

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

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 nieznany 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

sever, 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, then 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.