiany sensu Arg94Trp (16).

Mutację p.Arg94Gln stwierdzano u osób z wczesnym początkiem choroby CMT2 (około 3 roku życia) i klasycznym fenotypem obejmującym bociani chód, osłabienie mięśni odsiebnych kończyn dolnych i górnych, brak odruchów głębokich w odsiebnych częściach kończyn dolnych (63, 66). Mutację tę zidentyfikowano również w rodzinnej neuropatii aksonalnej z zanikiem nerwu wzrokowego. Ojciec wykazywał początki choroby w wieku 3 lat, od czterdziestego roku życia poruszał się na wózku inwalidzkim, po pięćdziesiątym roku życia zauważył problemy z widzeniem. Syn poruszał się samodzielnie. Uwagę zwracał bociani chód. Około 17-tego roku życia zauważył pogorszenie ostrości wzroku. U obu pacjentów stwierdzono mutację p.Arg94Gln w genie mitofuzyny 2 (64). Najprawdopodobniej w danej pozycji białka istnieje tak zwany *hot spot* mutacji, co potwierdza liczba ponad 30 mutacji w tym kodonie. Mutacja wykryta w badanej rodzinie wydaje się być mutacją *de novo*, gdyż nie została wykryta u rodziców pacjenta.

## **6.2 Mutacja c.821G>T (p.Arg274Trp)**

Zidentyfikowana mutacja c.821G>T (p.Arg274Trp) została stwierdzona u pacjenta z chorobą HMSN II o wczesnym początku (15 lat) i upośledzeniem umysłowym w stopniu lekkim. Taki dodatkowy względem HMSN II objaw może sugerować zaangażowanie ośrodkowego układu nerwowego w proces chorobowy. Nie można też wykluczyć, że obserwowany fenotyp jest zespołem nakładania, a występująca u pacjenta niepełnosprawność intelektualna związana jest z innymi, niezależnymi od HMSN czynnikami, dziedzicznymi bądź nabytymi.. Według piśmiennictwa, u pacjentów w HMSN II (35), u których stwierdzono mutacje w genie mitofuzyny 2, obserwuje się również zaburzenia ośrodkowego układu nerwowego Istnieje również możliwość, że zajęcie ośrodkowego układu nerwowego jest częścią wieloukładowego zaburzenia, jakie mogą powodować mutacje w genie mitofuzyny 2 (42).

Zidentyfikowana w pracy mutacja nie była do tej pory publikowana w literaturze, ani w bazie danych NCBI. Jednak w tym samym kodonie stwierdzono mutację zmieniającą aminokwas argininę na aminokwas glutaminę u pacjenta z HMSN II, bez dodatkowych objawów, z początkiem choroby w wieku 13 lat (12).

### 6.3 Mutacja c.311+1G>T

Mutacja c.311+1G>T jest mutacją splicingową zlokalizowaną za eksonem 4. Mutację tę stwierdzono u pacjentki o bardzo późnym początku choroby (6-ta dekada życia) i powolnie postępującą HMSN II. Mutacja c.311+1G>T powoduje nieprawidłowe wycinanie intronów skutkujące zaniknięciem miejsca splicingowego i wycięciem całego eksonu 4, co z kolei prowadzi do przedwczesnego kodonu terminującego translację (STOP) w białku i powstaniem 66-aminokwasowego polipeptydu.

Zidentyfikowana mutacja jest jedną z pięciu do tej pory opisanych mutacji splicingowych w genie mitofuzyny 2. Mutację c.1392+2T>C stwierdzono u czterech członków rodziny włoskiej z HMSN II z encefalopatią piorunującą oraz u kobiety bez objawów neuropatii, ale z historią 6 niewyjaśnionych poronień w pierwszym trymestrze ciąży. Warte uwagi jest również fakt, że choroba w rodzinie włoskiej charakteryzuje się późnym początkiem (od 4-tej dekady życia). Mutacja ta powodowała u wszystkich chorych w rodzinie powstanie 4 dodatkowych transkryptów, wynikających z zaburzeń wycinania intronów spowodowanych mutacją w donorowym miejscu splicingowym za eksonem 13 genu mitofuzyny 2 (35).

Park i współpracownicy zidentyfikowali mutację splicingową występującą razem z mutacją typu zmiany sensu (c.[474+4A>G; 668T>A]). Mutacja ta powodowała wycięcie eksonu 5 i pojawienie się przedwczesnego kodonu terminującego translację w eksonie 6. Początek choroby HMSN II o raczej łagodnym przebiegu wahał się u tych pacjentów w zakresie od 12 do 42 lat u chorych z mutacją (c.[474+4A>G; 668T>A]) (38).

Brockmann i współpracownicy zidentyfikowali mutację splicingową w piątym intronie (c.475-1G>C), wpływającą na akceptorowe miejsce splicingowe u dwóch spokrewnionych pacjentów. Proband w wieku 14 lat wykazywał leukomalację ciemieniowo-potyliczną istoty białej w MRI, co wskazuje na zajęcie ośrodkowego układu nerwowego (37). Mutację tę zidentyfikował również Lin i współpracownicy u dwóch spokrewnionych osób z HMSN II. Mutacja ta powoduje delecję 12 nukleotydów (czterech aminokwasów) ze względu na uaktywnienie się kryptycznego akceptorowego miejsca splicingowego w eksonie 6 w wyniku zaniku kanonicznego miejsca akceptorowego w intronie 5 (22).

Kolejne doniesienie o mutacji splicingowej w genie mitofuzyny 2 dotyczy mutacji c.708G>A, skutkującej wycięciem eksonu 7, przesunięciem ramki odczytu, w wyniku którego

powstaje skrócone 207-aminokwasowe białko. Mutacje stwierdzono u pacjentów w HMSN II o łagodnym przebiegu (39).

Mutacja c.311+1G>T najprawdopodobniej działa w sposób negatywnie-dominujący. Wykluczyć można zaangażowanie mechanizmu „nonsense-mediated decay” (degradacji mRNA ze względu na pojawienie się przedwczesnego kodonu STOP w transkrypcie) z uwagi na to, że po amplifikacji danego fragmentu cDNA zaobserwowano dwa prążki w żelu agarozowym, odpowiadające transkryptowi typu dzikiego (niezmutowanemu) i skróconemu w wyniku mutacji transkryptowi o podobnej intensywności.

#### **6.4 Warianty o nieokreślonym statusie patogenności**

Poza wyraźnie patogennymi mutacjami, podczas badań zidentyfikowano również warianty o nieokreślonym statusie patogenności. Jednym z nich jest wariant sekwencji genu mitofuzyny 2 c.1287+50G>T zidentyfikowany u pacjentki chorej na dystrofię mięśniową Emery-Dreifussa (EDMD) (zidentyfikowana w trakcie badań mutacja w genie *LMNA*) z łagodną komponentą neuropatii aksonalnej. Wariantu tego nie ma w bazie danych NCBI, nie zidentyfikowano go w 200 chromosomach osób zdrowych. Wariant c.1287+50G>T według programu Human Splicing Finder (56) wpływa na potencjalne motywy sekwencyjne związane z wycinaniem intronów lub jego regulacją lub modyfikowaniem. Jednak badania wykonane na mRNA pacjentki nie wykazują żadnych zmian związanych ze splicingiem – fragmenty transkryptów pacjentki i mRNA kontrolnych są takiej samej długości. Jest to prawdopodobnie spowodowane tym, że każdy program bioinformatyczny poszukujący motywów w sekwencji odpowiedzialnych za daną funkcję opiera się na pewnych sekwencjach konsensusowych, które w warunkach naturalnych w genomie niekoniecznie pełnią określoną funkcję.

Pojawia się pytanie, czy wariant sekwencji genu mitofuzyny 2 c.1287+50G>T wraz ze zidentyfikowaną mutacją w genie *LMNA* jest odpowiedzialny za wystąpienie u pacjentki zespołu nakładania choroby EDMD i CMT2. Z uwagi na to, że doświadczalnie nie wykryto żadnych zmian w długości transkryptów, jest mało prawdopodobne, że sam wariant c.1287+50G>T powoduje rozwinięcie choroby CMT2. Hipotetycznie, wariant ten może modulować przebieg choroby, jednak mechanizm taki nie jest znany w przypadku genu mitofuzyny 2. Wiadomo też, że same mutacje w genie *LMNA* mogą powodować neuropatię.



Istnieje więc prawdopodobieństwo, że współwystępowanie chorób EDMD i CMT2 jest wynikiem obecności mutacji tylko w genie laminy (67).

Drugim zidentyfikowanym wariantem sekwencji genu *MFN2* o trudnym do zakwalifikowania statusie patogenności jest wariant c.2113G>A (p.Val705Ile) o numerze identyfikacyjnym w bazie danych NCBI rs142271930. Obecność tego wariantu sekwencji stwierdzono u dwóch osób w grupie badanej. Oba przypadki charakteryzują się sporadycznym wystąpieniem choroby w rodzinach. Wariant c.2113G>A jest znany w literaturze i kilka grup badawczych stwierdzało jego obecność u chorych z CMT2. Zmianę c.2113G>A uważano za patogenną w badaniach niemieckich, gdzie zidentyfikowano go po raz pierwszy (30) i w badaniach norweskich (21). W pracy niemieckich autorów zbadano 212 kontrolnych chromosomów pod względem występowania danego wariantu, nie stwierdzając jego obecności. Badania segregacji wariantu c.2113G>A nie zostały jednak przeprowadzone z powodu, jak podają autorzy, braku dostępności materiału genetycznego członków rodziny. Grupa norweska wariant c.2113G>A również zakwalifikowała jako mutację patogenną i zidentyfikowała go u dwóch niespokrewnionych osób. Jednak w przeciwieństwie do tych badań ostatnie prace wykazują, że wariant sekwencji c.2113G>A jest niepatogennym wariantem sekwencji genu mitofuzyny 2 (68, 69). Obie grupy wykazały, że ta zmiana w genie mitofuzyny 2 występuje zarówno u chorych z CMT2, jak również u ich zdrowych członków rodzin oraz jest nieobecna u innych chorych na CMT2 w rodzinie. Dla potwierdzenia tezy o braku patogenności wariantu zbadano dodatkowo 57 niespokrewnionych zdrowych osób, jako kontrole i stwierdzono obecność wariantu c.2113G>A w stanie heterozygotycznym aż u 4,4% osób z tej grupy. Autorzy zauważają również, że do tej pory identyfikowano wariant c.2113G>A jedynie w stanie heterozygotycznym. Nie wiadomo, czy ta zmiana sekwencji genu *MFN2* w stanie homozygotycznym okaże się równie nieszkodliwą (69).

Ponadto wariant sekwencji genu mitofuzyny 2 c.2113G>A zidentyfikowano również jako współlistniejący z mutacją w genie *GDAP1*, którego mutacje również odpowiadają za rozwinięcie choroby CMT o dziedziczeniu autosomalnym dominującym. Zauważono, że współwystępowanie u pacjentów mutacji w genie *GDAP1* i wariantu c.2113G>A genu mitofuzyny 2 powoduje cięższy fenotyp choroby CMT2, niż występowanie izolowanej mutacji w genie *GDAP1*. Należy zauważyć, że sam wariant c.2113G>A w genie *MFN2* nie powodował choroby. Dane te pozwoliły sądzić autorom, że wariant c.2113G>A (p.Val705Ile)

może być czynnikiem modyfikującym przebieg neuropatii (68). W trakcie badań zsekwencjonowano również gen *GDAP1* u pacjentów, u których zidentyfikowano wariant c.2113G>A w genie *MFN2*, jednak nie stwierdzono współwystępowania mutacji w genie *GDAP1*.

Nie jest to pierwszy przypadek, kiedy uważany za patogenny wariant sekwencji genu okazuje się być polimorfizmem. Zjawisko takie miało miejsce w przypadku wariantu c.-713G>A genu *GJB1* kodującego białko koneksyny 32. Wariant ten stwierdzono w chińskiej rodzinie z CMTX (70). Niedługo potem okazało się, że dana zmiana sekwencji jest częstym polimorfizmem w populacji niemieckiej, chociaż przeprowadzane tam badania funkcjonalne wykazały zmniejszenie poziomu ekspresji genu *GJB1* w przypadku występowania wariantu sekwencji c.-713G>A (71).

Podobna sytuacja miała miejsce w przypadku wariantu p.Glu527del w białku NF-L, którego mutacje również odpowiadają za rozwinięcie choroby CMT. Wariant p.Glu527del stwierdzono w populacji japońskiej zarówno u pacjentów z CMT (5 osób ze zmianą na 124 badane), jak i w grupie kontrolnej (9 osób ze zmianą na 248 badanych), co daje podobne częstości występowania wariantu w grupie badanej i kontrolnej, wynoszące blisko 2% (72). Ten sam wariant zidentyfikowano w rodzinie bułgarskiej, w której dokładnie segregował z chorobą i nie stwierdzono go u 65 zdrowych osób (73). Kolejne doniesienia wskazywały, że wszyscy japońscy pacjenci z wariantem p.Glu527del prezentowali bardzo szerokie spektrum objawów klinicznych, co sugeruje brak patogenności wariantu. Jego obecność w rodzinie bułgarskiej może przemawiać za tym, że jest on jednak związany z fenotypem CMT, raczej jako modyfikator i wariant współistniejący z innym wariantem, niż patogenna mutacja. Dodatkowo związek wariantu p.Glu527del z fenotypem CMT może potwierdzać fakt, że populacje japońska i kaukaska wykazują zupełnie inne profile polimorficznych wariantów, a więc możliwe jest jego zaangażowanie w chorobę (74). Ponadto warto zauważyć, że obecność wariantów sekwencyjnych w różnych populacjach może się znacznie różnić (75). Patogenność danego wariantu sekwencji może zależeć od pochodzenia etnicznego pacjentów.

Trzecim wariantem genu mitofuzyny 2 o nieokreślonym statusie patogenności jest wariant c.1717G>A (p.Val573Ile) o numerze identyfikacyjnym w bazie danych rs370335693. Wariant ten opisuje się jako polimorfizm, mimo zmiany aminokwasu w pozycji 573 białka mitofuzyny 2. Średnia heterozygotyczność podawana w bazie NCBI dla wariantu c.1717G>A

wynosi 0,005, a zatem u 0,5% populacji wariant ten występuje w stanie heterozygotycznym. Jednak analiza w programie PolyPhen potwierdza, że taka zmiana niepolarniej waliny na polarną izoleucynę w pozycji 573 jest zmianą łagodną, a więc najprawdopodobniej niepatogenną.

### **6.5 Patogeny mechanizm działania mutacji w genie mitofuzyny 2**

W fińskiej pracy dotyczącej mutacji splicingowej, autorzy twierdzą, że patogeny mechanizm działania mutacji opiera się o mechanizm dominujący-negatywny (ang. dominant-negative) lub toksycznego uzyskania funkcji (ang. toxic gain-of-function) (39). Jest to zgodne z obserwacjami dotyczącymi mutacji w genie *MFN2*. Wydaje się, że zidentyfikowana mutacja splicingowa c.311+1G>T działa w sposób łagodny negatywny-dominujący. W badaniach przeprowadzonych na modelach mysich dowiedziono, że całkowita utrata funkcji białka mitofuzyny 2 w przypadku homozygotycznej mutacji w genie *MFN2* prowadzi do śmierci na wczesnych etapach rozwoju (76, 77). W modelu mutacji w genie *MFN2* dziedziczonych w sposób autosomalny recesywny w danio pręgowanym, uważanym za dobry model do badania zaburzeń neurologicznych, stwierdzono, że mutacje utraty funkcji (ang. loss-of-function) nie powodowały śmierci na etapie płodowym, lecz zaburzały funkcjonowanie białka mitofuzyny 2, tj. powodowały postępującą utratę funkcji motorycznych i zaburzały transport mitochondriów wzdłuż aksonów (78). Może to częściowo tłumaczyć nierozwiązany przypadek polskiej rodziny, opisywany w 2006 roku (13), gdzie mutacja p.Arg400X w układzie heterozygotycznym nie powodowała objawów choroby HMSN II, podczas gdy złożona heterozygota tej mutacji i mutacji p.Arg250Trp prowadzi do rozwinięcia choroby HMSN II.

Takie stwierdzenie popierają badania Polke i współpracowników, gdzie pacjent z tylko jedną mutacją w genie mitofuzyny 2 nie wykazuje objawów, a złożona heterozygota powodowała manifestację objawów klinicznych. Autorzy sugerują, że mitofuzyna 2 nie jest wrażliwa na haploinsuficjencję, potwierdzając fakt, że mutacje typu zmiany sensu w genie mitofuzyny 2 mają mechanizm negatywny-dominujący lub toksycznego uzyskania funkcji. Fakt ten potwierdza, że mutacje typu nonsense niekoniecznie są patogenne same w sobie i zawsze należy rozważyć dodatkowe występowanie mutacji na innym allelu lub prawdopodobieństwo wystąpienia mechanizmu nonsense-mediated decay. Takie zjawisko stwierdzono w przypadku mutacji p.Glu308X u matki probanta o łagodnym fenotypie HMSN

II, w wyniku czego u probanta ekspresji ulegał tylko allel z mutacją p.Arg519Pro od zdrowego ojca. Zaprezentowano również dwie inne rodziny, w których u chorych identyfikowano dwa zmutowane allele, np. delecja dwóch eksonów na jednym, dziedziczonym od zdrowego ojca oraz mutacja punktowa typu zmiany sensu na drugim, dziedziczonym od zdrowej matki. Dzieci wykazujące i mutację, i rearanzację były chore. W kolejnej rodzinie choroba rozwija się tylko u dzieci zdrowych rodziców, które mają dwie mutacje – jedną dziedziczoną od matki, a drugą prawdopodobnie od ojca, którego DNA nie było dostępne do badania (18). Doniesienia te pokazują, że choroba CMT2 dziedziczy się nie tylko, jak wcześniej się wydawało, w sposób autosomalny dominujący, ale także autosomalny recesywny.

Nicholson i współpracownicy badali sposób dziedziczenia w trzech rodzinach z mutacjami w genie *MFN2*. Badano pacjentów, będących heterozygotami złożonymi pod względem mutacji w genie mitofuzyny 2 oraz homozygotą pod względem mutacji w genie *MFN2*. Rodzice chorych nie wykazywali żadnych lub bardzo delikatne objawy choroby CMT2, chociaż byli nosicielami mutacji (po jednej mutacji u każdego z rodziców heterozygot złożonych i ta sama mutacja u obojga rodziców homozygot pod względem mutacji w genie *MFN2*). Taki wynik jasno sugeruje autosomalny recesywny sposób dziedziczenia mutacji w genie *MFN2* (20).

Autosomalny recesywny sposób dziedziczenia stwierdzono również u pacjenta ze zdiagnozowaną chorobą CMT1, u którego wykluczono najczęstsze geny, w których mutacje powodują CMT1. Zidentyfikowano u niego mutację *MFN2* w układzie homozygotycznym. Rodzice probanta byli kuzynami. Taką samą mutację (c.392A>G, p.Asn131Ser) w układzie homozygotycznym stwierdzono u krewnego probanta, o identycznym fenotypie (79).

## **6.6 Penetracja mutacji w genie mitofuzyny 2 w rodzinnych przypadkach HMSN II**

Braku manifestacji objawów neuropatii u pacjentów ze zidentyfikowaną mutacją w genie *MFN2* może mieć różnorodną przyczynę. Wiadomo, że pacjenci ze stwierdzoną daną mutacją w genie *MFN2* mogą wykazywać zróżnicowane objawy w obrębie jednej rodziny (80). Autorzy podkreślają, że w jednej rodzinie może pojawić się cały szereg objawów

o różnym nasileniu. Jak dotąd nie obserwowano jednak charakterystycznego dla zjawiska antycypacji, pogarszania się przebiegu klinicznego choroby w kolejnych pokoleniach. Ciężko chorzy pacjenci mogli mieć dzieci z lekkimi objawami i odwrotnie. Jest to też jedno ze zjawisk, które może tłumaczyć nietypową segregację mutacji w pierwszej polskiej rodzinie HMSN II z mutacjami w genie *MFN2*, gdzie rodzice probanta, mimo mutacji w genie *MFN2*, nie wykazywali żadnych objawów choroby (13).

Już w 2005 roku zauważono zjawisko niepełnej penetracji w rodzinach z CMT2 z mutacjami w genie mitofuzyny 2. Okazało się, że 25% osób z mutacjami w genie *MFN2* nie prezentowało objawów choroby i miało prawidłowe wyniki badania elektrofizjologicznego, a dopiero szczegółowe badanie nerwowo-mięśniowe wykazywało znamiona choroby (81).

Badania segregacji danego wariantu sekwencyjnego z występowaniem choroby uzupełniają badania genetyczne pacjenta, jednak nie zawsze wyjaśniają ostatecznie status patogenności zmiany sekwencji genu. Znane są przypadki, że zidentyfikowany wariant sekwencji genu mitofuzyny 2, będący mutacją typu zmiany sensu, nie zawsze idealnie segreguje z wystąpieniem choroby (82). Badania Østern i współpracowników wykazały, że aż 14,6% spośród chorych krewnych pacjentów, badanych pod względem mutacji patogennych lub prawdopodobnie patogennych stwierdzonych u pacjentów z CMT, nie miało tych zmian w sekwencji.

Dane te sugerują, że do pewnej diagnozy chorego potrzebne jest badanie kliniczne, elektrofizjologiczne oraz badanie genetyczne probanta oraz zarówno zdrowych jak i chorych członków rodziny. Badania segregacji wariantów sekwencji są konieczne do przewidywania ich statusu patogenności. Jednak często problemem staje się brak dostępności materiału genetycznego do badania oraz występowanie mutacji *de novo*, które w przypadku genu mitofuzyny 2 są częstym zjawiskiem (21, 82).

Ponadto okazało się, że jednemu fenotypowi nie można przypisać jednej tylko przyczyny, jaką jest mutacja w danym genie. Zhu i współpracownicy stwierdzili, że choroba CMT z objawami piramidowymi, może mieć szersze podłoże genetyczne niż tylko mutacje w genie mitofuzyny 2. Badania tej grupy wykazały, że w jednej rodzinie z fenotypem choroby CMT z objawami piramidowymi występuje mutacja c.493C>G (p.His165Asp) w genie *MFN2*, która segreguje z chorobą, natomiast w drugiej rodzinie z takim samym fenotypem występowanie mutacji w genie *MFN2* wykluczono za pomocą analizy sprzężeń (15).

## 6.7 Analiza regionu promotorowego genu mitofuzyny 2

W ramach analizy genu mitofuzyny 2, u 32 osób z grupy badanej, badaniem objęto również region promotorowy genu mitofuzyny 2 od pozycji c.-10 032 do c.-8 957. Region ten znajduje się przed niekodującym eksonem 1 genu mitofuzyny 2.

W grupie badanej zidentyfikowano 2 warianty, z których jeden jest znany (rs2236053) i jeden do tej pory nieopisywany (c.-9891delT). Znany wariant w bazie danych NCBI funkcjonuje jako nieszkodliwy polimorfizm.

Zmianę c.-9891 htz del T stwierdzono u 7 osób z 34-osobowej grupy badanej. Zmiana lokalizuje się w ciągu nukleotydów tyminowych, co utrudnia analizę sekwencji i bezbłędne namnożenie danego fragmentu przez polimerazę, z uwagi na istnienie zjawiska nazywanego „ślizganiem się” polimerazy. Takie „ślizganie się” polimerazy ma miejsce w sekwencjach bogatych w ciągi polinukleotydowe składające się z tego samego nukleotydu – w tym przypadku nukleotydu tyminowego. Do namnażania fragmentów DNA zastosowano polimerazę Taq pochodzącą z bakterii *Thermus aquaticus*, która wprowadza jeden błąd na 9 000 nukleotydów (83), a więc nie jest, tzw. wierną polimerazą. Stąd trudno wysnuć wnioski o bezsprzecznym istnieniu wariantu c.-9891 htz del T, a tym bardziej o jego ewentualnej patogenności. Dodatkowo przyjęto numerowanie usuniętego nukleotydu tyminowego, jako pierwszego (najbliżej pozycji +1, początku translacji) w ciągu nukleotydów tyminowych. Jednak nie ma możliwości sprawdzenia, który z nukleotydów uległ delecji i czy u każdego z 7 pacjentów brakuje tego samego nukleotydu tyminowego.

Z dotychczasowej literatury wynika, że podobne badania analizy sekwencji promotora genu *MFN2* nie były wykonywane na świecie. Jednak znane są przypadki, że stwierdzano mutacje w genie, w którym mutacje odpowiadają za wystąpienie choroby CMT. Przykładem mogą być mutacje w regionie promotorowym genu *GJB1*, w którym mutacje odpowiadają za wystąpienie polineuropatii sprzężonej z chromosomem X (84). Li i współpracownicy zidentyfikowali opisywany już w niniejszej pracy wariant c.-713G>A będący polimorfizmem, a uważany uprzednio za mutację patogenną, oraz wariant c.-459C>T, który segregował z chorobą w chińskiej rodzinie z CMTX. Wariant ten opisywano już w literaturze w rodzinie włoskiej i amerykańskiej (85, 86). Wariant c.-459C>T jest w prawdopodobnym miejscu IRES (ang. internal ribosome entry site), czyli w miejscu, gdzie rekrutowane są rybosomy

do zapoczątkowania translacji. Li i współpracownicy sugerują, że wariant c.-459C>T zmienia strukturę drugorzędową, poprzez co wpływa negatywnie na translację genu *GJBI* w komórkach Schwanna (84). Innym wariantem sekwencji genu zidentyfikowanym w regionie promotorowym genu *GJBI* jest wariant c.-526G>C, który znajduje się w miejscu wiązania czynnika transkrypcyjnego SOX10, powodując zaburzenia jego działania. Dowodem na taką tezę było zmniejszenie lub utrata transkryptu genu *GJBI* (87). Również w miejscu wiązania białka SOX10 stwierdzono inną mutację c.-529T>C, która także powoduje zmniejszenie poziomu ekspresji genu *GJBI*, poprzez obniżenie powinowactwa miejsca wiązania do białka SOX10 (88).

## 6.8 Wykorzystanie przesiewowej metody SSPC

Wyniki analizy promotora genu mitofuzyny 2 pozostają trudne do interpretacji z uwagi na zastosowaną metodę badania. Na początku niniejszych badań nad genem mitofuzyny 2, w 2009 roku, metoda SSPC była powszechnie stosowaną procedurą w laboratoriach genetycznych zajmujących się poszukiwaniem mutacji w genach, ponieważ jest metodą niedrogą i pozwala na dość szybką identyfikację zmian pojedynczych nukleotydów w dużej liczbie próbek. Jednak czułość tej metody przesiewowej naturalnie jest niższa niż 100% i wynosi około 80%, ponieważ nie opiera się na bezpośredniej obserwacji sekwencji. Analizę wszystkich trzech fragmentów regionu promotorowego genu mitofuzyny 2 wykonano przy tych samych parametrach procedury SSPC. Jednak dla dokładnego ustawienia metody SSPC, dla danych fragmentów sekwencji, doświadczalnie dopasowuje się temperaturę, dokładny skład buforu oraz napięcie stosowane przy rozdziale w żelu poliakrylamidowym. Prawdopodobnie jest to powód, dla którego jednej zmianie odpowiadały różne wzory migracji fragmentów w żelu poliakrylamidowym i odwrotnie – wielu wzorom odpowiadała jedna sekwencja, potwierdzona sekwencjonowaniem bezpośrednim metodą Sanger (89).

Jednak przy dostatecznie dobrym dopasowaniu parametrów rozdziału fragmentów DNA, za pomocą metody SSPC, można uzyskać bardziej zadowalające wyniki. Tak było w przypadku genu *KIF1B*, w którym za pomocą metody SSPC badano obecność zmiany p.Gln98Leu. Dla wszystkich badanych chorych (27 osób) i 63 osób zdrowych stwierdzono występowanie trzech wzorów migracji odpowiadających występowaniu polimorfizmu o numerze identyfikacyjnym w bazie NCBI rs12402052 w układzie homozygotycznym

zgodnym z sekwencją referencyjną, układzie heterozygotycznym i układzie homozygotycznym niezgodnym z sekwencją referencyjną, co potwierdzono za pomocą bezpośredniego sekwencjonowania.

### **6.9 Analiza MLPA**

Za pomocą analizy MLPA zbadano, czy pojawiają się zmiany w liczbie kopii poszczególnych fragmentów genu *MFN2* oraz genu *MPZ* (ujęty w zestawie odczynników razem z genem *MFN2*). W badaniach nie zidentyfikowano żadnych zmian. Część autorów zajmujących się problematyką neuropatii aksonalnych uważa badanie MLPA za zbędne i zwykle nie dające pozytywnych rezultatów (25). Inną kwestią, która przemawia przeciw wykorzystywaniu metody MLPA w rutynowym badaniu genu *MFN2* jest fakt, że ogromna większość mutacji w genie mitofuzyny 2 to mutacje typu zmiany sensu, a mutacje będące duplikacjami bądź delecjami fragmentów genu stanowią wyjątki. Tak jak na przykład wspomniany już przypadek delecji eksonów 7 i 8 u dwójki chorego rodzeństwa zdrowych rodziców (18).

### **6.10 Częstości występowania mutacji w genie mitofuzyny 2 w populacji polskich pacjentów z chorobą Charcot-Marie-Tooth typu 2**

Niniejsza praca jest pierwszą, która dotyczy mutacji w genie mitofuzyny 2 u pacjentów z chorobą HMSN II w ujęciu populacyjnym, w populacji polskiej. Badania pilotażowe wykonano w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej w Warszawie w 2006 roku na grupie 20 polskich pacjentów ze zdiagnozowaną chorobą HMSN II (13). Wykryto wtedy 2 mutacje, co było obiecującym wynikiem i zachęciło do badań zakrojonych na szerszą skalę.

W grupie badanej w ramach niniejszej pracy, patogenne mutacje genu *MFN2* stwierdzono tylko u pacjentów z czystą klasyczną postacią dziedzicznej ruchowo-czuciowej neuropatii (HMSN II; CMT 2). Częstość zidentyfikowanych mutacji w całej grupie badanej wynosi 4,5%. Jednak biorąc pod uwagę tylko przypadki czystej choroby HMSN II, częstość ta wzrasta o ponad trzy punkty procentowe, dając 7,7% częstości mutacji w genie *MFN2*



w polskiej populacji wśród chorych na HMSN II. Wykluczając pacjentów z chorobą HMSN II o dziedziczeniu autosomalnym recesywnym, częstość ta sięga aż 8,3%.

Wyniki te różnią się od wyników uzyskiwanych dla innych populacji na świecie, gdzie częstość mutacji w genie *MFN2*, biorąc pod uwagę przypadki rodzinne dziedzicznej neuropatii ruchowo-czuciowej wynosi około 20% (13). Jednak ostatnie badania wykazały, że częstość mutacji w genie mitofuzyny 2 w populacjach europejskich jest bardzo różna. Wyniki naszych badań są zbliżone do wyników prac na populacji najbliższych sąsiadów - Czechów i Niemców, gdzie częstość mutacji w genie *MFN2* w grupach chorych na CMT2 waha się w granicach 7-8%. Częstość ta wydaje się być dużo wyższa w populacjach basenu Morza Śródziemnego, wynosząc np. dla populacji włoskiej blisko 30% (27). Niejednoznaczne dane pochodzą z Hiszpanii. Jedna z prac na tej populacji donosi o częstości mutacji w genie mitofuzyny 2 wynoszącej 2,5% (24), co pozostaje w całkowitej sprzeczności z wynikami poprzednich badań, gdzie uzyskano częstość występowania mutacji w genie *MFN2* przekraczającą 20% (60). Z kolei ostatnie publikowane badania poszukiwania mutacji w genie *MFN2* w rosyjskiej populacji pacjentów z CMT2 o heterogennym pochodzeniu etnicznym wykazały niski procent częstości mutacji w genie *MFN2*, bo wynoszący około 3%, na który złożyły się 4 mutacje patogenne w grupie 170 niespokrewnionych pacjentów (26).

Pozostaje jednak pytanie, dlaczego w populacjach Europy Środkowo-Wschodniej częstość występowania mutacji w genie *MFN2* jest tak niska. Do grupy badanej w większości włączono pacjentów z fenotypem neuropatii aksonalnej. Jednak poza tym włączono także szeroki zakres fenotypów, począwszy od fenotypów neuropatii aksonalnej z objawami dodatkowymi, jak objawy piramidowe, zanik nerwu wzrokowego, upośledzenie umysłowe, przez neuropatie ruchowe i pośrednią aksonalno-demielinizacyjną chorobę CMT, po neuropatię czuciową i neuropatię z nadwrażliwością na ucisk. Decyzja włączenia do badań tylu fenotypów ma swoje uzasadnienie w literaturze, gdzie w norweskiej pracy stwierdzano obecność mutacji w genie *MFN2* w każdym z powyżej wymienionych fenotypów choroby (21). Wyniki tej grupy badawczej przedstawiają również niski procent występowania mutacji w genie *MFN2* wśród pacjentów z wymienianymi fenotypami, co sugerowało włączenie jak największej liczby fenotypów związanych z chorobami kręgu Charcot-Marie-Tooth typu aksonalnego.

W większości badań na świecie analizie genu *MFN2* poddawano głównie przypadki rodzinne, podczas gdy w grupie reprezentującej pacjentów z populacji polskiej przeważają przypadki sporadyczne.

#### **6.11 Polimorficzność genu mitofuzyny 2 wśród pacjentów z chorobami kręgu Charcot-Marie-Tooth typu 2 w populacji polskiej**

Oprócz mutacji patogennych i wariantów o nieokreślonym statusie patogenności w toku badań wykryto liczne warianty sekwencyjne genu mitofuzyny 2 określane mianem polimorfizmów. Wśród nich znajdują się warianty częste (o wartości średniej heterozygotyczności wyższej niż 0,1) i warianty rzadkie (o wartości średniej heterozygotyczności niższej niż 0,1). W grupie 69 chorych stwierdzono zatem obecność 15 różnych wariantów mitofuzyny 2 (6 częstych polimorfizmów i 9 rzadkich polimorfizmów). Łącznie u wszystkich chorych w grupie badanej stwierdzono występowanie aż 159 wariantów (Suplement, Tabela 1a i 1b). Część osób z grupy badanej wykazuje obecność aż 9 polimorfizmów u pojedynczego pacjenta. Dane te dają podstawę do próby utworzenia korelacji między fenotypem pacjenta a zestawem polimorfizmów, jaki dany pacjent posiada. Jednak w literaturze dane takie nie są znane i biorąc pod uwagę dużą liczbę polimorfizmów w genie mitofuzyny 2, zaskakujące jest to, że problem polimorficzności genu *MFN2* nie był do tej pory poruszany. W dotychczasowej literaturze nie stosuje się ujęcia polimorfizmów w genie *MFN2* w haplotypy, dlatego też w pracy nie dokonano takiej analizy. Autorka uważa, że do rozwiązania tego problemu konieczne byłoby zaangażowanie szeregu narzędzi bioinformatycznych i statystycznych. Jest to temat do dalszych badań, ponieważ pozostaje pytanie, czy poszczególne zestawy wariantów sekwencyjnych, w większości intronowych, mogą wpływać na wystąpienie i przebieg neuropatii aksonalnej.

## 7. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

W pracy zaprezentowano pierwsze badanie genu mitofuzyny 2 wśród pacjentów z polineuropatią aksonalną w polskiej populacji. Częstość występowania mutacji patogennych genu *MFN2* w populacji polskich pacjentów z CMT2 jest niska i wynosi 7,7%. Wynik ten jest podobny do uzyskanych wyników z analogicznych badań w populacji rosyjskiej i norweskiej.

Trudność w badaniach nad genem mitofuzyny 2 stanowi określenie, czy nowy wariant sekwencji typu zmiany sensu jest wariantem patogennym, ze względu na dużą liczbę polimorfizmów występujących u poszczególnego pacjenta. Może to sugerować efekt kumulacyjny wszystkich wariantów u jednego chorego. U poszczególnych chorych w grupie badanej stwierdzono występowanie dużej liczby polimorficznych wariantów sekwencji genu mitofuzyny 2 i dalszych badań wymaga ustalenie, czy dane warianty sekwencji mogą być modyfikatorami przebiegu choroby CMT2, wywołanej mutacjami w innym genie, czy też same ich zestawy mogą chorobę CMT2 wywoływać. Wydaje się, że można być pewnym patogenności mutacji, jeśli zaobserwowano segregację mutacji z chorobą, pełną penetrację mutacji, nieobecność w DNA osób zdrowych i jeśli mutacja ta jest mutacją powtarzającą się, np. występującą w tzw. pozycji *hot spot* genu.

Problemem jest niepełna penetracja niektórych mutacji w genie *MFN2*, a zatem brak segregacji danego wariantu z chorobą w rodzinie. Dodatkowym utrudnieniem jest fakt, że ten sam fenotyp może wiązać się z różnymi mutacjami w genie mitofuzyny 2, jak również to, że jedna mutacja w genie *MFN2* może odpowiadać za występowanie różnych fenotypów.

Do badań włączono grupę chorych o bardzo szerokim fenotypie choroby CMT: od czystej postaci aksonalnej neuropatii czuciowo-ruchowej, przez neuropatię ruchową, neuropatię czuciową, po neuropatię aksonalną z objawami dodatkowymi, jak zanik nerwu wzrokowego, objawy piramidowe, zaburzenia w ośrodkowym układzie nerwowym. Jednak mutacje patogenne w niniejszych badaniach stwierdzono tylko u pacjentów z klasyczną postacią choroby CMT2, jednak o różnym wieku zachorowania (od wczesnego początku choroby, do bardzo późnego, bo po 50-tym roku życia).

W dotychczasowych badaniach opisywanych w literaturze wskazaniem do badania genu mitofuzyny 2 był rodzinny charakter choroby CMT2. Z niniejszych badań wynika, że podstawowym kryterium włączenia do badań genu *MFN2* powinien być w pierwszej

kolejności fenotyp czystej czuciowo-ruchowej neuropatii aksonalnej. Ponadto, do wyników stanowiących nowe warianty w genie mitofuzyny 2 należy podchodzić ze szczególną ostrożnością ze względu na różny sposób dziedziczenia możliwy w przypadku mutacji w genie *MFN2* u pacjentów z chorobą CMT2, niepełną penetracją niektórych mutacji i związek wielu różnych mutacji w genie *MFN2* z tym samym fenotypem choroby. Za mutację patogenną z największym prawdopodobieństwem można uznać mutację znaną i już opisywaną u pacjentów z CMT2, szczególnie występującą w pozycji *hot spot*. Nie wyklucza to patogenności innych wariantów, jednak te nowe warianty zawsze wymagają bardziej rozszerzonych badań dotyczących ich patogenności.

## SUPLEMENT

**Tabela 1a.**

**Wyniki zbiorcze, prezentacja wariantów o nieznanym statusie patogenności i częstych wariantów genu mitofuzyny 2 zidentyfikowanych w grupie badanej**

Nr rodziny	Chorzy/inicjały	Warianty sekwencji genu mitofuzyny 2						
		Warianty o nieznanym statusie patogenności	Częste warianty					
R1	GT	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	-	-	-
R2	SM	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	-	-	-
R3	BK	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	rs77262016	rs41278626	rs11586204
R4	CP	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	-	-	-
R5	CD	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	-	-	-
R5	CO	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	-	-	-
R6	SP	-	rs2236056	-	rs1042842	rs77262016	rs41278626	rs11586204
R7	PN	-	-	-	-	-	-	-
R8	FA	c.1287+50G>T	-	rs2236057	rs1042842	-	-	-
R9	GJ	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	-	-	rs11586204
R10	PW	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	-	-	-
R11	KM	-	-	-	-	-	-	-
R12	NM	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	-	-	-
R13	MK	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	-	-	-
R14	WR	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	rs77262016	rs41278626	rs11586204
R15	RP	-	-	-	-	-	-	-
R16	KK	-	-	rs2236057	-	-	-	-
R17	SM	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	-	-	-
R18	PT	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	-	-	-
R19	GM	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	-	-	-

R20	KN	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	-	-	-
R21	OL	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	-	-	-
R22	PK	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	-	-	-
R23	MD	-	-	-	-	-	-	-
R24	WM	-	rs2236056	-	-	-	-	-
R25	RM	-	rs2236056	rs2236057	-	-	-	-
R26	KM	-	rs2236056	rs2236057	-	-	-	-
R27	CA	-	-	-	-	-	-	-
R27	GK	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	-	-	-
R28	SJ	-	rs2236056	-	rs1042842	-	-	-
R29	CM	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	rs77262016	rs41278626	rs11586204
R30	WA	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	-	-	-
R31	MJ	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	-	-	-
R32	MM	-	-	-	-	-	-	-
R33	RJ	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	-	-	-
R34	TK	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	rs77262016	rs41278626	-
R35	KK	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	-	-	-
R36	MM	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	-	-	-
R37	ŽH	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	-	-	-
R38	PM	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	-	-	-
R39	BS	-	-	-	-	-	-	-
R40	CK	-	rs2236056	-	-	-	-	-
R41	RT	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	-	-	-
R42	SD	-	-	-	-	-	-	-
R43	CL	-	-	-	-	-	-	-
R44	OJ	-	rs2236056	rs2236057	-	-	-	-
R45	MM	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	rs77262016	-	-
R46	WZ	-	-	-	-	-	-	-
R47	SG	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	-	-	-

R48	SK	rs142271930	rs2236056	rs2236057	rs1042842	-	-	-
R49	RB	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	-	-	-
R50	WM	-	rs2236056	-	rs1042842	-	-	-
R51	PP	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	-	-	-
R52	WA	-	rs2236056	-	rs1042842	-	-	-
R53	BK	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	-	-	-
R54	BK	-	rs2236056	-	rs1042842	-	-	-
R55	SN	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	-	-	-
R56	SK	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	-	-	-
R57	WR	-	-	-	-	-	-	-
R57	WJ	-	-	-	rs1042842	-	-	-
R58	SA	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	-	-	-
R59	PT	-	rs2236056	-	rs1042842	-	-	-
R60	GK	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	-	-	-
R61	KD	rs370335693	rs2236056	-	rs1042842	-	-	-
R62	KW	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	-	rs41278626	rs11586204
R63	LM	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	-	-	-
R64	LB	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	-	-	-
R65	RZ	rs142271930	-	-	rs1042842	-	-	-
R66	HB	-	rs2236056	rs2236057	rs1042842	-	-	-

**Tabela 1b**

**Wyniki zbiorcze, prezentacja mutacji patogennych i rzadkich wariantów genu mitofuzyny zidentyfikowanych w grupie badanej**

Nr rodziny	Chorzy/inicjalny	Warianty sekwencji genu mitofuzyny 2						
		Mutacje patogenne	Rzadkie warianty					
R1	GT	-	-	-	-	-	-	-
R2	SM	-	-	-	-	-	-	-
R3	BK	-	rs6680984	-	-	rs1042837	rs2273295	rs77262016
R4	CP	-	-	-	-	-	-	-
R5	CD	-	-	-	-	-	-	-
R5	CO	-	-	-	-	-	-	-
R6	SP	-	rs6680984	-	-	rs1042837	rs2273295	rs77262016
R7	PN	-	-	-	-	-	-	-
R8	FA	-	-	-	-	-	-	-
R9	GJ	-	-	-	-	-	-	-
R10	PW	-	-	-	-	-	-	-
R11	KM	-	-	-	-	-	-	-
R12	NM	-	-	-	-	-	-	-
R13	MK	-	-	-	-	-	-	-
R14	WR	-	rs6680984	-	-	rs1042837	rs2273295	rs77262016
R15	RP	-	-	-	-	-	-	-
R16	KK	-	-	-	-	-	-	-
R17	SM	-	-	-	-	-	-	-
R18	PT	-	-	-	-	-	-	-
R19	GM	Arg274Trp	-	-	-	-	-	-
R20	KN	-	-	-	-	-	-	-
R21	OL	-	-	-	-	-	-	-
R22	PK	-	-	-	-	-	-	-



R23	MD	-	-	-	-	-	-	-
R24	WM	-	-	-	-	rs1042837	-	-
R25	RM	-	-	-	-	-	-	-
R26	KM	-	-	-	-	-	-	-
R27	CA	-	-	-	-	-	-	-
R27	GK	-	-	-	-	-	-	-
R28	SJ	-	-	-	-	-	-	-
R29	CM	-	rs6680984	-	-	rs1042837	rs2273295	rs77262016
R30	WA	-	-	-	-	-	-	-
R31	MJ	-	-	-	-	-	-	-
R32	MM	-	-	-	-	-	-	-
R33	RJ	-	-	-	-	-	-	-
R34	TK	-	rs6680984	-	-	rs1042837	rs2273295	rs77262016
R35	KK	-	-	-	-	-	-	-
R36	MM	-	-	-	-	-	-	-
R37	ŽH	c.311+1G>T	-	-	-	-	-	-
R38	PM	-	-	-	-	-	-	-
R39	BS	-	-	-	-	-	-	-
R40	CK	-	-	-	-	-	-	-
R41	RT	-	-	-	-	-	-	-
R42	SD	-	-	-	-	-	-	-
R43	CL	-	-	-	-	-	-	-
R44	OJ	-	-	rs41278624	-	-	-	-
R45	MM	-	rs6680984	-	-	rs1042837	rs2273295	rs77262016
R46	WZ	-	-	-	-	-	-	-
R47	SG	-	-	-	-	-	-	-
R48	SK	-	-	-	-	-	-	-
R49	RB	-	-	-	-	-	-	-
R50	WM	-	-	-	-	-	-	-

R51	PP	-	-	-	-	-	-	-
R52	WA	-	-	-	-	-	-	-
R53	BK	-	-	-	-	-	-	-
R54	BK	-	-	-	-	-	-	-
R55	SN	-	-	-	-	-	-	-
R56	SK	rs28940291 Arg94Gln	-	-	-	-	-	-
R57	WR	-	-	-	-	-	-	-
R57	WJ	-	-	-	-	-	-	-
R58	SA	-	-	-	-	-	-	-
R59	PT	-	-	c.1160+45A>G	-	-	-	-
R60	GK	-	-	-	-	-	-	-
R61	KD	-	-	-	rs181445368	-	-	-
R62	KW	-	rs6680984	c.311+101G>A, c.1495+186A>G	c.2204+15T>C	-	-	-
R63	LM	-	-	-	-	-	-	-
R64	LB	-	-	-	-	-	-	-
R65	RZ	-	-	-	-	-	-	-
R66	HB	-	-	-	-	-	-	-

## PIŚMIENICTWO

- (1) Charcot JM, 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. *Revue médicale, Paris* 1886;6:97-138.
- (2) Harding AE, Thomas PK. The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain* 1980 Jun;103:259-280.
- (3) Dyck PJ, Thomas PK, Griffin JW, Low PA, Poduslo JF. Neuronal atrophy and degeneration predominantly affecting peripheral sensory and autonomic neurons in *Peripheral Neuropathy, 3rd ed.* 1993:1065-1093.
- (4) Hentati A, Lamy C, Melki J, Zuber M, Munnich A, de RJ. Clinical and genetic heterogeneity of Charcot-Marie-Tooth disease. *Genomics* 1992 Jan;12:155-157.
- (5) Loprest LJ, Pericak-Vance MA, Stajich J, et al. Linkage studies in Charcot-Marie-Tooth disease type 2: evidence that CMT types 1 and 2 are distinct genetic entities. *Neurology* 1992 Mar;42:597-601.
- (6) Ben 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 Aug;17:370-375.
- (7) Saito M, Hayashi Y, Suzuki T, Tanaka H, Hozumi I, Tsuji S. Linkage mapping of the gene for Charcot-Marie-Tooth disease type 2 to chromosome 1p (CMT2A) and the clinical features of CMT2A. *Neurology* 1997 Dec;49:1630-1635.
- (8) Zhao C, Takita J, Tanaka Y, et al. Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. *Cell* 2001 Jun 1;105:587-597.
- (9) Hirokawa N, Noda Y, Okada Y. Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. *Curr Opin Cell Biol* 1998 Feb;10:60-73.
- (10) Hirokawa N, Takemura R. Biochemical and molecular characterization of diseases linked to motor proteins. *Trends Biochem Sci* 2003 Oct;28:558-565.
- (11) Bissar-Tadmouri N, Nelis E, Zuchner S, et al. Absence of KIF1B mutation in a large Turkish CMT2A family suggests involvement of a second gene. *Neurology* 2004 May 11;62:1522-1525.
- (12) Zuchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, et al. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* 2004 May;36:449-451.
- (13) Verhoeven K, Claeys KG, Zuchner S, et al. MFN2 mutation distribution and genotype/phenotype correlation in Charcot-Marie-Tooth type 2. *Brain* 2006 Aug;129:2093-2102.

- (14) Kotruchow K, Kabzinska D, Hausmanowa-Petrusewicz I, Kochanski A. A late-onset and mild form of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 caused by a novel splice-site mutation within the Mitofusin-2 gene. *Acta Myol* 2013 Dec;32:166-169.
- (15) Zhu D, Kennerson ML, Walizada G, Zuchner S, Vance JM, Nicholson GA. Charcot-Marie-Tooth with pyramidal signs is genetically heterogeneous: families with and without MFN2 mutations. *Neurology* 2005 Aug 9;65:496-497.
- (16) Zuchner S, De Jonghe P, Jordanova A, et al. Axonal neuropathy with optic atrophy is caused by mutations in mitofusin 2. *Ann Neurol* 2006 Feb;59:276-281.
- (17) Chung KW, Kim SB, Park KD, et al. Early onset severe and late-onset mild Charcot-Marie-Tooth disease with mitofusin 2 (MFN2) mutations. *Brain* 2006 Aug;129:2103-2118.
- (18) Polke JM, Laura M, Pareyson D, et al. Recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease due to compound heterozygous mitofusin 2 mutations. *Neurology* 2011 Jul 12;77:168-173.
- (19) Bombelli F, Stojkovic T, Dubourg O, et al. Charcot-Marie-Tooth Disease Type 2A: From Typical to Rare Phenotypic and Genotypic Features. *JAMA Neurol* 2014 Aug 1;71:1036-1042.
- (20) Nicholson GA, Magdelaine C, Zhu D, et al. Severe early-onset axonal neuropathy with homozygous and compound heterozygous MFN2 mutations. *Neurology* 2008 May 6;70:1678-1681.
- (21) Braathen GJ, Sand JC, Lobato A, Hoyer H, Russell MB. MFN2 point mutations occur in 3.4% of Charcot-Marie-Tooth families. An investigation of 232 Norwegian CMT families. *BMC Med Genet* 2010;11:48.
- (22) Lin KP, Soong BW, Yang CC, et al. The mutational spectrum in a cohort of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 among the Han Chinese in Taiwan. *PLoS One* 2011;6:e29393.
- (23) Gess B, Schirmacher A, Boentert M, Young P. Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes in a German neuromuscular center population. *Neuromuscul Disord* 2013 Aug;23:647-651.
- (24) Sivera R, Sevilla T, Vilchez JJ, et al. Charcot-Marie-Tooth disease: genetic and clinical spectrum in a Spanish clinical series. *Neurology* 2013 Oct 29;81:1617-1625.
- (25) Brozkova DS, Posadka J, Lassuthova P, et al. Spectrum and frequencies of mutations in the MFN2 gene and its phenotypical expression in Czech hereditary motor and sensory neuropathy type II patients. *Mol Med Rep* 2013 Dec;8:1779-1784.
- (26) Khidiyatova IM, Skachkova IA, Saifullina EV, et al. [MFN2 gene analysis in patients with hereditary motor and sensory neuropathy from Bashkortostan Republic]. *Genetika* 2013 Jul;49:884-890.

- (27) Bergamin G, Boaretto F, Briani C, et al. Mutation Analysis of MFN2, GJB1, MPZ and PMP22 in Italian Patients with Axonal Charcot-Marie-Tooth Disease. *Neuromolecular Med* 2014 May 13.
- (28) Choi BO, Nakhro K, Park HJ, et al. A cohort study of MFN2 mutations and phenotypic spectrums in Charcot-Marie-Tooth disease 2A patients. *Clin Genet* 2014 May 23.
- (29) McCorquodale DS, III, Montenegro G, Peguero A, et al. Mutation screening of mitofusin 2 in Charcot-Marie-Tooth disease type 2. *J Neurol* 2011 Jul;258:1234-1239.
- (30) Engelfried K, Vorgerd M, Hagedorn M, et al. Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A: novel mutations in the mitofusin 2 gene (MFN2). *BMC Med Genet* 2006;7:53.
- (31) Vital A, Latour P, Sole G, et al. A French family with Charcot-Marie-Tooth disease related to simultaneous heterozygous MFN2 and GDAP1 mutations. *Neuromuscul Disord* 2012 Aug;22:735-741.
- (32) Vielhaber S, Debska-Vielhaber G, Peeva V, et al. Mitofusin 2 mutations affect mitochondrial function by mitochondrial DNA depletion. *Acta Neuropathol* 2013 Feb;125:245-256.
- (33) Feely SM, Laura M, Siskind CE, et al. MFN2 mutations cause severe phenotypes in most patients with CMT2A. *Neurology* 2011 May 17;76:1690-1696.
- (34) Vital A, Latour P, Sole G, et al. A French family with Charcot-Marie-Tooth disease related to simultaneous heterozygous MFN2 and GDAP1 mutations. *Neuromuscul Disord* 2012 Aug;22:735-741.
- (35) Boaretto F, Vettori A, Casarin A, et al. Severe CMT type 2 with fatal encephalopathy associated with a novel MFN2 splicing mutation. *Neurology* 2010 Jun 8;74:1919-1921.
- (36) Chung KW, Suh BC, Cho SY, et al. Early-onset Charcot-Marie-Tooth patients with mitofusin 2 mutations and brain involvement. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010 Nov;81:1203-1206.
- (37) Brockmann K, Dreha-Kulaczewski S, Dechent P, et al. Cerebral involvement in axonal Charcot-Marie-Tooth neuropathy caused by mitofusin2 mutations. *J Neurol* 2008 Jul;255:1049-1058.
- (38) Park SY, Kim SY, Hong YH, Cho SI, Seong MW, Park SS. A novel double mutation in cis in MFN2 causes Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Neurogenetics* 2012 Aug;13:275-280.
- (39) Martikainen MH, Kytovuori L, Majamaa K. Novel mitofusin 2 splice-site mutation causes Charcot-Marie-Tooth disease type 2 with prominent sensory dysfunction. *Neuromuscul Disord* 2014 Apr;24:360-364.

- (40) Cartoni R, Martinou JC. Role of mitofusin 2 mutations in the physiopathology of Charcot-Marie-Tooth disease type 2A. *Exp Neurol* 2009 Aug;218:268-273.
- (41) Koshihara T, Detmer SA, Kaiser JT, Chen H, McCaffery JM, Chan DC. Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* 2004 Aug 6;305:858-862.
- (42) de Brito OM, Scorrano L. Mitofusin 2: a mitochondria-shaping protein with signaling roles beyond fusion. *Antioxid Redox Signal* 2008 Mar;10:621-633.
- (43) Sugioka R, Shimizu S, Tsujimoto Y. Fzo1, a protein involved in mitochondrial fusion, inhibits apoptosis. *J Biol Chem* 2004 Dec 10;279:52726-52734.
- (44) Suen DF, Norris KL, Youle RJ. Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev* 2008 Jun 15;22:1577-1590.
- (45) Pich S, Bach D, Briones P, et al. The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Hum Mol Genet* 2005 Jun 1;14:1405-1415.
- (46) Misko A, Jiang S, Wegorzewska I, Milbrandt J, Baloh RH. Mitofusin 2 is necessary for transport of axonal mitochondria and interacts with the Miro/Milton complex. *J Neurosci* 2010 Mar 24;30:4232-4240.
- (47) Russo GJ, Louie K, Wellington A, et al. Drosophila Miro is required for both anterograde and retrograde axonal mitochondrial transport. *J Neurosci* 2009 Apr 29;29:5443-5455.
- (48) Baloh RH, Schmidt RE, Pestronk A, Milbrandt J. Altered axonal mitochondrial transport in the pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth disease from mitofusin 2 mutations. *J Neurosci* 2007 Jan 10;27:422-430.
- (49) Rizzuto R, Brini M, Murgia M, Pozzan T. Microdomains with high Ca<sup>2+</sup> close to IP<sub>3</sub>-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science* 1993 Oct 29;262:744-747.
- (50) de Brito OM, Scorrano L. An intimate liaison: spatial organization of the endoplasmic reticulum-mitochondria relationship. *EMBO J* 2010 Aug 18;29:2715-2723.
- (51) Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 1999 Oct;79:1127-1155.
- (52) Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988 Feb 11;16:1215.
- (53) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987 Apr;162:156-159.
- (54) Aarskog NK, Vedeler CA. Real-time quantitative polymerase chain reaction. A new method that detects both the peripheral myelin protein 22 duplication in

Charcot-Marie-Tooth type 1A disease and the peripheral myelin protein 22 deletion in hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Hum Genet* 2000 Nov;107:494-498.

- (55) Kabzinska D, Pierscinska J, Kochanski A. Screening of the 17p11.2--p12 region in a large cohort of patients with Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease or hereditary neuropathy with liability to pressure palsies (HNPP). *J Appl Genet* 2009;50:283-288.
- (56) Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Beroud G, Claustres M, Beroud C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res* 2009 May;37:e67.
- (57) Zhang XH, Chasin LA. Computational definition of sequence motifs governing constitutive exon splicing. *Genes Dev* 2004 Jun 1;18:1241-1250.
- (58) Cho HJ, Sung DH, Kim BJ, Ki CS. Mitochondrial GTPase mitofusin 2 mutations in Korean patients with Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2. *Clin Genet* 2007 Mar;71:267-272.
- (59) Calvo J, Funalot B, Ouvrier RA, et al. Genotype-phenotype correlations in Charcot-Marie-Tooth disease type 2 caused by mitofusin 2 mutations. *Arch Neurol* 2009 Dec;66:1511-1516.
- (60) Casasnovas C, Banchs I, Cassereau J, et al. Phenotypic spectrum of MFN2 mutations in the Spanish population. *J Med Genet* 2010 Apr;47:249-256.
- (61) Lv H, Wang L, Li W, et al. Mitofusin 2 gene mutation causing early-onset CMT2A with different progressive courses. *Clin Neuropathol* 2013 Jan;32:16-23.
- (62) Braathen GJ. Genetic epidemiology of Charcot-Marie-Tooth disease. *Acta Neurol Scand Suppl* 2012;iv-22.
- (63) Neusch C, Senderek J, Eggermann T, Elloff E, Bahr M, Schneider-Gold C. Mitofusin 2 gene mutation (R94Q) causing severe early-onset axonal polyneuropathy (CMT2A). *Eur J Neurol* 2007 May;14:575-577.
- (64) Banchs I, Casasnovas C, Montero J, Martinez-Matos JA, Volpini V. Two Spanish families with Charcot-Marie-Tooth type 2A: clinical, electrophysiological and molecular findings. *Neuromuscul Disord* 2008 Dec;18:974-978.
- (65) Sole G, Ferrer X, Vital C, Martin-Negrier ML, Vital A, Latour P. Ultrastructural mitochondrial modifications characteristic of mitofusin 2 mutations (CMT2A). *J Peripher Nerv Syst* 2009 Sep;14:206-207.
- (66) Kijima K, Numakura C, Izumino H, et al. Mitochondrial GTPase mitofusin 2 mutation in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Hum Genet* 2005 Jan;116:23-27.
- (67) Rankin J, Ellard S. The laminopathies: a clinical review. *Clin Genet* 2006 Oct;70:261-274.

- (68) Auranen M, Ylikallio E, Toppila J, Somer M, Kiuru-Enari S, Tyynismaa H. Dominant GDAP1 founder mutation is a common cause of axonal Charcot-Marie-Tooth disease in Finland. *Neurogenetics* 2013 May;14:123-132.
- (69) Albulym OM, Zhu D, Reddel S, Kennerson M, Nicholson G. The MFN2 V705I Variant Is Not a Disease-Causing Mutation: A Segregation Analysis in a CMT2 Family., 2013 ed 2013:1-5.
- (70) Wang HL, Wu T, Chang WT, et al. Point mutation associated with X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease impairs the P2 promoter activity of human connexin-32 gene. *Brain Res Mol Brain Res* 2000 May 31;78:146-153.
- (71) Bergmann C, Schroder JM, Rudnik-Schoneborn S, Zerres K, Senderek J. A point mutation in the human connexin32 promoter P2 does not correlate with X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth neuropathy in Germany. *Brain Res Mol Brain Res* 2001 Mar 31;88:183-185.
- (72) Yoshihara T, Yamamoto M, Hattori N, et al. Identification of novel sequence variants in the neurofilament-light gene in a Japanese population: analysis of Charcot-Marie-Tooth disease patients and normal individuals. *J Peripher Nerv Syst* 2002 Dec;7:221-224.
- (73) Jordanova A, De JP, Boerkoel CF, et al. Mutations in the neurofilament light chain gene (NEFL) cause early onset severe Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain* 2003 Mar;126:590-597.
- (74) 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 Feb;5:75-77.
- (75) Schneider JA, Rees DC, Liu YT, Clegg JB. Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Am J Hum Genet* 1998 May;62:1258-1260.
- (76) Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 2003 Jan 20;160:189-200.
- (77) Detmer SA, Vande VC, Cleveland DW, Chan DC. Hindlimb gait defects due to motor axon loss and reduced distal muscles in a transgenic mouse model of Charcot-Marie-Tooth type 2A. *Hum Mol Genet* 2008 Feb 1;17:367-375.
- (78) Chapman AL, Bennett EJ, Ramesh TM, De Vos KJ, Grierson AJ. Axonal Transport Defects in a Mitofusin 2 Loss of Function Model of Charcot-Marie-Tooth Disease in Zebrafish. *PLoS One* 2013;8:e67276.
- (79) Fischer C, Trajanoski S, Papic L, et al. SNP array-based whole genome homozygosity mapping as the first step to a molecular diagnosis in patients with Charcot-Marie-Tooth disease. *J Neurol* 2012 Mar;259:515-523.



- (80) Klein CJ, Kimmel GW, Pittock SJ, et al. Large kindred evaluation of mitofusin 2 novel mutation, extremes of neurologic presentations, and preserved nerve mitochondria. *Arch Neurol* 2011 Oct;68:1295-1302.
- (81) Lawson VH, Graham BV, Flanigan KM. Clinical and electrophysiologic features of CMT2A with mutations in the mitofusin 2 gene. *Neurology* 2005 Jul 26;65:197-204.
- (82) Ostern R, Fagerheim T, Hjellnes H, Nygard B, Mellgren SI, Nilssen O. Segregation analysis in families with Charcot-Marie-Tooth disease allows reclassification of putative disease causing mutations. *BMC Med Genet* 2014;15:12.
- (83) Tindall KR, Kunkel TA. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* 1988 Aug 9;27:6008-6013.
- (84) Li M, Cheng TS, Ho PW, et al. -459C>T point mutation in 5' non-coding region of human GJB1 gene is linked to X-linked Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 2009 Mar;14:14-21.
- (85) Flagiello L, Cirigliano V, Strazzullo M, et al. Mutation in the nerve-specific 5'non-coding region of Cx32 gene and absence of specific mRNA in a CMTX1 Italian family. Mutations in brief no. 195. Online. *Hum Mutat* 1998;12:361.
- (86) Ionasescu VV, Searby C, Ionasescu R, Neuhaus IM, Werner R. Mutations of the noncoding region of the connexin32 gene in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Neurology* 1996 Aug;47:541-544.
- (87) Houlden H, Girard M, Cockerell C, et al. Connexin 32 promoter P2 mutations: a mechanism of peripheral nerve dysfunction. *Ann Neurol* 2004 Nov;56:730-734.
- (88) Beauvais K, Furby A, Latour P. Clinical, electrophysiological and molecular genetic studies in a family with X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth neuropathy presenting a novel mutation in GJB1 Promoter and a rare polymorphism in LITAF/SIMPLE. *Neuromuscul Disord* 2006 Jan;16:14-18.
- (89) Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 1975 May 25;94:441-448.