

## Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth: estudio clínico y molecular de los genes *GJB-1* y *MFN2* en la población española

Carlos Casasnovas Pons

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

# Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth: Estudio Clínico y Molecular de los Genes *GJB-1* y *MFN2* en la Población Española



Jean-Martin Charcot

Pierre Marie

Howard Henry Tooth

**Carlos Casasnovas Pons**

**ENFERMEDAD DE CHARCOT-MARIE-TOOTH:  
ESTUDIO CLÍNICO Y MOLECULAR DE LOS GENES  
*GJB-1* Y *MFN2* EN LA POBLACIÓN ESPAÑOLA**

**Doctorando**

Carlos Casanovas Pons

**Co-Directores**

Victor Volpini Bertrán

Juan Antonio Martínez-Matos

**Tutor**

Francisco Rubio Borrego

**ÁREA DE NEUROCIENCIAS**

**GRUP D'ESTUDI DE MALALTIES NEUROLÒGIQUES I NEUROGENÈTICA**

**Institut d'Investigacions Biomèdiques de Bellvitge – IDIBELL**



*A Nacho*  
*Moltes Gràcies*



*“Quizá le parezca raro que me haya  
mostrado tan dispuesta a aceptarlo así, en  
seguida. ¿Sabe a qué se debe? Se debe -  
continuó, tomándome una mano y  
colocándola contra su corazón, cuyas  
palpitaciones violentas y repetidas yo sentía,  
se debe a que, ante la perspectiva de vivir  
menos que los demás, me he propuesto vivir  
más de prisa”*

*Marguerite Duras  
en “La Dama de las Camelias”*

*Alejandro Dumas Hijo*







## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quisiera agradecer al Victor Volpini y al Dr. Juan Antonio Martínez-Matos el haber hecho posible la realización de esta tesis doctoral bajo su dirección, por haberme dado la oportunidad de trabajar con ellos, por su ayuda, conocimientos y consejos.

Gracias al Dr. Francisco Rubio por facilitarme el tiempo para dedicarme a este trabajo

Gracias al Dr. Jordi Montero, que me ha sabido transmitir, además del conocimiento, el entusiasmo por el arte de la electromiografía y que es el tercer co-director.

Agradezco a la Dra Povedano su tiempo y su paciencia mientras me enseñó electromiografía y por todos los buenos momentos de tardes "PIP"

Gracias a Yolanda Martínez, sin su ayuda con el EMG, y con todo, nunca hubiera tenido tiempo suficiente para realizar este trabajo

Gracias a la Dra. Montserrat Olivé y al Dr. Isidre Ferrer que me encaminaron hacia el estudio de la enfermedad de Charcot cuando acabe la residencia.

Gracias a Eva Oliver, porque estuvo allí.

Gracias a mi familia, que me lo ha dado todo.

Gracias a mis compañeros de trabajo en el Servicio de Neurología en el Hospital Universitario de Bellvitge especialmente a la Dra. Helena Quesada, que fue la primera persona fuera del laboratorio que tuvo que aguantar mis rollos sobre la mitofusina.

Gracias a todos los pacientes y a sus familias, ya que sin ellos mi trabajo no tendría sentido.

---

Gracias a todos los componentes del laboratorio del Centro de diagnóstico Genético y Molecular de Enfermedades Hereditarias. Gracias a Loli y a Javi, por su ayuda, sus consejos su apoyo y, como no, las risas durante las comidas y en especial gracias a Isabel Banchs, a la que agradezco su paciencia, su predisposición, sus conocimientos, sus consejos y su ayuda incondicional. Este trabajo es, obviamente, también su trabajo.

---

# ÍNDICE

---

<b>Índice</b> .....	03
---------------------	----

<b>Abreviaturas</b> .....	11
---------------------------	----

<b>Glosario</b> .....	15
-----------------------	----

## **Introducción**

1. Historia.....	32
2. Clasificación.....	35
2.1 CMT 1 .....	37
2.1.1 CMT1A .....	38
2.1.2 Neuropatía hereditaria por labilidad a las presiones (NHLP).....	43
2.1.3 CMT1B .....	44
2.1.4 Otros tipos de CMT 1 .....	45
2.2 CMT2 .....	46
2.2.1 CMT2A .....	47
2.2.2 Otros tipos de CMT2 .....	48
2.3 CMT con VCN intermedias .....	49
2.4 CMT X .....	51
2.5 CMT 4 .....	52
2.6 Clínica, electrofisiología y hallazgos moleculares del CMTX	
- Introducción .....	55
- Clínica neuromuscular.....	55
- Hallazgos electrofisiológicos.....	55
- Hallazgos a nivel de sistema nervioso central.....	56
- Hallazgos anatomopatológicos .....	57
- Mutaciones del <i>GJB-1</i> .....	59
- La conexina 32 .....	60

---

2.7 Clínica, electrofisiología y hallazgos moleculares del CMT2A	
- Historia.....	62
- Clínica del CMT2A.....	62
- Epidemiología .....	63
- La mitofusina 2 .....	63
- La función mitocondrial.....	66
- Estudio molecular .....	69
<b>Beneficios de aplicabilidad y validez.....</b>	<b>71</b>
<b>Objetivos e hipótesis de trabajo</b>	
1. Objetivos.....	77
2. Hipótesis de trabajo.....	78
<b>Material y Métodos</b>	
1. Estudios clínicos y electrofisiológicos.....	81
2. Estudios Genéticos	
- Estudio de la cohorte con sospecha de herencia ligada a X .....	82
- Estudio de la cohorte con CMT 2 .....	86
3. Estudios funcionales en el paciente con la mutación Arg468His en el gen <i>MFN2</i>	
- Cultivos celulares .....	87
- Parámetros respiratorios.....	88
- Eficiencia de la producción de ATP mitocondrial en células permeabilizadas .....	88
- Actividades enzimáticas .....	89
- Imágenes de fluorescencia.....	89
4. Estudios estadísticos.....	90

## Resultados

1. <i>Clinical and molecular analysis of X-linked Charcot-Marie-Tooth type 1 in Spanish population</i> .....	93
2. <i>Two Spanish families with Charcot-Marie-Tooth Type 2 A: clinical, electrophysiological and molecular findings</i> .....	107
3. <i>Phenotypic Spectrum of MFN2 Mutations in the Spanish Population</i> .....	115
4. <i>Diagnosis of Charcot-Marie-Tooth Disease</i> .....	145
5. Resumen de resultados	
5.1 Estudios clínicos/electrofisiológicos.....	157
5.2 Estudios moleculares .....	159
5.3 Relación clínico/electrofisiológica y genética	
- Estudio del gen <i>GJB-1</i> .....	160
- Estudio del gen <i>MFN2</i> . Mutaciones descritas previamente .....	163
- Mutaciones no previamente descritas en el gen <i>MFN2</i> .....	169
- Fenotipos sin mutaciones en el gen <i>MFN2</i> .....	170
- Polimorfismos en los genes <i>GJB-1</i> y <i>MFN2</i> .....	170
5.4 Estudios funcionales en fibroblastos del paciente con la mutación Arg468His	
- Disminución de la eficiencia en la síntesis de ATP .....	171
- Cambio en el equilibrio entre La tasa respiratorias ligadas a los complejos I y II.....	172
- Red mitocondrial.....	173

## Discusión

1. Estudio molecular del gen <i>GJB-1</i>	
- Resultado del estudio.....	177
- Estudio de la frecuencia de afectación de los dominios de la proteína Cx32.....	177
2. Estudio molecular del gen <i>MFN2</i>	
- Resultados del estudio.....	178
- Homogeneidad molecular.....	178

---

3. Relación fenotipo-genotipo de las mutaciones halladas en el gen <i>GJB-1</i>	
- VCN en las mutaciones del gen <i>GJB-1</i> .....	180
- Mutación Tyr211His y deleción en la familia CMT-61.....	180
- La mutación no descrita previamente Leu39fs.....	181
- Nuevas mutaciones con un fenotipo homogéneo .....	182
4. Relación fenotipo-genotipo de las mutaciones halladas en el gen <i>MFN2</i>	
- Las mutaciones no descritas Arg364Gln, Gln276His y Met376Val .....	183
- La mutación no descrita Asn252Lys.....	184
- La mutación no descrita Ile203Met .....	185
- La mutación Arg94Gln y la atrofia óptica en el CMT2A .....	187
- Las mutaciones Arg94Trp y Gly298Arg .....	188
5. La mutación Arg468His en la <i>MFN2</i> . Estudio bioenergético en fibroblastos	
- El cambio Arg468His es el cambio en la <i>MFN2</i> más frecuente .....	189
- Estudio bioenergético en fibroblastos .....	189
- Significado patogénico real de la mutación Arg468His .....	190
6. Heterogeneidad clínica del CMT2.....	191
7. Frecuencia de mutaciones en los genes <i>GJB1</i> y <i>MFN2</i> .....	192
8. Polimorfismos en los genes <i>GJB-1</i> y <i>MFN2</i> .....	194
9. Aplicación del conocimiento de las frecuencias de mutaciones protocolos diagnósticos	
- Protocolo diagnóstico del CMT1 .....	195
- Protocolo diagnóstico de CMT2.....	196
10. Limitaciones del estudio.....	197



<b>Conclusiones.....</b>	<b>201</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>205</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>229</b>

## **ABREVIATURAS**

ACETILCoA:	<i>Acetil Coencima A</i>
ADP:	<i>Adenosindifosfato</i>
ATP:	<i>Adenosintrifosfato</i>
AO:	<i>Atrofia óptica</i>
CMT:	<i>Charcot-Marie-Tooth</i>
CMAP:	<i>Potencial de acción motor</i>
CMTNS:	<i>CMT neuropathy score</i>
CRM:	<i>Cadena respiratoria mitocondrial</i>
Cx32:	<i>Conexina 32</i>
DNM2:	<i>Dynamin 2</i>
EC:	<i>Extracelular</i>
ERG2:	<i>Proteína de Respuesta de crecimiento precoz</i>
FAD:	<i>Dinucleótido de flavina y adenina</i>
GDAP1:	<i>Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1</i>
GJB-1:	<i>Gap junction beta 1</i>
IC:	<i>Intracelular</i>
LITAF:	<i>Factor de necrosis tumoral inducido por polisacáridos</i>
MFN1:	<i>Mitofusina 1</i>
MFN2:	<i>Mitofusina 2</i>
MLPA:	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
MPZ:	<i>Proteína de la mielina Zero</i>
MTMR2:	<i>Myotubularin-related protein 2</i>
NAD:	<i>Dinucleótido de adenina y nicotinamida</i>
NHLP:	<i>Neuropatía hereditaria por labilidad a las presiones</i>
NHSM:	<i>Neuropatía hereditaria sensitiva motora</i>
NMH:	<i>Neuropatía motora hereditaria</i>
NSH:	<i>Neuropatía sensitiva hereditaria</i>

OPA1:	<i>Atrofia óptica autosómico dominante 1</i>
PCR:	<i>Reacción en cadena de la polimerasa</i>
PMP22:	<i>Proteína de la Mielina Periférica</i>
RM:	<i>Retraso mental</i>
SNAP:	<i>Potencial de acción sensitivo</i>
SSCA:	<i>Single strand conformation análisis (análisis de conformación de cadena sencilla)</i>
TM:	<i>Transmembrana</i>
VCN:	<i>Velocidad de conducción nerviosa</i>
YARS:	<i>Tirosil-tRNA sintetasa</i>

## **GLOSARIO**

**Alelo:** Cada uno de los dos genes presentes en el mismo lugar (locus) del par de cromosomas homólogos. En general, uno de los diferentes estados moleculares alternativos del mismo gen.

**Aminoácido:** Es la unidad básica constituyente de las proteínas. Existen 20 aminoácidos esenciales distintos, componentes de todas las proteínas, cada uno de ellos codificado por un codón según el código genético. Los aminoácidos se unen linealmente uno a otro formando polipéptidos.

**Atrofia Muscular:** Involución funcional y estructural del músculo. Se trata de una deficiencia adquirida, lo que implica una preexistencia de normalidad, debe diferenciarse de la hipoplasia, de la aplasia y de la agenesia. En el caso de la enfermedad de CMT se trata de una atrofia neurógena

**Atrofia Óptica:** La atrofia óptica es un término clínico aplicado a ciertos cuadros de palidez, avascularidad, o excavación de la papila que reflejan a posteriori la extensión del daño degenerativo subyacente. La atrofia del nervio óptico es una incapacidad permanente de la vista causada por daños al nervio óptico. La atrofia puede variar desde parcial a total. Puede afectar a un ojo o a los dos. Puede ser progresiva, dependiendo de la causa.

**Axón:** Extensión del cuerpo de una célula nerviosa, especializado en la conducción de los impulsos nerviosos. Puede estar recubierto por una cubierta aislante de mielina.

**Bloqueo de la Conducción:** Reducción significativa de la amplitud del potencial de acción muscular compuesto (CMAP) o del área de la fase o pico negativo de este potencial en ausencia de dispersión temporal anormal, en un segmento focal establecido del trayecto de un nervio.

**Bulbo de Cebolla:** En la biopsia de nervio. Muy frecuentes en las neuropatías crónicas desmielinizantes, especialmente en el CMT1A. Es debido a fenómenos de desmielinización y remielinización.

**Cadena Respiratoria Mitocondrial:** Conjunto de reacciones REDOX de transporte de electrones. El objetivo es acumular H<sup>+</sup> en el espacio intermembrana mitocondrial y acoplarse a la síntesis de ATP.

**Calambre:** Contracción involuntaria, dolorosa y transitoria de un músculo o de un grupo de músculos. En el caso de CMT está provocado por la denervación.

**Cebador:** Se refiere a una secuencia corta de DNA complementaria a cada una de las hebras del DNA que se autoduplicarán. El cebador proporciona un extremo 3' OH libre para que las enzimas DNA polimerasas prosigan el proceso de síntesis de DNA. Finalmente los cebadores son eliminados y reemplazados por secuencias de DNA.

**Célula de Schwann:** Son células gliales periféricas. Recubren a los axones de las neuronas formándoles una vaina aislante de mielina.

**Codón:** Secuencia de 3 nucleótidos (tripleto) en la hebra codificadora del DNA ó en el mRNA que se corresponde con un aminoácido específico en el código genético. También existen codones que no codifican aminoácidos y funcionan como señales de término de la traducción.

**Conducción Saltatoria:** Proceso por el que los impulsos nerviosos se transmiten a lo largo del nervio mielínico. Se despolariza el primer *nodo de Ranvier* y la corriente eléctrica se dirige hasta el siguiente *nodo de Ranvier*. El impulso "salta" de un nodo a otro. Es valiosa por dos razones: 1.- Se incrementa la velocidad de conducción sobre la fibra, 2.- La vaina de mielina disminuye en gran medida la cantidad de energía que requiere el nervio para la transmisión del impulso.

**Conexina 32:** Proteína codificada por el gen GJB-1, las mutaciones del cual producen el CMT ligado a X más frecuente. Un hexamero de conexinas se une a otro hexamero en otra célula o de otra región de la membrana citoplasmática de la misma célula para formar una unión de tipo Gap.

**Cromosoma:** Estructura en la que se encuentra organizado el DNA. Son los portadores de los genes y representan el fundamento de los mecanismos mendelianos de segregación. Un cromosoma corresponde a una molécula de DNA acomplexada con histonas y RNA.

**Cronodispersión:** El fenómeno de dispersión es debido a las diferencias de VCN en los distintos axones de los que está formado un nervio. Hace que el potencial de acción sea más ancho cuanto más dispersión haya (más diferencia entre VCN).



**Dedos en Martillo:** Deformidad muy frecuente en los pies de los pacientes con CMT, de un dedo, principalmente la tercera falange del pie, en el que adopta una actitud flexionada, doblando el extremo del dedo hacia abajo.

**Delección:** Pérdida de material genético de un cromosoma que puede ir desde la pérdida de un solo nucleótido (delección puntual) hasta la pérdida de grandes regiones visibles citogenéticamente.

**Dispersión Temporal:** Ver Cronodispersión.

**DNA:** Acido desoxiribonucleico. Polímero formado por la unión covalente de nucleótidos. Un nucleótido = base (Adenina, Timina, Guanina, Citosina) + azúcar (2' desoxirribosa) + fosfato. Definida por Watson y Crick al analizar los parámetros de hélice obtenidos por difracción de rayos X. El DNA es el material genético de células procariotas, eucariotas y virus de DNA. La información genética está contenida en la secuencia de bases de la molécula dúplex.

**Dominancia:** Se refiere a la interacción entre un par de alelos del mismo locus (Ej. pigmentación normal es dominante respecto a albinismo). El alelo dominante es aquel cuyo fenotipo se expresa en los heterocigotos. El alelo recesivo es aquel cuya expresión se enmascara en el heterocigoto.

**Electroforesis:** Técnica para separar moléculas de diferentes tamaños y cargas, típicamente DNA ó proteínas. La muestra se pone en una matriz que generalmente es un gel (de acrilamida, agarosa...), se somete a la acción de un campo eléctrico y las moléculas se separan de acuerdo a carga y tamaños. Para moléculas de DNA y RNA donde todas tienen igual carga, migran más rápido aquellas de menor tamaño.

**Exon:** Secuencia de DNA que se transcribe a una molécula de RNA.

**Fenotipo:** Efecto del genotipo y en el cual contribuye el medio ambiente y la acción de otros genes.

**Gen (Factor Mendeliano):** Unidad física y funcional que ocupa una posición específica en el genoma.

**Genotipo:** Constitución genética de un organismo. Puede referirse al conjunto de genes (genoma) o a la constitución de un locus particular.

**Hemicigosis:** La condición de un gen que está presente en una sola copia en un individuo diploide (por ejemplo, el cromosoma X humano contiene muchos más genes que el cromosoma Y. Estos genes están en hemicigosis en los varones que tienen un cromosoma X y un cromosoma Y).

**Heterocigosis:** Un individuo para un gen dado (locus), tiene en cada uno de los dos cromosomas homólogos un alelo distinto, es decir dos formas moleculares diferentes de un gen en particular; cada una heredada de los respectivos progenitores.

**Heterocigosis compuesta:** Individuo que tiene dos alelos anormales y diferentes en un locus determinado, uno en cada cromosoma de un par, normalmente se refiere a los individuos afectados por una enfermedad autosómica recesiva.

**Homocigosis:** Como del anterior caso pero en el que los alelos que posee el individuo en cada uno de los cromosomas homólogos son iguales.

**Hot Spot:** Lugar en el DNA en el cual la frecuencia de mutación ó recombinación está aumentada.

**Incisuras de Schmidt-Lanterman:** Se encuentra entre las superficies del citoplasma (interna y externa) de la célula de Schwann. Es donde se acumulan la conexina 32.

**Locus (Plural: Loci):** Posición definida de una secuencia de DNA determinada en un cromosoma

**Malato:** Sustrato empleado en el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial.

**Mano en Garra:** Trastorno de la mano caracterizado por la flexión extrema de las falanges media y distal. Se puede asociar a la atrofia grave de extremidades superiores de inicio congénito.

**Marcha en Stepagge:** Marcha característica de pacientes con pie caído. Puede ser debida a múltiples causas, entre ellas la enfermedad de CMT.

**Microsatélite:** Secuencias de ADN en las que un fragmento se repite de manera consecutiva. La variación en el número de repeticiones crea diferentes alelos que se distinguen entre sí por la longitud del fragmento. Generalmente se encuentran en zonas no codificantes del DNA. La variabilidad que presentan es útil como marcadores moleculares.

**Mielina:** Lipoproteína que se encuentra en el sistema nervioso formando vainas alrededor de los axones de las neuronas. Permite la transmisión de los impulsos nerviosos gracias a su efecto aislante. En el sistema nervioso periférico, las vainas de mielina están formadas por capas de lípidos y proteínas producidas por las *células de Schwann*.

**Mitofusina 2:** Proteína relacionada con la fusión de las mitocondrias. Las mutaciones del gen que la codifica son diagnósticas del CMT tipo 2A.

**MLPA** (multiplex ligation-dependent probe amplification): Técnica por la cual se amplifican múltiples fragmentos de forma simultánea (algunos de ellos incluidos en los distintos exones del gen a estudiar, como el PMP22 en el caso del CMT1A; otros en regiones cercanas al gen a estudiar; y otros fragmentos situados en regiones en distintos cromosomas que actúan a modo de controles).

**MPZ o P0:** Proteína más abundante de la mielina. Las mutaciones del gen que la codifica (con el mismo nombre, MPZ) producen la enfermedad de CMT tipo 1B.

**Mutación:** alteración o cambio en la información genética que va a producir usualmente un cambio de características fenotípicas, y que se puede transmitir a la descendencia. Las mutaciones sólo pueden ser heredadas cuando afectan a las células germinales. Una consecuencia de las mutaciones puede ser una enfermedad genética.

**Mutación de cambio de sentido (*missense*):** Una mutación que produce la aparición de un codón que traduce para un aminoácido distinto. Ello producirá un cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína.

**Mutación *de novo*:** Alteración en un gen que se presenta por primera vez en un miembro de una familia como resultado de una mutación producida en una célula germinal (óvulo o espermatozoide) de uno de los progenitores, o en el óvulo fertilizado.

**Mutación sin sentido (*nonsense*):** Una mutación que produce la aparición de uno de los tres codones de terminación del ARN aparece en medio de la secuencia. Ello produciría la aparición de la terminación de forma prematura de la traducción de la proteína.

**Mutación silenciosa:** Mutación que no se expresa fenotípicamente. Habitualmente afecta a la segunda o tercera posición del codón.

**Mutación por cambio de pauta de lectura:** Cambio en el material genético por adición ó deleción de un número de bases no múltiplo de tres, lo que provoca un corrimiento en el marco de lectura del mRNA, originándose nuevos triplete.

**Nervio mediano motor:** El nervio más utilizado en el estudio de velocidades de conducción nerviosa.

**Neuromiotonía:** Síndrome que se caracteriza por una actividad muscular continua, originado por una descarga anómala de las fibras nerviosas o de sus terminales.

**Nódulo de Ranvier:** Interrupciones que ocurren a intervalos regulares en la vaina de mielina a lo largo de la longitud del axón. El impulso nervioso se trasladará con mayor velocidad, de manera saltatoria ya que el potencial de acción saltará de un nodo al siguiente. El potencial de acción de la neurona logra saltar de un nodo al otro debido a que éstos, presentan acumulos de canales de sodio.

**Nucleósido:** Unidad monomérica de los ácidos nucleicos. En el DNA se encuentran los desoxirribonucleótidos, que están formados por la unión covalente de una base (Adenina, Guanina, Citosina , Timina) + azúcar ( 2' Desoxirribosa) + Fosfato.

**Oligomicina:** Compuesto que inhibe la ATP sintetasa.

**Pauta de Lectura:** Secuencia lineal de codones ó tripletes en un ácido nucleico. Es una de las tres posibles alternativas de lectura de una secuencia nucleotídica de una serie de tripletes.

**PCR:** Ver reacción en cadena de la polimerasa.

**Penetrancia:** Probabilidad de que se manifieste un fenotipo determinado.

**Pie Cavo:** Se denomina pie cavo aquél que tiene una altura de arco longitudinal medial superior a lo normal. Esta definición no implica por sí sola un síndrome. Muchas causas pueden conducir a esta deformidad, entre otras la enfermedad de CMT.

**Piruvato:** Sustrato ligado al complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial.

**PMP 22:** Una de las proteínas más frecuentes en la mielina del nervio periférico. Cambios en el gen que la codifica (en su mayoría de ocasiones duplicación) producen la enfermedad de CMT1A.

**Polimorfismo:** Variación en la secuencia del ADN, muchas de ellas no tienen consecuencia selectiva biológica alguna. Debe ser detectable en, al menos, el 1% de los individuos de una población.

**Primer (Oligonucleótido iniciador):** Ver *Cebador*.

**Reacción en Cadena de la Polimerasa:** Es un método in vitro para la amplificación enzimática de secuencias específicas de DNA. Utiliza cebadores y la enzima Taq DNA polimerasa. La amplificación ocurre a través de ciclos de denaturación, anillamiento con cebador y extensión con DNA polimerasa. La secuencia de DNA se amplifica  $>10^6$  veces.

**Recesividad:** Se refiere a que en condición heterocigota un alelo en un locus está enmascarado, no se detecta fenotípicamente.

**Southern Blot:** Técnica desarrollada por E.M. Southern y utilizada para analizar fragmentos de DNA, los cuales son separados mediante electroforesis, transferidos a un filtro de papel e hibridados con sondas específicas.

**Succinato:** Sustrato empleado en el complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial.

**Región promotora:** Porción del ADN situada al principio del gen que no codifica para ningún aminoácido, que es reconocida por las enzimas que realizarán la transcripción.

**Rotenona:** Compuesto que inhibe el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial.

**Unión tipo gap:** Comunicación entre las células mediante mecanismo directo, que permiten la comunicación entre células adyacentes a través de uniones.

**Zona de *splicing*:** Secuencia de nucleótidos situada a cada extremo de un intrón. Determina el punto de empalme, es decir, el nucleótido exacto en el que se producirá la escisión del intrón y el posterior empalme de exones.



# **INTRODUCCIÓN**

Las neuropatías hereditarias constituyen un grupo genéticamente heterogéneo de enfermedades que afectan al sistema nervioso periférico. Se pueden clasificar dependiendo del tipo de nervio afectado en: Neuropatías sensitivas hereditarias (NSH), neuropatías motoras hereditarias (NMH o atrofia espinal distal) y Neuropatías hereditarias sensitivo motoras (NHSM) o Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT).

Las NSH se caracterizan por una degeneración o agenesia de las neuronas del ganglio raquídeo posterior que pueden manifestarse en forma de distintas modalidades según haya a) predominio de neuropatía de fibra fina afectando sensibilidad nociceptiva, termoalgésica y, a menudo, al sistema autónomo; b) de neuropatía atáxica sensorial, afectando predominantemente a las fibras mielínicas de grueso calibre; o c) neuropatía pansensorial, en los casos en que se afecta globalmente todo el espectro de fibras tanto mielínicas como amielínicas (*Rotthier et al, 2009*).

Por otro lado, las NMH son un grupo, clínica y genéticamente heterogéneo, de entidades que se caracterizan por cursar únicamente con debilidad muscular y atrofia sin afectación de la sensibilidad, ni clínica ni electrofisiológicamente. Dyck y Lambert ya denominaron a esta enfermedad "forma espinal de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth o *atrofia espinal distal*". Los estudios neurofisiológicos muestran velocidad de conducción motora normal y ausencia de afectación de los axones sensitivos; la biopsia de nervio sural es normal. Se han clasificado en distintos subtipos de acuerdo a la edad de inicio, evolución y patrón de herencia. (*Harding et al, 1993; Emery et al, 1971; Christodoulou et al, 1995; Timmerman et al, 1996*).

La forma más frecuente de neuropatía hereditaria es la neuropatía sensitivo-motora o enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT). El CMT constituye un grupo clínica, electrofisiológica y genéticamente heterogéneo de enfermedades caracterizadas por la afectación tanto de los nervios sensitivos como de los motores.

Dependiendo de la región, la prevalencia de CMT va desde 10 a 30 casos por 100.000 habitantes (*Emery et al, 1991; Berciano et al, 2004*).

## **1. Historia**

En 1886 *Charcot y Marie* en Francia y *Tooth* en Inglaterra describieron una forma de atrofia muscular progresiva que denominaron "atrofia muscular peroneal" y que se corresponde con lo que hoy conocemos por enfermedad de CMT. La enfermedad era familiar y el inicio de la clínica era en la infancia. Se presentaba con debilidad muscular y atrofia de la musculatura de EEII de predominio peroneal y lenta progresión (*Charcot et al, 1886; Tooth et al, 1886*).

En 1893 *Dejerine y Sottas* describieron dos hermanos, la mujer presentaba una neuropatía cuyos síntomas se iniciaron en la primera infancia y progresaron en forma de intensa atrofia distal y déficit sensitivo y en su hermano la enfermedad se inició a los 14 años con un curso menos grave. Los nervios estaban hipertróficos (*Dejerine et al, 1893*).

En 1926 *Roussy y Lévy* publicaron las características clínicas de siete miembros de una familia con veinte miembros afectados; el síndrome clínico era semejante al descrito por Charcot, Marie y Tooth, salvo que la atrofia no existía o era mínima, la sensibilidad era normal y cuatro pacientes mostraban temblor de acción (*Roussy et al, 1926*). *Lapresle y Salisachs* demostraron en un caso de esta familia que las

características neurofisiológicas y patológicas eran idénticas a la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (*Lapresle et al, 1973*).

*Dyck y Lambert (1968)* observaron en los estudios electrofisiológicos la presencia de un marcado enlentecimiento de la velocidad de conducción (VCN) en algunas familias mientras que en otras estaba preservada. Estos autores contribuyeron a una clasificación racional de las atrofiás musculares peroneales de acuerdo con el patrón de herencia y los hallazgos clínicos, electrofisiológicos y anatomopatológicos. Propusieron el término neuropatía hereditaria sensitivo motora (NHSM) tipo 1 (o CMT 1) que se correspondería con la forma autosómica dominante con VCN disminuidas; y la NHSM tipo 2 (o CMT 2) para la forma autosómica dominante con VCN conservadas. *Buchthal y Behse (1977)* proponen que el 60% de la VCN normal marca el límite en el que ya no existirían axones con mielina intacta. *Harding y Thomas (1980)* observaron que la distribución de las VCN de nervio motor mostraban un patrón bimodal y propusieron la VCN de 38 m/s en el nervio mediano motor, correspondiente al 60% de su VCN mínima, como un límite racional aunque arbitrario entre las formas desmielinizantes (CMT1 o NHSM tipo 1) con VCN (en nervio motor) <38 m/s y las formas axonales (CMT2 o NHSM tipo 2) con VCN en nervio motor >38 m/s).

## 2. Clasificación

La clasificación que con más frecuencia se usa en la actualidad, combina los hallazgos clínicos, con el patrón de herencia (autosómico dominante, autosómico recesivo, o ligado a X) y los hallazgos electrofisiológicos o anatomopatológicos (axonal o desmielinizante). Las formas desmielinizantes se caracterizan por afectar de forma predominante a la vaina de mielina que envuelve al axón. Una función de la mielina es incrementar la VCN. Ello es debido a que en los axones mielínicos, estos están recubiertos por una vaina de mielina formada por las células de Schwann. En los puntos de contacto entre células contiguas esta cubierta queda interrumpida; en estos puntos de interrupción o nodos de Ranvier, el impulso nervioso avanza a saltos, de nodo a nodo, aumentando la velocidad de propagación del potencial de acción. A éste fenómeno se le denomina *conducción saltatoria del impulso*. En cada espacio sin mielina o nodo de Ranvier se generará el potencial de acción, debido, además, a la gran cantidad de canales de sodio.

Por lo tanto, en los estudios electrofisiológicos de una neuropatía desmielinizante, el hallazgo más llamativo será la reducción de la VCN. Por otro lado, las formas axonales de la enfermedad, son debidas a la afectación primaria del axón. En estas últimas, los estudios electrofisiológicos pondrán de manifiesto unas VCN conservadas y será la amplitud de los potenciales (que son los que indican si el axón está conservado) las que estarán disminuidas. También se han descrito formas que combinan los efectos sobre el axón y la vaina de mielina que lo envuelve, y que se presentan con VCN en el rango intermedio en los estudios electrofisiológicos, muchas de estas variantes tienen un patrón de herencia ligado a X (Dyck et al, 1993).

La presencia de formas con velocidades de conducción intermedia hace que la clasificación original entre desmielinizante y axonal, basada únicamente en VCN

mayores o menores de 38 m/s, haya quedado desfasada. Actualmente para catalogar una neuropatía en desmielinizante o axonal se requerirán más datos electrofisiológicos además de las VCN, tales como latencias distales, amplitud de los potenciales o estudios de segmentos más proximales de los nervios. En este trabajo, para simplificar su comprensión, a partir de ahora hablaremos de VCN en el rango desmielinizante, intermedio o axonal.

Se pueden identificar algunas categorías principales de CMT combinando el patrón de herencia, los datos clínicos y los datos electrofisiológicos o anatomopatológicos. La mayoría de los casos pueden estar incluidos en: CMT tipo 1 (CMT1; formas desmielinizantes con VCN disminuidas y transmisión autosómica dominante); CMT tipo 2 (CMT2; VCN en los estudios electrofisiológicos en el rango axonal y habitualmente con patrón de herencia autosómico dominante); CMT con VCN intermedias; y CMT tipo 4 que se corresponde al CMT recesivo y formas graves. Cada uno de estos tipos de CMT puede a su vez dividirse en distintos subtipos, dependiendo del defecto molecular subyacente que lo cause (**Tabla 1 y 2**). Sin embargo, cabe mencionar que no existe una buena correlación entre fenotipo y genotipo y que puede existir variabilidad tanto interfamiliar como intrafamiliar cuando se considera el grado de expresividad clínica (*Sevilla et al, 2004*).

Con la llegada de los estudios genéticos, la biopsia de nervio se reserva a pacientes en los que el estudio genético no ha determinado el diagnóstico molecular, con presentaciones atípicas o en pacientes donde se sospecha una neuropatía inflamatoria. De hecho la fiebre puede empeorar la conducción nerviosa y casos de CMT clínicamente leves pueden ser confundidos con neuropatías inflamatorias disímunes recidivantes cuando presentan un cuadro febril. Últimamente la resonancia magnética de músculo, la resonancia magnética de nervio y la biopsia de piel han demostrado su papel potencial en el diagnóstico en ciertos subtipos de CMT (*Szigeti et al, 2009*).

**Formas Dominantes***CMT 1 (desmielinizante)*

Tipo	Gen	Herencia	Locus
CMT1A:	PMP-22	Dominante/ esporádico	17p11
NHLP	PMP-22	Dominante	17p11
CMT1B:	MPZ	Dominante	1q22
CMT1C:	LITAF	Dominante	16p13
CMT1D:	EGR2	Dominante	10q21
CMT1E:	MPZ	Dominante	1q22
CMT1F:	Neurofilament Light chain	Dominante/ esporádico	8p21

*CMT 2 (axonal)*

Tipo	Gen	Herencia	Locus
CMT 2A:	MFN2	Dominante	1p36
CMT 2B:	RAB7	Dominante	3q13-q22
CMT 2C:		Dominante	12q23-q24
CMT 2D:	GARS	Dominante	7p15
CMT 2E:	Neurofilament light chain	Dominante	8p21
CMT 2F:	HSPB1	Dominante/ recesivo	7q11-q21
CMT 2G:		Dominante	12q12
CMT 2I:	MPZ	Dominante	1q22
CMT 2J:	MPZ	Dominante	1q22
CMT 2K:	GDAP1	Dominante	8q21
CMT 2L:	HSPB8	Dominante	12q24

*CMT con VCN intermedias*

Tipo	Gen	Herencia	Locus
CMT DIA		Dominante	10q24
CMT DIB	DNM2	Dominante	19p12
CMT DIC	Tyrosyl-tRNA synthetase	Dominante	1p34
CMT DI3	MPZ	Dominante	1q22
CMT 2E:	Neurofilament light chain	Dominante	8p21
CMTX	GJB1	Ligado a X	Xq13

**Formas Recesivas***AR-CMT 2 (axonal y recesivo)*

Tipo	Gen	Herencia	Locus
AR-CMT2A	Lamin A/C	Recesivo	1q21.2
AR-CMT2B	Med25	Recesivo	19q13.3
CMT 2K:	GDAP1	Recesivo	8q21

*CMT 4(Desmielinizantes y axonales)*

Tipo	Gen	Herencia	Locus
CMT 4A:	GDAP1	Recesivo	8q21
CMT 4B1:	MTMR2	Recesivo	11q23
CMT 4B2:	SBF2	Recesivo	11p15
CMT 4C:	SH3TC2 (KIAA1985)	Recesivo	5q32
CMT 4D (Lom):	NDRG1	Recesivo	8q24
CMT 4E:	EGR2	Recesivo	10q21
CMT 4F:	Periaxin	Recesivo	19q13
HMSN-Russe (4G)		Recesivo	10q23
CMT 4H:	FGD4	Recesivo	12q12

**Tabla 1:** Clasificación de la enfermedad de Charcot

Tipo	Características	Loci	Marcador	Lod Score
CMT2C	Axonal Dominante	12q23-24	D12S105	10
CMT 2G:	Axonal Dominante	12q12	D12S1632	4.56
HMSN-Russe (4G)	Recesivo (etnia Gitana)	10q23	D10S1652	3.96

**Tabla 2:** CMT cuyos loci han sido localizados pero que permanecen sin clonar

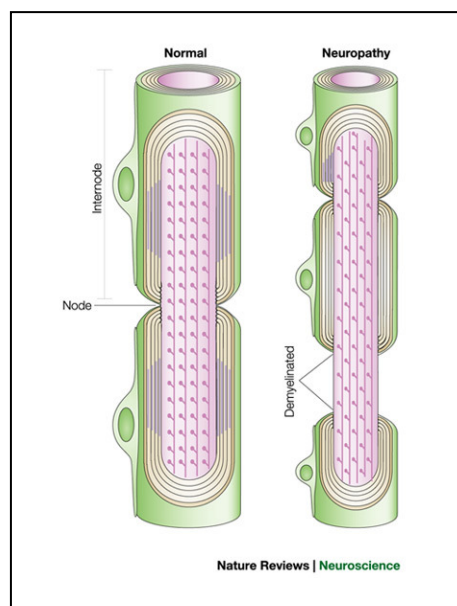
## 2.1 CMT1

Esta forma de CMT se caracteriza por transmisión autosómica dominante y VCN en el rango desmielinizante en los estudios electrofisiológicos; El grado de reducción de las VCN no se corresponde con la gravedad clínica de la enfermedad, de forma que VCN bajas pueden encontrarse en individuos asintomáticos y en menores de 1 año de edad (*Szigeti et al, 2009*). En un miembro de una familia con CMT1, la persistencia de VCN bajas después de los 2-3 años de edad será sugestiva de enfermedad. La biopsia de nervio que no se indica ya de rutina, muestra pérdida de fibras gruesas mielinizadas, fenómenos de desmielinización (**Figura 1**) y remielinización con aspecto de "bulbo de cebolla". Dependiendo del defecto molecular subyacente se puede dividir en CMT1 A, B, C, D, E o F (**Tabla 1 y 3**).

Tipo	Gen	Herencia	Locus
CMT1A:	PMP-22	Dominante/ esporádico	17p11
NHLP	PMP-22	Dominante	17p11
CMT1B:	MPZ	Dominante	1q22
CMT1C:	LITAF	Dominante	16p13
CMT1D:	EGR2	Dominante	10q21
CMT1E:	MPZ	Dominante	1q22
CMT1F:	Neurofilament Light chain	Dominante/ esporádico	8p21

**Tabla 3.** Clasificación CMT 1 (desmielinizante)





**Figura 1:** Esquema muy básico de los cambios anatomopatológicos en el CMT (Suter et al, 2003)

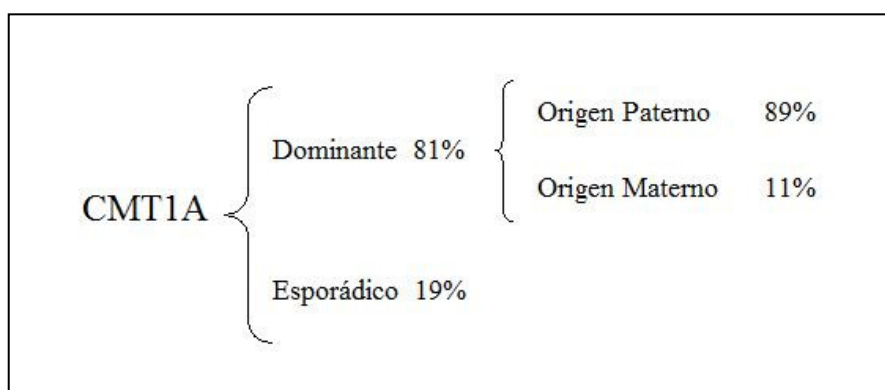
### 2.1.1 CMT1A

Esta es la variante de CMT1 más frecuente, en los países occidentales representando hasta el 70% de los casos de CMT1 (Bort et al, 1997; Sorour et al, 1998; Silander et al, 1998; Bissar-Tadmouri et al, 2000; Mersiyanova et al, 2000; Mostacciolo et al, 2001; Boerkoel et al, 2002; Namakura et al, 2002). En la gran mayoría de casos es debida a la duplicación de un fragmento de DNA de 1.5 megabases en el cromosoma 17p.11.2, que contiene el gen *PMP22* que codifica para la Proteína de la Mielina Periférica (también denominada PMP22). La proteína PMP22 es una glicoproteína de 22 kDa hidrofóbica de 160 aminoácidos. Constituye uno de los componentes más importantes de la mielina representando el 3-5% de las proteínas que forman parte de su estructura. Se expresa de forma predominante en las células de Schwann y se encuentra en la mielina compacta

(*Snipes et al, 1992; Naef et al, 1998*). Se le atribuye una función estructural realizando un papel crucial en su desarrollo y mantenimiento. El gen *PMP22* también juega un papel importante en el crecimiento celular ya que interviene en la regulación de la división, maduración y muerte celular (*Vallat et al, 2003*)

La mayor parte de la proteína se almacena en el retículo endoplásmico de la célula de Schwann para ser posteriormente degradada. Un pequeño porcentaje es transportado al aparato de Golgi donde es glicosilada para ser, posteriormente, incorporada a la mielina. La proteína PMP22 forma parte de la superfamilia de inmunoglobulinas y consta de dos dominios terminales intracitoplasmáticos, un dominio intracelular, dos dominios extracelulares y 4 dominios transmembrana hidrofóbicos. La sobreexpresión de la PMP22 reduciría la proliferación de las células de Schwann (*Vallat et al, 2003*).

En un 81% de los casos se encuentra una herencia dominante conocida. Entre ellos, en el 89% la duplicación es origen paterno y en el 11% restante el origen es materno. Se ha publicado que hasta un 19% de los casos son esporádicos (*Szigeti et al, 2009*).



En un pequeño porcentaje, el CMT1A es debido a la presencia de mutaciones puntuales en el gen. Estos representarían aproximadamente el 2-5 % del total de casos de CMT 1 A (*Hattori et al, 2003*).

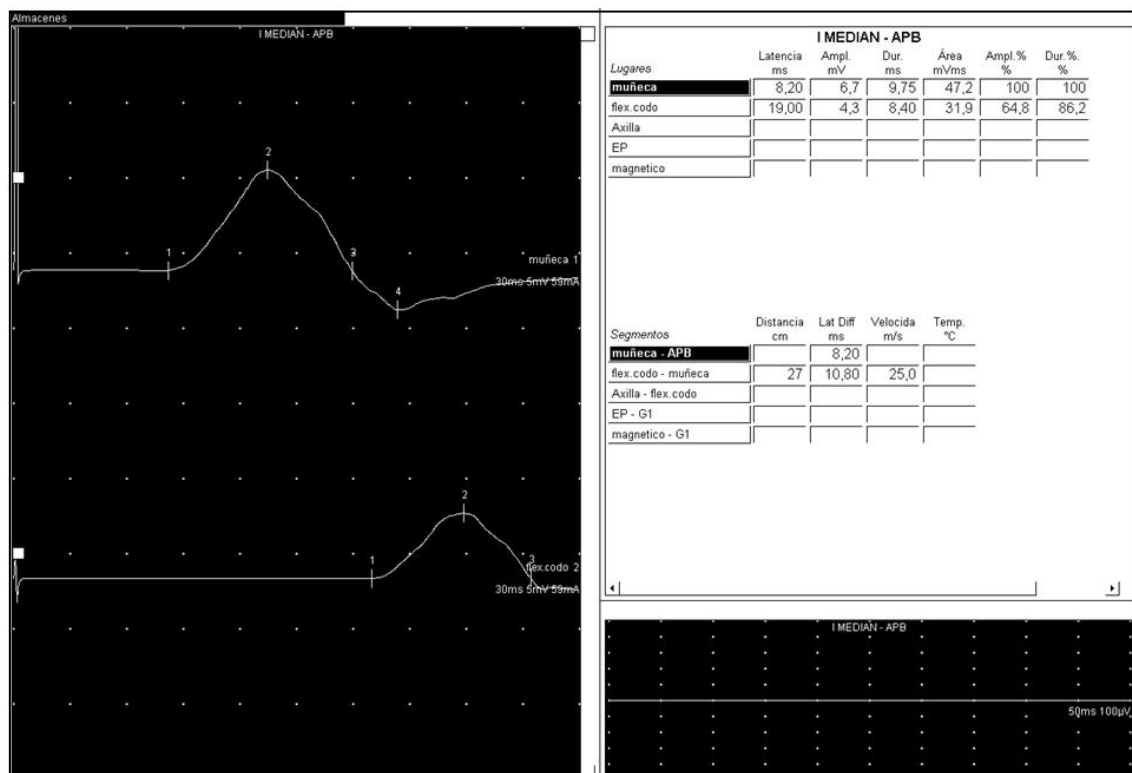
Los síntomas se inician mayoritariamente en la infancia, manifestándose con torpeza a la deambulación y deformidad en los pies. El paciente puede presentar calambres, que aumentan tras el ejercicio físico. No son frecuentes las alteraciones sensitivas positivas. A la exploración física destacan pies cavos (**Figura 2**), retracción aquilea y callosidades abundantes en los puntos de apoyo. Con el tiempo se añaden debilidad y atrofia de los músculos intrínsecos del pie y peroneales, condicionando marcha en pie caído o "stepagge" bilateral.

También pueden afectarse las manos, presentando *mano en garra* en casos extremos. Los reflejos, desaparecen en orden ascendente empezando por los aquíleos. En algunos pacientes existe escoliosis (10%) e hipertrofia de nervios (25%).



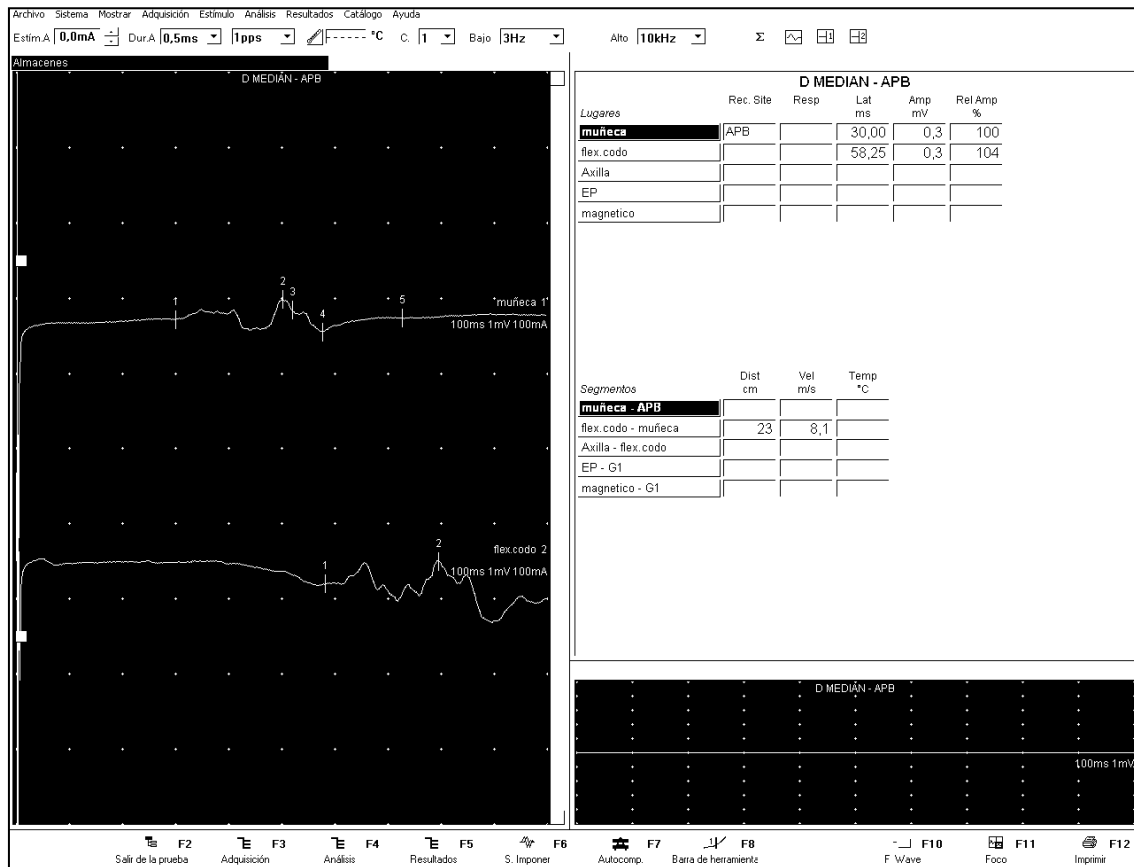
**Figura 2:** Deformación de los pies en forma de pie cavo y dedos en martillo en paciente con CMT1a y duplicación del fragmento que contiene la PMP22

Series extensas publicadas demuestran que las VCN en los estudios electrofisiológicos, están siempre en el rango desmielinizante y que, además estas VCN se mantienen constantes a lo largo de la evolución de la enfermedad, demostrando que la determinación de la VCN de la vertiente motora del nervio mediano (un nervio de extremidades superiores) es un marcador excelente para neuropatías genéticamente determinadas (**Figura 3**).



**Figura 3:** ENG motora de nervio mediado derecho en un paciente con CMT1A (duplicación *PMP 22*). Podemos observar un aumento de latencia distal y una VCN de 25 m/s. Este aumento de latencia y disminución de la VCN es desproporcionado a la disminución de la amplitud del CMAP cuya morfología se muestra homogéneamente cronodispersa

Son excepcionales los *bloqueos de conducción* y los fenómenos de *dispersión temporal o cronodispersión*, a diferencia de las neuropatías desmielinizantes adquiridas (**Figura 4**), y en casos aislados de CMT1 tipo B y C, de donde la mielina no se afectaría de forma homogénea, dando una característica dispersión de forma heterogénea del potencial (Stanton et al, 2006; Cleland et al, 2003; Thaisetthawatkul et al, 2002; Sander et al, 2003). También puede haber signos de degeneración axonal secundarios especialmente en extremidades inferiores (Kurihara et al, 2002).



**Figura 4:** Estudio electroneurográfico en nervio mediano motor derecho en paciente con Polirradiculoneuropatía desmielinizante crónica (CIDP). Se observa una intensa desmielinización (con aumento de latencias distales y disminución de VCN). En este caso la cronodispersión es heterogénea.

### **2.1.2 Neuropatía hereditaria por labilidad a las presiones**

El fenotipo clínico de estos pacientes se caracteriza por la presencia de neuropatías recurrentes en puntos de habitual compresión. Por lo tanto se presentan en forma de debilidad asimétrica desencadenada después de compresiones o traumatismos de relativamente poca intensidad. Con los años de evolución, estos pacientes, debido a compresiones repetidas que pueden no llegar a ser del todo reversibles, pueden llegar a tener un solapamiento clínico y electrofisiológico significativo con el CMT1.

Entre los hallazgos electrofisiológicos del NHLP se incluyen una VCN levemente disminuidas, aumento de latencias motoras distales y bloqueos de la conducción (Meuleman et al, A. 2001; Li et al, 2002; Shy et al, 2006; *Szigeti et al, 2009*).

En la mayoría de los casos (hasta el 85%) la NHLP es producida por las deleción de fragmento de 1.5 Mb en el cromosoma 17p.11, que incluye el gen *PMP22* que es exactamente la misma región que está afectada en el CMT1A. Han sido descritas familias con NHLP debida a mutaciones tipo *nonsense*, mutaciones tipo *missense*, cambios de la pauta de lectura con aparición de codones de terminación prematuros y cambios en la zona de *splicing*. También se han descrito familias cuyos miembros afectos se presentan clínica y electrofisiológicamente como una NHLP y los estudios genéticos ponen de manifiesto mutaciones en el gen *MPZ* (*Magot et al, 2008*)

### 2.1.3 CMT 1 B

Es debida a mutaciones en el gen que codifica para la proteína de mielina cero (MPZ). Esta es una proteína de 28Kd y 219 aminoácidos. Se encuentra mayoritariamente en las células de Schwann, y es la proteína más abundante en la mielina del nervio periférico encontrándose también en la mielina del sistema nervioso central. Es imprescindible para la estructura normal y función de la mielina. El gen que codifica para la MPZ tiene 6 exones y se encuentra en el cromosoma 1q22. La enfermedad está causada, en la mayoría de casos por mutaciones puntuales, sobre todo en los exones 2 y 3, que se corresponde con el dominio extracelular tipo inmunoglobulina. Se han descrito hasta el momento más de 95 mutaciones de este gen como causa de CMT (*Hattori et al, 2003; Shy et al, 2004; Lauria et al, 2007*).



**Figura 5:** Discreta deformación de pies en forma de pie cavo y dedo en martillo en paciente con CMT 1B

En estos pacientes, el inicio de los síntomas (**Figura 5**) puede ser más tardío y puede haber afectación de la motilidad pupilar y sordera. En los estudios electrofisiológicos se observa una distribución bimodal de las VCN con dos grupos, uno con velocidades en el rango desmielinizante y otro grupo con VCN situadas en el rango axonal. Estos hallazgos hacen todavía más difícil la clasificación del CMT ya que mutaciones en un mismo gen pueden causar tanto CMT desmielinizante como CMT axonal (*Gemignani et al, 2001; Street et al, 2002; Hattori et al, 2003*). También se han descrito familias en las que por los estudios electrofisiológicos podrían incluirse tanto en el grupo desmielinizante o en el grupo axonal y que formarían parte del grupo de CMT con VCN intermedias (*Mastaglia et al, 1999; Banchs et al, en prensa*). Así como la presencia de bloqueos de la conducción nerviosa (*Street et al, 2002*).

#### **2.1.4 OTROS TIPOS DE CMT 1**

Mutaciones en el gen *LITAF* y *ERG 2* que codifican para las proteínas Factor de necrosis tumoral inducido por polisacáridos, localizado en cromosoma 16p13.3-p12, y la proteína de Respuesta de crecimiento precoz-2 (en cromosoma 10q21.1-q22.1), producirían CMT 1 C y D respectivamente. En el CMT 1C se han descrito entre otros hallazgos electrofisiológicos la presencia de *dispersión temporal* y de *bloqueos*. El estudio molecular de ambos genes se realiza por secuenciación directa en busca de mutaciones puntuales en las zonas codificantes. (*Szigeti et al, 2009*)



## 2.2 CMT 2

En esta forma de CMT la mayoría de subtipos (**Tabla 1 y 2**) tienen una herencia autosómica dominante. Aunque dentro de CMT2 se incluye la variante AR-CMT2A y AR-CMT2B, limitadas a escasas familias y con genes LAMIN A/C y MED25 afectados y con herencia autosómica recesiva (**Tabla 1**).

Es imprescindible el estudio electrofisiológico inicial para distinguirla de la CMT1. Estos estudios pondrán de manifiesto unas amplitudes de los potenciales sensitivos y motores por debajo de los límites normales con unas VCN conservadas y proporcionadas a esa disminución de los potenciales (**Figura 7**).

Se diferencia de las atrofiás musculares espinales distales en que éstas tienen la neurografía sensitiva normal. La anatomía patológica evidencia degeneración axonal con relativa preservación de la mielina.

Tipo	Gen	Herencia	Locus
CMT 2A:	MFN2	Dominante	1p36
CMT 2B:	RAB7	Dominante	3q13-q22
CMT 2C:		Dominante	12q23-q24
CMT 2D:	GARS	Dominante	7p15
CMT 2E:	Neurofilament light chain	Dominante	8p21
CMT 2F:	HSPB1	Dominante/recesivo	7q11-q21
CMT 2G:		Dominante	12q12
CMT 2I:	MPZ	Dominante	1q22
CMT 2J:	MPZ	Dominante	1q22
CMT 2L:	HSPB8	Dominante	12q24
AR-CMT2A	Lamin A/C	Recesivo	1q21.2
AR-CMT2B	Med25	Recesivo	19q13.3
CMT 2K:	GDAP1	Recesivo/dominante	8q21

**Tabla 4.** Clasificación del CMT 2 (axonal)

### 2.2.1 CMT2A

En diferentes estudios de distintas poblaciones (Japón, Korea, Norte América) el CMT2A es la causa más frecuente de CMT 2 (Züchner *et al*, 2004; Chung *et al*, 2006; Sołtysińska *et al*, 2007). Esta causada por mutaciones en el gen *MFN2* que codifica para la proteína Mitofusina 2. Estas mutaciones producirían una neuropatía sensitivo-motora axonal con un fenotipo altamente heterogéneo. Se han descrito algunas asociaciones como la presencia de atrofia óptica y temblor, migraña y afectación de sistema nervioso central. En general, podemos encontrar mayor atrofia en extremidades (**Figura 6**) y ausencia de nervios hipertróficos a la palpación (Zuchner *et al*, 2006).



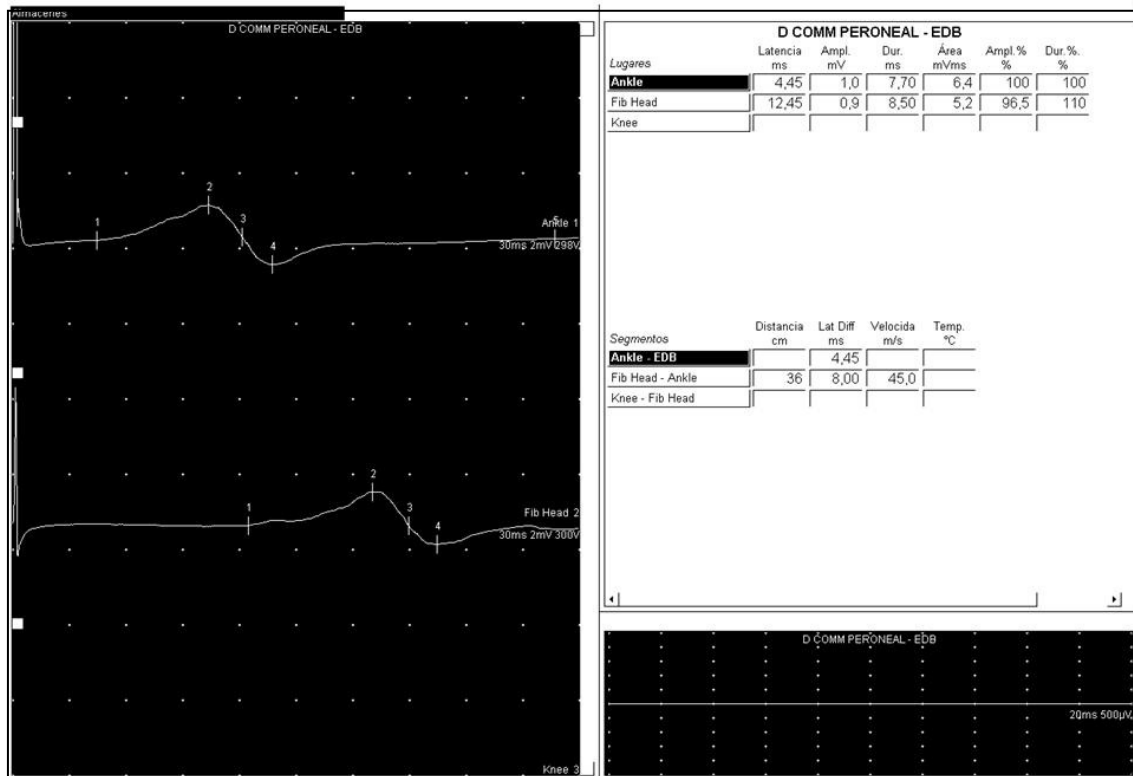
**Figura 6:** Atrofia también en extremidades superiores en un paciente con CMT2A y mutación puntual en el gen *MFN2*

Este subtipo se explicará con mayor detalle en el capítulo 2.7 "Clínica, electrofisiología y hallazgos moleculares del CMT2A"

### **2.2.2 Otros tipos de CMT2**

Son menos frecuentes y pueden presentarse con características peculiares (**Tabla 4**). El CMT 2B se presenta con fenómenos úlcero-mutilantes, el 2C con parálisis de cuerdas vocales y afectación del diafragma, 2D tiene preferencia por los músculos intrínsecos de la mano, el 2I tiene inicio tardío y el subtipo 2J se asocia a hipoacusia, alteraciones pupilares y grave afectación sensitiva. Estos dos últimos subtipos (el 2I y el 2J) corresponden a las mutaciones del gen *MPZ* que cursa con VCN conservadas, es decir en el rango axonal.

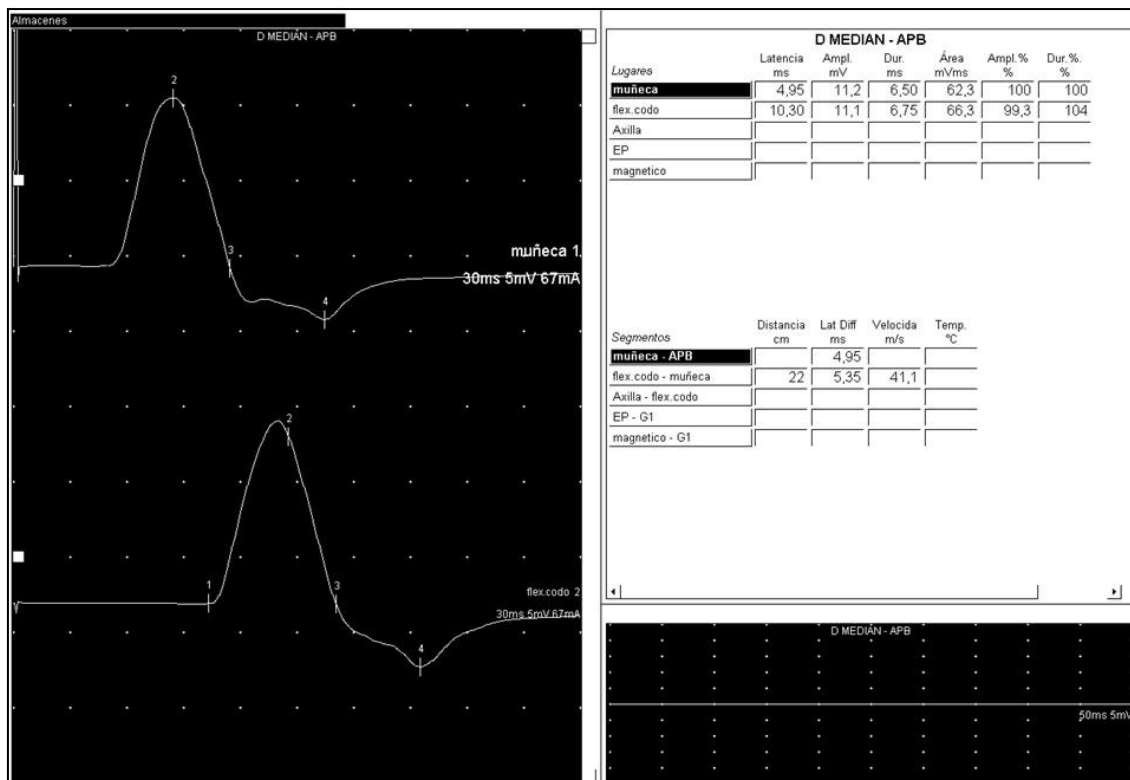
Por lo tanto, mutaciones en el gen *MPZ* pueden producir CMT tanto con VCN en rangos desmielinizantes (llamado CMT1B, comentado anteriormente) como CMT con VCN en rangos axonales (CMT2I y CMT2J). Incluso también se han descrito casos de CMT debidos a mutaciones del gen *MPZ* que causan VCN en el rango intermedio (*Mastaglia et al, 1999; Hattori et al, 2003; Shy et al, 2004; Banchs et al, en prensa*).



**Figura 7:** ENG motora de nervio ciático politeo izquierdo en un paciente con neuropatía sensitivo-motora axonal hereditaria. Podemos observar una disminución de la amplitud del CMAP sin un aumento significativo de la latencia distal ni reducción de la VCN

### 2.3 CMT con VCN intermedias

El CMT con VCN intermedias (DI-CMT) se divide en distintos subtipos dependiendo del gen mutado (**Tabla 5**). a) El DI-CMT tipo A ha sido localizado en una familia italiana en el cromosoma 10q24.1-q25.1. Se trasmite de forma dominante. El inicio de los síntomas es en la primera o segunda década de vida. Se caracteriza por debilidad de predominio distal, discreto déficit sensitivo, arreflexia y progresión lenta. Muchos de los miembros afectados de la familia no llegan a requerir de silla de ruedas. Las VCN oscilan entre 25 y 45 m/s (en el rango intermedio) (**Figura 8**).



**Figura 8:** ENG motora de nervio mediado derecho en un paciente con CMT y VCM intermedias. Podemos observar un discreto Aumento de la latencia distal y una VCN de 41.1 m/s. Sin embargo la amplitud del CMAP es normal

Los estudios anatomopatológicos ponen de manifiesto la pérdida de fibra gruesa mielinizada y ocasionales *bulbos de cebolla* (Rossi et al, 1985; Villanova et al, 1998; Verhoeven et al, 2001). B) El DI-CMT tipo B se asocia a mutaciones del gen *Dynamin 2 (DNM2)* en el cromosoma 19p12-p13.2. Se han descrito familias de múltiples orígenes con patrón de herencia dominante. El inicio de la clínica es en la primera o segunda década de vida y presenta una lenta evolución. Los estudios electrofisiológicos ponen de manifiesto la presencia de VCN en el rango intermedio de (24 a 54 m/s). Algunos miembros afectados presentan neutropenia y cataratas (Claeys et al, 2009). C) El DI-CMT tipo C se asocia a mutaciones del gen de la

*Tirosil-tRNA sintetasa (YARS)* en el cromosoma 1p34-p35. Se han publicado familias procedentes del medio oeste de los Estados Unidos y de Bulgaria. Presenta una progresión lenta a lo largo de décadas, muchos pacientes no requieren de silla de ruedas y se evidencian VCN en el rango intermedio (30 a 50 m/s) (*Jordanova et al, 2003 y 2006*)

Se han descrito otros tipos de CMT con VCN en el rango intermedio asociados a mutaciones de la MPZ (CMT-DI3) (*Mastaglia et al, 1999; Banchs et al, en prensa*), *Neurofilament Light Chain Protein (NEFL)* y, a mutaciones del gen *GJB-1* (CMT X) (*Miltenberger-Miltenyi et al, 2007*)

Tipo	Gen	Herencia	Locus
CMT DIA		Dominante	10q24
CMT DIB	DNM2	Dominante	19p12
CMT DIC	Tyrosyl-tRNA synthetase	Dominante	1p34
CMT DI3	MPZ	Dominante	1q22
CMT 2E:	Neurofilament light chain	Dominante	8p21
CMTX	GJB1	Ligado a X	Xq13

**Tabla 5.** Clasificación del CMT con VCN intermedias

## 2.4 CMTX

La forma más frecuente es la forma semidominante ligada a X causada por mutaciones en el gen *GJB-1*. Hasta el momento se han descrito más de 290 mutaciones distintas. El gen *GJB-1* codifica para la proteína Connexina 32. (*Janssen et al, 1997; Kurihara et al, 2002 ; Colomer-Oferil et al, 2002; Taylor et al, 2003; Hattori N, 2003; Murru et al, 2006*)

El gen se localiza en el cromosoma Xq13.1, los varones son hemizigotos e inician los síntomas antes presentando mayor intensidad de la sintomatología durante el curso de la enfermedad que las mujeres afectas, que son heterocigotas. Ellos suelen tener un inicio de la clínica en la primera década y ellas, hacia la tercera década (*Dubourg et al, 2001*).

Aunque raras, existen dos formas ligadas a X recesivas que se asocian a sordera, retraso mental y encefalomiелitis (*Bergoffen et al, 1993; Taylor et al, 2003; Murru et al, 2006*).

Este subtipo de CMT será explicado en el capítulo 2.6 (*Clínica, electrofisiología y hallazgos moleculares del CMTX*) con más detalle.

## 2.5 CMT 4

Se agrupa bajo este nombre las formas graves y recesivas de CMT (**Tabla 1 y 6**).

Tipo	Gen	Herencia	Locus
CMT 4A:	GDAP1	Recessive	8q21
CMT 4B1:	MTMR2	Recessive	11q23
CMT 4B2:	SBF2	Recessive	11p15
CMT 4C:	SH3TC2 (KIAA1985)	Recessive	5q32
CMT 4D (Lom):	NDRG1	Recessive	8q24
CMT 4E:	EGR2	Recessive/dominant	10q21
CMT 4F:	Periaxin	Recessive	19q13
HMSN-Russe (4G)		Recessive	10q23
CMT 4H:	FGD4	Recessive	12q12

**Tabla 6.** Clasificación del CMT4

La forma más común es la CMT4A causada por mutaciones en el gen que codifica para la GDAP1 (*ganglioside-induced differentiation-associated protein 1*). Se trata de una grave neuropatía sensitivo-motora de inicio precoz (**Figura 9**). Los estudios electrofisiológicos ponen de manifiesto la presencia de VCN tanto en el rango axonal como en el desmielinizante. Puede asociarse a parálisis de cuerda vocal (*Cuesta et al, 2002; Sevilla et al, 2003*).



**Figura 9:** Atrofia también en extremidades superiores en una paciente con CMT4A

La forma CMT4B1 está causada por mutaciones en el gen que codifica para la *myotubularin-related protein 2* o *MTMR2*. La enfermedad se inicia en la infancia. Se han descrito familias con afectación bulbar, facial, y diafragmática (*Bolino A, 2000; Houlden et al, 2001; Verny et al, 2004*). El locus de la CMT4B2 ha sido localizado en el cromosoma 11p15 en familias tunecinas (*Othmane et al, 1999*).



El locus del CMT4C fue localizado en el cromosoma 5q23-q33 (LeGuern et al, 1996) y ha sido publicada su asociación con la presencia de mutaciones en el gen *SH3TC2* o *KIAA1985* (Senderek et al, 2003). La principal característica de este subtipo de CMT recesivo es la presencia escoliosis (que se ha asociado a la mayoría de los pacientes afectados) (Dubourg et al, 2006).

Entre la población gitana con CMT recesivo es frecuente encontrar mutaciones en el gen *NDRG1*, que es diagnóstico del CMT tipo 4D (o también denominado "tipo Lom"; ya que Lom es la región de Bulgaria de donde se origina dicha mutación). El otro subtipo de CMT que se ha asociado a población de etnia gitana es el CMT tipo Russe. Esta subtipo ha sido descrito en población gitana de distintos países, como Bulgaria, Rumania, y España (Rogers et al, 2000; Thomas et al, 2001) y su locus ha sido localizado al cromosoma 10q23. Se caracteriza, desde el punto de vista clínico por un inicio de la sintomatología a una edad comprendida entre 8 y 16 años. La debilidad distal de extremidades progresa llegando a ser grave. Los estudios electrofisiológicos ponen de manifiesto la presencia de VCN moderadamente reducidas (Dubourg et al, 2006).

Los subtipos CMT4E y CMT4F han sido relacionados con mutaciones en el gen *EGR2* (*early growth response 2*) y al gen *PRX* (*periaxin*) respectivamente. El subtipo CMT4H ha sido asociado a un locus en el cromosoma 12p11.21-q13.11 (De Sandre-Giovannoli et al, 2005). (**Tabla 1 y 6**)

## 2.6 Clínica, electrofisiología y hallazgos moleculares del CMTX

### *Introducción*

La forma más frecuente de CMT ligado a X es la forma semidominante, causada por mutaciones en el gen *GJB-1* en el cromosoma Xq13.1. Representaría la segunda causa de CMT en distintas poblaciones después de la duplicación del PMP22 (*Kleopas et al, 2006*). Hasta el momento se han descrito 296 mutaciones distintas ([http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations /Mutations/Mutations.cfm](http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/Mutations/Mutations.cfm)). El gen *GJB-1* codifica para la proteína Conexina 32. (*Janssen et al, 1997; Kurihara et al, 2002 ; Colomer-Oferil et al, 2002; Taylor et al, 2003; Hattori et al, 2003; Murru et al, 2006*)

### *Clínica neuromuscular*

Los varones afectados suelen tener el inicio de los síntomas entre los 5 y 20 años de edad. La clínica es el resultado de la pérdida axonal. Clínicamente es indistinguible de los subtipos CMT1A y CMT1B, aunque parece que el CMTX sería más grave. Debemos considerar el CMTX como semidominante ligado a X, ya que las mujeres portadoras pueden manifestar síntomas, aunque lo hacen de forma más tardía y con menor intensidad que los varones. Ello es debido probablemente a la inactivación del cromosoma X, por lo que únicamente una parte de sus células de Schwann expresarían el alelo mutado del *GJB-1* (*Scherer et al, 1998*)

### *Hallazgos electrofisiológicos*

Clásicamente los pacientes afectados presentan VCN en el rango intermedio. Se evidencian latencias distales y latencias de ondas F levemente alargadas. Las VCN suelen ser más rápidas que en CMT1, pero suelen ser más lentas que en los pacientes con CMT2. La presencia de una familia con CMT con el patrón de herencia que sugiere ligado a X y VCN con estas características, aconsejaría la búsqueda de mutaciones en el *GJB-1*. Se ha llegado a afirmar que debido a este fenómeno de solapamiento en las VCN de los pacientes con CMTX, las mutaciones del *GJB-1* cursan tanto en forma de CMT1 como CMT2, aunque este tema no está falto de controversia (*Hahn et al, 1998; Silander et al, 1998; Boerkoel et al, 2002*). Probablemente el CMTX debería clasificarse fuera de los subtipos CMT1 y CMT2 ya que, en la era premoleculare, cuando se estableció el valor de corte de 38 m/s, el CMTX estaría infradiagnosticado (*Kleopas et al, 2006*).

### *Hallazgos a nivel de sistema nervioso central*

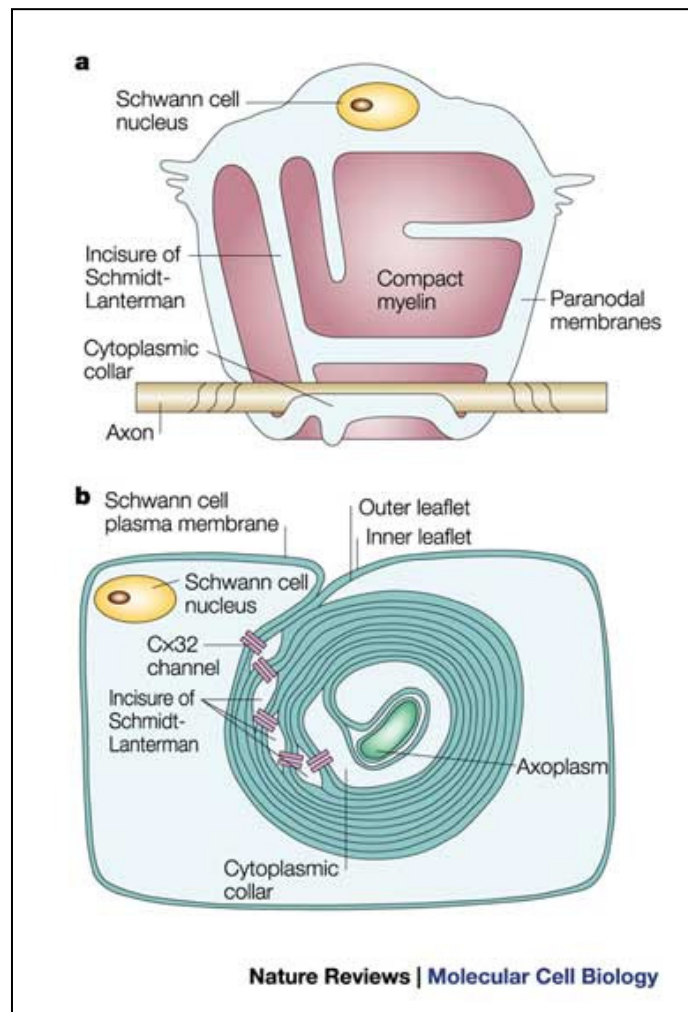
Algunas mutaciones en el *GJB-1* están asociadas a alteraciones en potenciales evocados de tronco cerebral, potenciales evocados visuales, y resonancia magnética cerebral. (*Nicholson et al, 1998; Bahr et al 1999*). Algunas mutaciones se han asociado a encefalopatías transitorias y, en ocasiones recidivantes, desencadenados por viajes a altitudes elevadas, infección o actividad física intensa (*Bergoffen et al, 1993; Taylor et al, 2003*).

Mutaciones del gen que codifica para la unión tipo gap Cx47 (el gen el *GJA12*) en homocigosis causan una severa leucodistrofia similar a la enfermedad de *Pelizaeu-Merzbacher* (*Uhlenberg et al, 2004*). Parece que en el sistema nervioso central, las funciones de las conexinas Cx32 y Cx47 se solapan. Por lo que algún efecto de las

Cx32 mutadas sobre la Cx47 podría explicar la afectación del sistema nervioso central. Se ha descrito también la presencia de sordera en contexto de mutaciones del *GJB-1*, aunque no queda clara su relación causal ya que esas mismas mutaciones se han descrito sin ella. No obstante, mutaciones en genes que codifican para otras conexinas se han relacionado con sordera hereditaria (*Buniello A, 2004*)

#### *Hallazgos anatomopatológicos*

Parece que las biopsias de pacientes con CMTX descritas hasta ahora en la literatura son semejantes. El hallazgo más llamativo es la pérdida de fibras mielinizadas asociado a un aumento del número de *clusters* de axones en regeneración dependiente de la edad. Muchas de las capas de mielina son anormalmente delgadas para el tamaño del axón aunque sin llegar esto a ser tan notable como lo observado en biopsias de pacientes con CMT1A. En algunos casos se evidencia "*bulbos de cebolla*". En los estudios de microscopía electrónica se observan alteraciones en la estructura de las *incisuras de Schmidt-Lanterman*, donde la Cx32 se localiza habitualmente. (**Figura 10**)



**Figura 10:** (a) capa de mielina “desenrollada”. Los paranodos y las incisuras son regiones donde la mielina no está compactada. La conexión del citoplasma queda tubular por lo que la unión entre las distintas zonas del mismo son largas y de pequeño diámetro. La difusión sería un mecanismo poco eficiente para el paso de moléculas entre el cuerpo celular y el citoplasma periaxonal. (b) Se muestra una célula de Schwann “enrollada”. Así en el sistema nervioso periférico, los canales intercelulares tipo unión gap, conectan distintas regiones dentro de la misma célula y también distintas células. Por tanto, la pérdida de esos canales resultará en el fallo en la homeostasis de la mielina. (Goodenough *et al*, 2003)

### *Mutaciones en el gen GJB-1*

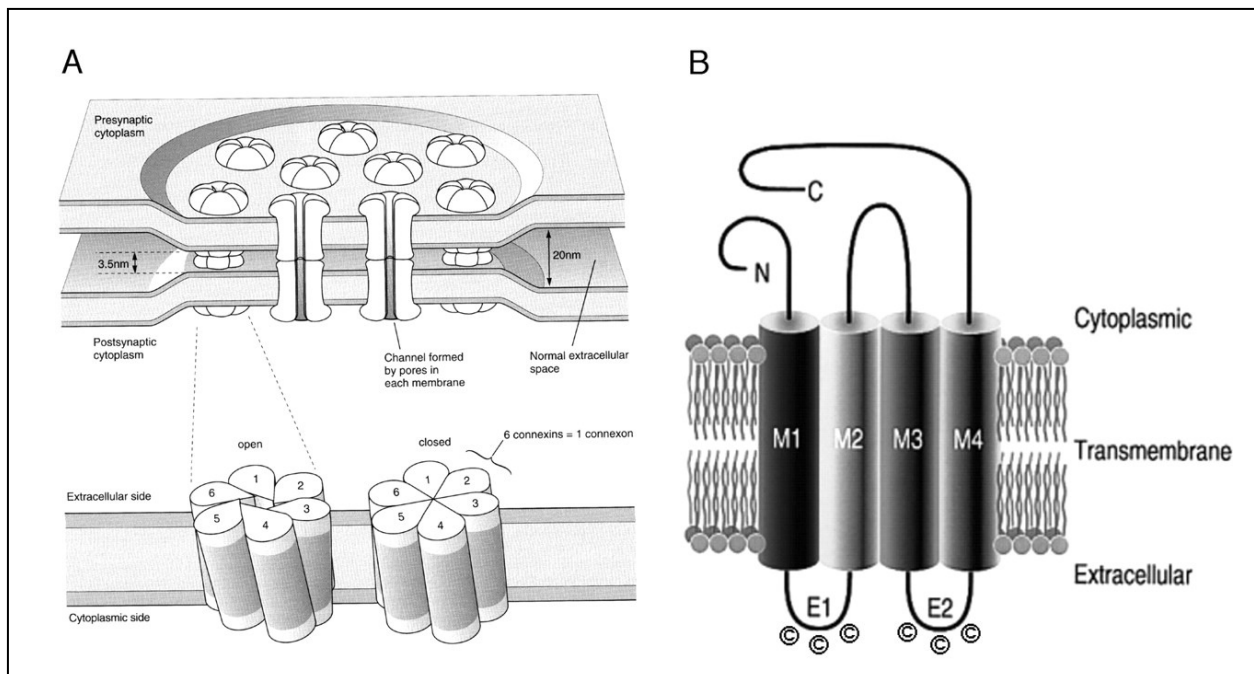
Hasta el momento se han descrito casi 300 mutaciones distintas (<http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/Mutations/Mutations.cfm>). Se incluyen tanto *missense*, *nonsense*, deleciones, inserciones y cambios en la pauta de lectura. Algunas de las familias descritas presentan la mutación en la *zona promotora* del gen. La Cx32 que se transcribe en el nervio periférico es principalmente iniciada por la región promotora P2 que se localiza muy cerca del Exón 2, que contienen la zona codificante del gen en su totalidad. Parece que serían muy poco frecuentes las mutaciones fuera de la zona codificante que causen CMTX y que, algunas variantes alélicas, no tienen porque causarlo (*Kleopas et al, 2006*).

Las mutaciones de la conexina 32 darían lugar a clínica de CMT por varios mecanismos, ya que las mutaciones que se han encontrado afectan de forma distinta a la proteína. Se han descrito cuatro patrones de localización distinta de la Cx32 en células mutadas (*Yum et al, 2002*):

1. No se detecta Cx32 a pesar que se expresa su mRNA,
2. La Cx32 está retenida en el retículo endoplasmático sugiriendo que el transito de la proteína se interrumpe a ese nivel,
3. La Cx32 está retenida en el aparato de Golgi sugiriendo que el transito de la proteína se interrumpe a ese nivel,
4. Provocando defectos en los hemicanales de conexina 32 de manera que no puedan llegar a formar la uniones tipo gap o que las formen pero con una permeabilidad alterada, observándose placas similares a unión gap (*unión gap - like*) en la superficie de la célula.

### La conexina 32

Las conexinas son un grupo de proteínas que forman estructuras hexaméricas en la membrana plasmática llamadas hemicanales o hemiexones. Estos hemicanales tienen un poro central que permite el paso de moléculas entre el citoplasma y el espacio extracelular (**Figuras 10 y 11 A**)



**Figura 11** (A) Esquema de los canales tipo Unión Gap. Cada una de las dos células opuestas contribuye con un hemicanal. Cada hemicanal está formado por seis subunidades llamada conexinas. Las seis conexinas que forman un hemicanal, pueden cambiar, de forma coordinada, cambiar la configuración para abrir o cerrar el hemicanal. (B) Los cilindros representan los dominios transmembrana (M1–M4). Los giros entre el primero y el segundo, así como entre el tercero y el cuarto, son los dominios extracelulares (E1 y E2, respectivamente) cada uno con tres residuos cisteína preservados (Söhl *et al* 2004)

Cada conexina tiene cuatro dominios transmembrana y los extremos amino y carboxi terminales son intracelulares. Las dos asas extracelulares restantes están altamente conservadas y son las responsables, de la unión de las dos conexinas expresadas en la membrana de células adyacentes para formar una unión tipo gap **(Figuras 11 A, 11 B y 12)**

La nomenclatura de las conexinas es Cx seguido de su peso molecular, así, la conexina 32 (Cx32) pesa 32 Kda. La función clásica de las conexinas es la formación de uniones de tipo gap entre células, permitiendo el acoplamiento eléctrico y metabólico entre células mediante el paso directo entre ellas de iones y segundos mensajeros de hasta 1 kDa (Na, K, Ca, cAMP...). Son canales no selectivos y el movimiento a través del canal es a favor de gradiente, modulado por la diferencia de potencial. La Cx32 fue la primera en describirse y tiene una expresión ubicua. Sin embargo se supone que la función de la Cx32 en otros órganos distintos del sistema nervioso periférico podría ser suplida por otras conexinas, ya que las mutaciones en el gen que codifica para la Cx32 produce de forma predominante neuropatía periférica.

En los nervios periféricos la Cx32 se expresa en las células de Schwann, encargada de la formación de la vaina de mielina, concretamente en las *regiones paranodales* y en las incisuras de *Schmidt-Lanterman* de la vaina de mielina, donde la Cx32 hace uniones que permitirían una vía directa entre el citoplasma perinuclear y el adaxonal de las células de Schwann, facilitando así la distribución de nutrientes, mensajeros, retornando la concentración de K<sup>+</sup> a niveles basales después de un potencial de acción.

Los estudios electrofisiológicos demuestran que la conexina 32 se activa con la despolarización de la membrana. Estos hemicanales se abren con el aumento de calcio intracelular y que puede cerrarse con bloqueadores de las uniones tipo gap o con péptidos específicos.



La importancia de CMTX viene determinada por un lado, por su frecuencia, siendo, según estudios la segunda causa de CMT en distintas poblaciones Y, por el otro lado, por la tendencia a presentar VCN en el rango intermedio con ese fenómeno de solapamiento que se ha comentado, con los rangos axonales y los rangos desmielinizantes.

Debido a estas dos características, el CMTX podría ser considerado en el estudio molecular tanto de pacientes con VCN en rangos desmielinizantes como en pacientes en rangos axonales.

## **2.7 Clínica, electrofisiología y hallazgos moleculares del CMT2A**

### *Historia*

El locus del CMT2A fue inicialmente localizado en el cromosoma 1p36 (*Ben Othmane et al, 1993*). En 2001 una mutación en el gen *kinesin motor protein B (KIF1B)* fue publicada en una única familia de origen japonés sugiriendo que ese era el gen afectado en el CMT2A. En ese mismo trabajo un ratón knockout con *Kif1b* mutado en heterocigosis desarrolló un fenotipo de tipo neuropatía (*Zhao et al, 2001*). Sin embargo, trabajos posteriores no pudieron encontrar otras familias con mutaciones en ese gen. En 2004 se hizo un *screening* con 15 genes candidatos distintos situados en esa region y se identificó el gen *mitofusina 2 (MFN2)* como la causa subyacente de CMT2A (*Züchner et al, 2004*).

### *Epidemiología*

En diferentes estudios poblacionales, en Japón, Korea y Norte América, la causa más frecuente de CMT 2 es el CMT 2 A (Züchner *et al*, 2004; Chung *et al*, 2006; Sołtysińska *et al*, 2007). Su frecuencia oscilaría entre 12 y 30% según las series y según se trate de familias con herencia dominante conocida o casos esporádicos. Mutaciones en el gen *MFN2* sería la causa más frecuente causante de CMT después de la duplicación de la PMP 22 e incluso que el *GJB-1*.

### *Clínica del CMT2A*

El fenotipo es muy heterogéneo con penetrancia variable existiendo mutaciones asociadas a un inicio a edades tempranas y mutaciones asociadas a un inicio tardío. Se han descrito algunas asociaciones frecuentes como la presencia de atrofia óptica y temblor, migraña y afectación de sistema nervioso central. En general, podemos encontrar mayor atrofia en extremidades (**Figura 6**) y ausencia de nervios hipertróficos a la palpación (Zuchner *et al*, 2006).

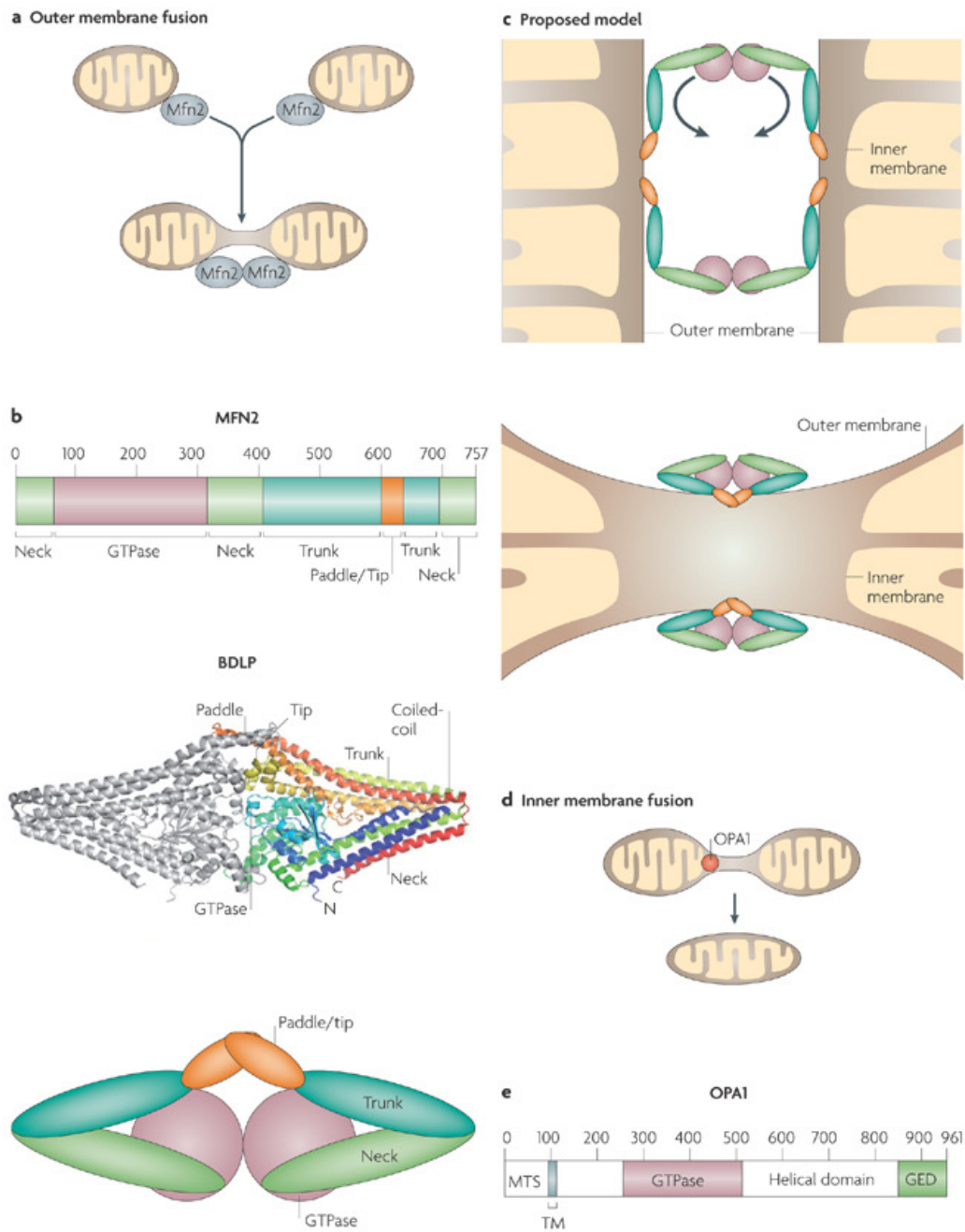
### *La Mitofusina 2*

La Mitofusina 2 es una GTPasa que está implicada en la fusión de la mitocondria. Se expresa de forma ubicua, está presente en médula espinal, músculo, corazón y nervio periférico. En la célula se encuentra en la membrana mitocondrial externa, anclada a ella mediante el dominio C-terminal. Consta además de un dominio GTPasa, N-terminal que está localizado en el citoplasma. Este dominio puede formar un complejo con otra proteína mitocondrial, la mitofusina 1. Regula la arquitectura de la red mitocondrial mediante la fusión de las mitocondrias, (Santel *et al*, 2001; Rojo *et al*, 2002; Bach *et al*, 2003; Chen *et al*, 2003; Züchner *et al*, 2006; Guillet *et al*, 2009) (**Figura 13**).

A pesar que, como se ha mencionado, la MFN2 se expresa de forma ubicua, la mutaciones del gen que codifica para la MFN2 produce de forma preferente neuropatía axonal (*Bach et al, 2003*). Esto podría ser explicado por las características propias del nervio periférico donde debe mantenerse un transporte intracelular a través de gran distancia a lo largo de todo el axón y ello requeriría de la formación de una extensa red de mitocondrias para poder mantener el axón del nervio periférico (*Kijima K, 2005*).

Recientes estudios sugieren que la MFN1, otra proteína que se encuentra en la membrana mitocondrial, podría mantener la función de fusión mitocondrial incluso en células que expresan MFN2 mutada gracias a la complementación de las funciones entre ambas proteínas. Sin embargo, las neuronas del sistema nervioso periférico, donde la MFN1 se expresa en niveles bajos, podrían estar específicamente afectas en pacientes con CMT2A debido a la presencia de MFN2 mutada de la que dependería en exclusiva la fusión de las mitocondrias para mantener la arquitectura de la extensa red mitocondrial.

Por otro lado, la función mitocondrial, podría ser normal en células que expresaran la MFN1 a niveles suficientes para compensar la deficiencia de MFN2, como por ejemplo, en fibroblastos (*Rojo M, 2002; Chen H, 2003; Detmer SA, 2007*). Sin embargo en fibroblastos procedentes de biopsia de piel de pacientes con mutaciones en el *MFN2* y, a pesar que la morfología de la arquitectura de la red mitocondrial aparece inalterada, se ha demostrado la presencia de un defecto significativo en el acoplamiento de la cadena respiratoria mitocondrial y una reducción del potencial de membrana mitocondrial. Ello conlleva una reducción de la eficacia la fosforilación oxidativa y una reducción de la producción de ATP. Todo contribuiría a la fisiopatología de la CMT en pacientes con mutaciones de la *MFN2* (*Loiseau et al, 2007, Guillet et al, 2009*)



Nature Reviews | Neuroscience

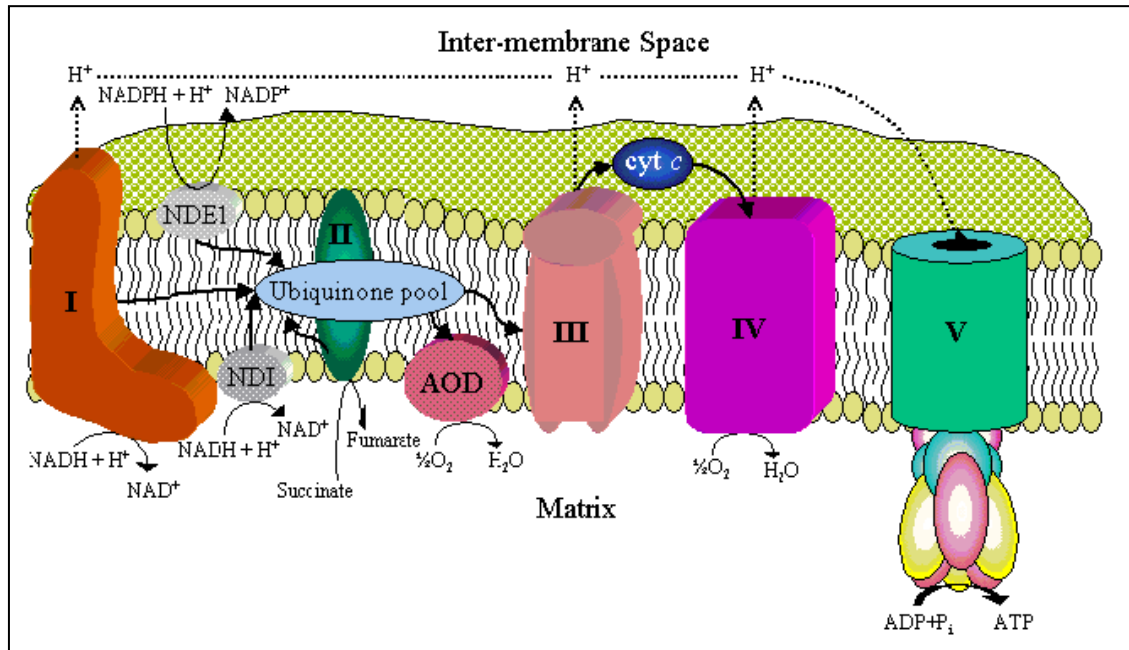
**Figura 13:** (a) La fusión de la membrana externa mitocondrial se facilita por la interacción de MFN2 homotípica que tiene lugar entre dos mitocondrias. (b) Modelo del dominio de la MFN2, se muestra el dominio GTPasa y el resto de regiones (c) El modelo propuesto para explicar el mecanismo de fusión mediado por la MFN2. Un dímero de MFN2 se une con el dominio hidrofóbico produciéndose un cambio de conformación (inducido por la hidrólisis de GTP). Es posible que otras proteínas estén implicadas. (d y e) Modelo de fusión mitocondrial mediado por la OPA-1 (Knott et al, 2008)

## La función mitocondrial

Las mitocondrias son orgánulos esenciales para el mantenimiento funcional y la viabilidad de las células. En las mitocondrias tiene lugar la producción de energía en forma de ATP, aunque en su interior también se realizan otras funciones importantes para la célula. La función principal de las mitocondrias es la producción de ATP a través del acoplamiento de la fosforilación oxidativa con la respiración aeróbica (sistema OXPHOS, **figura 14**).

En el año 1961 se propuso por primera vez un mecanismo por el cual las células derivaban ATP a partir del metabolismo oxidativo. Este sistema proporciona a la mayoría de tipos celulares alrededor del 90% de su requerimiento energético.

En la mitocondria entran ácidos grasos que se oxidan en acetilcoenzima A (acetilCoA) durante el proceso denominado beta-oxidación. El piruvato (producto final de la glucólisis en el citoplasma celular) también entra en la mitocondria y se descarboxila gracias a la piruvato descarboxilasa, la cual incorpora la molécula del coenzima A produciendo acetilCoA. La parte acetato de esta molécula se oxida en el ciclo de los ácidos tricarbónicos o ciclo de Krebs. Al final de este ciclo se generan dos moléculas de CO<sub>2</sub> y 4 pares de átomos de hidrógeno que se transfieren al dinucleótido de adenina y nicotinamida (NAD<sup>+</sup>) y al dinucleótido de flavina y adenina (FAD) los cuales se reducen en NADH y FADH<sub>2</sub> respectivamente. Estas dos moléculas presentan una capacidad donadora de electrones muy elevada, esta energía se va liberando a lo largo de una serie de reacciones redox en las crestas mitocondriales con la participación de complejos enzimáticos y coenzimas, constituyendo la cadena respiratoria mitocondrial (CRM) o cadena de transporte de electrones (**Figura 14**).



**Figura 14:** Cadena respiratoria mitocondrial (Extraído de Jack Kennell y lab co-workers en Saint Louis University en <http://pages.slu.edu/faculty/kennellj/index.html>)

La cadena respiratoria es un sistema complejo que debe responder a las necesidades energéticas de la célula. Mientras que hay tipos celulares con necesidades constantes (los hepatocitos) también los hay que presentan necesidades variables en cortos períodos de tiempo (es el caso del músculo esquelético).

La CRM está formada por una serie de complejos multiproteicos localizados en las membranas de las crestas mitocondriales que atraviesan la bicapa lipídica y sobresalen hacia la matriz y el espacio intermembranoso. Las coenzimas están disueltas en lípidos y difunden a lo largo de la membrana o a través de su superficie (**Figura 14**). El complejo I (NADH ubiquinona oxidoreductasa o también llamado

NADH deshidrogenasa) tiene la función de catalizar la transferencia de electrones desde el NADH a la ubiquinona o coenzima Q (CoQ). El complejo II (succinato CoQ oxidoreductasa) cataliza la oxidación del succinato a fumarato y transfiere también los electrones a la ubiquinona (en la CRM). El citocromo c (citocromo c oxidoreductasa), localizado en el espacio intermembrana, participa en la transferencia de electrones entre los complejos III y IV. El complejo IV (citocromo c oxidasa o también conocido como COX) transfiere 4 electrones desde el citocromo c a una molécula de oxígeno, creándose una molécula de agua.

Esta transferencia de electrones entre los complejos de la cadena respiratoria se aprovecha de forma indirecta para sintetizar ATP. Al principio de la cadena las moléculas reducidas NADH y FADH<sub>2</sub> transfieren los electrones del hidrógeno al siguiente complejo enzimático y liberan los protones a la matriz mitocondrial. Los electrones fluyen entre los complejos gracias a un gradiente electroquímico propiciado por los complejos III y IV y al transporte realizado por la ubiquinona y el citocromo c. La energía liberada durante este proceso de transferencia se usa en los complejos I, III y IV para bombear protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembrana. La acumulación de protones en este espacio frente a los electrones de la matriz, crea un potencial eléctrico que tiende a llevar a los protones de nuevo a la matriz. La distribución asimétrica de iones como Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> a lo largo de la membrana interna contribuye a la creación de un gradiente químico. Esta entrada de protones genera energía que es usada para sintetizar adenosina trifosfato (ATP) a partir de adenosina difosfato (ADP) y fósforo inorgánico.

Dos requisitos son necesarios para que se produzca la fosforilación oxidativa: integridad de la membrana interna (de forma que los protones que vuelven a la matriz solamente lo puedan hacer mediante un proceso acoplado a la síntesis de ATP) y concentración elevada de protones en el espacio intermembrana.

### *Estudio molecular*

La mayoría de mutaciones en el gen *MFN2* descritas son del tipo *missense*, aunque también se han descrito mutaciones tipo *nosense*. Estas mutaciones se han encontrado tanto en los dominios citoplasmáticos, en el dominio GTPasa o inmediatamente adyacente. Ocasionalmente se han encontrado *mutaciones de novo*. A pesar que la mayoría de casos son autonómico dominantes, se han descrito casos en homocigosis o en heterocigosis compuesta que puede producir una enfermedad más grave. El estudio molecular se realiza por secuenciación directa de los 19 exones de que consta el gen (*Rojo et al, 2002; Bach et al, 2003; Chen et al, 2003*).



**BENEFICIOS DE LA INVESTIGACIÓN**

**APLICABILIDAD Y VALIDEZ**

En el caso del CMT, la detección de una mutación genética constituye un diagnóstico molecular etiológico e identifica una neuropatía hereditaria. Permite clasificarla según el tipo de mutación hallada y el diagnóstico diferencial con otras causas de neuropatía adquirida. En las familias en las que se llega a un diagnóstico molecular, es posible la realización de diagnósticos prenatales y de portadores presintomáticos, cuando se solicitan y valoran convenientemente, en el ámbito de un adecuado asesoramiento genético. Los afectados de estas enfermedades pueden pues beneficiarse directamente de estos estudios a través de un diagnóstico molecular y consejo genético.

Es imprescindible encontrar y reportar mutaciones no descritas debido a que ello, aparte de ampliar el conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad, podrá simplificar el diagnóstico molecular, ya que, al quedar etiquetadas como patológicas no hace falta nuevos estudios bioquímicos, poblacionales y funcionales para comprobarlo.

Tanto el CMTX como el CMT2A son con toda probabilidad, como se ha demostrado previamente en otras poblaciones, muy frecuentes también en nuestro medio.

Conocer la verdadera frecuencia de mutaciones en el gen GJB-1 en familias que no tengan transmisión dominante varón a varón, permitirá establecer protocolos de diagnóstico más eficientes. Ello es debido a que, característicamente, este tipo de CMT tiene VCN intermedias y existiría un fenómeno de solapamiento entre las familias con CMT2 con VCN en los límites bajos dentro del rango axonal y aquellas familias con CMT1 y con VCN en los límites altos del rango desmielinizante. Ello hace pensar que, en nuestro medio, como parece que se intuye en estudios previos en otras poblaciones, el estudio de búsqueda de mutaciones del gen GJB-1 estaría indicado tanto en los protocolos de estudio de CMT1 como de CMT2.

En el CMT2A, causado por mutaciones en el gen MFN2, al ser una enfermedad recientemente descrita donde faltan muchos datos, especialmente de las

frecuencias reales en distintas poblaciones, no queda clara su rentabilidad hoy por hoy en una población como la española, y en la que ni siquiera existen estudios centrados en población mediterránea. Es imprescindible el estudio en nuestra población de las frecuencias de mutaciones en este gen, para saber, con certeza, si debe incluirse en los protocolos diagnósticos de CMT2.

El estudio de las mutaciones causantes de los subtipos de CMT, incluidos los genes *GJB-1* y *MFN2*, es importante conocer, además de sus frecuencias, también las características clínicas, electrofisiológicas, el patrón de herencia y rasgos clínicos adicionales que se puedan asociar a cada tipo. Ello nos ayudaría a ser más eficientes en el estudio del CMT. Un buen ejemplo de ello sería en estudio directo del CMT tipo "Lom" en familias de etnia gitana con CMT con patrón de herencia recesivo.

Por otro lado, el estudio de los polimorfismos genéticos va en aumento. A partir de los datos generados de su estudio se puede lograr entender, al menos parcialmente, los mecanismos de susceptibilidad a ciertas enfermedades. Por otra parte, es necesario estudiar el papel del medio ambiente y su influencia en los polimorfismos genéticos. En este contexto, se han demostrado asociaciones de cierto gen con una enfermedad, que son potenciados dependiendo de algunas condiciones ambientales.

Adicionalmente, los estudios acerca de la etiología y la subsiguiente patogenia de estas enfermedades, son una etapa esencial para futuras terapias que razonablemente han de surgir en los próximos años. Estas terapias serán, con toda probabilidad, específicas del defecto molecular etiológico y, por tanto, será imprescindible un estudio molecular previo de cada uno de estos casos. El estudio de las mutaciones causantes de CMT es imprescindible para profundizar en la fisiopatología de las enfermedades del sistema nervioso periférico en su totalidad y no solo de las neuropatías hereditarias.

**OBJETIVOS E HIPOTESIS DE  
TRABAJO**

## 1. Objetivos

El **objetivo principal** de este trabajo es el estudio molecular de los genes *GJB-1* y *MFN2* en dos cohortes distintas de pacientes con sospecha de CMT.

La primera cohorte, con pacientes de origen español y portugués, con herencia compatible ligada a X y la segunda cohorte, formada por pacientes de origen español y con formas axonales de CMT

Los **objetivos concretos** son:

1. Detectar y analizar mutaciones en los genes *GJB-1* y *MFN2* en los diversos individuos estudiados, para así:

Caracterizar el espectro de mutaciones en los genes *GJB-1* y *MFN2* en población española

Estudiar posibles asociaciones entre genotipo-fenotipo

Evaluar la frecuencia de estas mutaciones

2. Establecer la posible patogeneicidad de los cambios no descritos y de las variantes con efecto biológico dudoso identificadas durante el proceso de detección de mutaciones
3. Diseñar protocolos diagnósticos más eficientes de la enfermedad de CMT

## 2. Hipótesis

1. En la población española, las mutaciones del gen *GJB-1* son la causa más frecuente de CMT en pacientes pertenecientes a familias con patrón de herencia sospechoso de ser ligado a X.
2. Las regiones que con más frecuencia se encuentran mutaciones son los dominios extracelulares que son las zonas funcionalmente más importantes de la conexina 32.
3. En la población española, las mutaciones en el gen *MFN2* son la causa más frecuente de CMT axonal o CMT2.
4. Las regiones que con más frecuencia se encuentran mutaciones son el dominio GTPasa o las regiones adyacentes a el.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

## 1. Estudios clínicos y electrofisiológicos

Para la cohorte de pacientes destinada al estudio de mutaciones del gen *GJB-1*, fueron estudiadas 498 familias. Estas familias provenían de un total de 979 que habían sido referidas al Centro de Diagnóstico Genético y Molecular desde 1995 a 2006 desde los servicios de neurología o departamentos de genética molecular de España y Portugal con la sospecha clínica de CMT. De estas 979 se seleccionaron las familias que podían tener herencia ligada a X, descartándose las familias con herencia dominante y transmisión varón – varón y las familias con duplicación de gen *PMP22*.

Para el estudio de los miembros de la cohorte del gen *MFN2*, se recogió al menos un miembro afecto de cada una de 85 familias que habían sido remitidas al Centro de Diagnóstico desde 1994 a 2007 para estudio de CMT2. Todos los miembros afectados de estas familias presentaban una neuropatía sensitivo y motora axonal. Ninguno de los miembros afectados presentaba atrofia espinal distal ni fenotipo de CMT con afectación predominante de extremidades superiores. La exploración neurológica y los estudios electrofisiológicos fueron realizados en los centros de origen tanto en los miembros afectados como en los no afectados. 26 de los probandos fueron estudiados clínicamente y electrofisiológicamente por el mismo neurólogo en el Hospital Universitario de Bellvitge. Se clasificó la gravedad de la neuropatía de acuerdo con la *CMT neuropathy score* (CMTNS) de la siguiente manera: Leve (una puntuación menor o igual a 10), moderada (una puntuación entre 11 y 20), o grave (una puntuación mayor de 21) (*Shy et al, 2005; Sivakumar et al, 2005; Del Bo et al, 2006*) (**Tabla 1 en apartado de Anexos**)

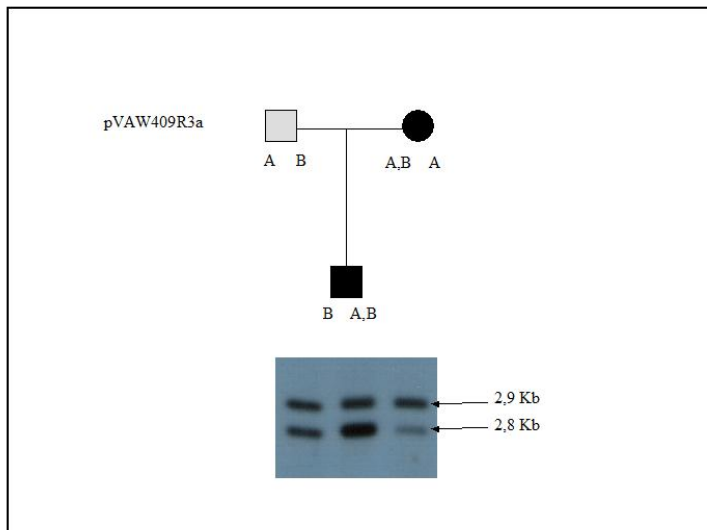


## 2. Estudios Genéticos

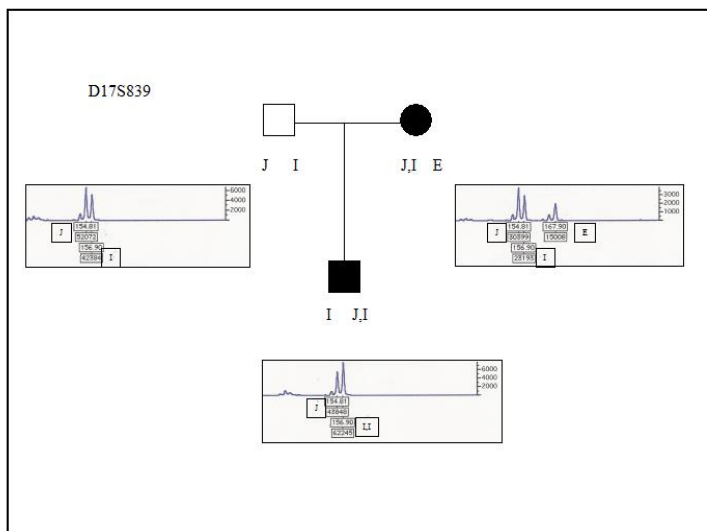
Se obtuvo el DNA de cada uno de los miembros de las familias, después de que fuera firmado un consentimiento informado, a partir de leucocitos de sangre periférica mediante la técnica de extracción por sales o extracción por fenol-cloroformo. A partir del 2003, para la extracción se utilizó el *kit Wizard (Promega)*.

### *Estudio de la cohorte con sospecha de herencia ligada a X*

Para el estudio en busca de cambios en el gen *GJB-1*, en primer lugar se descartó la presencia de la duplicación de 1.5 Mb causante del CMT1A. Para ello se analizaron 7 marcadores moleculares o microsatélites que se encuentran en la región duplicada de 1.5Mb. Los microsatélites utilizados para este estudio fueron D17S839, D17S921, D17S1356, D17S1357, D17S1358, D17S955, D17S261. Se amplifican mediante la técnica de PCR mediante cebadores marcados con fluorescencia y se analizaron mediante el secuenciador *ABI PRISM 3130 XL* y se realizó la interpretación de los resultados mediante *Genmaper*. Posteriormente se completó el estudio mediante *Southern blot* (**Figuras 15 y 16**)



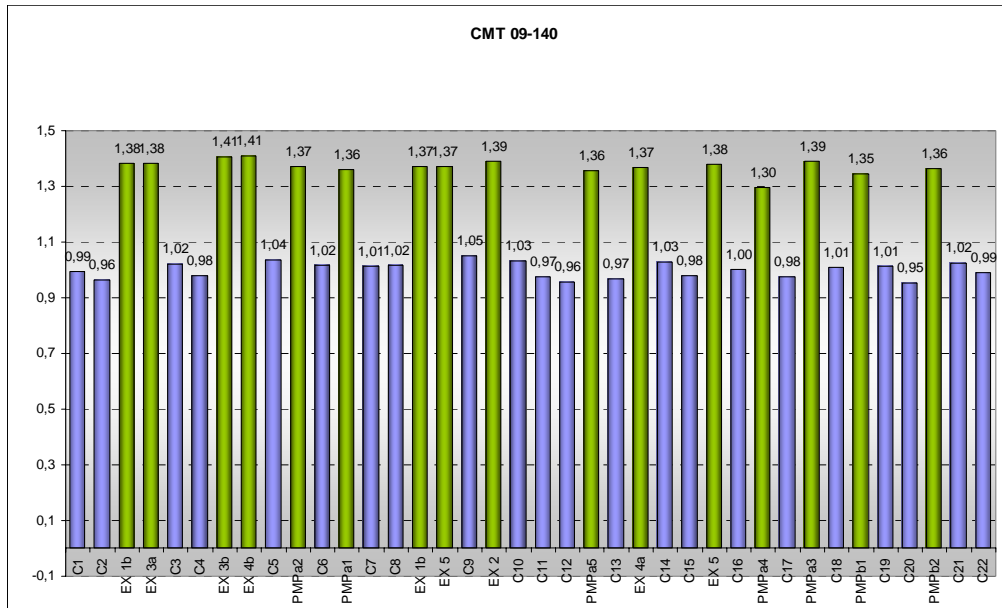
**Figura 15:** Estudio de Southern Blot de familia con duplicación de la *PMP22*



**Figura 16:** Estudio por microsatelites de familia con duplicación de la *PMP22*

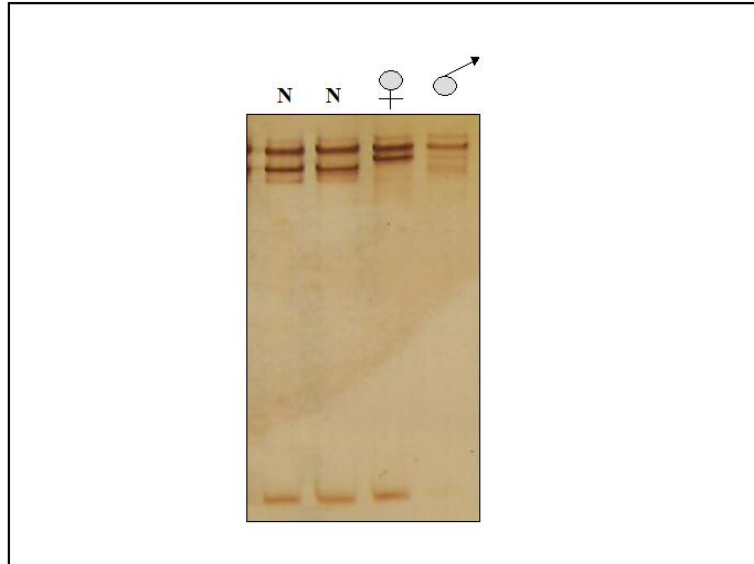
A partir de 2006, los estudios moleculares en búsqueda de mutación de la *PMP22* se realizan usando la técnica de MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*). Se amplifican 38 fragmentos de forma simultánea. Nueve de ellos incluidos en los distintos exones del gen *PMP22*, 7 en la región cercana al *PMP22* incluida en la duplicación, dos son fragmentos fuera de la región duplicada, y el resto de los fragmentos que se amplifican corresponden a fragmentos situados en

regiones de distintos cromosomas. Estos actúan a modo de controles, útiles para calcular dosis. Una vez realizada esta PCR se analiza mediante secuenciador ABI PRISM 3130 XL Genetic Analyzers. (*Southern et al, 1975; Lupski et al, 1991; Takahashi et al, 1992; Bell et al, 1998; Greenberg et al, 2005*) (**Figura 17**).



**Figura 17:** Estudio de MLPA de paciente con duplicación de la *PMP22*

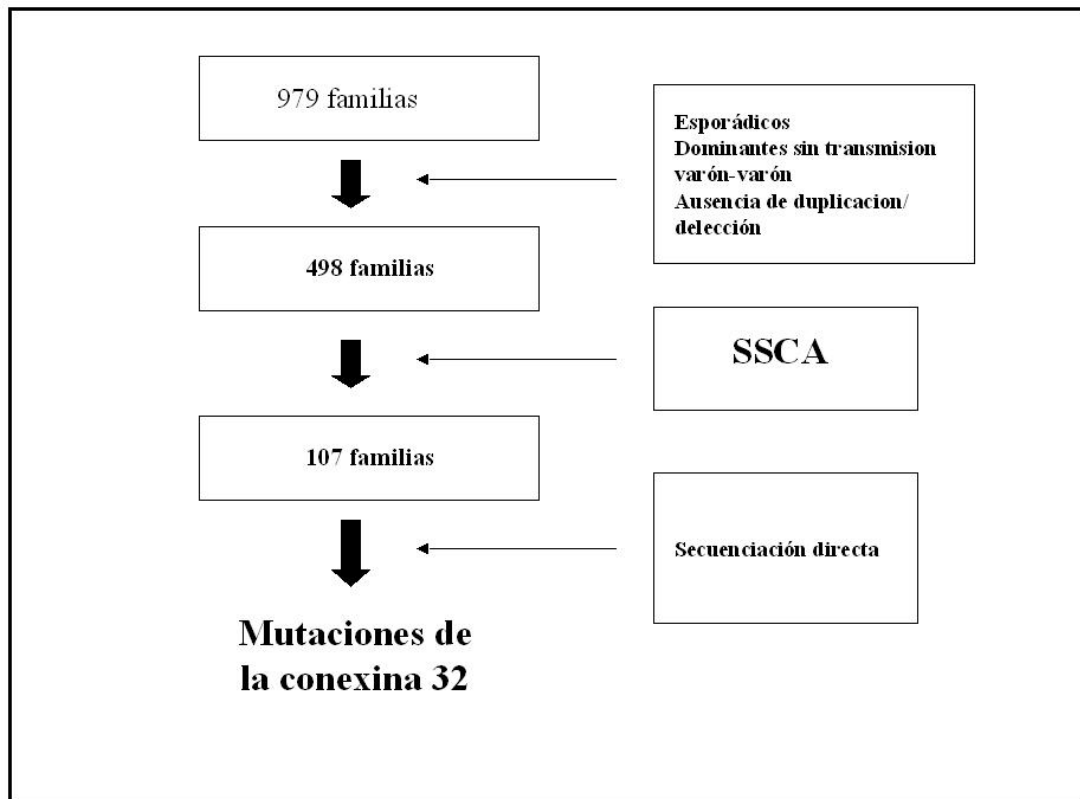
Posteriormente, una vez descartada la presencia de la duplicación del fragmento que contiene el *PMP22*, se amplificaron mediante PCR los dos fragmentos del exón 2 (exón codificante) del *GJB-1*. Los productos de esta amplificación, fueron inicialmente estudiados por SSCA (*single strand conformation análisis*) usando acrilamida al 10% y al 12% en busca de alteraciones en la migración del DNA por electroforesis (**Figura 18**).



**Figura 18:** Gel de acrilamida al 12% donde se observa por SSCA la migración del DNA de 4 individuos. Dos individuos (N) sin cambios y dos individuos con el mismo cambio (un varón hemicigoto y una mujer heterocigota)

Las 107 familias en las que por electroforesis se demostró una migración anormal del DNA, fueron secuenciadas directamente usando el secuenciador *ABI PRISM 3130 XL Genetic Analyzers* (**Figura 19**).

Los estudio poblacionales caso-control en la cohorte de estudio de *GJB-1* se realizaron buscando alteraciones del patrón de migración de DNA en 50 controles usando el análisis de SSCA en las mismas condiciones que los previamente descritas.



**Figura 19:** Esquema seguido para la selección de familias en la cohorte de estudio del gen *GJB1*

#### *Estudio de la cohorte con CMT 2*

De la cohorte de familias con CMT2, para estudio del gen *MFN2*, se descartó la presencia de mutaciones en gen *GJB-1* en familias con herencia dominante y sin transmisión varón – varón y en casos esporádicos, mediante secuenciación directa utilizando las condiciones descritas previamente (*Janssen et al, 1997; Kurihara et al, 2000; Taylor et al, 2003; Hattori N, 2001*). Los seis exones del gen *MPZ* fueron estudiados, en todas las familias, por secuenciación directa usando las condiciones descritas previamente (*Roa et al, 1996*). El gen *GDAP1* se estudió por secuenciación directa en familias con casos esporádicos (*Baxter et al, 2002; Cuesta*

A, 2002). Ninguna de las familias tenía miembros afectados con fenotipo CMT2D por lo que el gen *GARS* no fue estudiado (Sivakumar et al, 2005; Del Bo et al, 2006).

El estudio molecular del gen *MFN2* se inicio amplificando por PCR cada uno de los 19 exones utilizando los cebadores previamente publicados (Züchner et al, 2004). Los productos de la PCR fueron secuenciados directamente usando el *kit BigDye Terminator Reaction* (Applied Biosystems, Foster City, CA), u usando posteriormente un secuenciador *ABIPRISM 3130 XL – Genetic Analyzers* (Applied Biosystems).

Los estudio poblacionales caso-control en la cohorte de estudio de CMT2, se realizaron en las mismas condiciones en 100 alelos procedentes de 50 controles anónimos y en 30 controles clínica y electrofisiológicamente sanos.

### **3. Estudios funcionales en el paciente con la mutación Arg468His en el gen *MFN2***

#### *Cultivos Celulares*

Los fibroblastos fueron aislados a partir de una biopsia de piel realizada tras obtención de consentimiento informado. Los fibroblastos se conservaron en un medio de Eagle modificado por Dulbecco. Todos los cultivos estaban libres de mycoplasma. (Loiseau et al, 2007; Casserau et al, 2009; Guillet et al, 2009).

### *Parámetros respiratorios*

Las tasas de respiración fueron medidas en células permeabilizadas por exposición a digitonina (Loiseau et al, 2007) y registradas a 37°C usando un *Oxygraph respirometer* de dos canales y alta resolución (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). La respiración fue iniciada con los sustratos dependientes de complejo I (5 mM de malato y 5 mM de piruvato), la respiración acoplada al complejo I se midió añadiendo 0,5 mM de NAD<sup>+</sup> y 1,5 mM de ADP. La respiración acoplada máxima (complejos I + II) se obtuvo añadiendo succinato (10 mM) y la respiración acoplada del complejo II se obtuvo tras añadir 10 µM de rotenona. Finalmente, se determinó la respiración basal ligada al complejo II únicamente añadiendo oligomicina (Loiseau et al, 2007; Casserau et al, 2009; Guillet et al, 2009).

### *Eficiencia de la producción de ATP mitocondrial en células permeabilizadas*

Para medir la tasa de síntesis de ATP mitocondrial y la ratio ATP/O, se suplementó en buffer respiratorio R con 2 mM de iodoacetato y 2 mM EDTA, para evitar la síntesis de ATP glicolítico y la hidrólisis de ATP por parte de las ATPasas celulares respectivamente. La síntesis de ATP se inició añadiendo 5 mM de malato, 5 mM de succinato, 5 nM de piruvato y 0,5 nM de ADP. Se usaron tres alícuotas control a las que se añadió oligomicina para inhibir la síntesis de ATP mitocondrial. El ATP sintetizado fue medido usando un Enliten ATP assay (Promega, Madison, WI). La luminiscencia fue medida en un Miniluma luminometer (Berthold Technologic, Bad Wilbad, Germany) (Loiseau et al, 2007 ; Casserau et al, 2009; Guillet et al, 2009).

### *Actividades enzimáticas*

Se midieron las actividades de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial y citrato sintetasa en células homogeneizadas a 37°C en buffer celular usando un espectrofotómetro Beckman DU-640 (Beckman Coulter, Fullerton, CA), como se describió previamente (Loiseau et al, 2007 ; Casserau et al, 2009; Guillet et al, 2009).

### *Imágenes de fluorescencia*

El análisis de la red mitocondrial se realizó siguiendo la metodología previamente publicada. Las imágenes Z-stack se tomaron con una Leica (DMI6000B; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) y una Roper CoolSnap HQ2 camera (Photometrics, Roper Scientific, Tucson, AZ). Se usó el software MetaMorph (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) para el análisis de las imágenes. Se determinó el tamaño mitocondrial así como su número usando un análisis morfométrico integrado de las regiones creado al rededor de la mitocondria (**Figura 2 y tabla 3 en apartado 3 de Resultados**) (Loiseau et al, 2007; Casserau et al, 2009; Guillet et al, 2009)



#### 4. Estudios estadísticos

Se utilizaron test U de *Mann-Whitney* para las comparaciones estadísticas en los estudios funcionales. Las diferencias estadísticamente significativas fueron calculadas usando el test de  $\chi^2$ .

El 95% de intervalo de confianza (p) se obtuvo usando la expresión siguiente:

$$p \pm Z_{0.95} \cdot S, \text{ donde } Z_{0.95} = 1.96; q = 1-p; s = (pq/N)^{1/2}$$

## **RESULTADOS**

**1. Clinical and molecular analysis of X-linked Charcot-Marie-Tooth type 1 in Spanish population**

**Casasnovas C\***, Banchs I\*, Corral J, Martínez-Matos JA, Volpini V

\* Co-Autores al mismo nivel de contribución

*Clin Genet. 2006 Dec; 70(6):516-23.*

En este trabajo se estudian un total de 498 familias de origen español y portugués con sospecha de CMT y posible herencia ligada a X. Se encuentran 59 pacientes pertenecientes a 34 familias con 20 mutaciones distintas en el gen *GJB-1*, lo que representa un 6.82 +/- 2.2% de las familias estudiadas. Seis de las mutaciones no estaban previamente descritas.

Se estudia la frecuencia de afectación de los dominios de la proteína conexina 32. Se relaciona las mutaciones y su localización en la proteína con los hallazgos clínicos y electrofisiológicos disponibles.

## Short Report

# Clinical and molecular analysis of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease type 1 in Spanish population

Casasnovas C, Banchs I, Corral J, Martínez-Matos JA, Volpini V. Clinical and molecular analysis of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease type 1 in Spanish population. Clin Genet 2006; 70: 516–523. © Blackwell Munksgaard, 2006

From 1995 to 2004, 979 families with hereditary peripheral neuropathy were referred to the Genetic Diagnosis Center. Using single-strand conformation analysis (SSCA), the connexin 32 gene was analysed in all the patients from 498 families with sporadic or dominant inheritance with no male-to-male transmission and absence of the 17p2 duplication or deletion. Affected males had pes cavus, distal leg weakness, muscular distal atrophy, areflexia and distal sensory loss. The 106 families in which SSCA revealed abnormal migration electrophoresis were directly sequenced. We found 34 families (59 patients) with mutations in connexin 32 gene. In electrophysiological studies, 58.8% families presented slow and 14.7% intermediate nerve conduction velocities. Molecular findings revealed that codon 164 ( $29.4 \pm 15.3\%$ ) and the second extracellular (EC2) domain ( $44.1 \pm 16.6\%$ ) were the most frequently affected codon and domain of the connexin 32. Six novel mutations, Leu39fs, Glu47Gly, His153fs, Cys179Tyr, Cys201Phe and Ser211fs, were found in our study.

**C Casasnovas<sup>a,\*</sup>, I Banchs<sup>b,\*</sup>, J Corral<sup>b</sup>, JA Martínez-Matos<sup>a</sup> and V Volpini<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>Neuromuscular Unit, Neurology Department, Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, Feixa Llarga s/n, and <sup>b</sup>Genetic Molecular Diagnosis Centre of Inherited Diseases, Institut de Recerca Oncològica-IDIBELL, Hospital Duran i Reynals, Gran Via s/n, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

\*Coauthors at the same level.

Key words: Charcot-Marie-Tooth – CMT X – Connexin 32 – Cx32 – GJB1 – X-linked CMT

Corresponding author: Carlos Casasnovas MD, Neuromuscular Unit, Neurology Department, Hospital Universitari de Bellvitge, Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.  
Tel.: +34 932 607 711;  
fax: +34 932 607 414;  
e-mail: carloscasasnovas@csb.scs.es

Received 30 May 2006, revised and accepted for publication 28 September 2006

Charcot-Marie-Tooth (CMT) is a hereditary peripheral neuropathy characterized by distal muscle weakness, muscle atrophy, sensory loss and areflexia. By means of electrophysiology, CMT can be divided into demyelinating forms or CMT 1, with reduced nerve conduction velocities (NCV), and axonal forms or CMT 2, with NCVs in the near-normal range. CMT can be genetically divided in autosomal dominant, autosomal recessive and X-linked types (1–3).

CMT type X1 disease (CMTX1) is an X-dominant peripheral neuropathy caused by mutations in the GJB1 gene coding for the gap junction protein connexin 32 and located within the Xq13 region (4–6). Males are usually more severely affected, and the onset of symptoms is

earlier than in females. The electrophysiological studies frequently show demyelinating and intermediate NCVs (3, 5, 7–9).

The connexins are a family of structural proteins that are important for the formation of gap junctions. Normal conformation of connexin 32 reveals the presence of two extracellular (EC) loops (EC1 and EC2), four transmembrane (TM) regions (TM1, TM2, TM3 and TM4), one intracellular (IC) loop and two IC ends, carboxyl terminus (C) and amino terminus (N) (Fig. 1) (10, 11).

Molecular genetic analysis of the GJB1 gene is crucial for CMTX1 diagnosis and for genetic counselling. To date, molecular genetic analysis of the GJB1 gene revealed 283 mutations (2, 3, 7,

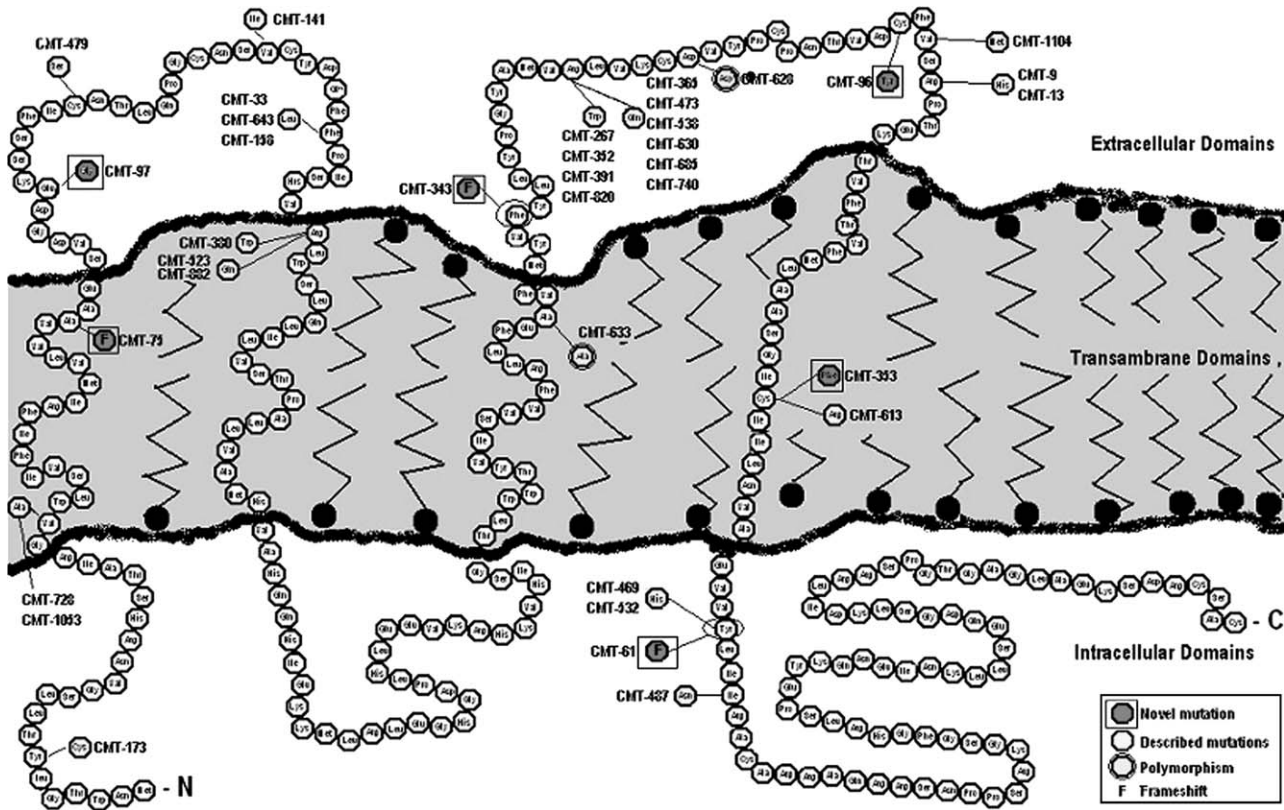


Fig. 1. Structure of connexin 32. The conformation of the protein shows the different intracellular, transmembrane, extracellular and terminal domains. Each mutation or polymorphism found is marked with the kind of change and the code of affected family.

8, 12–25). We report the molecular genetic analysis of 36 families (60 patients) of Spanish and Portuguese descent.

**Materials and methods**

From 1995 to 2004, 979 families with hereditary peripheral neuropathy were referred to the Genetic Diagnosis Center. DNA was isolated from white blood cells from all members of the family with the Wizard Promega kit. The molecular analysis first excluded the 1.4-Mb duplication-causing typical CMT 1A by means of microsatellite analysis using four polymorphic markers located in this region and Southern blot analysis (6, 26–28).

Families with dominant inheritance with no male-to-male transmission or sporadic pattern (498 families) were studied for changes in GJB1.

The 498 families studied were referred from Neurology Departments in Spain and Portugal with the suspected clinical diagnosis of hereditary peripheral neuropathy. Affected males had pes cavus, distal leg weakness, muscular distal atrophy, areflexia and distal sensory loss.

Affected females presented with less severe symptoms than affected males.

The two exons of GJB1 gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR). Amplification products of coding exon 2 were first screened by single-strand conformation analysis (SSCA) using 10 and 12% acrylamide and silver-stained gels to look for altered mobility pattern. The 106 families in which PCR products revealed abnormal SSCA migration electrophoresis pattern were directly sequenced using ABI PRISM 3100. No other altered mobility pattern was observed in 50 healthy controls using SSCA with the same conditions for all detected mutations.

The 95% confidence interval around observed proportions (*p*) was calculated according to normal distribution function as follows:  $p \pm Z_{0.95}\sigma$ , in which  $Z_{0.95} = 1.96$ ;  $q = 1 - p$ ;  $\sigma = (pq/N) \exp(1/2)$ .

**Results**

In 34 families (59 patients), molecular genetic studies revealed the presence of mutations in GJB1 gene. A total of 28 previously described and six novel mutations (Table 1) were defined.

Table 1. Changes found

Family	Base	Base number	Codon	AA	Domain	Described	Clinics	NCV	Inheritance	Affected	Females	Males
CMT-173	TAC→TGC	20	7	Tyr→Cys	N	Yes	SM N	Demyelinating	D No male-to-male	3	1	2
CMT-728	GTA→GCA	68	23	Val→Ala	TM1	Yes	SM N	Demyelinating	D No male-to-male	1	0	1
CMT-1053	GTA→GCA	68	23	Val→Ala	TM1	Yes	SM N	Demyelinating	D No male-to-male	1	0	1
CMT-479	TGC→AGC	157	53	Cys→Ser	EC1	Yes	SM N	Demyelinating	D No male-to-male	1	1	0
CMT-141	GTT→ATT	187	63	Val→Ile	EC1	Yes	SM N	Demyelinating	D No male-to-male	1	1	0
CMT-33	TTC→CTC	205	69	Phe→Leu	EC1	Yes	SM N	Demyelinating	D No male-to-male	4	3	1
CMT-643	TTC→CTC	205	69	Phe→Leu	EC1	Yes	SM N	Demyelinating	D No male-to-male	3	2	1
CMT-158	TTC→CTC	205	69	Phe→Leu	EC1	Yes	SM N	Intermediate	D No male-to-male	2	1	1
CMT-380	CGG→TGG	223	75	Arg→Trp	TM2	Yes	SM N	Intermediate	D No male-to-male	2	1	1
CMT-882	CGG→CAG	224	75	Arg→Gln	TM2	Yes	SM N	Intermediate	D No male-to-male	2	1	1
CMT-523	CGG→CAG	224	75	Arg→Gln	TM2	Yes	SM N	Intermediate	D No male-to-male	1	0	1
CMT-267	CGG→TGG	490	164	Arg→Trp	EC2	Yes	SM N	NDA	Sporadic PNE	1	0	1
CMT-352	CGG→TGG	490	164	Arg→Trp	EC2	Yes	SM N	NDA	NDA	1	0	1
CMT-391	CGG→TGG	490	164	Arg→Trp	EC2	Yes	SM N	NDA	Sporadic PNE	1	0	1
CMT-820	CGG→TGG	490	164	Arg→Trp	EC2	Yes	SM N	NDA	Sporadic PNE	1	0	1
CMT-365	CGG→CAG	491	164	Arg→Gln	EC2	Yes	SM N	Demyelinating	D No male-to-male	1	0	1
CMT-473	CGG→CAG	491	164	Arg→Gln	EC2	Yes	SM N	Demyelinating	D No male-to-male	1	0	1
CMT-538	CGG→CAG	491	164	Arg→Gln	EC2	Yes	SM N	Intermediate	D No male-to-male	2	1	1
CMT-630	CGG→CAG	491	164	Arg→Gln	EC2	Yes	SM N	Intermediate	D No male-to-male	2	1	1
CMT-685	CGG→CAG	491	164	Arg→Gln	EC2	Yes	SM N	Demyelinating	D No male-to-male	1	1	0
CMT-740	CGG→CAG	491	164	Arg→Gln	EC2	Yes	SM N	Demyelinating	Sporadic PE	1	0	1
CMT-1104	GTG→ATG	541	181	Val→Met	EC2	Yes	SM N	Demyelinating	Sporadic PE	1	0	1
CMT-9	CGC→CAC	548	183	Arg→His	EC2	Yes	SM N	Intermediate	Sporadic PNE	1	1	0
CMT-13	CGC→CAC	548	183	Arg→His	EC2	Yes	SM N	Intermediate	Sporadic PNE	1	0	1
CMT-613	TGC→CGC	601	201	Cys→Arg	TM4	Yes	SM N	Intermediate	D No male-to-male	3	2	1
CMT-469	TAC→CAC	631	211	Tyr→His	C	Yes	SM N	Intermediate	D No male-to-male	4	0	4
CMT-532	TAC→CAC	631	211	Tyr→His	C	Yes	SM N	Intermediate	D No male-to-male	4	0	4
CMT-487	ATC→AAC	641	214	Ile→Asn	C	Yes	SM N	Demyelinating	D No male-to-male	2	1	1
CMT - 75	Del C	115	39	Frameshift	EC1	No	SM N	Intermediate	Sporadic PE	1	1	0
CMT-97	GAG→GGG	140	47	Glu→Gly	EC1	No	SM N	Demyelinating	D No male-to-male	1	0	1
CMT-343	Del TT	458/459	153	Frameshift	EC2	No	SM N	Demyelinating	D No male-to-male	4	3	1
CMT-96	TGC→TAC	536	179	Cys→Tyr	EC2	No	SM N	Demyelinating	D No male-to-male	2	1	1
CMT-353	TGC→TTC	602	201	Cys→Phe	TM4	No	SM N	NDA	Sporadic PNE	2	1	1
CMT-61	Del G	633	211	Frameshift	C	No	SM N	Demyelinating	D No male-to-male	2	1	1
CMT-633	GCT→GCC	441	147	Ala→Ala	TM3	Yes	SM N	Demyelinating	Sporadic PNE	1	1	0
CMT-628	GAC→GAT	507	169	Asp→Asp	EC2	Yes	Polymorphism	Demyelinating	Sporadic PNE	1	1	0

SM N, sensitive motor neuropathy; NDA, no data available; D No male-to-male, dominant inheritance with no male-to-male transmission; sporadic PE, sporadic pattern with parents well explored; sporadic PNE, sporadic pattern with parents not well explored or only one of the parents well explored; demyelinating, nerve conduction velocity (NCV) less than 38 m/s; intermediate, NCV between 38 and 48 m/s.

Table 2. Size of connexin 32 domains and number of mutations found (in number of amino acids)

Domain	Size	Number of mutations
N	22	1
TM1	23	3
EC1	30	6
TM2	20	3
IC	34	0
TM3	21	0
EC2	40	15
TM4	15	2
C	77	4

Thirty-one families had missense point mutations, two families had deletion of one nucleotide and one family had a deletion of two nucleotides. These changes resulted in 31 families with amino acid substitutions and three families with a read-

ing frameshift causing a premature stop codon (Table 1).

Of these 34 families with mutations in GJB1 gene, 58.8% of probands presented with slow and 14.7% with intermediate NCV (Table 1).

The EC domains were affected in 64.6% (44% EC2 and 20.6% EC1) of mutations detected. The TM2, C, TM1, TM4 and N were affected in these proportions: 11.7, 11.7, 5.9, 5.9 and 2.9%, respectively. No mutation in IC or TM3 domains was found in our study. Codon 164 was affected in 10 families (Tables 1 and 2). Two previously described polymorphisms were found in two unrelated patients involving codons 147 (base number 441) and 169 (base number 507) (Tables 1 and 2).

Molecular genetic studies revealed the presence of six families with no previously described mutations. Females with changes were found in a heterozygous state and males in hemizygous

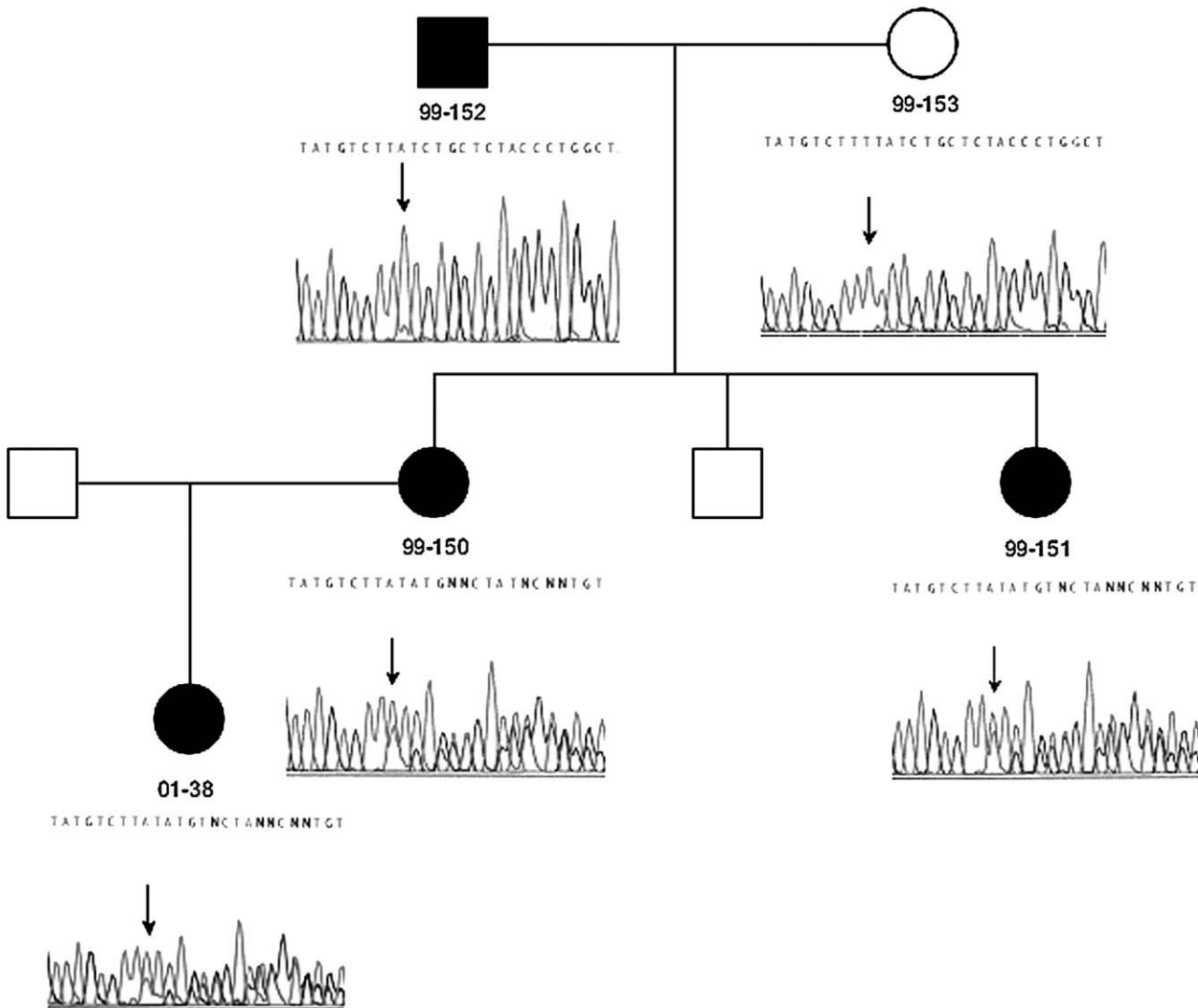


Fig. 2. CMT-343. Deletion of TT. Dominant inheritance with no male-to-male transmission. Affected male has the frameshift in homozygous state. Mildly affected females have the same change in heterozygous state.

state (10 affected family members). All the patients presented with a sensory motor neuropathy (with slow or intermediate NCV in 84%). Affected males had more severe clinical findings than affected females in the same family. The most frequent pattern was dominant with no male-to-male transmission (in three families). A deletion of one nucleotide was found in two families (a G deletion in CMT-61 and a C deletion in CMT-75) and a deletion of two nucleotides (TT) in family CMT-343 (Figs 1 and 2). The other three families described presented with point mutations causing amino acid substitutions (Table 1, Fig. 2).

**Discussion**

Screening for mutations in the GJB1 gene causing X-linked CMT was carried out in 498 families referred to our centre with a disease diagnosis of CMT in which we determined the

absence of 17p2 deletion or duplication. We have found 34 mutations ( $6.82 \pm 2.2\%$  of studied families) and two polymorphisms. Until now, molecular genetic analysis of the GJB1 gene has revealed 283 mutations. To the best of our knowledge, this is the largest series of mutations of the GJB1 gene that has been published (11, 14, 24, 25, 29–31). This represents 28 families with previously described mutations (48 patients), six families with novel mutations (10 patients) and the most frequently altered codons affecting the different domains of connexin 32.

In spite of the EC2 domain representing only 13% of the size of connexin 32, it is affected in  $44.1 \pm 16.6\%$  of the families in our series. The EC2 is the most frequently affected domain of connexin 32 in our series, suggesting that this is the most important functional area in the gap junction. The most frequently altered bases are number 490 (four families) and 491 (six families), both in codon 164, which causes Arg164Trp and

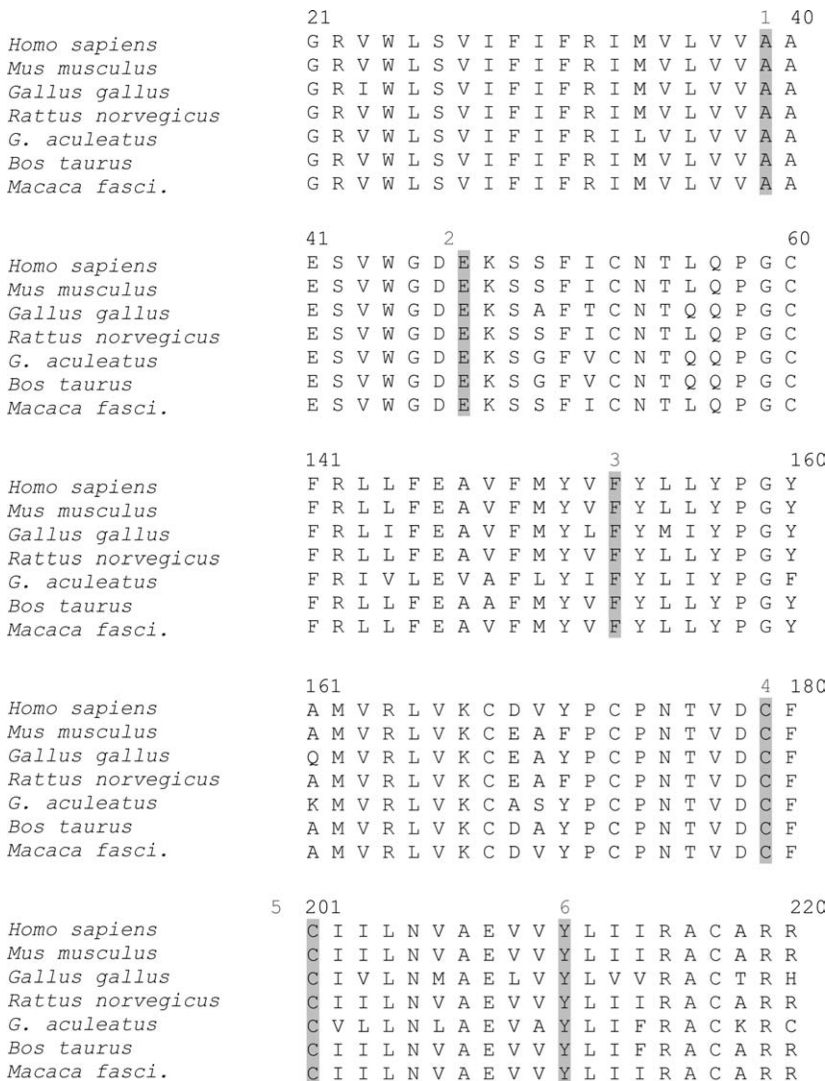


Fig. 3. Sequence of connexin 32 in different species. Amino acid sequence comparison in seven species. All the novel mutations are conserved within six species. 1. Site of CMT-75 deletion. 2. Site of CMT-97 amino acid substitution. 3. Site of CMT-343 deletion. 4. Site of CMT-96 mutation. 5. Site of CMT-353 mutation. 6. Site of CMT-61 mutation.



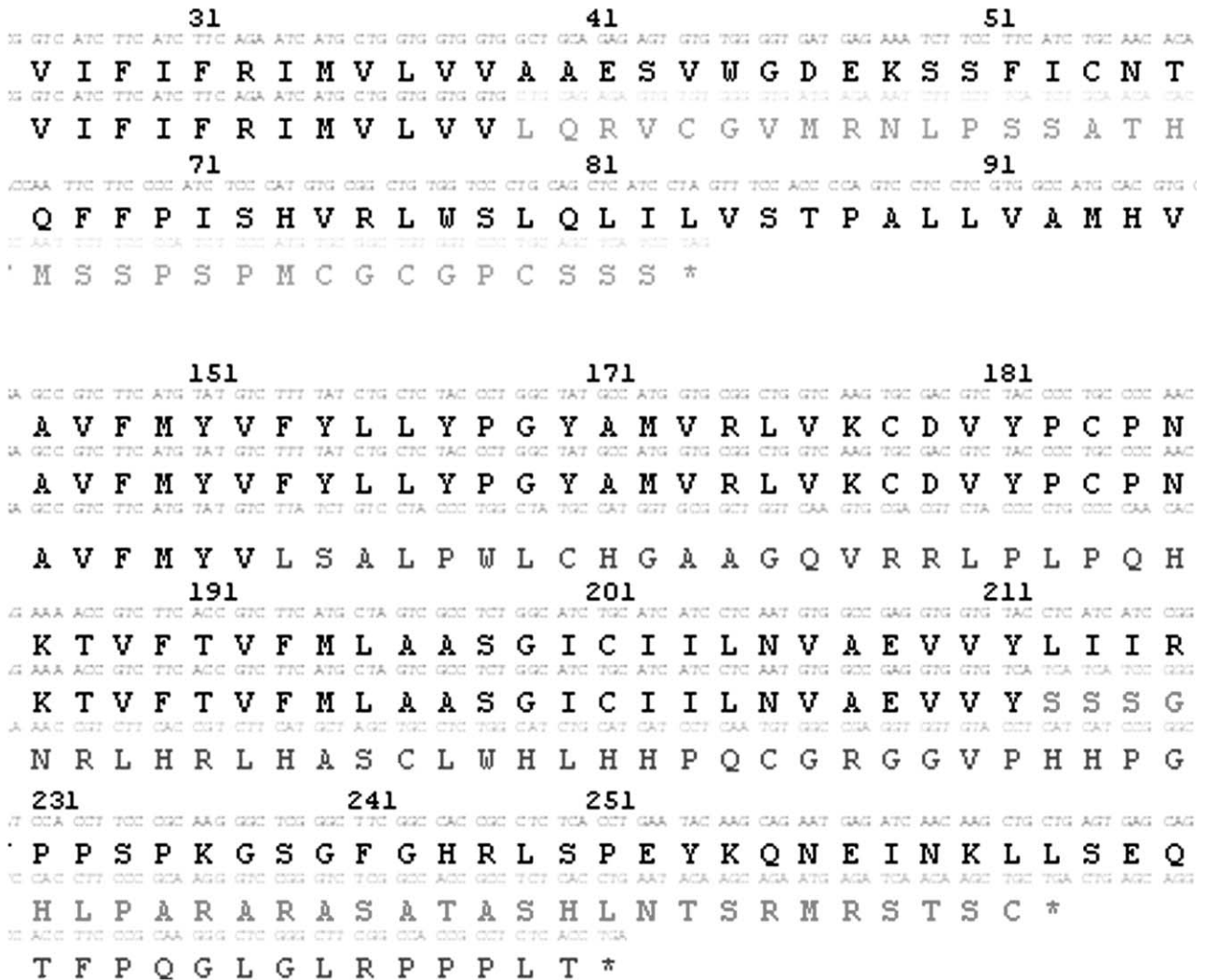


Fig. 4. Sequences of novel deletions. \*Stop codon. Control sequence. CMT-75. CMT-343. CMT-61.

Arg164Gln mutations. This area represents hot spots for point mutations. On the other hand, TM3 and IC domains together represent 19.4% of the total size of the protein, but no mutations have been found in either of these in our study (Fig. 1, Table 1).

Until now, there were few previously reported studies describing mutation localization frequencies in connexin 32, and all included fewer families.

Latour et al. described eight novel mutations and reviewed 57 previously reported mutations in GJB1 gene, including 21 French families, showing the presence of a high frequency of changes in the EC domains (19). Kochanski et al. described six mutations, three of these (50%) were also located in EC2 domain (18). Of the families with mutations in GJB1 gene, 58.8% of probands presented slow and 14.7% presented intermediate NCV in electrophysiological studies. Seventy-seven per cent of the families with intermediate

NCV (between 38 and 48 m/s) in electrophysiological studies had the mutation located in TM2 or EC2 domains (Table 1). Eight of the families with electrophysiological data available and mutations found in TM or IC domains (72.7%) had NCV in the demyelinating range (NCV less than 38 m/s) (Table 1).

In families CMT-61 and CMT-343 (Fig. 2), we found novel mutations comprising deletion of one (G) and two (TT) nucleotides causing a reading frameshift and a premature stop codon in C and EC2 domains causing a demyelinating form of neuropathy. One change in the same codon as CMT-61 has been previously described in a family with a similar neuropathy causing the amino acid substitution Tyr211His and a stop codon (31). In fact, we also detected a new example of this mutation in one of our described families (CMT-469) with low motor NCV. In family CMT-75 (Table 1), a change in the same

codon was first described but causing the missense mutation alanine for proline in codon 39 (Ala39Pro) (1) instead of the deletion of a C causing a premature stop codon. In our family, the proband is a female who had pes cavus, areflexia, distal sensory loss, mild distal leg weakness and muscular distal atrophy.

Electrophysiological studies revealed an NCV of motor ulnar nerve of 37 m/s, and she was the only member of the family with the CMT phenotype.

We have found three families with novel mutations comprising amino acid substitutions. They are located in highly conserved regions of GJB1 gene, suggesting critical function in the gap junction (Fig. 3). In CMT-96, two-generation family with dominant inheritance and with no male-to-male transmission is presented. Only affected members of the family were found to have the mutation (Fig. 4). Another family, CMT-613, with the previously reported Cys201Arg mutation and a demyelinating form of neuropathy is also described in our study. Hattori et al. has already described another change in this codon, Cys201Tyr (14). In our two families, the probands present the mutation in a hemizygous state, and the mildly affected mothers present with the mutation in heterozygous state. No mutation was found in their healthy paternal pedigree.

The molecular genetic analysis of the GJB1 gene is crucial for CMTX1 diagnosis and for genetic counselling. To date, a large series of molecular genetic analysis of the GJB1 gene has not been published, and the real frequency of mutations and affected domains are not known.

## References

- Nelis E, Haites N, Van Broeckhoven C. Mutations in the peripheral myelin genes and associated genes in inherited peripheral neuropathies. *Hum Mutat* 1999; 13 (1): 11–28.
- Tan CC, Ainsworth PJ, Hahn AF, MacLeod PM. Novel mutations in the connexin 32 gene associated with X-linked Charcot-Marie tooth disease. *Hum Mutat* 1996; 7(2): 167–171.
- Kuhlenbaumer G, Young P, Hunermund G, Ringelstein B, Stogbauer F. Clinical features and molecular genetics of hereditary peripheral neuropathies. *J Neurol* 2002; 249: 1629–1650.
- Huelnhe K, Benes V, Thief C et al. *Hum Mutat*. 2002: Mutation in Brief#572 Online.
- Pleasure D. Genetics of Charcot-Marie-Tooth disease. *Arch Neurol* 2003; 60: 481–482.
- Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; 98: 503–517.
- Houlden H, Girard M, Cockerell C et al. Connexin 32 promoter P2 mutations: a mechanism of peripheral nerve dysfunction. *Ann Neurol* 2004; 56: 730–734.
- Janssen E, Kempt S, Hensels G et al. Connexin 32 gene mutations in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMTX1). *Hum Genet* 1997; 99: 501–505.
- Zhou L, Hoke A. A novel insertional mutation in connexin 32 gene causes demyelinating polyneuropathy with predominantly motor axonal loss. *J Peripher Nerv Syst* 2004; 9: 1994–1995.
- Grace S, Liang L, De Miguel M, Gomez-Hernandez JM, Glass J, Scherer S. Severe neuropathy with leaky connexin 32 hemichannels. *Ann Neurol* 2005; 57: 749–754.
- Lopez-Bigas N, Olive M, Rabionet R et al. Connexin 31 (GJB3) is expressed in the peripheral and auditory nerves and causes neuropathy and hearing impairment. *Hum Mol Genet* 2001; 10 (9): 947–952.
- Ekici AB, Schweitzer D, Park O et al. Charcot-Marie-Tooth disease and related peripheral neuropathies: novel mutations in the peripheral myelin genes connexin 32 (Cx32), peripheral myelin 22 (PMP22), and peripheral myelin protein zero (MPZ). *Neurogenetics* 2000; 3: 49–50.
- Fairweather N, Bell C, Cochrane S et al. Mutations in the connexin 32 gene in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMTX1). *Hum Mol Genet*. 1994; 3 (1): 29–34.
- Hattori N, Yamamoto M, Yoshihara T et al. Gen Sobuc and the Group for Hereditary Neuropathy in Japan. Demyelinating and axonal features of Charcot-Marie-Tooth disease with mutations of myelin related proteins (PMP22, MPZ and Cx32): a clinicopathological study of 205 patients. *Brain* 2003; 126: 134–151.
- Ionasescu VV, Searby C, Ionasescu R, Neuhaus IM, Werner R. Mutations of the noncoding region of the connexin 32 gene in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Neurology* 1996; 47 (2): 541–544.
- Karadima G, Panas M, Floroskufi P, Kalfakis N, Vassilopoulos D. Four novel connexin 32 mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease with phenotypic variability. *J Neurol* 2006; 253: 263–264.
- Kochanski A, Nowakowski A, Kawulak M, Kabzinska D, Hausmanowa-Petrusewicz I. Somatic mosaicism in Charcot-Marie-Tooth type X disease. *Neurology* 2004; 62 (2): 336–337.
- Kochanski A, Kabzinska D. Molecular genetic analysis of the GJB1 gene: a study of six mutations. *J Appl Genet* 2004; 45 (1): 95–100.
- Latour P, Levy N, Paret M et al. Mutations in the X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease in the French population. *Neurogenetics* 1997; 1 (2): 117–123.
- Rouger H, LeGuern E, Birouk N et al. Links Charcot-Marie-Tooth disease with intermediate motor nerve conduction velocities: characterization of 14 Cx32 mutations in 35 families. *Hum Mutat* 1997; 10 (6): 443–452.
- Schiavon F, Fracasso C, Mostacciolo ML. Novel missense mutation of the connexin 32 (GJB1) gene in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Hum Mutat* 1996; 8 (1): 83–84.
- Sillen A, Anneren G, Dahl N. A novel mutation (C201R) in the transmembrane domain of connexin 32 in severe X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Hum Mutat* 1998; (Suppl. 1): S8–S9.
- Taylor R, Simon E, Marks H, Scherer S. The CNS phenotype of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. More than a peripheral problem. *Neurology* 2003; 61 (11): 1475–1478.
- Vondracek P, Seeman P, Hermanova M, Fajkusiva L. X-linked Charcot-Marie-Tooth disease: phenotypic expression of a novel mutation Ile127Ser in the GJB1 (connexin 32) gene. *Muscle Nerve* 2005; 31: 252–255.

## Analysis of X-linked Charcot disease

25. Yoshimura T, Ohnishi A, Yamamoto T, Fukushima Y, Kitani M, Kobayashi T. Two novel mutations (C53S, S26L) in the connexin 32 of Charcot-Marie-Tooth disease type X families. *Hum Mutat* 1996; 8 (3): 270–272.
26. Bell C, Haites N. Genetic aspects of Charcot-Marie-Tooth disease. *Arch Dis Child* 1998; 78 (4): 296–300.
27. Greenberg S, Walsh R. Molecular diagnosis of inheritable neuromuscular disorders. Part I: Genetic determinants of inherited disease and laboratory detection. *Muscle Nerve* 2005; 31: 418–430.
28. Greenberg S, Walsh R. Molecular diagnosis of inheritable neuromuscular disorders. Part II: Application of genetic testing in neuromuscular disease. *Muscle Nerve* 2005; 31: 431–451.
29. Boerkoel C, Takashima H, Garcia C et al. Charcot-Marie-Tooth disease and related neuropathies: mutation distribution and genotype-phenotype correlation. *Ann Neurol* 2002; 51: 190–201.
30. Bort S, Nelis E, Timmerman V et al. Mutational analysis of the MPZ, PMP22 and Cx32 genes in patients of Spanish ancestry with Charcot-Marie-Tooth disease and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Hum Genet* 1997; 99: 746–754.
31. Bissar-Tadmouri N, Parman Y, Boutrand L et al. Mutational analysis and genotype/phenotype correlation in Turkish Charcot-Marie-Tooth Type 1 and HNPP patients. *Clin Genet* 2000; 58 (5): 396–402.

## *Corrigendum*

Casasnovas C, Banchs I, Corral J, Martínez-Matos JA, Volpini V. Clinical and molecular analysis of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease type 1 in Spanish population. *Clin Genet* 2006; 70: 516–523.

The authors of the above paper would like to highlight the following errors:

- Page 517 Line 2: “60 patients” replace by “61 patients”
- Page 518. Table 1. In family CMT-61: “Del G” replace by “Del C”
- Page 520 Line 9: “a G deletion” replace by “a C deletion”

## *Corrigendum*

Casasnovas C, Banchs I, Corral J, Martínez-Matos JA, Volpini V. Clinical and molecular analysis of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease type 1 in Spanish population. *Clin Genet* 2006; 70 (6): 516–523.

Page 518. Table 1.

In family CMT-75: 'Del C' replace by 'Del G'

In family CMT-96: 'Sporadic PNE' replace by 'D No male-to-male'

In family CMT 343: '458/459' replace by 'c.459\_460delTT'

Page 520. Line 9-10.

'and a C deltion in CMT-75' replace by 'and a G deletion in CMT-75'

Page 522. Line 36.

Include:

'Acknowledgments: The authors want to thank Eva Nelis PhD (DNA Diagnostics Unit of the Department of Molecular Genetics of University of Antwerp) for her comments, indispensable for improving their work'

**2. Two Spanish families with Charcot-Marie-Tooth Type 2 A: clinical, electrophysiological and molecular findings.**

*Banchs I, Casasnovas C, Montero J, Martínez-Matos JA, Volpini V.*

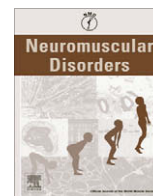
*Neuromuscul Disord.* 2008 Dec; 18(12): 974-8

En este trabajo se describen los hallazgos clínicos, electrofisiológicos, moleculares y de resonancia magnética en las dos primeras familias de origen español con mutaciones en el gen *MFN2* diagnósticas de CMT2A.

En primer lugar, se describen dos pacientes pertenecientes a una familia con CMT2A puro de inicio tardío. Se aporta los hallazgos clínicos y electrofisiológicos de los 17 años de seguimiento. Se aporta el estudio molecular que pone de manifiesto una mutación no previamente descrita. Se analiza la patogeneidad de dicha mutación.

En segundo lugar, se describen dos pacientes pertenecientes a una familia con CMT2A de inicio precoz asociada a atrofia óptica, los hallazgos clínicos tanto neurológicos como oftalmológicos y los estudios electrofisiológicos y de resonancia magnética. Los estudios moleculares confirmaron la presencia de una mutación ya descrita en la *MFN2*, aunque no descrita asociada a atrofia óptica.

Se discute la heterogeneidad clínica del CMT 2A.



## Two Spanish families with Charcot–Marie–Tooth type 2A: Clinical, electrophysiological and molecular findings

I. Banchs<sup>a</sup>, C. Casanovas<sup>b,\*</sup>, J. Montero<sup>b</sup>, J.A. Martínez-Matos<sup>b</sup>, V. Volpini<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Molecular Diagnosis Center of Inherited Diseases, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Bellvitge (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Unitat de Neuromuscular, Neurology Department, Hospital Universitari de Bellvitge (IDIBELL), Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 15 May 2008

Received in revised form 7 August 2008

Accepted 8 September 2008

#### Keywords:

MFN2

CMT 2

Axonal Charcot

CMT 2A

Mitofusin 2

CMT

Charcot–Marie–Tooth

### ABSTRACT

Mutations in the Mitofusin 2 (MFN2) gene have been related to the axonal type of Charcot–Marie–Tooth type 2 (CMT 2A). We report the first two Spanish families with CMT 2 and mutations in MFN2 gene. Molecular studies of one family with late onset revealed the novel mutation Arg364Gln. The affected family members presented mild clinical and electrophysiological worsening after 14 years of follow-up. The other family presented an early onset and optic atrophy. Molecular studies revealed the Arg94Gln mutation. This is the first report of a family in which this mutation is related to optic atrophy. Molecular analysis aimed at detecting mutations of MFN2 could be extremely useful in mild axonal neuropathies with slow evolution and indispensable in cases of dominant inheritance or optic atrophy. Population studies of mutations in MFN2 should be undertaken to discover the real frequencies in the Mediterranean area.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Charcot–Marie–Tooth (CMT) neuropathy is one of the most common hereditary diseases [1]. Clinically it is characterized by distal sensory loss, weakness, muscle atrophy, pes cavus, scoliosis and loss of deep tendon reflexes. Historically it has been divided in demyelinating forms (CMT 1) with decreased nerve conduction velocities (NCV) in the electrophysiological studies, and axonal forms (CMT 2) with conserved NCV [2]. The most common form of CMT 2 is the type 2A caused by mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 (MFN2) [3]. Initially a missense mutation in the KIF1 B gene on chromosome 1p35–36.19 in a single Japanese family was described as the cause of CMT 2A [4]. However, no further mutations were described in this locus. In posterior studies, CMT 2A has been linked to families with mutations in MFN2 on 1p36.2 near the KIF 1 B locus [3]. MFN2 is a mitochondrial GTPase protein that regulates the mitochondrial network architecture by fusion of mitochondria [5]. To date, 45 mutations have been described as causes of CMT type 2A [6]. Different clinical features such as Parkinsonism, tremors and optic atrophy have been associated with axonal neuropathy CMT, with dominant inheritance caused by mutations in MFN2. Families with severe neuropathy and very early onset have been described, as have families with mild neuropathy and late onset [7–10].

\* Corresponding author.

E-mail address: [carloscasanovas@idibell.org](mailto:carloscasanovas@idibell.org) (C. Casanovas).

In this article, we describe molecular findings from two Spanish pedigree families. The affected members of one family presented early onset axonal neuropathy, pes cavus, distal muscle atrophy, optic atrophy and dominant inheritance. The molecular studies revealed the Arg94Gln mutation in a heterozygous state in the affected family members. This mutation has previously been associated with “pure” CMT and CMT with tremors [3,6,7,11]. This is the first family in which this mutation is related to CMT with optic atrophy. In the other family, we describe more than 14 years of clinical and electrophysiological follow-up of affected members in which the molecular studies reveal the novel mutation Arg364Gln in the MFN2 gene.

This is the first report of Spanish families with mutations in MFN2. Molecular analysis aimed at detecting mutations of MFN2 could be extremely useful in mild axonal neuropathies with slow evolution and indispensable in cases of dominant inheritance or optic atrophy. This article also shows the importance of ophthalmologic examinations patients with axonal CMT caused by mutations in the MFN2 gene. Population studies of mutations in MFN2 should be undertaken to discover the real frequencies in the Mediterranean area.

### 2. Methods

We encountered four patients in two unrelated Spanish families. One family presented late onset (Family 1) and the other early onset

(Family 2) sensory and motor neuropathy. There was no distant consanguinity between the parents (Figs. 1 and 2a). Detailed neurological, ophthalmologic examination and electrophysiological studies were performed on the patients and on unaffected individuals. Cranial MRI was performed on one affected member in each family.

Blood samples were obtained with informed consent from all the members of the families. Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes. All exons of the MFN2, Myelin Protein-0 (MPZ), Connexin 32 (Cx32) and Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 (GDAP1) genes were screened by direct DNA sequencing. Polymerase chain reaction (PCR) primers have been reported previously [3,12–15]. Amplified DNA samples were directly sequenced by applying the BigDye Terminator Reaction kit (Applied Biosystems) and subjected to an ABI PRISM sequencer.

### 3. Results

#### 3.1. Clinical examination

##### 3.1.1. Family 1 (late onset)

MFN 06-06; A 27-year-old woman was referred to our center in 1993 with a 9-year history of progressive distal weakness and muscle atrophy. The patient complained of difficulty running since early childhood. Neurological examination revealed moderate distal sensory loss, weakness and muscle atrophy. Other clinical findings were pes cavus and loss of deep tendon reflexes at the ankle (Fig. 1c). Her Medical Research Council score (MRCSS) was 56 (normal strength 60). After 14 years the MRCSS decreased to 54 (Table 1). No other clinical finding—such as optic atrophy, hearing loss, Parkinsonism or pyramidal signs—was ever made.

MFN 07-06: Her 53-year-old mother also presented a mild CMT phenotype. Her MRC score was 54 in 1993 and 52 after 14 years: at the age of 67. No other clinical features were found during the evolution (Table 1).

##### 3.1.2. Family 2 (early onset)

MFN 06-15: A 56-year-old man was referred to our center due to progressive distal wasting and weakness in upper and lower

extremities. The onset of symptoms was at 3 years of age. Initially, the patient was diagnosed with poliomyelitis. He had been wheelchair-dependent since his forties. Neurological examination (Fig. 2 and Table 2) revealed severe distal weakness and atrophy in the extremities, deep tendon areflexia, and distal sensory loss. The patient presented three months of progressive visual impairment when he was sixteen, followed by slow recovery during the next few years. No tremors, Parkinsonism or spasticity was found.

MFN 07-02: The 24-year-old son of patient MFN 06-15 presented a subacute visual impairment at 17, which lasted for six months. He was diagnosed with retrobulbar neuritis and was undergoing corticoid treatment. He presented steppage gait and was not wheelchair-dependent. However, he had needed orthopedic ferrules since age 14 (Fig. 2 and Table 2). An ophthalmologic examination 7 years after the onset of visual impairment revealed an optic atrophy (Fig. 1).

#### 3.2. Electrophysiological studies

##### 3.2.1. Family 1

Affected family members' electrophysiological findings revealed a mild to moderate sensory and motor axonal neuropathy. The ENG studies revealed conserved nerve conduction velocities (NCV) and decreased compound motor action potential (CMAP). A new ENG/EMG performed after 14 years revealed further decreased CMAP with conserved NCV (Table 1).

Brainstem auditory evoked potential (BAEP) recordings performed in both affected family members were normal.

##### 3.2.2. Family 2

Electrophysiological studies (Table 3) revealed sensory and motor axonal neuropathy that was more severe in the MFN 06-15 patient (Table 3). Visually evoked potentials recorded for the 07-02 patient revealed delayed P100 responses in both optic nerves, but predominantly in the right eye. No abnormality was found in brainstem-evoked potentials in the same patient.

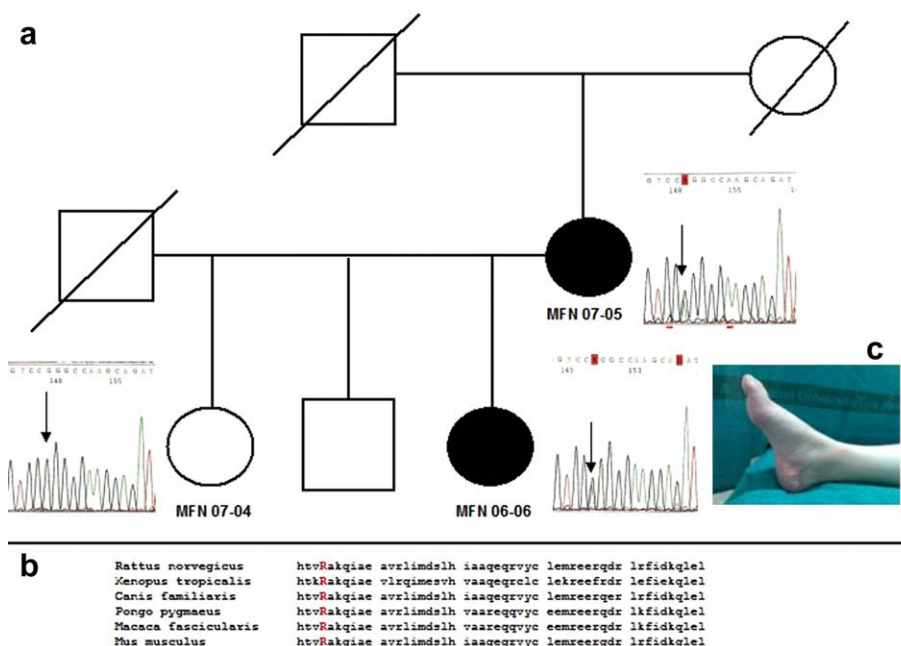
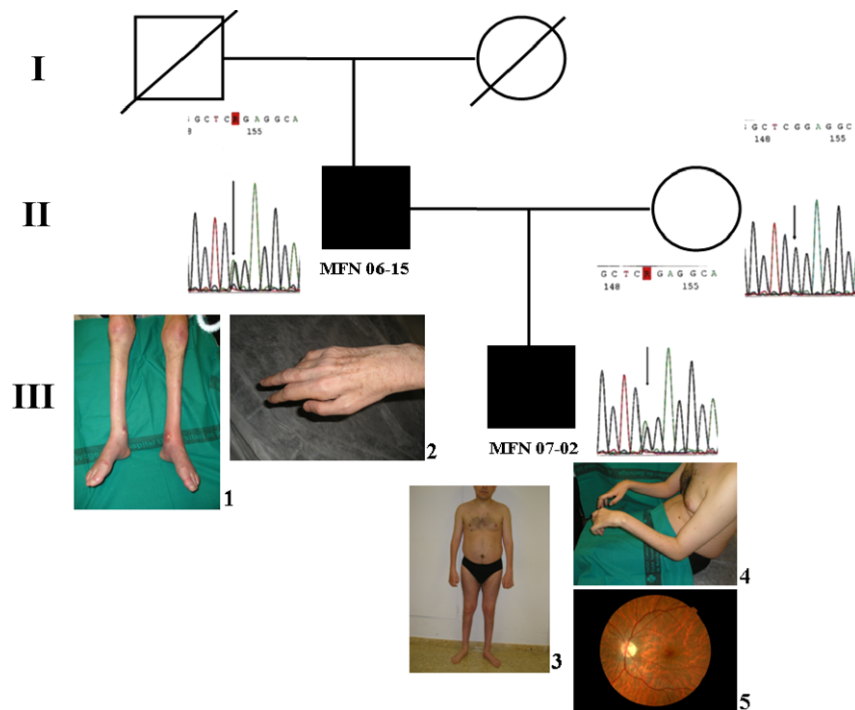


Fig. 1. (a) Summary of molecular findings in MFN2 for the affected members of Family 1. (b) Sequences of MFN2 in different species demonstrate that the change is located in a high preserved region of DNA. (c) Mild CMT phenotype in 06-06 patient.





**Fig. 2.** Summary of molecular findings in MFN2 for affected members of Family 2 and summary of clinical findings. Patient 06-15: (1 and 2) severe distal muscular atrophy in extremities. Patient 07-02: (3) moderate distal atrophy, (4) typical CMT phenotype and (5) optic atrophy.

**Table 1**  
Family 1. Summary of clinical and electrophysiological findings for affected family members over 14 years (normal values)

	Year	Age	MRCSS	Absent reflexes	Sensory loss	Survival ( $\mu$ V)	Median ( $\mu$ V)	Ulnar ( $\mu$ V)	Peroneal/NCV (MV/m/s)	Median/NCV (MV/m/s)
MFN 06-06	1993	27	54	Ankle	Distal upper/lower extremities	1.9 [11]	19 [18]	5.9 [9]	320/31 (2000/42)	8500/49.9 (6000/50)
	2007	39	52	Ankle/patellar	Distal upper/lower extremities	1.6 [11]	15 [18]	3.2 [9]	NR (2000/42)	8300/49.3 (6000/50)
MFN 07-05	1993	53	56	All preserved	Distal lower extremities	3.5 [9]	14.8 [16]	7.2 [9]	3200/38.6 (2000/42)	6400/48.9 (6000/50)
	2007	67	54	Ankle	Distal upper/lower extremities	2.4 [9]	12.2 [16]	5.8 [5]	1800/35.5 (2000/42)	6100/48.5 (6000/50)

### 3.3. Molecular study

#### 3.3.1. Family 1

Direct sequence analysis of the 19 exons of MFN2 gene revealed a G-to-C change in base number 1091 in exon 11. The prediction for the mutation at protein level is the Arg to Gln variant in codon 364 and it is located immediately upstream of the GTPase domain. The change was observed in heterozygous state in the patient and in her mother (Fig. 1). No mutation was found in the molecular analysis in her healthy sister. The molecular analysis of MPZ, Connexin 32, PMP 22 and GDAP1 genes did not revealed any changes.

#### 3.3.2. Family 2

The 19 exons of the MFN2 gene were directly sequenced. A G-to-A change (CGG–CAG) was found in base number 281 in exon 4. The prediction for the mutation at protein level is the Arg to Gln variant in codon 94 and it is located within the GTPase domain. This change was only observed in the heterozygous state in the affected family members (Fig. 2). It was not found in the healthy mother of patient MFN 07-02. A molecular analysis of the PMP 22, MPZ and GDAP1 genes did not reveal any pathologic changes.

### 3.4. MRI study

#### 3.4.1. Family 1

The cranial MRI study performed in 06-06, did not reveal any abnormality

#### 3.4.2. Family 2

The cranial magnetic resonance (MRI) studies performed on the MFN 07-02 patient during his episode of subacute visual impairment at the age of 17 revealed minimal optic nerve enhancement. A control cranial MRI at the age of 24 was normal.

## 4. Discussion

Mitochondria are dynamic organelles which are highly motile undergoing frequent fusion and fission. MFN2 is located to the outer mitochondrial membrane and regulates the mitochondrial network architecture by fusion of mitochondria [16–19]. Instead of MFN2 being expressed ubiquitously, MFN2 mutation causes predominantly axonal neuropathy. The importance of proper mitochondrial dynamics in motor axons has been reported [20]. This could be explained by the characteristic structure of the peripheral nerve, where, in order to maintain the function of the peripheral nervous system, mitochondria are transported along the axon over a long distance and formation of a mitochondrial network is required to maintain the peripheral nerve axon [11]. Recent studies suggest that MFN1 can maintain mitochondrial fusion in cells that express mutant MFN2 protein due to complementation. Neurons from the peripheral nervous system may be specifically affected in CMT 2A patients, as they express low levels of MFN1 and rely primarily on MFN2 for fusion. By contrast, mitochondrial fusion should be normal in cells that express MFN1 at levels sufficient to compensate for the MFN2 deficiency, such as fibroblasts [21,22].

**Table 2**

Family 2. Summary of the neurological, ophthalmologic and cranial resonance findings in affected family members

Patient	MFN 06-15	MFN 07-10
Age (years)	57	24
Sex	M	M
Age at onset (years)	2–4	2
MRCSS	22	44
Upper extremities distal weakness	+++	++
Lower extremities distal weakness	+++	++
Distal amyotrophy	+++	++
Absent ankle jerks	+++	+++
Upper extremities distal sensory loss	+++	++
Lower extremities distal sensory loss	+++	++
Hammer toes	+	+
Pes cavus	+++	+++
Dependent	Wheelchair	Feed ferules
Vocal cord paresis	–	–
Nystagmus	–	–
Babinski sign	–	–
Hyperreflexia	–	–
Tremor	–	–
Parkinsonism	–	–
Enlarged nerves	–	–
Retinal examination	NP	Optic atrophy
Visual impairment	–	+
Cranial MRI	NP	Normal

M, male; NP, not performed; MRI, magnetic resonance.

No Spanish family had previously been reported with mutations in the MFN2 gene: these are the first with typical CMT 2 findings and autosomal dominant inheritance. In one family, we only found the change in Arg364Gln in the heterozygous state in the affected family members with mild sensory-motor neuropathy and normal NCV. This change was not found in the healthy family members. The population studies that were performed in 100 alleles (50 healthy controls) reveal no change and sequences in different species demonstrate that the change is located in a high preserved region of DNA (Fig. 1b). All these findings strongly suggested that this mutation is pathological. After 14 years of follow-up, the affected members presented mild clinical and electrophysiological worsening of their axonal neuropathy. The NCVs were always within the normal range, although there was slight deceleration that may be attributed to the decrease in CMAP or to physiological slowing associated with patient age. We found clinical and electrophysiological correlation in the mild to moderate sensory and motor neu-

ropathy during the follow-up of the affected family members (Table 1). No other clinical findings—such as optic atrophy, hearing loss, Parkinsonism or pyramidal signs—were ever found. No affected family members are wheelchair-dependent.

In the family with early onset reported in this paper (Family 2), affected family members presented a subacute onset of visual impairment followed by a mild improvement over the next few years. Not surprisingly, patient 07-02 was initially diagnosed with retrobulbar neuritis and underwent a high-dose methylprednisolone treatment with no clear clinical improvement. There were no mitochondrial mutations in this patient, so Leber's hereditary optic atrophy was ruled out. The father of patient 07-02 had a subacute visual impairment episode when he was sixteen, suggesting that he had also suffered from optic neuropathy. The Arg94Gln mutation in the MFN2 gene had been reported as “pure” CMT 2A disease, or CMT 2 associated with tremors [3,6,7,11]. This is the first family in which this mutation is related to CMT with optic atrophy.

Optic atrophy is a severe condition involving deterioration of visual acuity whose therapeutic options are limited. There are different clinical variants, ranging from subacute episodes, which sometimes improve spontaneously, to a chronic progressive disease course [23]. The dynamin-like GTPase MFN2 belongs to the same protein family as OPA1 (autosomal dominant optic atrophy 1). Both factors act in concert to mediate the fusion of mitochondrial double membranes [9,23]. Spontaneous recovery of vision was reported in patients with Leber's hereditary optic atrophy and in 6 out of 10 patients with optic atrophy and mutations in MFN2, as described by Züchner in 2006 [23]. In our study, the two family members affected presented slow and spontaneous recovery over the following few years.

The Arg364Gln mutation found in our study is located immediately upstream of the GTPase domain of the MFN2 and the Arg94Gln mutation is located within this domain of MFN2. The significant role of the GTPase domain in the function of MFN2 was confirmed by previously reported studies [19].

Other changes have been reported in the same codons. The Arg364Trp mutation has been reported in codon 364, in base 1090; this mutation is associated with an early onset neuropathy with optic atrophy phenotype and identified in several individuals, in some of whom it is associated with optic atrophy [8,23]. In codon 94, the Arg94Trp mutation has been reported previously. It causes axonal neuropathy with optic atrophy too [3,6,7,23]. Previously studies had been published describing heterogeneity in the

**Table 3**

Family 2. Summary of the electrophysiological findings for affected family members (normal values)

Patient	MFN 06-15	MFN 07-02
<i>Sensory nerves amplitude potentials (<math>\mu</math>V)/nerve conduction velocity (m/s)</i>		
Left sural nerve	NR (9/40)	NR (11/41)
Right sural nerve	NR (9/40)	NR (11/40)
Left Median nerve	NR (16/44)	2,6/44,8 (18/46)
Right Median nerve	NR (16/44)	2,6/45,6 (18/46)
<i>Compound motor action potentials (mV)/nerve conduction velocity</i>		
Left peroneal nerve (in pedis muscle)	NR (2000)	NR (2000)
Right peroneal nerve (in pedis muscle)	NR(2000)	NR (2000)
Left Median nerve	0,1/42,5 (6000/50)	0,1/43,3 (6000/50)
Right Median nerve	NR (6000/50)	0,2/41,4 (6000/50)
<i>Facial nerve compound motor action potential (mV)/distal latency (ms)</i>		
Right facial nerve (in nasalis)	2,8/3,65 (1,0/4,0)	3,1/3,2 (1,0/4,0)
Left facial nerve (in nasalis)	3,1/3,1 (1,0/4,0)	3,3/2,5 (1,0/4,0)
<i>Right Blink reflex (ms)</i>		
R1 compound latency	12,00 (12,5)	11,2 (12,5)
R2 compound latency	33,1 (41,6)	29,4 (41,6)
Rc compound latency	34,0 (40,4)	31,05 (40,4)

NR, no response.

age of presentation and severity in different mutations of MFN2 and in different individuals with the same mutation [7–9,11,23]. In this paper, we demonstrate this heterogeneity over different mutations of MFN2 and mutations found in the same codon.

Population data on MFN2 mutations by ethnicity are still limited. In a Korean population study, MFN2 was found to be the cause of CMT 2 in 24.2% of the 62 families studied [8]. In American pedigree families, MFN2 mutations were found in three of 13 families studied [10]. Molecular studies in a Japanese population revealed a lower frequency (seven of 81 CMT 2 families studied) [11].

These are the first reports of families of Spanish origin with mutations in MFN2. Molecular analysis aimed at detecting mutations of MFN2 could be extremely useful in mild axonal neuropathies and indispensable in cases of dominant inheritance or optic atrophy, and indicates the importance of ophthalmologic examinations in patients with axonal CMT caused by mutations in the MFN2 gene. Population studies of mutations in MFN2 should be undertaken to discover the real frequency in the Mediterranean area.

## References

- [1] Skre H. Genetic and clinical aspects of Charcot–Marie–Tooth disease. *Clin Genet* 1974;6:98–1998.
- [2] Pareyson D. Differential diagnosis of Charcot–Marie–Tooth disease and related neuropathies. *Neurol Sci* 2004;25:72–82.
- [3] Züchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, et al. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot–Marie–Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* 2004;36(5):449–51.
- [4] Zhao C, Takita J, Tanaka Y, et al. Charcot–Marie–Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. *Cell* 2001;105(5):587–97.
- [5] Ishihara N, Eura Y, Mihara K. Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J Cell Sci*. 2004;15;117(Pt 26).
- [6] Inherited Peripheral database. Available from: <http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/Mutations/Mutations.cfm>. Last accessed 28.04.08.
- [7] Verhoeven K, Claeys KC, Züchner S, et al. MFN2 mutation distribution and genotype/phenotype correlation in Charcot–Marie–Tooth type 2. *Brain* 2006;129(Pt 8):2093–102.
- [8] 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;129(Pt 8):2103–18.
- [9] Zhu D, Kennerson ML, Walizada G, et al. Charcot–Marie–Tooth with pyramidal signs is genetically heterogeneous: families with and without MFN2 mutations. *Neurology* 2005;65(3):496–7.
- [10] Lawson VH, Graham BV, Flanigan KM. Clinical and electrophysiologic features of CMT 2A with mutations in the mitofusin 2 gene. *Neurology* 2005;65(2):197–204.
- [11] Kijima K, Numakura C, Izumino H, et al. Mitochondrial GTPase mitofusin 2 mutation in Charcot–Marie–Tooth neuropathy type 2A. *Hum Genet* 2005;116(1–2):23–7.
- [12] Lupski JR, de Oca-Luna RM, Slaugenhaupt S, et al. DNA duplication associated with Charcot–Marie–Tooth disease type 1A. *Cell* 1991;66(2):219–32.
- [13] Takahashi E, Takeda O, Himoro M, et al. Localization of PMP-22 gene (candidate gene for the Charcot–Marie–Tooth disease 1A) to band 17p11.2 by direct R-banding fluorescence in situ hybridization. *Jpn J Hum Genet* 1992;37(4):303–6.
- [14] Baxter RV, Ben Othmane K, Rochelle JM, et al. Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot–Marie–Tooth disease type 4A/8q21. *Nat Genet* 2002;30(1):21–2.
- [15] Casasnovas C, Banchs I, Corral J, et al. Clinical and molecular analysis of X-linked Charcot–Marie–Tooth disease type 1 in Spanish population. *Clin Genet* 2006;70(6):516–23.
- [16] Santel A, Fuller MT. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci* 2001;114:867–74.
- [17] Rojo M, Legros F, Chateau D, et al. Membrane topology and Mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J Cell Sci* 2002;115:1663–74.
- [18] Bach D, Pich S, Soriano FX, et al. Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J Biol Chem* 2003;278(19):17190–7.
- [19] Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, et al. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 2003;160(2):189–200.
- [20] Detmer SA, Vande Velde C, Cleveland DW, et al. 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;17(3):367–75.
- [21] Detmer SA, Chan DC. Complementation between mouse Mfn1 and Mfn2 protects mitochondrial fusion defects caused by CMT 2A disease mutations. *J Cell Biol* 2007;176(4):405–14.
- [22] Amiot EA, Lott P, Soto J, et al. Mitochondrial fusion and function in Charcot–Marie–Tooth type 2A patient fibroblasts with mitofusin 2 mutations. *Exp Neurol* 2008;211(1):115–27.
- [23] Züchner S, De Jonghe P, Jordanova A, et al. Axonal neuropathy with optic atrophy is caused by mutations in mitofusin 2. *Ann Neurol* 2006;59(2):276–81.

### **3. Phenotypic Spectrum of MFN2 Mutations in the Spanish Population.**

**Casasnovas C, Banchs I, Cassereau J, Gueguen N, Chevrollier A, Martínez-Matos JA, Bonneau D, Volpini V. D**

*J Med Genet J Med Genet. 2009 Nov 3. [Epub ahead of print]*

En este trabajo se estudian 85 familias con CMT2 en busca de mutaciones de la *MFN2*. Se encuentran 24 pacientes pertenecientes a 14 familias con 9 mutaciones distintas de la *MFN2*, lo que representa el  $16\% \pm 7.7\%$  del total de familias estudiadas. Si se toman las familias con patrón de herencia dominante conocida, en el  $30.0\% \pm 14.2\%$  (12/40) de ellas se encuentra mutación. Si únicamente consideramos la familias que se presentan con neuropatía grave y con un patrón de herencia dominante conocido entonces son un 60% (3/5) las que tienen mutaciones del gen *MFN2*.

Cuatro de las mutaciones no estaban previamente descritas.

Se estudia la relación fenotipo-genotipo de las mutaciones encontradas. Se analiza el papel patogénico de la mutación que se encuentra con mayor frecuencia.

## TITLE PAGE

Title: Phenotypic Spectrum of MFN2 Mutations in the Spanish Population

### Authors and affiliations

1. C Casasnovas, MD  
Neuromuscular Unit. Neurology Department. Hospital Universitari de Bellvitge – IDIBELL.  
C/ Feixa Llarga s/n. 08907 L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona. SPAIN
2. I Banchs, BS  
Molecular Diagnostic Centre for Hereditary Diseases. Institut de Investigacions Biomèdiques  
de Bellvitge (IDIBELL). Gran Via 199, 08907 L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona. SPAIN
3. J Cassereau, MD  
INSERM, U771, Angers, France; Département de Neurologie, Centre hospitalier universitaire,  
4 rue Larrey, 49933 Angers cedex 9 France
4. N Gueguen, PhD  
INSERM U694, Angers, France; Département de Biochimie et Génétique, Centre Hospitalier  
Universitaire, 4 rue Larrey, 49933 Angers cedex 9, France
5. A Chevrollier, PhD  
INSERM U694, Angers, France; Département de Biochimie et Génétique, Centre Hospitalier  
Universitaire, 4 rue Larrey, 49933 Angers cedex 9, France
6. JA Martínez-Matos, MD, PhD  
Neuromuscular Unit. Neurology Department. Hospital Universitari de Bellvitge – IDIBELL.  
C/ Feixa Llarga s/n. 08907 L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona. SPAIN
7. D. Bonneau, MD, PhD  
INSERM U694, Angers, France; Département de Biochimie et Génétique, Centre Hospitalier  
Universitaire, 4 rue Larrey, 49933 Angers cedex 9, France
8. V Volpini, MD, PhD  
Molecular Diagnostic Centre for Hereditary Diseases. Institut de Investigacions Biomèdiques  
de Bellvitge (IDIBELL). Gran Via 199, 08907 L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona. SPAIN

Corresponding author. Carlos Casasnovas Pons MD  
Neuromuscular Unit. Neurology Department  
Hospital Universitari de Bellvitge  
C/ Feixa Llarga s/n  
08907 L'Hospitalet de Llobregat  
Barcelona  
SPAIN  
Telf 0034932607711 Fax 0035932607585  
E mail: [carloscasasnovas@bellvitgehospital.cat](mailto:carloscasasnovas@bellvitgehospital.cat)

Competing Interest: None to declare.

Thank you for your time and your consideration.

The authors

# Phenotypic Spectrum of MFN2 Mutations in the Spanish Population

The most common form of axonal Charcot–Marie–Tooth disease (CMT) is type 2A, caused by mutations in mitochondrial GTPase mitofusin 2 (MFN2). The objective of our study is to establish the incidence of MFN2 mutations in a cohort of Spanish patients with axonal CMT neuropathy. We studied 85 families with suspected axonal CMT. All MFN2 exons were studied through direct sequencing. A bioenergetics study in fibroblasts was conducted using a skin biopsy taken from a patient with an Arg468His mutation. Twenty-four patients from 14 different families were identified with nine different MFN2 mutations (Arg94Trp, Arg94Gln, Ile203Met, Asn252Lys, Gln276His, Gly296Arg, Met376Val, Arg364Gln, and Arg468His). All mutations were found in the heterozygous state and four of these mutations had not been described previously. MFN2 mutations were responsible for CMT2 in  $16\% \pm 7.7\%$  of the families studied and in  $30.8\% \pm 14.2\%$  (12/39) of families with known dominant inheritance. The bioenergetic studies in fibroblasts show typical results of MFN2 patients with a mitochondrial coupling defect (ATP/O) and an increase of the respiration rate linked to complex II. We conclude that mutations in MFN2 are the most frequent cause of CMT2 in this region. The Arg468His mutation was the most prevalent (6/14 families) and our study confirmed that it is pathological, presenting as a neuropathy in a mild to moderate degree. This study also demonstrated the value of MFN2 studies in cases of congenital axonal neuropathy, especially in cases of dominant inheritance, severe clinical symptoms, or additional symptoms such as optic atrophy.

KEY WORDS: CMT2; CMT2A; CMT; axonal Charcot–Marie–Tooth; MFN2; mitofusin 2

## INTRODUCTION

Charcot–Marie–Tooth disease (CMT) is one of the most common inherited neurological disorders, affecting about one in 2500 people [1]. Historically, CMT neuropathy has been divided into the demyelinating forms (CMT1) with decreased nerve conduction velocities (NCV) in electrophysiological studies, and the axonal forms (CMT2) [2, 3]. The most common form of CMT2 is type 2A, caused by mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 (MFN2) [4, 5]. MFN2 regulates the mitochondrial network architecture by fusion of mitochondria [6]. To date, 45 mutations have been described as causes of CMT2A [7]. Different clinical features such as parkinsonism, tremors, pyramidal tract signs, mental retardation (MR), and optic atrophy (OA) have been associated with axonal CMT neuropathy with dominant inheritance caused by mutations in MFN2. Families with severe neuropathy and very early onset and families with mild neuropathy and late onset have been described [8-12].

In a Korean population study, MFN2 was found to be the cause of CMT2 in 24.2% of the 62 families studied [11]. In American pedigree families, MFN2 mutations were found in three of 13 families studied [10]. Molecular studies in a Japanese population revealed a lower frequency [6].

This is the first population study in the Mediterranean area. Our aim was to establish the incidence of MFN2 mutations in a cohort of Spanish patients with axonal CMT neuropathy. We also studied mitochondrial function in fibroblasts from a skin biopsy performed on a patient presenting the most prevalent mutation, Arg468His.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Clinical Electrophysiological Studies**

We studied an affected member from each of the 85 families who had been referred to our center between 1994 and 2007 for CMT tests. All the affected members from these families presented with CMT2. None of the affected family members presented distal spinal muscular atrophy or CMT with upper limb predominance phenotypes. Detailed neurological and electrophysiological studies were performed on the patients and on unaffected individuals at the centers where they were originally treated. We classified the severity of neuropathy symptoms according to the CMT neuropathy score (CMTNS) as follows: mild (a score of less than or equal to 10), moderate (11 to 20), or severe (more than 21) [13-15].

### **Genetic Studies**

Blood samples were obtained from all family members once informed consent had been given. Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes. Direct DNA sequencing was used to screen all MFN2 exons, the myelin protein zero gene in all families, the Gap Junction Protein Beta 1 gene in families with no male-to-male inheritance, and the ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 (GDAP1) gene in families with sporadic presentation. None of the affected family members presented CMT2D phenotype therefore GARS gene was not systematically studied [14-15]. Suitable polymerase chain reaction primers have been reported previously [4, 16-21]. Amplified DNA samples were directly sequenced by applying the BigDye Terminator Reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), and subsequently using an ABIPRISM sequencer (Applied Biosystems). The case-control population studies were conducted with 100 alleles from 50 anonymous controls and 60 alleles from 30



clinically and electrophysiologically healthy controls.

## **Functional Studies in a Patient with an Arg468His Mutation**

### *Primary Cultures*

Human fibroblast cells were isolated from skin biopsies taken after obtaining written consent. Fibroblasts were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% bovine calf serum at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. All fibroblast cultures were mycoplasma-free, as shown by 4',6-diamidino-2-phenylindole·2HCl·H<sub>2</sub>O I–Hoechst in situ coloration. All experiments were conducted on cells with similar passage numbers, ranging from five to 15, to avoid artifacts due to senescence, e.g., at passage numbers >30.

### *Respiratory Parameters*

Respiration rates were measured on cells permeabilized by digitonin exposure as described by Loiseau et al., 2007. Three to four million cells were resuspended in respiratory buffer R (10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM mannitol, 10 mM KCl, and 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4) and the respiratory rates were recorded at 37°C in 2 ml glass chambers using a two-channel, high-resolution Oxygraph respirometer (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). Basal (state IV). Respiration was started with complex I-dependent substrates (5 mM malate and 5 mM pyruvate). Complex I-coupled respiration (state III) was measured by adding 0.5 mM NAD<sup>+</sup> and 1.5 mM adenosine diphosphate (ADP). Maximal coupled respiration (complexes I + II) was elicited by 10 mM succinate and then 10 μM rotenone was injected to obtain complex II-coupled state III respiration. Finally, oligomycin was added to determine basal respiration linked to complex II alone.

### *Efficiency of Mitochondrial ATP Production in Permeabilized Cells*

For the rate of mitochondrial ATP synthesis and the ATP/O ratio measurement, the respiratory buffer R was supplemented with 2 mM iodoacetate and 2 mM EDTA, in order to prevent glycolytic ATP synthesis and ATP hydrolysis by cellular ATPases, respectively. ATP synthesis was started by addition of 5 mM malate, 5 mM pyruvate, 10 mM succinate, and subsequent addition of 0.5 mM NAD<sup>+</sup> and 1.5 mM ADP. Five aliquots were sampled each minute and quenched with an equal volume of 1% TCA solution and neutralized by adding a 25 mM HEPES, 2 mM EDTA, pH 7.8 buffer. Three aliquots were also sampled after addition of oligomycin (for mitochondrial ATP synthesis inhibition) as controls. The ATP synthesized was measured using the Enliten ATP assay (Promega, Madison, WI). Luminescence was measured on a Miniluma luminometer (Berthold Technologic, Bad Wilbad, Germany) using a 10-second integration period. Standardization was performed with known quantities of ATP measured under the same conditions.

### *Enzymatic Activities*

The activities of the mitochondrial respiratory chain complexes and citrate synthase were measured in cell homogenates at 37°C in a cell buffer (250 mM saccharose, 20 mM tris[hydroxymethyl]aminomethane, 2 mM EGTA, and 1 mg/ml bovine serum albumin, pH 7.2) using a Beckman DU-640 spectrophotometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA), as described previously [22].

### *Fluorescence Imaging*

The mitochondrial network analysis was performed as described elsewhere [23]. Briefly, cells cultured in a two-well chamber slide (Lab-Tek; Nalge Nunc International, Naperville, IL) were incubated with 100 nM Mitotracker<sup>®</sup> to label the mitochondria network according to the

manufacturer's instructions (Molecular Probes, Carlsbad, CA). Z-stack images were acquired with a Leica (DMI6000B; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and a Roper CoolSnap HQ2 camera (Photometrics, Roper Scientific, Tucson, AZ). We took 21 plane images along the Z-axis at 0.2- $\mu\text{m}$  increments. Stack images were deconvoluted using a Meinel algorithm. MetaMorph software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) was used to analyze the images. Mitochondrial length and number were determined using integrated morphometric analysis of regions created around mitochondria, after deconvolution and thresholding (Fig. 2 and Table 3).

### **Statistical Studies**

Mann–Whitney  $U$  tests were used for statistical comparisons in the functional studies. Statistical significance of differences was calculated using the  $\chi^2$  test. The 95% confidence interval (p) was obtained using the following formula:  $p \pm Z_{0.95} \cdot S$ , where  $Z_{0.95} = 1.96$ ;  $q = 1 - p$ ;  $s = (pq/N)^{1/2}$

## **RESULTS**

### **Clinical Electrophysiological and Genetic Studies**

All those affected presented with CMT2. Thirty-nine of the 85 families (45.8%) presented dominant inheritance. Inheritance data were not available for four families (4.7%). Thirty-two families (37%) presented mild symptoms (CMTNS < 10), 29 (34%) presented moderate symptoms (CMTNS 10–20), and 10 (11.7%) presented severe symptoms (CMTNS > 20). Data for symptom severity were not available for 14 families (16%). Five of the families had a member with MR. Two families had a family member with OA. Two patients from different families presented CMT2 and neuromyotonia in needle electrophysiological tests.

FAMILY	EXON	BASE	CODON	CHANGE	AA	REGION	TRANSMISSION	ORIGIN	ONSET	SEVERITY	NUMBER OF AFFECTED FAMILY MEMBERS	ADDITIONAL FEATURES	REPORTED
MFN 06-7	4	280	94	CGG- TGG	Arg94Trp		Dominant	Spain	1st decade	Moderate sensory and motor neuropathy	1		Reported
MFN 06-15	4	281	94	CGG -CAG	Arg94Gln		Dominant	Spain	1st decade	Severe sensory and motor neuropathy	2	Optic atrophy	Reported
CMT II-2	7	609	203	ATT- ATG	Ile203Met	GTPase	Dominant	Spain	2nd decade	Moderate sensory and motor neuropathy	5	Tremor	In this study
CMT 560	8	756	252	AAC- AAA	Asn252Lys	GTPase	Dominant	Spain	2nd decade	Severe sensory and motor neuropathy	1	VI neuropathy	In this study
CMT II-4	9	828	276	CAG-CAC	Gln276His		Dominant	Spain	3th decade	Mild sensory and motor neuropathy	1		In this study
CMT 1344	9	892	298	GGG-AGG	Gly298Arg		Dominant	Spain	2nd decade	Moderate sensory and motor neuropathy	2		Reported
CMT 364	11	1126	375	ATG -GTG	Met376Val		Dominant	Spain	3th decade	Severe sensory and motor neuropathy	2		In this study
MFN 06-6	11	1091	364	CGG -CAG	Arg364Gln		Dominant	Spain	3th decade	Moderate sensory and motor neuropathy	2		Reported
MFN 06-16	14	1403	468	CGC -CAC	Arg468His		Dominant	Spain	3th decade	Moderate sensory and motor neuropathy	1		Reported
CMT 1045	14	1403	468	CGC CAC	Arg468His		Dominant	Spain	3th decade	Mild sensory and motor neuropathy	1		Reported
CMT II-6	14	1403	468	CGC -CAC	Arg468His		Sporadic	Spain	5th decade	Moderate sensory and motor neuropathy	1		Reported
CMT 1088	14	1403	468	CGC- CAC	Arg468His		Dominant	Spain	5th decade	Mild sensory and motor neuropathy	1		Reported
CMT II-21	14	1403	468	CGC -CAC	Arg468His		Sporadic	Spain	5th decade	Mild sensory and motor neuropathy	1		Reported
MFN 06-9	14	1403	468	CGC -CAC	Arg468His		Dominant	Spain	5th decade	Mild sensory and motor neuropathy	3		Reported

TABLE 1. Summary of the Molecular and Clinical Findings for the 14 Families with MFN2 Gene Changes Identified in our Research

The screening of all MFN2 coding regions using direct sequencing detected nine different mutations in 24 patients from 14 families. All mutations were found in the heterozygous state (Table 1 and Fig. 1). Five of the changes had been described previously (Arg94Trp, Arg94Gln, Gly298Arg, Arg364Gln, and Arg468His) while four had not (Ile203Met, Asn252Lys, Gln276His, and Met376Val). The Arg94Gln mutation, described elsewhere [24-25], presented with an early onset in the first decade of life. The two members from the family with the Arg94Gln mutation (MFN 06–15) presented with OA. Magnetic resonance imaging showed minimal contrast enhancement in the optic nerve of one of the patients, without white matter lesions. Two other families with novel mutations also presented with severe CMT2. The CMT-560 family presented the Asn252Lys mutation. The only member of the family available for neurological exploration presented a congenital abduction deficit in his right eye. The CMT-364 family presented the Met376Val mutation. The two affected members of the family experienced late onset of clinical symptoms in the third decade of their lives. However, the course of the neuropathy had been rapidly progressive. One family presented the novel Ile203Met mutation. The affected members experienced onset in their second decade of life, presenting moderate CMT2 and discreet intention tremor. The previously reported missense mutations, Gly298Arg and Arg364Gln (Lawson et al., 2005), and the novel mutations, Gln276His and Met376Val, present pure CMT2 without additional symptoms. The affected members of these families had experienced onset between the second and fourth decades of their lives and presented neuropathies that varied between mild and moderate. These changes were located in the most functionally important domain of the protein, the dynamin-like GTPase MFN2, and immediately upstream of this domain, respectively.

Sequences in different species demonstrated that the changes were located in a highly conserved region of DNA with moderate or highly conserved amino acids (considering 11

species). Population studies revealed no changes. These previously undescribed changes were not found in the healthy family members. The most frequently identified change in this study was Arg468His. This was found in six of the families presenting mutations (42.8%). All families with the Arg468His mutation presented either mild or moderate CMT2 (four and two families, respectively). Four of the families presented dominant inheritance. In all cases, the affected members presented late onset of clinical symptoms in the fifth decade of their lives.

No pathological changes in MFN2 were found in either of the sporadic inheritance cases presented in two different families with CMT2 and neuromyotonia and five different families with CMT2 and MR.

The nonpathological changes found in this study, together with their individual frequencies are described in Table 2 and Fig. 1A.

EXON/INTRON	NUMBER OF FAMILIES (%)	BASE NUMBER	ESTATE	AA	SNP	DESCRIBED
5' UTR	3 (3,5)	c.-372_387del	<i>heterozygous</i>			No
5' UTR	5 (5,9)	c.-367 A>G	<i>homozygous</i>		rs2236054	Yes
5' UTR	41 (48,2)	c.-367 A>G	<i>heterozygous</i>		rs2236054	Yes
EXON 1 (5'UTR)	1 (1,2)	c.-212 T>C	<i>homozygous</i>		rs2180183	Yes
EXON 1 (5'UTR)	44 (51,8)	c.-212 T>C	<i>heterozygous</i>		rs2180183	Yes
INTRON 1 (5'UTR)	1 (1,2)	c.-149-15T>G	<i>heterozygous</i>			No
INTRON 3	1 (1,2)	c.176-207 G>A	<i>homozygous</i>		rs667593	Yes
INTRON 3	25 (29,4)	c.176-207G>A	<i>heterozygous</i>		rs667593	Yes
INTRON 3	1 (1,2)	c.176-179C>A	<i>heterozygous</i>			No
INTRON 5	9 (10,6)	c.474+65 C>T	<i>homozygous</i>		rs223605	Yes
INTRON 5	55 (64,7)	c.474+65 C>T	<i>heterozygous</i>		rs223605	Yes
INTRON 6	10 (11,7)	c.600-25 T>C	<i>heterozygous</i>		rs41278626	Yes
INTRON 7	1 (1,2)	c.709-32C>T	<i>heterozygous</i>		rs41278628	Yes
EXON 9	1 (1,2)	c.957C>T	<i>heterozygous</i>	G319G	rs41278632	Yes
EXON 9	1 (1,2)	c.892G>A	<i>heterozygous</i>	G298R	rs41278630	Yes
INTRON 10	3(1,5)	c.1039-19G>A	<i>heterozygous</i>			No
INTRON 10	7 (8,2)	c.1039-22 T>C	<i>heterozygous</i>		rs6680984	Yes
INTRON 10	6 (7,0)	c.1039-41C>G	<i>heterozygous</i>			No
INTRON 13	4 (4,9)	c.1392+78 G>A	<i>heterozygous</i>			No
INTRON 13	15 (17,6)	c.1392+79 C>A	<i>heterozygous</i>			No
INTRON 13	1 (1,2)	c.1392+79C>T	<i>heterozygous</i>			No
EXON 15	11 (12,9)	c.1569C>T	<i>heterozygous</i>	S523S	rs1042837	Yes
INTRON 16	3(1,5)	c.1872+68 T>C	<i>heterozygous</i>			No
INTRON 16	5 (5,9)	c.1873-66 T>G	<i>heterozygous</i>		rs7550536	Yes
INTRON 16	1 (1,2)	c.1873+63 T>C	<i>heterozygous</i>		rs2273295	Yes
INTRON 17	1 (1,2)	c.2070-45 T>C	<i>heterozygous</i>			No
INTRON 18	7 (8,2)	c.2204+15 T>C	<i>heterozygous</i>			No
INTRON 19	5 (5,9)	c.*58A>G	<i>homozygous</i>		rs1042842	Yes
INTRON 19	57 (67,0)	c.*58A>G	<i>heterozygous</i>		rs1042842	Yes

TABLE 2. Summary of the Polymorphisms Found, Together with their Frequency (Database of Transcriptional Start Sites: <http://dbtss.hgc.jp/>)

## Functional Studies

### *Decrease in Efficiency of ATP Synthesis*

While no difference in complex activities could be found between the patient and controls (Table 3), the patient fibroblasts demonstrated bioenergetic impairment. Indeed, as previously shown in fibroblasts from 12 patients with CMT2A disease, carrying six different MFN2 mutations [22-26], we measured a decrease of the ATP/O ratio in the patient (0.97 vs.  $2.58 \pm 0.17$  for controls) (Fig. 2B). This lower oxidative phosphorylation (OXPHOS) coupling efficiency is associated with a 50% decrease in mitochondrial ATP production (Fig. 2A).

	I/CS	II/CS	III/CS	IV/CS	V/CS	LDH/CS
controls	$0,50 \pm 0,18$	$0,15 \pm 0,04$	$0,71 \pm 0,22$	$1,14 \pm 0,17$	$0,38 \pm 0,10$	$21,1 \pm 10,40$
patient	0,46	0,14	0,81	0,98	0,41	24,2

TABLE 3. Mitochondrial Complex Enzymatic Activities (Mean  $\pm$  Standard Deviation) NADH ubiquinone reductase (complex I), succinate ubiquinone reductase (complex II), ubiquinone cytochrome c reductase (complex III), cytochrome c oxidase (complex IV), F1-ATPase (complex V), lactate dehydrogenase (LDH), and citrate synthase (CS) enzymatic activities were measured in two independent experiments in fibroblasts from an Arg468His patient and control subjects (n=12). Activities were normalized to that of CS.

### *Change in Balance between Complexes I and II — Linked Respiratory Rates*

First, malate, pyruvate, and succinate were used to establish the coupled respiration (state III) and ATP synthesis. Indeed, when using only pyruvate and malate or only succinate, the Krebs'



cycle is not functionally closed (citrate and 2-oxoglutarate are exchanged for malate), while convergent electron transport (complexes I + II) corresponds to the mitochondrial substrate supply in vivo, allowing the measurement of the maximal respiratory rate.

Then, we further analyzed the mitochondrial state III respiration supported by complex I-dependent respiration (malate and pyruvate) or complex II-dependent respiration (succinate and rotenone) in order to investigate if a decrease in one substrate could explain the decreased ATP synthesis. No decrease in complex I- or II-related respiration could be found in patient fibroblasts, instead an increase in complex II-related respiration was observed (Fig. 2C). This leads to a change in the equilibrium of substrates used compared with controls (MP/SR ratios: 0.53 in patient vs.  $1.11 \pm 0.26$  for controls; Fig. 2D).

### *Mitochondrial Network*

The mitochondrial network was unfragmented and quite similar to that of controls.

## **DISCUSSION**

Mitochondria are dynamic organelles that are highly motile, undergoing frequent fusion and fission. MFN2 is located in the outer mitochondrial membrane and regulates the mitochondrial network architecture by fusion of mitochondria [27-29]. Instead of MFN2 being expressed ubiquitously, the MFN2 mutation causes predominantly axonal neuropathy [32]. The importance of proper mitochondrial dynamics in motor axons has been reported elsewhere [31, 41]. This may be explained by the characteristic structure of peripheral nerves, where mitochondria are transported along the axon over a long distance and formation of a mitochondrial network is required in order to maintain the peripheral nerve axon (Kijima et al., 2005). Recent studies have suggested that MFN1 can maintain mitochondrial fusion in cells that express mutant MFN2 proteins due to complementation. Neurons from the peripheral nervous system may be

specifically affected in CMT2A patients, as they express low levels of MFN1 and rely primarily on MFN2 for fusion. In contrast, mitochondrial fusion should be normal in cells that express MFN1 at levels sufficient to compensate for the MFN2 deficiency, such as fibroblasts [31, 33, 34].

In this study, 24 patients from 14 of the 85 families with CMT2 presented nine different mutations in the *MFN2*, which encodes MFN2. All the mutations were missense mutations in a heterozygous state. None of the mutations were found in a homozygous state, despite some cases of CMT2 with homozygous mutations in the *MFN2* gene having been described previously [35]. Twelve of the 14 families presented known dominant inheritance. The age of onset of clinical symptoms varied. The Arg94Gln mutation described elsewhere [25] presented early onset, with OA as a sign of full expression [24]. Of all the families studied; only one other presented congenital axonal neuropathy and OA, although there was no evidence of change in *MFN2*. Both families presented severe CMT2 with known dominant inheritance. It would appear that the presence of OA could be related to the possibility of identifying mutations, as changes to *MFN2* were found in 50% of the families with CMT2 and OA studied for this research. On the other hand, five of the 85 families with CMT studied included a member with MR. None of them presented other affected family members. No *MFN2* change was found in these 5 families. Our research suggests that studying *MFN2* mutations in CMT2 where the inheritance pattern is unknown and MR is present is not especially productive. There does not appear to be any significant value to these studies in cases of CMT2 and neuromyotonia, at least in the absence of a medical history for the family. Another family with the novel mutation, Asn252Lys, and severe CMT2 is CMT-560. The only member of the family available for neurological exploration presented a congenital abduction deficit in his right eye. Given the frequency of congenital ocular motility disorders, together with the lack of other family members available for clinical

exploration, we cannot dismiss the possibility that this clinical finding was not related to the CMT2A mutation. The most frequently identified change in this study was Arg468His and had not only been described previously in a patient with CMT2, but also in one of the alleles in the population studies carried out on 260 chromosomes from 130 anonymous control subjects [36]. Since then, it has not been possible to attribute a pathological role to this change as regards CMT2A, and it has been considered a possible polymorphism. Given the high prevalence of this change and the doubt surrounding its possible pathological role as regards CMT2, we decided to conduct functional studies of fibroblasts taken from a skin biopsy. In this study, a decreased efficiency of ATP synthesis leading to decreased ATP production was found in the fibroblasts of our patients. This alteration in mitochondrial metabolism was proven to be a common one in fibroblasts of CMT2A patients [22]. Biochemical investigations also showed that OXPHOS complexes were not equally implied in the maximal coupled respiration rate: patients' cells preferentially use complex II-linked substrate compared with controls, without any increase in the maximal succinate ubiquinone reductase (complex II) activity. This change in the balance between substrate use (succinate vs. malate and pyruvate) was also found in fibroblasts of CMT2A patients [22, 26]. These bioenergetic alterations could be largely indirect and be, for example, the result of mitochondrial fusion impairment. However, some studies argue for a mitochondrial fusion independent role of MFN2 in bioenergetics. Other reports support that mitochondrial abnormal transport in neurons is independent of an energy production defect [37]. Other authors have reported that overexpression of a truncated form of MFN2 that lacks the transmembrane domain was unable to affect mitochondrial morphology, although the membrane potential of mitochondria was substantially increased [38]. How this mitochondrial fusion independent activity of MFN2 is achieved is unclear [39]. The mitochondrial coupling defect of the fibroblasts in the Arg468His mutation patient, the presence of a change located in highly

conserved regions, and the population studies performed, suggest that this could be actually a pathological mutation. In our opinion, it is possible that the anonymous control subject with the Arg468His mutation found in research carried out by Engelfried et al., 2006 [36] could in fact represent a CMT2A patient with minimal CMT2 symptoms that were not detected, or a young control subject who had not yet reached the age of symptom onset. In fact, in our research, we found a family (MFN 06–16) where the father presented discreet symptoms of neuropathy that had begun in his fifth decade, while electrophysiological studies in his 16-year-old daughter showed that her sensory and motor potential was situated at the lower limits of normality, and physical exploration revealed only discreet pes cavus. The daughter did not present other symptoms previously associated with the disease, such as areflexia, loss of distal strength in the extremities, scoliosis, muscular atrophy, parkinsonism, tremor, MR, or OA. We believe it is possible that the presence of this mutation represents an additional risk factor for this patient of developing CMT2 symptoms and clinical and electrophysiological indications, probably mild, over the years.

Population data on MFN2 mutations by ethnicity are still limited. In a Korean population study, MFN2 was found to be the cause of CMT2 in 24.2% of the 62 families studied [11]. In American pedigree families, MFN2 mutations were found in three of 13 families studied [10]. Molecular studies in a Japanese population revealed a lower frequency (seven of 81 CMT2 families studied) [34], although the low frequency of mutations identified in that research was probably due to the technique employed. In our research, 24 patients from a total of 14 families exhibited mutations in the MFN2 gene. This represents  $16\% \pm 7.7\%$  of all the families studied. However, if we focus on the inheritance pattern,  $30.0\% \pm 14.2\%$  (12/40) of dominant types presented mutation and 85% (12/14) of the families where changes were identified had dominant inheritance. Meanwhile, only two families (4.8%) from the 42 cases studied where the

inheritance pattern was unknown presented MFN2 mutations (Table 1). This constituted a statistically significant difference of  $p=0.002$  when the  $\chi^2$  test was applied. When these findings were correlated with severity, it was observed that MFN2 mutation was found in 14.7% of families presenting mild neuropathy (5/34), in 19.3% of families presenting moderate neuropathy (6/31), and in 37.5% of families presenting severe neuropathy (3/8). Ten of the 39 families with moderate or severe neuropathy ( $25.6\pm 13.2\%$ ) presented MFN2 mutations. Moreover, if only the families presenting severe neuropathy and with known dominant inheritance were considered, 60% (3/5) were found to have MFN2 mutations.

This research has contributed the largest number of polymorphisms found for the MFN2 gene published to date. We would like to highlight the change, c.-372\_387del, in exon 1. This change was found in three of the 85 families studied and was not found in any of the anonymous, healthy controls. However, segregation studies of this change in one family demonstrate that it is not pathogenic, despite being found close to the gene promoter area.

This is the first research to investigate MFN2 mutations in axonal CMT patients from the Mediterranean population. From this study, conducted on a large sample of 85 families with axonal neuropathy and suspected CMT, we conclude that MFN2 gene mutations are the most frequent cause of CMT2 in this region. These findings are consistent with the epidemiological studies published to date. A further contribution of this research was the functional study of the Arg468His mutation, which represented the most prevalent mutation found in this study, and confirmed that this is a pathological mutation or at least represents an additional risk factor for developing sensory–motor axonal neuropathy. Because of our research findings, we believe that molecular analysis of the MFN2 gene is indicated in the study of CMT2 in this region, and that it is of most use in cases of known dominant inheritance, severe symptoms, or the presence of additional symptoms, especially OA.

## REFERENCES

1. Skre H. Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie, Tooth disease. *Clin Genet.* 1974;6:98-1998
2. Pareyson D. Differential diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease and related neuropathies. *Neurol Sci.* 2004;25:72-82
3. Pareyson D, Scaiola V, Laurà M. Clinical and electrophysiological aspects of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med.* 2006;8(1-2):3-22.
4. Zhao C, Takita J, Tanaka Y, Setou M, Nakagawa T, Takeda S, Yang HW, Terada S, Nakata T, Takei Y, Saito M, Tsuji S, Hayashi Y, Hirokawa N. Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. *Cell.* 2001 1;105(5):587-97
5. Züchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, Zappia M, Nelis E, Patitucci A, Senderek J, Parman Y, Evgrafov O, Jonghe PD, Takahashi Y, Tsuji S, Pericak-Vance MA, Quattrone A, Battaloglu E, Polyakov AV, Timmerman V, Schröder JM, Vance JM. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet.* 2004;36(5):449-51
6. Ishihara N, Eura Y, Mihara K. Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J Cell Sci.* 2004; 15;117(Pt 26)

7. Inherited Peripheral database.  
<http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/Mutations/Mutations.cfm>. Last access August the 12th 2009
8. Verhoeven K, Claeys KG, Züchner S, Schröder JM, Weis J, Ceuterick C, Jordanova A, Nelis E, De Vriendt E, Van Hul M, Seeman P, Mazanec R, Saifi GM, Szigeti K, Mancias P, Butler IJ, Kochanski A, Ryniewicz B, De Bleecker J, Van den Bergh P, Verellen C, Van Coster R, Goemans N, Auer-Grumbach M, Robberecht W, Milic Rasic V, Nevo Y, Tournev I, Guergueltcheva V, Roelens F, Vieregge P, Vinci P, Moreno MT, Christen HJ, Shy ME, Lupski JR, Vance JM, De Jonghe P, Timmerman V. MFN2 mutation distribution and genotype/phenotype correlation in Charcot-Marie-Tooth type 2. *Brain*. 2006;129(Pt 8):2093-102
9. Zhu D, Kennerson ML, Walizada G, Züchner S, Vance JM, Nicholson GA Charcot-Marie-Tooth with pyramidal signs is genetically heterogeneous: families with and without MFN2 mutations. *Neurology*. 2005 ; 9;65(3):496-7.
10. Lawson VH, Graham BV, Flanigan KM. Clinical and electrophysiologic features of CMT2A with mutations in the mitofusin 2 gene. *Neurology*. 2005; 26;65(2):197-204.
11. Chung KW, Kim SB, Park KD, Choi KG, Lee JH, Eun HW, Suh JS, Hwang JH, Kim WK, Seo BC, Kim SH, Son IH, Kim SM, Sunwoo IN, Choi BO. Early onset severe and late-onset mild Charcot-Marie-Tooth disease with mitofusin 2 (MFN2) mutations. *Brain*. 2006;129(Pt 8):2103-18.
12. Del Bo R, Moggio M, Rango M, Bonato S, D'Angelo MG, Ghezzi S, Airoidi G, Bassi MT, Guglieri M, Napoli L, Lamperti C, Corti S, Federico A, Bresolin N, Comi GP. Mutated mitofusin 2 presents with intrafamilial variability and brain mitochondrial dysfunction. *Neurology*. 2008.; 9;71(24):1959-66

13. Shy ME, Blake J, Krajewski K, Fuerst DR, Laura M, Hahn AF, Li J, Lewis RA, Reilly M. Reliability and validity of the CMT neuropathy score as a measure of disability. *Neurology*. 2005;12;64(7):1209-14.
14. Sivakumar K, Kyriakides T, Puls I, Nicholson GA, Funalot B, Antonellis A, Sambuughin N, Christodoulou K, Beggs JL, Zamba-Papanicolaou E, Ionasescu V, Dalakas MC, Green ED, Fischbeck KH, Goldfarb LG. Phenotypic spectrum of disorders associated with glycyI-tRNA synthetase mutations. *Brain*. 2005 Oct;128(Pt 10):2304-14.
15. Del Bo R, Locatelli F, Corti S, Scarlato M, Ghezzi S, Prella A, Fagiolari G, Moggio M, Carpo M, Bresolin N, Comi GP. Coexistence of CMT-2D and distal SMA-V phenotypes in an Italian family with a GARS gene mutation. *Neurology*. 2006 Mar 14;66(5):752-4
16. Lupski JR, de Oca-Luna RM, Slaugenhaupt S, Pentao L, Guzzetta V, Trask BJ, Saucedo-Cardenas O, Barker DF, Killian JM, Garcia CA, Chakravarti A, Patel PI. DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell*. 1991; 26;66(2):219-32.
17. Takahashi E, Takeda O, Himoro M, Nanao K, Takada G, Hayasaka K. Localization of PMP-22 gene (candidate gene for the Charcot-Marie-Tooth disease 1A) to band 17p11.2 by direct R-banding fluorescence in situ hybridization. *Jpn J Hum Genet*. 1992;37(4):303-6.
18. Baxter RV, Ben Othmane K, Rochelle JM, Stajich JE, Hulette C, Dew-Knight S, Hentati F, Ben Hamida M, Bel S, Stenger JE, Gilbert JR, Pericak-Vance MA, Vance JM. 2002 Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nat Genet*. 2002;30(1):21-2.
19. Cuesta A, Pedrola L, Sevilla T, García-Planells J, Chumillas MJ, Mayordomo F, LeGuern E, Marín I, Vílchez JJ, Palau F. The gene encoding ganglioside-induced differentiation-



associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nat Genet.* 2002;30(1):22-5.

20. Casasnovas C, Banchs I, Corral J, Martínez-Matos JA, Volpini V. Clinical and molecular analysis of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease type 1 in Spanish population. *Clin Genet.* 2006;70(6):516-23
21. Houlden H, Reilly MM. Molecular genetics of autosomal-dominant demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med.* 2006;8(1-2):43-62
22. Loiseau D, Chevrollier A, Verny C, Guillet V, Gueguen N, Pou de Crescenzo MA, Ferré M, Malinge MC, Guichet A, Nicolas G, Amati-Bonneau P, Malthièry Y, Bonneau D, Reynier P. Mitochondrial coupling defect in Charcot-Marie-Tooth type 2A disease. *Ann Neurol.* 2007;61(4):315-23
23. Cassereau J, Chevrollier A, Gueguen N, Malinge MC, Letournel F, Nicolas G, Richard L, Ferre M, Verny C, Dubas F, Procaccio V, Amati-Bonneau P, Bonneau D, Reynier P. Mitochondrial complex I deficiency in GDAP1-related autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMT2K). *Neurogenetics.* 2009;10(2):145-50.
24. Banchs I, Casasnovas C, Montero J, Martínez-Matos JA, Volpini V. Two Spanish families with Charcot-Marie-Tooth type 2A: clinical, electrophysiological and molecular findings. *Neuromuscul Disord.* 2008;18(12):974-8.
25. Züchner S, De Jonghe P, Jordanova A, Claeys KG, Guergueltcheva V, Cherninkova S, Hamilton SR, Van Stavern G, Krajewski KM, Stajich J, Tournev I, Verhoeven K, Langerhorst CT, de Visser M, Baas F, Bird T, Timmerman V, Shy M, Vance JM. Axonal neuropathy with optic atrophy is caused by mutations in mitofusin 2. *Ann Neurol.* 2006;59(2):276-81

26. Guillet V, Gueguen N, Chevrollier A, Verny C, Loiseau D, Ferre M, Procaccio V, Amati-Bonneau P, Bonneau D, Reynier P. ATP/ADP Translocase is involved in mitochondrial coupling defect in Charcot–Marie–Tooth Type 2A Disease related to MFN2 mutations. *Neurogenetics*. 2009 Jul 18. [Epub ahead of print]
27. Santel A, Fuller MT. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci*. 2001;114:867-874
28. Bach D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Baumgartner B, Oriola J, Dagaard JR, Lloberas J, Camps M, Zierath JR, Rabasa-Lhoret R, Wallberg-Henriksson H, Laville M, Palacín M, Vidal H, Rivera F, Brand M, Zorzano A. Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J Biol Chem*. 2003;9;278(19):17190-7
29. 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;20;160(2):189-200.
30. Rojo M, Legros F, Chateaou D, Lombes A. Membrane topology and Mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J Cell Sci*. 2002; 115:1663-1674
31. Detmer SA, Chan DC. Complementation between mouse Mfn1 and Mfn2 protects mitochondrial fusion defects caused by CMT2A disease mutations. *J Cell Biol*. 2007; 12;176(4):405-14.
32. Detmer SA, Vande Velde C, 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; 1;17(3):367-75.

33. Amiott EA, Lott P, Soto J, Kang PB, McCaffery JM, DiMauro S, Abel ED, Flanigan KM, Lawson VH, Shaw JM. Mitochondrial fusion and function in Charcot-Marie-Tooth type 2A patient fibroblasts with mitofusin 2 mutations. *Exp Neurol*. 2008;211(1):115-27.
34. Kijima K, Numakura C, Izumino H, Umetsu K, Nezu A, Shiiki T, Ogawa M, Ishizaki Y, Kitamura T, Shozawa Y, Hayasaka K. Mitochondrial GTPase mitofusin 2 mutation in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Hum Genet*. 2005;116(1-2):23-7.
35. Nicholson GA, Magdelaine C, Zhu D, Grew S, Ryan MM, Sturtz F, Vallat JM, Ouvrier RA. Severe early-onset axonal neuropathy with homozygous and compound heterozygous MFN2 mutations. *Neurology*. 2008;67(19):1678-81.
36. Engelfried K, Vorgerd M, Hagedorn M, Haas G, Gilles J, Epplen JT, Meins M. Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A: novel mutations in the mitofusin 2 gene (MFN2). *BMC Med Genet*. 2006; 8;7:53
37. 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; 10;27(2):422-30
38. Pich S, Bach D, Briones P, Liesa M, Camps M, Testar X, Palacín M, Zorzano A. The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Hum Mol Genet*. 2005;14(11):1405-15 Database of Transcriptional Start Sites. <http://dbtss.hgc.jp>, last access August the 12th 2009
39. Cartoni R, Martinou JC. Role of mitofusin 2 mutations in the physiopathology of Charcot-Marie-Tooth disease type 2A. *Exp Neurol*. 2009;218(2):268-73.

## TABLE LEGENDS

TABLE 1. Summary of the Molecular and Clinical Findings for the 14 Families with MFN2 Gene Changes Identified in our Research

TABLE 2. Summary of the Polymorphisms Found, Together with their Frequency (Database of Transcriptional Start Sites: <http://dbtss.hgc.jp/>)

TABLE 3. Mitochondrial Complex Enzymatic Activities (Mean  $\pm$  Standard Deviation)  
NADH ubiquinone reductase (complex I), succinate ubiquinone reductase (complex II), ubiquinone cytochrome c reductase (complex III), cytochrome c oxidase (complex IV), F1-ATPase (complex V), lactate dehydrogenase (LDH), and citrate synthase (CS) enzymatic activities were measured in two independent experiments in fibroblasts from an Arg468His patient and control subjects (n=12). Activities were normalized to that of CS.

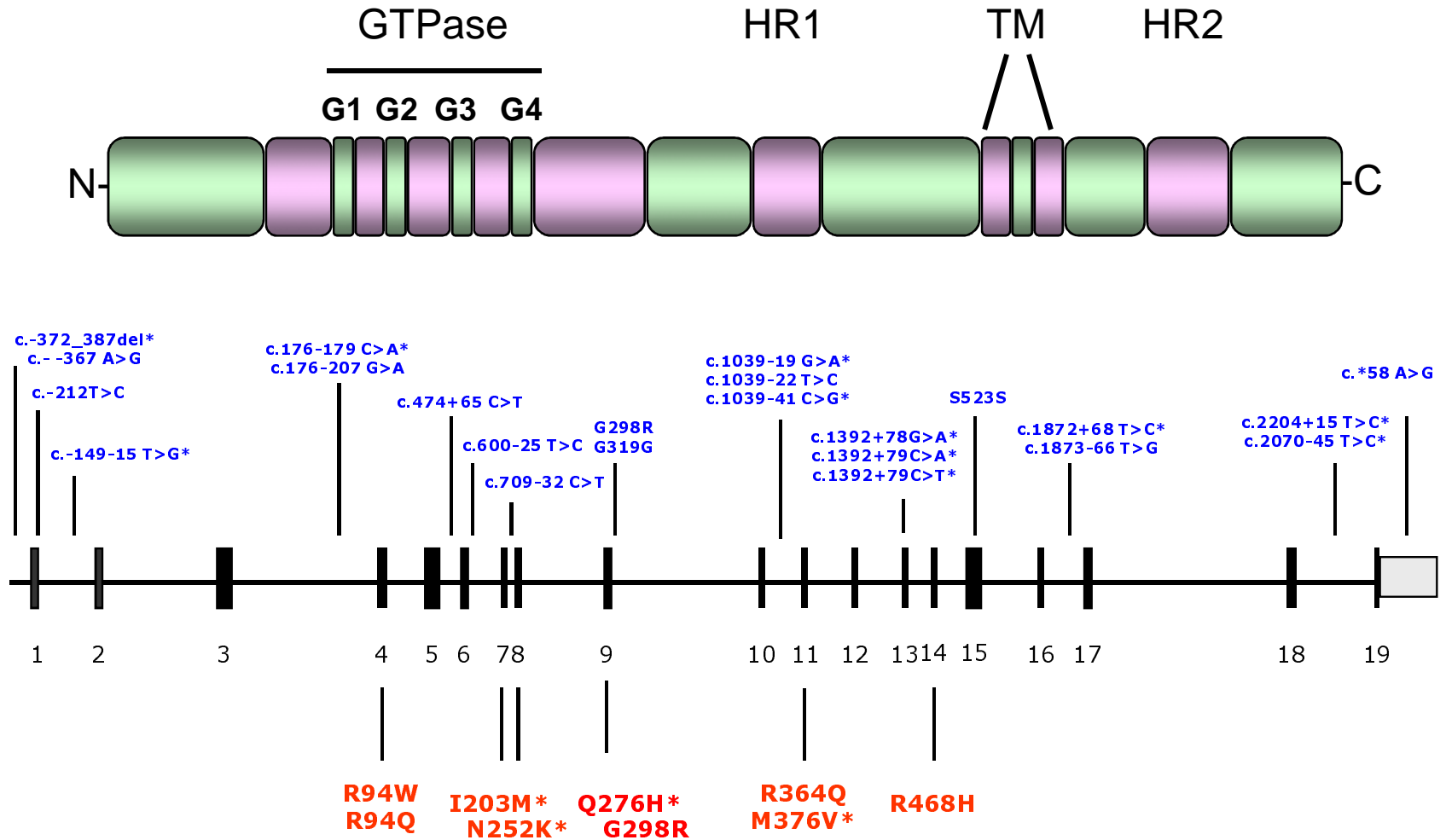
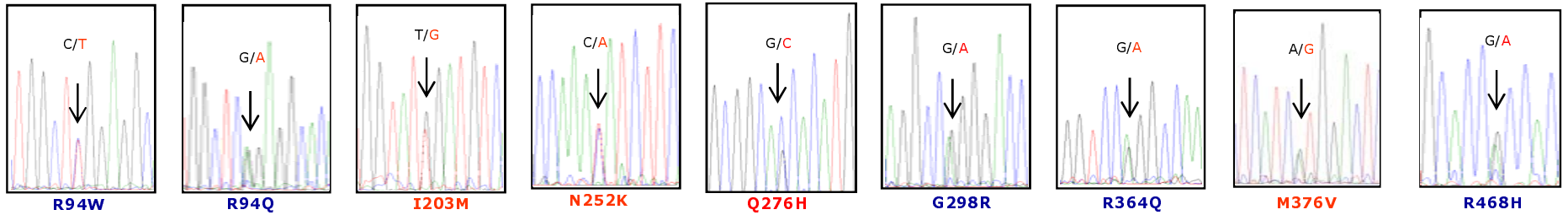
## FIGURE LEGENDS

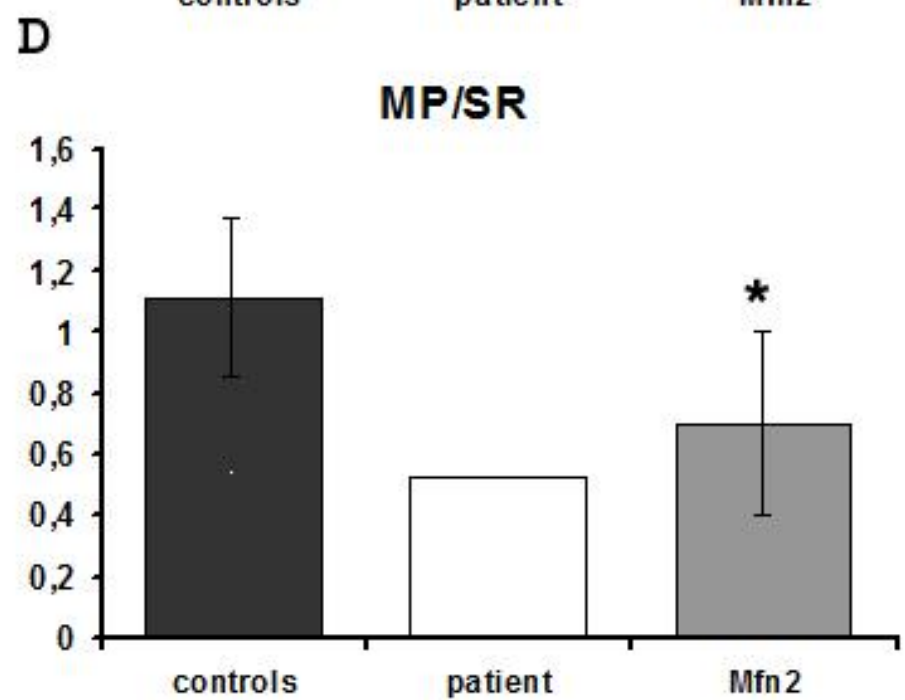
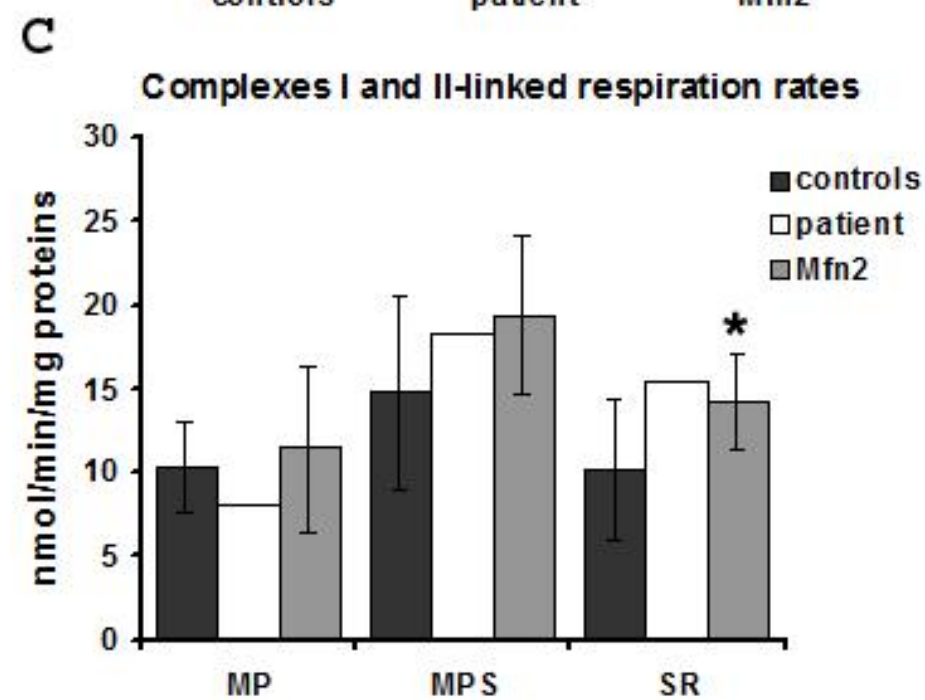
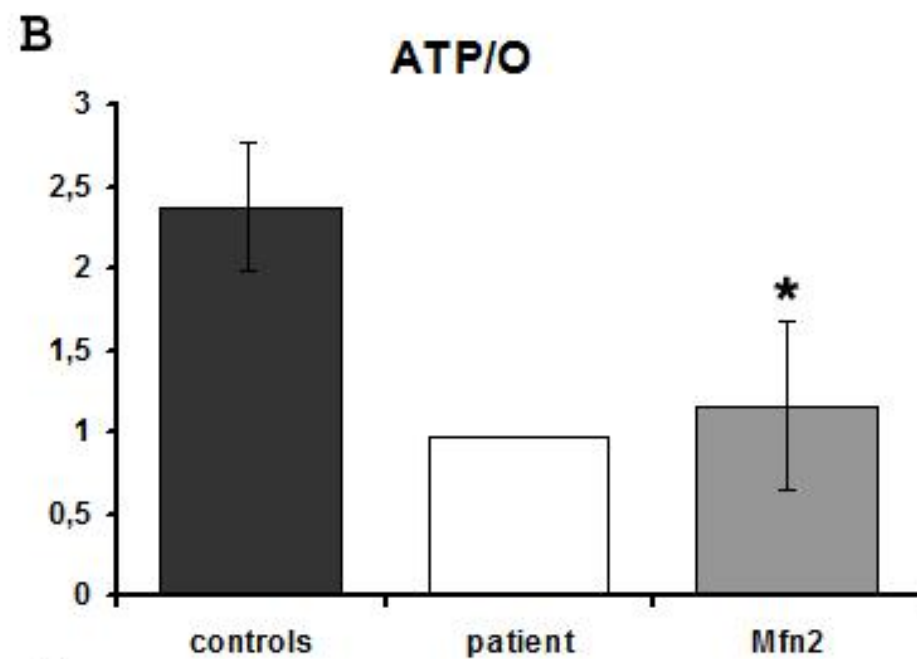
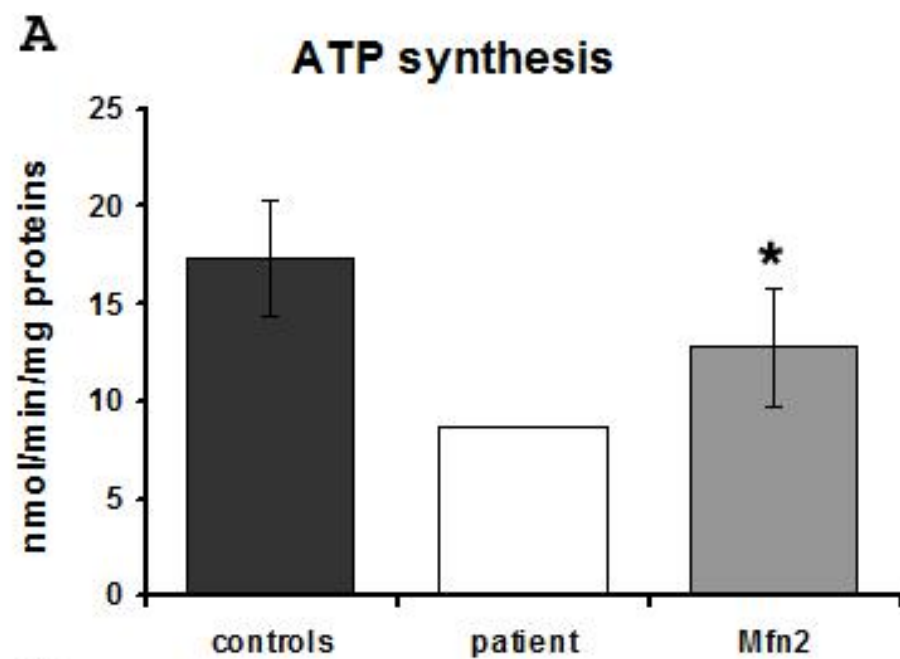
FIGURE 1. A. Position of the different changes found in our study of the MFN2 gene. Polymorphisms are shown in blue and pathological changes are shown in red. Changes not previously described are marked with an asterisk\*. B. Electropherogram images of the nine different mutations found in the 14 families presenting changes to MFN2. The previously undescribed changes are marked with an asterisk\*.

FIGURE 2. Determination of respiratory parameters in permeabilized fibroblasts from controls, CMT2A patients, and the Arg468His patient. (A) Rates of mitochondrial ATP synthesis measured by luminescence from aliquots sampled in a polarographic chamber. (B) Coupling efficiency (ATP/O) i.e., rate of nanomoles of ATP produced per nanomole of oxygen consumed with malate, pyruvate, and succinate as substrates. (C) Oxygen consumption measured in permeabilized cells in the presence of complex I-dependent substrates (5 mM malate and 5 mM pyruvate) or complex II-dependent substrate (10 mM succinate), and rotenone (10  $\mu$ M) and 1.5 mM ADP. (D) MP/SR ratio was calculated as the ratio of the malate–pyruvate-dependent respiration rate to the succinate–rotenone-dependent respiration rate.

"The Corresponding Author has the right to grant on behalf of all authors and does grant on behalf of all authors, an exclusive licence (or non exclusive for government employees) on a worldwide basis to the BMJ Publishing Group Ltd to permit this article (if accepted) to be published in Journal of Medical Genetics and any other BMJPGl products and sublicences such use and exploit all subsidiary rights, as set out in our licence (<http://group.bmj.com/products/journals/instructions-for-authors/licence-forms>)."

Competing Interest: None to declare.

**A****B**





#### **4. Diagnosis of Charcot-Marie-Tooth Disease**

*Banchs I\*, Casasnovas C\*, Albertí A, De Jorge L, Povedano M, Montero J, Martínez-Matos JA, Volpini V.*

\* Co-Autores al mismo nivel de contribución

*J Biomed Biotechnol.* 2009;2009:985415. Epub 2009 Oct 8

En este trabajo se revisan los últimos avances clínicos, electrofisiológicos y moleculares en la enfermedad de Charcot.

Se proponen algoritmos diagnósticos del CMT 1, 2 y CMT recesivo, en base a los últimos estudios poblacionales publicados.

## Review Article

# Diagnosis of Charcot-Marie-Tooth Disease

**Isabel Banchs,<sup>1</sup> Carlos Casasnovas,<sup>2</sup> Antonia Albertí,<sup>2</sup> Laura De Jorge,<sup>1</sup> Mónica Povedano,<sup>2</sup> Jordi Montero,<sup>2</sup> Juan Antonio Martínez-Matos,<sup>2</sup> and Victor Volpini<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Molecular Diagnosis Center of Inherited Diseases, Institut de Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), Gran Via 199, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain*

<sup>2</sup> *Unitat de Neuromuscular, Neurology Department, Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain*

Correspondence should be addressed to Carlos Casasnovas, carloscasasnovas@bellvitgehospital.cat

Received 24 March 2009; Revised 24 June 2009; Accepted 8 July 2009

Recommended by John McGregor

Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease or hereditary motor and sensory neuropathy (HMSN) is a genetically heterogeneous group of conditions that affect the peripheral nervous system. The disease is characterized by degeneration or abnormal development of peripheral nerves and exhibits a range of patterns of genetic transmission. In the majority of cases, CMT first appears in infancy, and its manifestations include clumsiness of gait, predominantly distal muscular atrophy of the limbs, and deformity of the feet in the form of foot drop. It can be classified according to the pattern of transmission (autosomal dominant, autosomal recessive, or X linked), according to electrophysiological findings (demyelinating or axonal), or according to the causative mutant gene. The classification of CMT is complex and undergoes constant revision as new genes and mutations are discovered. In this paper, we review the most efficient diagnostic algorithms for the molecular diagnosis of CMT, which are based on clinical and electrophysiological data.

Copyright © 2009 Isabel Banchs et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 1. Introduction

Hereditary neuropathies are a genetically heterogeneous group of diseases that affect the peripheral nervous system. The most common form is the hereditary motor and sensory neuropathy (HMSN), also called Charcot-Marie-Tooth disease (CMT). Almost 120 years have elapsed since the first contemporary description of the same familial neurological syndrome, “peroneal muscular atrophy” (Charcot and Marie, 1886; Tooth, 1886). Dyck and Lambert (1968) were the first to observe, using electrophysiological studies, a marked nerve conduction slowing in some families, whereas conduction was preserved in others. These authors contributed to a rational classification of the complex peroneal muscular atrophies according to inheritance pattern and clinical, electrophysiological, and pathological features. They introduced the term “hereditary motor and sensory neuropathy” and classified the autosomal-dominant form with low conduction velocities as HMSN type I (or CMT 1) and the autosomal-dominant form with preserved conduction velocities as HMSN type II (or CMT 2). Harding and Thomas (1980) observed that the motor nerve conduction

velocities (NCV) showed a bimodal distribution and set a median NCV of 38 m/s as an arbitrary but rational threshold between the demyelinating HMSN type I (motor NCV <38 m/s) and the axonal HMSN type II (motor NCV >38 m/s).

## 2. Classification

The most commonly used classification combines clinical findings with the inheritance pattern (autosomal dominant, autosomal recessive, or X linked) and either electrophysiological or anatomical pathology findings (axonal or demyelinating). The demyelinating forms are characterized by predominantly affecting the sheath of myelin that surrounds the axon of peripheral nerves. The main function of myelin is to increase NCV. Therefore, the most notable electrophysiological finding in this form of the disorder is a low NCV. The axonal forms of the disease are caused by specific effects on the axon itself; neurophysiological studies reveal conserved NCVs, while the amplitude of the motor and sensory potentials (which are a reliable indication of axon conservation) are greatly reduced. Recently, disease



FIGURE 1: Foot drop in a patient with CMT1 caused by duplication of the genomic fragment that encompasses *PMP22* (CMT1A).

variants have been described that combine effects on both the myelin and the axon and that, therefore, have intermediate conduction speeds. The transmission of many of these new variants is X linked [1].

The combination of these data allows the identification of several main categories of CMT. The majority of cases can be classified as CMT1 (i.e., demyelinating forms with low NCVs and autosomal-dominant transmission), CMT2 (i.e., axonal form, usually showing a dominant inheritance pattern), or CMT4 (i.e., recessive and severe forms). Each of these types can be further divided into subtypes, depending on the underlying causative molecular defect (Table 1). However, it should be noted that there is not a good genotype—phenotype correlation and that great variability exists, both within and between families, regarding the degree of clinical expression [2]. With the advent of genetic testing, nerve biopsies are reserved for patients for whom genetic testing did not lead to a molecular diagnosis, for patients with atypical presentation, or for patients with suspected inflammatory neuropathy. Recently, peripheral nerve, magnetic resonance studies and skin biopsy have emerged as potential diagnostic aids for certain types of hereditary neuropathies [3].

### 3. Epidemiology of CMT

The prevalence of CMT ranges from 10 to 30 per 100,000, depending on the geographical region of origin [4, 5]. Two extensive studies in the literature indicate that the most common subtypes are CMT1 (demyelinating with autosomal-dominant transmission) and CMT2 (axonal and usually dominant). In Western countries, the most common cause of CMT1 is CMT1A, which results from the duplication of a genomic fragment that encompasses the *PMP22* gene on chromosome 17. It would appear that CMT1B is more common in Japan than in Western countries [6, 7]. In the recent years, all the published studies identify CMT2A as the most common cause of CMT2 (which would account for 10–33% of cases) [8].

## 4. CMT1

This form is characterized by autosomal-dominant transmission and NCVs in the demyelinating range, as indicated by electrophysiological studies, that is, NCVs <38 m/s (the normal NCV being >50 m/s). The degree of reduction in NCV does not correlate with the clinical severity of the disease, and low NCVs can even be detected in asymptomatic individuals and as early as one year of age [9].

Nerve biopsy, which is not routinely carried out, reveals a loss of large myelinated fibers, demyelination and remyelination, and an “onion bulb” appearance.

CMT1 can be divided into CMT1 A, B, C, D, E, or F, depending on the underlying causative molecular defect (Table 1).

**4.1. CMT1A.** CMT1A is the most common cause of CMT1 in Western countries. In the majority of cases, it is caused by the duplication of a 1.5 Mb fragment on chromosome 17p.11 that includes the *PMP22* gene. The *PMP22* protein is predominantly expressed in Schwann cells and can be found in compact myelin. It has a structural function (myelination) and regulates cell growth. Overexpression of *PMP22* reduces the proliferation of Schwann cells. This trait is dominant; in 89% of cases, it is of paternal origin, while in 11% of cases it is of maternal origin [2, 9]. It is estimated that about 5–24% of the the duplication mutation may occur de novo thus, the absence of family history does not preclude genetic testing.

Molecular studies of *PMP22* are carried out using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), in which all 38 fragments of the gene are amplified at once (nine within the different exons of the *PMP22* gene, seven in the region that encompasses the duplication, two outside the duplicated region, and the rest in different chromosomes, as controls to calculate gene dosage). Once this Polymerase Chain Reaction has been performed, sequence analysis is carried out using an ABI Prism sequencer. To complete the study, seven molecular markers or microsatellites present in the 1.5 Mb duplicated region are analyzed. Microsatellites are repetitions of 2 to 6 nucleotides that exhibit great variability, which renders them very polymorphic. They are normally found in noncoding regions of the genome. The microsatellites considered here are D17S839, D17S921, D17S1356, D17S1357, D17S1358, D17S955, and D17S261. They are amplified using PCR and are then analyzed using the ABI Prism sequencer.

Point mutations of this gene have also been described as a cause of CMT1A, although not very frequently (2–5% of CMT1A cases) [7]. It is estimated that about one third of the point mutations may occur de novo. The molecular analysis of these cases should be performed by direct sequencing of each of the coding fragments and exons of the gene.

Symptoms usually first appear in infancy and include clumsiness of gait and deformity of the feet. Patients may suffer from cramps, which are heightened after physical exercise. Positive sensory alterations are extremely rare and represent a departure feature from acquired polyneuropathies. Foot drop is evident on physical examination (Figure 1) and so are retraction of the Achilles tendon and the presence of

TABLE 1: Summary of CMT classification, including clinical data (such as electrophysiological results) and molecular findings.

Dominant forms			
CMT 1 (demyelinating)			
Type	Gene	Inheritance	Locus
CMT1A:	PMP-22	Dominant/sporadic	17p11
CMT1B:	P <sub>0</sub> protein	Dominant	1q22
CMT1C:	LITAF	Dominant	16p13
CMT1D:	EGR2	Dominant	10q21
CMT1E:	P <sub>0</sub> protein	Dominant	1q22
CMT1F:	Neurofilament Light chain	Dominant/sporadic	8p21
CMT 2 (axonal)			
Type	Gene	Inheritance	Locus
CMT 2A1:	KIF1B	Dominant	1p36
CMT 2A2:	MFN2	Dominant	1p36
CMT 2B:	RAB7	Dominant	3q13-q22
CMT 2C:		Dominant	12q23-q24
CMT 2D:	GARS	Dominant	7p15
CMT 2E:	Neurofilament light chain	Dominant	8p21
CMT 2F:	HSPB1	Dominant/recessive	7q11-q21
CMT 2G:		Dominant	12q12
CMT 2I:	P <sub>0</sub>	Dominant	1q22
CMT 2J:	P <sub>0</sub>	Dominant	1q22
CMT 2L:	HSPB8	Dominant	12q24
AR-CMT2A	Lamin A/C	Recessive	1q21.2
AR-CMT2B	Med25	Recessive	19q13.3
CMT 2K:	GDAP1	Recessive/dominant	8q21
Intermediate NCV			
Type	Gene	Inheritance	Locus
Connexin-32	GJB1	X-linked	Xq13
CMT DIA		Dominant	10q24
CMT DIB	DNM2	Dominant	19p12
CMT DIC	Tyrosyl-tRNA synthetase	Dominant	1p34
CMT DI3	P <sub>0</sub>	Dominant	1q22
CMT 2E:	Neurofilament light chain	Dominant	8p21
CMT 4			
Type	Gene	Inheritance	Locus
CMT 4A:	GDAP1	Recessive	8q21
CMT 4B1:	MTMR2	Recessive	11q23
CMT 4B2:	SBF2	Recessive	11p15
CMT 4C:	SH3TC2 (KIAA1985)	Recessive	5q32
CMT 4D (Lom):	NDRG1	Recessive	8q24
CMT 4E:	EGR2	Recessive/dominant	10q21
CMT 4F:	Periaxin	Recessive	19q13
HMSN-Russe	(4G)	Recessive	10q23
CMT 4H:	FGD4	Recessive	12q12

an abundance of corns. Over time, these symptoms are compounded by weakness and atrophy of the intrinsic foot and peroneal muscles, which cause “steppage” gait. The hands can also be affected, with the presence of claw hand in extreme cases. Generalized areflexia is an early and very frequent finding. Some patients present with scoliosis (10%) and nerve hypertrophy (25–66%). Extensive electrophysiological studies reported in the literature reveal that NCVs are always in the demyelinating range and remain constant throughout the evolution of the disease. This confirms that the determination of motor NCV of the median nerve is an excellent marker for genetically determined neuropathies. Conduction blocks are rare in CMT1A, as are temporal dispersion phenomena, as opposed to what is observed in acquired demyelinating neuropathies or CMT1 Types B and C. There may also be signs of secondary axonal degeneration [7].

Hereditary Neuropathy with Liability to Pressure Palsies (HNPP).

In the majority of cases (85%), HNPP is caused by the deletion of a 1.5 Mb fragment on chromosome 17p.11, which includes the *PMP22* gene. Therefore, the deleted region is identical to the region duplicated in CMT1A. Nonsense mutations, frameshifts with premature termination, missense mutations, and splice site changes have been reported in the remaining 15% of cases. The clinical phenotype of these patients is characterized by recurrent nerve dysfunction at compression sites. Asymmetric palsies can occur after relatively minor compression or trauma. With ageing, these patients can have a significant clinical overlap with CMT1, as the repeated injuries to the nerve can prevent full reversal. Electrophysiological findings include mildly slowed NCV and increased motor latencies and conduction blocks [3, 10–12].

**4.2. CMT1B.** This form of the disease is caused by mutations in the myelin zero protein (MZP), which is a 28 kDa protein comprising 219 amino acids. MZP is found exclusively in Schwann cells and is the most abundant protein in the myelin of peripheral nerve tissues, whereas it is not found in the myelin of the central nervous system. It is indispensable for the normal structure and function of myelin. The gene that encodes MZP has six exons and is located on chromosome 1q22. In the majority of cases, the disease is caused by point mutations, particularly in exons 2 and 3, which correspond to the immunoglobulin-like extracellular domain [8–10].

In CMT1B, the onset of symptoms may be delayed, movement of the pupils may be affected, and deafness may be present. Electrophysiological studies reveal that patients can be segregated into two groups, according to NCV: one with NCVs <38 m/s and the other with NCVs above this threshold (i.e., in the axonal range). These findings render the classification of CMT even more difficult, as mutations in the same gene can cause either CMT1 (demyelinating), CMT2 (axonal), CMT with intermediate NCV (CMTDI3) or CMT associated with deafness (CMT1E) [6]. Nerve conduction blocks have also been described in CMT1B [13].

**4.3. Other Types of CMT1.** Mutations in the *LITAF* and *ERG2* genes cause CMT1C and D, respectively. In CMT1C, electrophysiological findings include the presence of temporal dispersion and nerve conduction blocks. The molecular study of both genes is carried out by direct sequencing to search for point mutations in coding regions [6].

## 5. Diagnostic Protocol for CMT1

The diagnostic protocol for demyelinating and dominant CMT (CMT1), which has been adapted from England et al. [14, 15], is summarized in Figure 2. Given that the data available suggest that duplication of *PMP22* is the most frequent cause of CMT1 and that mutation of *PMP22* is the most common cause of sporadic CMT1 [6, 16], it is proposed that the study of demyelinating CMT should begin by checking for duplication of the genomic fragment encompassing *PMP22*. Once this duplication has been ruled out, in sporadic cases or in cases where there is no male-to-male transmission, researchers should check for point mutations in the *GJB1* gene (which can be used to diagnose up to 12% of cases). If there are no changes in *GJB1*, *MPZ* and then *PMP22* should be analyzed for the presence of point mutations. In the remaining cases, one should look for alterations in genes that are known to cause CMT at a lower frequency: *EGR2*, *NEFL*, and *LITAF*.

## 6. CMT2

The most common form of CMT2 is CMT2A [17–19]. It is caused by mutations in *MFN2*, which codes for the mitofusin 2 protein. Mitofusin 2 is a GTPase that is involved in the fusion of mitochondria. It is ubiquitously expressed and is present in the spinal cord, muscle, heart, and peripheral nerves. Intracellularly, it is attached to the outer mitochondrial membrane via its C-terminal domain. It also has an N-terminal GTPase domain, which is located in the cytoplasm. This domain can form a complex with another mitochondrial protein, mitofusin 1. Mitofusin 2 regulates the architecture of the mitochondrial network via mitochondrial fusion, in a stage downstream of mitofusin 1 [19–24].

The majority of *MFN2* mutations described in the literature are of the missense type, although stop mutations have also been described. These mutations have been found in cytoplasmic domains, within or immediately upstream of the GTPase domain, within two coiled-coil domains, or in association with the functioning or mitochondrial targeting of mitofusin 2. De novo mutations have also been found occasionally. Although most cases are autosomal dominant, homozygous or compound heterozygous mutations that produce a more severe form of the disease have been described. The molecular study of CMT2 is carried out by direct sequencing of the 19 exons of *MFN2* [18–20].

The CMT2 phenotype is highly heterogeneous, with variable penetrance, and there are mutations associated with both early- and late-onset forms of the disease. Some frequent clinical associations have been described, such as the presence of optical atrophy and tremors, migraine, and

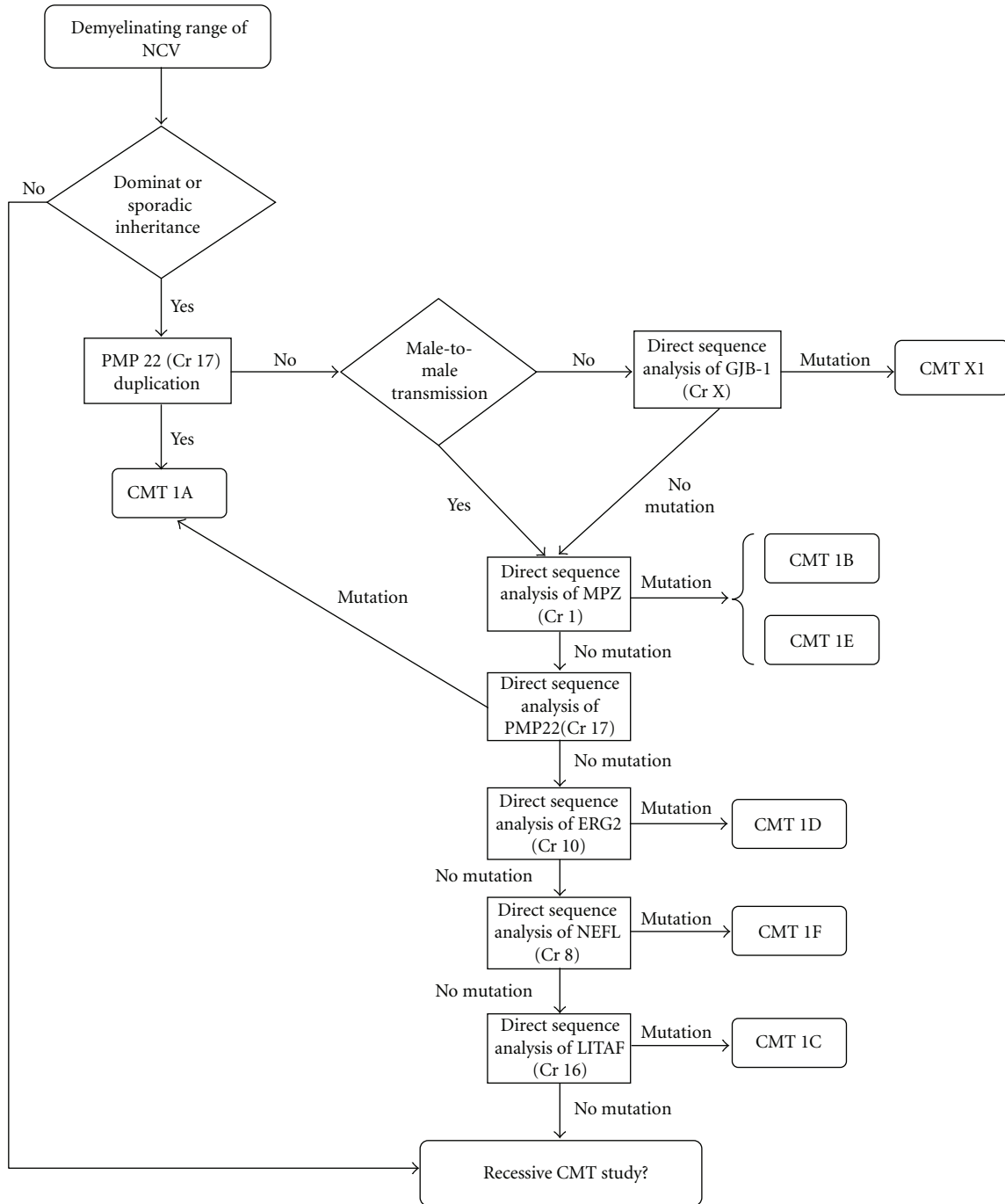


FIGURE 2: Diagnostic protocol for demyelinating CMT (adapted from England et al.) [10, 11].

effects on the central nervous system. In general, we expect to find greater atrophy of the limbs (Figure 3) and an absence of nerve hypertrophy on palpation [23, 25].

Other less common CMT2 subtypes with unusual characteristics may be encountered. CMT2B presents with ulcerative-mutilating phenomena, CMT2C exhibits paralysis of the vocal chords and affects the diaphragm, CMT2D has a greater effect on the intrinsic muscles of the hand, and CMT2J is associated with hearing impairment, alterations of

the pupils, and severe sensory disruption. Subtypes 2I and 2J are caused by mutations in the *MPZ* gene and exhibit conserved NCVs; that is, in the axonal range. Therefore, defects in the production of MPZ can lead to both Type 1 and Type 2 CMT. Cases of CMT caused by mutations in *MPZ* that result in NCVs in the intermediate range have also been reported [8, 9, 16].

The majority of cases of CMT2 show an autosomal-dominant inheritance pattern. However, some of the CMT2



FIGURE 3: Severe atrophy of the intrinsic hand muscles of a patient with CMT2 who carries a mutation in *MFN2* (CMT2A).

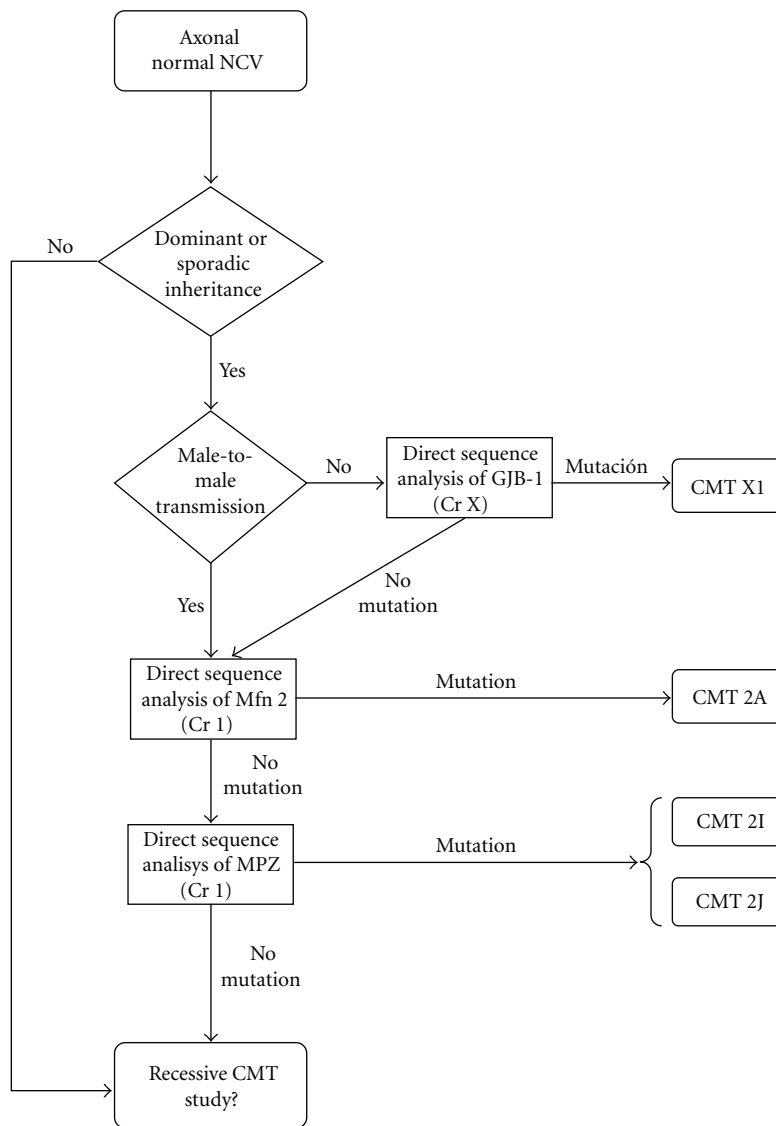


FIGURE 4: Diagnostic protocol for axonal CMT; adapted from England JD et al. [10, 11].

causative genes display recessive inheritance (*RAB7* and *LMNA*, among others), but these are limited to a few families.

An initial electrophysiological study is necessary to distinguish CMT2 from CMT1.

NCVs are normal in CMT2, but the amplitudes of the motor and sensory potentials are severely reduced. It differs from distal spinal muscular atrophy in that the latter presents normal sensory neurography. The anatomical pathology points to axonal degeneration with relative preservation of myelin.

## 7. Diagnostic Protocol for CMT2

It is proposed to start the study of axonal CMT by checking for point mutations of *MFN2* (Figure 4, adapted from England et al. [14, 15]). This is probably the most common cause of CMT2 and is responsible for up to 33% of cases in families where the inheritance pattern is known to be dominant. The data currently available suggest that variations in the *GJB1* gene may explain up to 12% of CMT (both axonal and demyelinating). Hence, the presence of mutations in this gene should be ruled out in cases of axonal CMT that have no evidence of mutations in *MFN2* and that are sporadic or have no known male-to-male transmission. After this, and in selected cases, the study should continue by checking for mutations in the genes that code for MPZ and NEFL (if dominant) or for GDAP1 (if sporadic or recessive). Other genes that could be studied in selected cases are *RAB7*, *GARS*, and *HSPB1* [13, 24–31].

## 8. CMT4

CMT4A is the most common form of CMT4 and is caused by mutations in the *GDAP1* gene. It is a severe motor and sensory neuropathy with early onset (Figure 5). Neurophysiological studies reveal NCVs in both the axonal and demyelinating range. CMT4A can be associated with paresis of the vocal cords [32, 33].

CMT4B1 is caused by mutations in the gene encoding the myotubularin-related protein 2 (MTMR2). Disease onset is in early infancy. Facial, bulbar, and diaphragmatic involvement has been reported in some families [34–37].

The CMT4B2 locus was mapped to chromosome 11p15 in Tunisian families [38].

CMT4C was mapped to chromosome 5q23-q33 [39] and was recently associated with mutations in the *KIAA1985* gene [40]. The hallmark of CMT4C is the presence of early and severe scoliosis, which is reportedly the presenting sign in the majority of patients [41].

Recessive CMT caused by mutations in *NDRG1* is particularly common among the Gypsy population. This form is classified as CMT4D (or Type “Lom”; Lom is the region of Bulgaria where this mutation originated). In our diagnostic protocol (Figure 6), we suggest studying this gene first if the subject is of Gypsy ethnicity; if no mutation is found or the subject is from a different ethnic group, then *GDAP1* should be analyzed [14, 15]. The other CMT related to the Gypsy population is the CMT Russe type. This entity has been described in Bulgarian, Romanian, and Spanish

Gypsies [42, 43] and was mapped to chromosome 10q23. It is characterized by an age of onset ranging between 8 to 16 years and progression to severe distal weakness. NCVs are moderately reduced [41].

CMT4E and CMT4F are associated with mutations in the *EGR2* and periaxin (*PRX*) genes, respectively. Finally, CMT4H was recently mapped to a new locus on chromosome 12p11.21-q13.11 [44] (Table 1).

## 9. CMT with Intermediate NCV

DI-CMT Type A has been mapped to chromosome 10q24.1-q25.1 in an Italian family. It has dominant inheritance, and the age of onset is in the first or second decade of life. It is characterized by distal weakness, mild sensory loss, absent tendon reflexes, and slow progression. Many of these patients never use a wheelchair. Nerve conduction studies reveal NCVs ranging between 25 and 45 m/s (i.e., in the intermediate range). Loss of large myelinated axons and occasional onion bulbs are found in nerve biopsies.

DI-CMT Type B is related to mutations in the dynamin 2 (*DNM2*) gene located on chromosome 19p12-p13.2. Dominant inheritance of the trait has been described in Australian, Belgian, and North-American families. This disease is allelic with centronuclear myopathy. The clinical onset of disease occurs in the first or second decade of life, and patients present with a slow evolution. Electrodiagnostic studies reveal NCVs in the intermediate range (24–54 m/s).

DI-CMT Type C is associated with mutations in the tyrosyl-tRNA synthetase (*YARS*) gene on chromosome 1p34-p35. Two DI-CMT Type C families have been reported, one from Midwestern USA and one from Bulgaria. Because of slow disease progression over decades, many patients never use a wheelchair. Electrodiagnostic studies revealed NCVs in the intermediate range (30–50 m/s). Other CMT disorders with intermediate NCV have been reported in association with mutations in *MPZ* (CMT-DI3), in the neurofilament light chain protein (*NEFL*) gene, and in *GJB-1* (CMT X) [3].

## 10. CMTX

The most common form of CMTX is dominant, X linked, and caused by point mutations in the *GJB1* gene, which is located in chromosome Xq13.1. Many different mutations have been described that are normally located on the cell surface domains of the protein (i.e., extracellular domains). At present, mutation of *GJB1* is the second most common cause of CMT in our setting [6, 7, 27, 45–49]. *GJB1* encodes connexin 32, which acts as a gap junction at the level of compact myelin.

Boys experience symptoms in the first decade of life and are seriously affected. In women, the disease follows a less severe course, with onset at 20–30 years of age and a mild presentation of the disease.

The slowing of nerve conduction is proportional to clinical severity. Unlike CMT1, there are more myelinated fibers, more regenerating fibers, and fewer “onion bulbs”, as assessed by anatomical pathology.

Characteristically, electrophysiological studies reveal NCVs in the intermediate range; that is, between the





FIGURE 5: Very severe atrophy in the arms of a patient carrying a homozygous mutation in the *GDAP1* gene (CMT4).

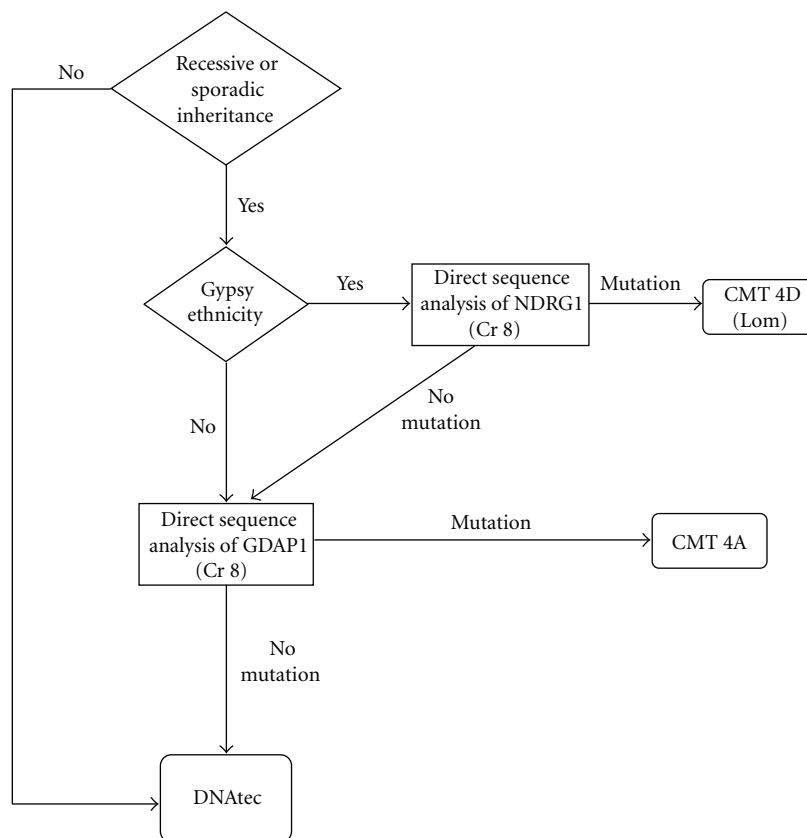


FIGURE 6: Diagnostic protocol of CMT with a suspected recessive inheritance pattern (adapted from England et al.) [10, 11].

demyelinating range of CMT1 and the axonal range of CMT2.

Although rare, there are two recessive X-linked forms of CMT, which are associated with deafness, mental retardation, and encephalomyelitis [48, 50].

## 11. Evolution and Treatment of CMT

The disease follows a slow but progressive course. At present, there is no etiological treatment; however, a prospective European multicentre study is under way to assess the use of high doses of ascorbic acid in patients with CMT1A. Ascorbic

acid has been associated with improved clinical evolution in mice. It is particularly important that patients with CMT avoid other known risk factors for the development of neuropathies, such as the use of neurotoxins (e.g., drugs and alcohol). The literature describes transitory clinical improvements in CMT1B after treatment with corticoids [4].

## 12. Conclusions

CMT is a disease that is highly heterogeneous, both clinically and genetically. Clinical and electrophysiological data are indispensable for performing efficient molecular diagnoses

of this entity. It is crucial to know which subtype affects each patient in order to provide good clinical treatment, effective diagnosis of family members, and valid prognosis.

## Acknowledgment

The first two authors (Isabel Banchs and Carlos Casasnovas) have contributed at the same level.

## References

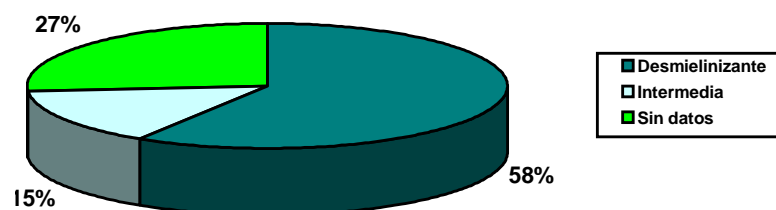
- [1] P. Dyck, P. Chance, R. Lebo, et al., "Hereditary motor and sensory neuropathies," in *Peripheral Neuropathy*, P. Dick, Ed., pp. 1094–1136, W.B. Saunders, Philadelphia, Pa, USA, 3rd edition, 1993.
- [2] T. Sevilla and J. J. Vilchez, "Diferentes fenotipos del síndrome de Charcot-Marie-Tooth causados por mutaciones del mismo gen: siguen siendo útiles los criterios de clasificación clásicos?" *Neurología*, vol. 19, no. 5, pp. 264–271, 2004.
- [3] K. Szigeti and J. R. Lupski, "Charcot-Marie-Tooth disease," *European Journal of Human Genetics*, vol. 17, no. 6, pp. 703–710, 2009.
- [4] J. Berciano and O. Combarros, "Hereditary neuropathies," *Current Opinion in Neurology*, vol. 16, no. 5, pp. 613–622, 2003.
- [5] A. E. H. Emery, "Population frequencies of inherited neuromuscular diseases—a world survey," *Neuromuscular Disorders*, vol. 1, no. 1, pp. 19–29, 1991.
- [6] S. Kurihara, Y. Adachi, K. Wada, E. Awaki, H. Harada, and K. Nakashima, "An epidemiological genetic study of Charcot-Marie-Tooth disease in Western Japan," *Neuroepidemiology*, vol. 21, no. 5, pp. 246–250, 2002.
- [7] N. Hattori, M. Yamamoto, T. Yoshihara, et al., "Demyelinating and axonal features of Charcot-Marie-Tooth disease with mutations of myelin-related proteins (PMP22, MPZ and Cx32): a clinicopathological study of 205 Japanese patients," *Brain*, vol. 126, no. 1, pp. 134–151, 2003.
- [8] M. E. Shy, A. Jáni, K. Krajewski, et al., "Phenotypic clustering in MPZ mutations," *Brain*, vol. 127, no. 2, pp. 371–384, 2004.
- [9] M. Laurà, M. Milani, M. Morbin, et al., "Rapid progression of late onset axonal Charcot-Marie-Tooth disease associated with a novel MPZ mutation in the extracellular domain," *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, vol. 78, no. 11, pp. 1263–1266, 2007.
- [10] J. Meuleman, A. Pou-Serradell, A. Löfgren, et al., "A novel 3'-splice site mutation in peripheral myelin protein 22 causing hereditary neuropathy with liability to pressure palsies," *Neuromuscular Disorders*, vol. 11, no. 4, pp. 400–403, 2001.
- [11] M. E. Shy, M. T. Scavina, A. Clark, et al., "T118M PMP22 mutation causes partial loss of function and HNPP-like neuropathy," *Annals of Neurology*, vol. 59, no. 2, pp. 358–364, 2006.
- [12] J. Li, K. Krajewski, M. E. Shy, and R. A. Lewis, "Hereditary neuropathy with liability to pressure palsy: the electrophysiology fits the name," *Neurology*, vol. 58, no. 12, pp. 1769–1773, 2002.
- [13] S. Bort, E. Nelis, V. Timmerman, et al., "Mutational analysis of the MPZ, PMP22 and Cx32 genes in patients of Spanish ancestry with Charcot-Marie-Tooth disease and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies," *Human Genetics*, vol. 99, no. 6, pp. 746–754, 1997.
- [14] J. D. England, G. S. Gronseth, G. Franklin, et al., "Practice Parameter: evaluation of distal symmetric polyneuropathy: role of laboratory and genetic testing (an evidence-based review). Report of the American Academy of Neurology, American Association of Neuromuscular and Electrodiagnostic Medicine, and American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation," *Neurology*, vol. 72, no. 2, pp. 185–192, 2009.
- [15] J. D. England, G. S. Gronseth, G. Franklin, et al., "Evaluation of distal symmetric polyneuropathy: the role of laboratory and genetic testing (an evidence-based review)," *Muscle and Nerve*, vol. 39, no. 1, pp. 116–125, 2009.
- [16] V. A. Street, G. Meekins, H. P. Lipe, et al., "Charcot-Marie-Tooth neuropathy: clinical phenotypes of four novel mutations in the MPZ and Cx 32 genes," *Neuromuscular Disorders*, vol. 12, no. 7-8, pp. 643–650, 2002.
- [17] S. Züchner, I. V. Mersiyanova, M. Muglia, et al., "Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A," *Nature Genetics*, vol. 36, no. 5, pp. 449–451, 2004.
- [18] E. Sołtysińska, D. Kabzińska, and A. Kochański, "Mutations in the mitofusin 2 gene are the most common cause of Charcot-Marie-Tooth type 2 disease," *Neurologia i Neurochirurgia Polska*, vol. 41, no. 4, pp. 350–354, 2007.
- [19] E. A. Amiott, P. Lott, J. Soto, et al., "Mitochondrial fusion and function in Charcot-Marie-Tooth type 2A patient fibroblasts with mitofusin 2 mutations," *Experimental Neurology*, vol. 211, no. 1, pp. 115–127, 2008.
- [20] D. Loiseau, A. Chevrollier, C. Verny, et al., "Mitochondrial coupling defect in Charcot-Marie-Tooth type 2A disease," *Annals of Neurology*, vol. 61, no. 4, pp. 315–323, 2007.
- [21] N. Ishihara, Y. Eura, and K. Mihara, "Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity," *Journal of Cell Science*, vol. 117, no. 26, pp. 6535–6546, 2004.
- [22] S. Züchner and J. M. Vance, "Molecular genetics of autosomal-dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease," *Neuromolecular Medicine*, vol. 8, no. 1-2, pp. 63–74, 2006.
- [23] K. Verhoeven, K. G. Claeyss, S. Züchner, et al., "MFN2 mutation distribution and genotype/phenotype correlation in Charcot-Marie-Tooth type 2," *Brain*, vol. 129, no. 8, pp. 2093–2102, 2006.
- [24] S. Züchner, P. De Jonghe, A. Jordanova, et al., "Axonal neuropathy with optic atrophy is caused by mutations in mitofusin 2," *Annals of Neurology*, vol. 59, no. 2, pp. 276–281, 2006.
- [25] I. Banchs, C. Casasnovas, J. Montero, J. A. Martínez-Matos, and V. Volpini, "Two Spanish families with Charcot-Marie-Tooth type 2A: clinical, electrophysiological and molecular findings," *Neuromuscular Disorders*, vol. 18, no. 12, pp. 974–978, 2008.
- [26] J. E. Hoogendijk, G. W. Hensels, A. A. Gabreëls-Festen, et al., "De-novo mutation in hereditary motor and sensory neuropathy type 1," *The Lancet*, vol. 339, no. 8801, pp. 1081–1082, 1992.
- [27] E. A. Janssen, S. Kemp, G. W. Hensels, et al., "Connexin32 gene mutations in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMTX1)," *Human Genetics*, vol. 99, no. 4, pp. 501–505, 1997.
- [28] K. Silander, P. Meretoja, V. Juvonen, et al., "Spectrum of mutations in Finnish patients with Charcot-Marie-Tooth disease and related neuropathies," *Human Mutation*, vol. 12, no. 1, pp. 59–68, 1998.
- [29] E. Nelis, C. Van Broeckhoven, P. De Jonghe, et al., "Estimation of the mutation frequencies in Charcot-Marie-Tooth disease type 1 and hereditary neuropathy with liability to pressure

- palsies: a European collaborative study," *European Journal of Human Genetics*, vol. 4, no. 1, pp. 25–33, 1996.
- [30] G. A. Nicholson, "Mutation testing in Charcot-Marie-Tooth neuropathy," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 883, pp. 383–388, 1999.
- [31] B. O. Choi, M. S. Lee, S. H. Shin, et al., "Mutational analysis of PMP22, MPZ, GJB1, EGR2 and NEFL in Korean Charcot-Marie-Tooth neuropathy patients," *Human Mutation*, vol. 24, no. 2, pp. 185–186, 2004.
- [32] A. Cuesta, L. Pedrola, T. Sevilla, et al., "The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease," *Nature Genetics*, vol. 30, no. 1, pp. 22–25, 2002.
- [33] T. Sevilla, A. Cuesta, M. J. Chumillas, et al., "Clinical, electrophysiological and morphological findings of Charcot-Marie-Tooth neuropathy with vocal cord palsy and mutations in the GDAP1 gene," *Brain*, vol. 126, no. 9, pp. 2023–2033, 2003.
- [34] A. Bolino, M. Muglia, F. L. Conforti, et al., "Charcot-Marie-Tooth type 4B is caused by mutations in the gene encoding myotubularin-related protein-2," *Nature Genetics*, vol. 25, no. 1, pp. 17–19, 2000.
- [35] A. Bolino, E. R. Levy, M. Muglia, et al., "Genetic refinement and physical mapping of the CMT4B gene on chromosome 11q22," *Genomics*, vol. 63, no. 2, pp. 271–278, 2000.
- [36] H. Houlden, R. H. King, A. Hashemi-Nejad, et al., "A novel TRK A (NTRK1) mutation associated with hereditary sensory and autonomic neuropathy type V," *Annals of Neurology*, vol. 49, no. 4, pp. 521–525, 2001.
- [37] C. Verny, N. Ravisé, A.-L. Leutenegger, et al., "Coincidence of two genetic forms of Charcot-Marie-Tooth disease in a single family," *Neurology*, vol. 63, no. 8, pp. 1527–1529, 2004.
- [38] K. B. Othmane, E. Johnson, M. Menold, et al., "Identification of a new locus for autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease with focally folded myelin on chromosome 11p15," *Genomics*, vol. 62, no. 3, pp. 344–349, 1999.
- [39] E. LeGuern, A. Guilbot, M. Kessali, et al., "Homozygosity mapping of an autosomal recessive form of demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease to chromosome 5q23-q33," *Human Molecular Genetics*, vol. 5, no. 10, pp. 1685–1688, 1996.
- [40] J. Senderek, C. Bergmann, C. Stendel, et al., "Mutations in a gene encoding a novel SH3/TPR domain protein cause autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth type 4C neuropathy," *American Journal of Human Genetics*, vol. 73, no. 5, pp. 1106–1119, 2003.
- [41] O. Dubourg, H. Azzedine, C. Verny, et al., "Autosomal-recessive forms of demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease," *Neuromolecular Medicine*, vol. 8, no. 1-2, pp. 75–85, 2006.
- [42] T. Rogers, D. Chandler, D. Angelicheva, et al., "A novel locus for autosomal recessive peripheral neuropathy in the EGR2 region on 10q23," *American Journal of Human Genetics*, vol. 67, no. 3, pp. 664–671, 2000.
- [43] P. K. Thomas, L. Kalaydjieva, B. Youl, et al., "Hereditary motor and sensory neuropathy-russe: new autosomal recessive neuropathy in Balkan gypsies," *Annals of Neurology*, vol. 50, no. 4, pp. 452–457, 2001.
- [44] A. De Sandre-Giovannoli, V. Delague, T. Hamadouche, et al., "Homozygosity mapping of autosomal recessive demyelinating Charcot-Marie-Tooth neuropathy (CMT4H) to a novel locus on chromosome 12p11.21-q13.11," *Journal of Medical Genetics*, vol. 42, no. 3, pp. 260–265, 2005.
- [45] J. Colomer-Oferil, "Aspectos clínicos y abordaje diagnóstico y terapéutico de las neuropatías hereditarias sensitivo-motoras," *Revista de Neurología*, vol. 35, no. 3, pp. 239–245, 2002.
- [46] J. Berciano, O. Combarros, J. Calleja, et al., "The application of nerve conduction and clinical studies to genetic counseling in hereditary motor and sensory neuropathy type I," *Muscle and Nerve*, vol. 12, no. 4, pp. 302–306, 1989.
- [47] J. R. Lupski, R. M. de Oca-Luna, S. Slaughter, et al., "DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A," *Cell*, vol. 66, no. 2, pp. 219–232, 1991.
- [48] C. Casasnovas, I. Banchs, J. Corral, J. A. Martínez-Matos, and V. Volpini, "Clinical and molecular analysis of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease type 1 in Spanish population," *Clinical Genetics*, vol. 70, no. 6, pp. 516–523, 2006.
- [49] R. A. Taylor, E. M. Simon, H. G. Marks, and S. S. Scherer, "The CNS phenotype of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease: more than a peripheral problem," *Neurology*, vol. 61, no. 11, pp. 1475–1478, 2003.
- [50] J. Bergoffen, S. S. Scherer, S. Wang, et al., "Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease," *Science*, vol. 262, no. 5142, pp. 2039–2042, 1993.

## 5. RESUMEN DE LOS RESULTADOS

### 5.1 Estudios clínicos / electrofisiológicos

Los 498 pacientes de la primera cohorte, de estudio del gen *GJB-1*, presentaban una neuropatía sensitivo-motora. En las familias con presencia de mutación en el gen *GJB-1* y en las que fue posible estudiar miembros de distintos sexos, los varones afectados tenían una neuropatía de mayor gravedad que las mujeres afectas dentro de la misma familia. En los estudios electrofisiológicos realizados en los probandos de cada una de las familias con mutación, se ponía de manifiesto la presencia de VCN en el rango intermedio en el 14.7% de los casos y desmielinizante en el 58.8% de ellos (**Figura 20**).

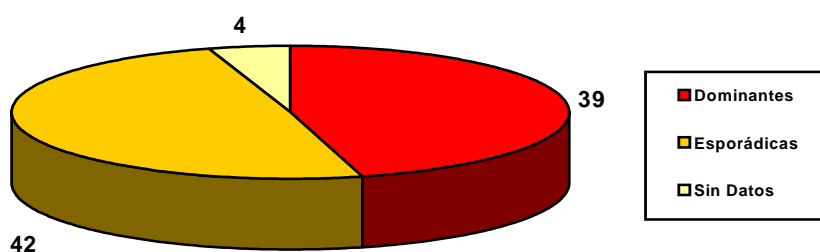


**Figura 20:** Distribución familias de la primera cohorte según datos electrofisiológicos

En la Segunda cohorte, la del estudio de *MFN2*, los probandos pertenecientes a las 85 familias presentaban una neuropatía sensitivo-motora. En los estudios neurofisiológicos los probandos presentaban VCN en el rango axonal. Treinta y nueve de las 85 familias (45.8%) tenían herencia dominante conocida. Treinta y dos familias tenían síntomas leves (37,6%), 29 (34%) presentaban síntomas moderados y 10 (11.7%) presentaban síntomas graves (**Tabla 7 y Figura 21**).

	Leve	Moderada	Grave	Sin datos	Total
Número	32	29	10	14	85
Porcentaje	37,6	34	11,7	16,4	100

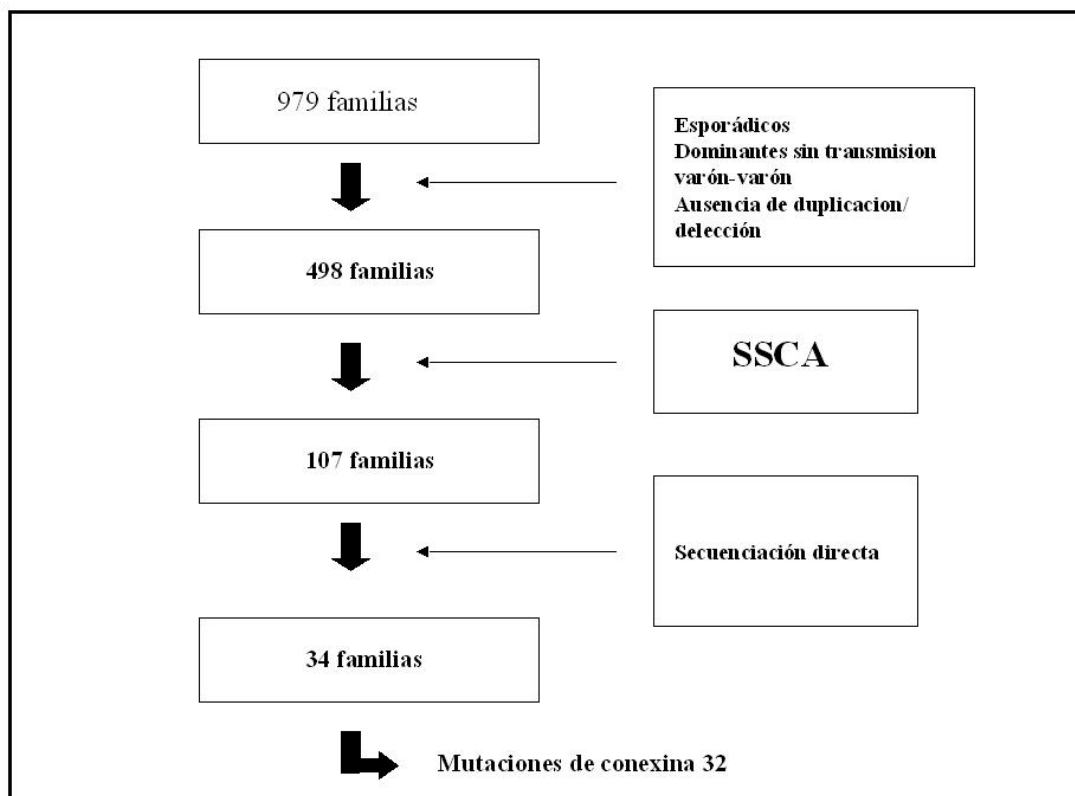
**Tabla 7:** Distribución familias en la cohorte de estudio de *MFN2* por gravedad de la neuropatía



**Figura 21:** Distribución de las familias en la cohorte de estudio de *MFN2* según su herencia (números absolutos)

## 5.2 Estudios Moleculares

En la cohorte de estudio de GJB1-1 se encontraron 34 familias, con un total de 59 pacientes con 20 mutaciones distintas en el gen *GJB-1* (**Figura 22**). Catorce de estas mutaciones estaban previamente descritas y 6 (Leu39fs, Glu47Gly, His153fs, Cys179Tyr, Cys201Phe, Ser211fs) no se habían publicado previamente. Treinta y una familias presentaban mutaciones puntuales de tipo *missense*, 2 familias presentaban la delección de un nucleótido y una familia la delección de dos nucleótidos. En 31 familias, estos cambios producían, a nivel de proteína, un cambio de aminoácido y en las tres familias con delección de uno o dos nucleótidos se producía una alteración de la *pauta de lectura* que conllevaba a la aparición de un *codón de stop* prematuro.



**Figura 22:** Esquema final de la selección de pacientes para el estudio de mutaciones en el gen *GJB-1*

Las mutaciones se encontraron en distintas regiones del DNA. Las mutaciones afectaban a distintos dominios que conforman la proteína. Los dominios extracelulares de la conexina 32 estaban afectados en el 64.6% (44% EC2 y 20.6% EC1). El codón 164 era el que se encontraron más mutaciones (en 10 familias).

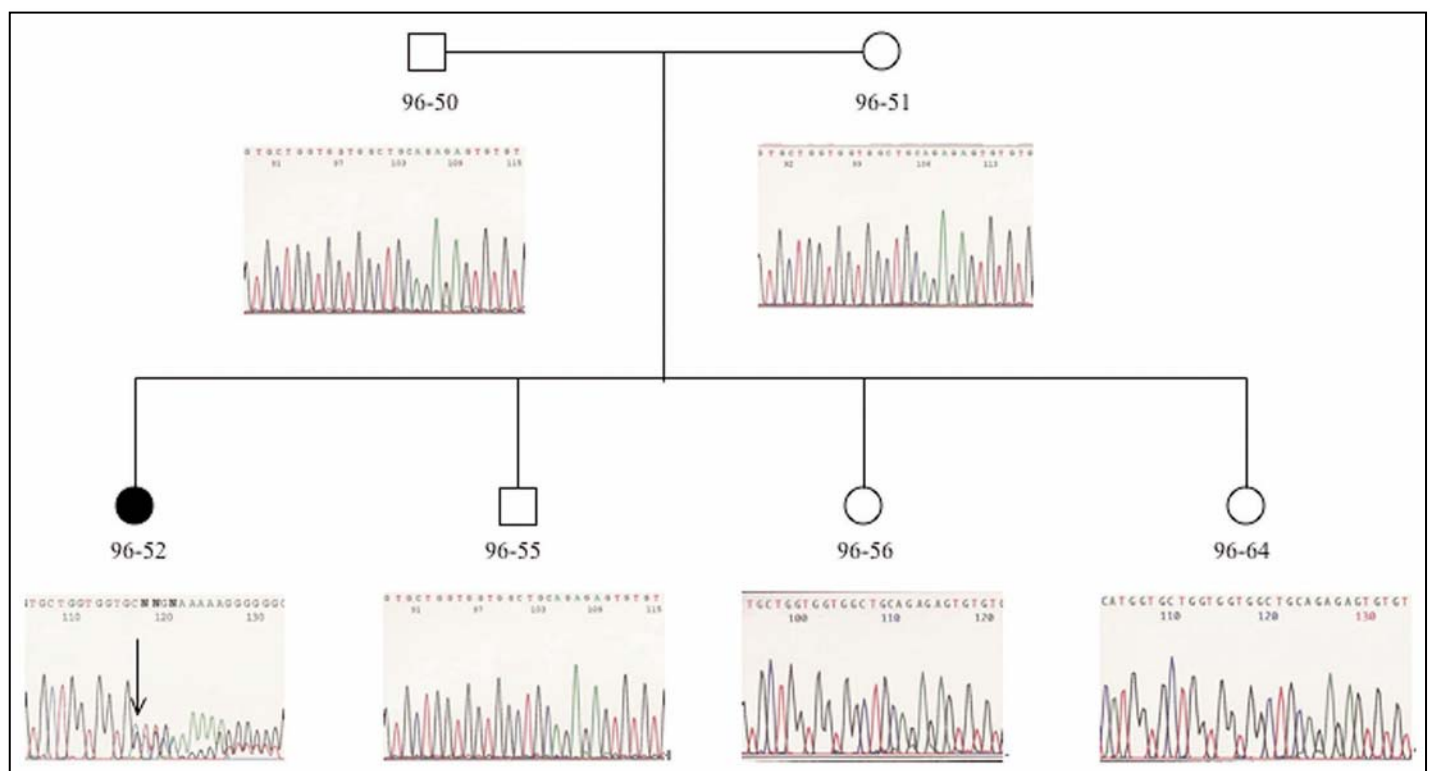
En los estudios genéticos del gen *MFN2* en la cohorte de pacientes con CMT2, Se detectaron 24 pacientes procedentes de 14 familias distintas con 9 mutaciones distintas del gen *MFN2*. Todas las mutaciones eran tipo *missense* y todas se encontraron en *heterocigosis*. Cinco de las mutaciones no estaban previamente descritas (Arg364Gln, Ile203Met, Asn252Lys, Gln276His, and Met376Val).

### **5.3 Relación Clínico/electrofisiológica y genética**

#### *Estudio del gen GJB-1*

En el estudio del gen *GJB-1* en las familias CMT-61 y CMT-343 (**Figura 2 en apartado 1 de Resultados**) se evidenció en los miembros afectados de cada una de ellas, la presencia de un fenotipo CMT con velocidades de conducción en el rango desmielinizante. En estas familias se puso de manifiesto dos mutaciones distintas que no habían sido previamente descritas. Las mutaciones eran debidas a la delección de uno (G) y dos (TT) nucleótidos respectivamente. Estas delecciones causaban un cambio en la *pauta de lectura* y la aparición de un *codón de stop* prematuro en los dominios C y EC2 de la proteína Cx32. De hecho en este estudio se reportaron dos familias (CMT-469 y CMT-532) con VCN disminuidas en los estudios electrofisiológicos y con un cambio en el mismo codón que la familia CMT-61 produciendo la mutación previamente descrita Tyr211His (*Bissar-Tadmouri N, 2000*).

En la familia CMT-75 (**Tabla 1 en apartado 1 de Resultados**), se describe un caso en que el probando es una mujer con pies cavos, arreflexia, pérdida de sensibilidad distal en extremidades y debilidad distal moderada-grave así como atrofia muscular distal en las cuatro extremidades de predominio en las inferiores que la obliga al uso de férulas antiequino desde la edad de 21 años. En los estudios electrofisiológicos se pone de manifiesto la presencia de una VCN de 37 m/s y es un caso de novo y sin descendencia. Ella es el único miembro con el cambio y el único miembro de la familia con signos clínicos y electrofisiológicos de CMT. En este paciente los estudios moleculares ponen de manifiesto la presencia de una delección de un nucleótido (C) que causa un cambio de la *pauta de lectura* y la aparición de un *codón de stop* prematuro (**Figuras 23, 24 y 25**).

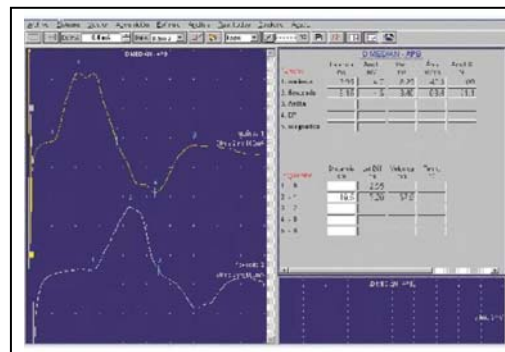


**Figura 23:** Secuencias de todos los miembros de la familia CMT-75, Únicamente el miembro afecto presenta la delección que causa un cambio de la pauta de lectura en estado de heterocigosis





**A**



**B**

**Figura 24:** Miembro afecto de la familia CMT-75: **a.** Se pone de manifiesto fenotipo CMT y atrofia incipiente en manos a la edad de 21 años. **b.** Estudio electrofisiológico que pone de manifiesto una VCN en nervio cubital de 37 m/s

	21		* 40
HOMO · SAPIENS	G · R · V · W · L · S · V · I · F · I · F · R · I · M · V · L · V · V	A	A
MUS · MUSCULUS	G · R · V · W · L · S · V · I · F · I · F · R · I · M · V · L · V · V	A	A
GALLUS · GALLUS	G · R · I · W · L · S · V · I · F · I · F · R · I · M · V · L · V · V	A	A
RATTUS · NORVEGICUS	G · R · V · W · L · S · V · I · F · I · F · R · I · M · V · L · V · V	A	A
G · ACULEATUS	G · R · V · W · L · S · V · I · F · I · F · R · I · L · V · L · V · V	A	A
BOS · TAURUS	G · R · V · W · L · S · V · I · F · I · F · R · I · M · V · L · V · V	A	A
MACACA · FASCI.	G · R · V · W · L · S · V · I · F · I · F · R · I · M · V · L · V · V	A	A

**Figura 25:** El Cambio está conservado a lo largo de la evolución de las especies

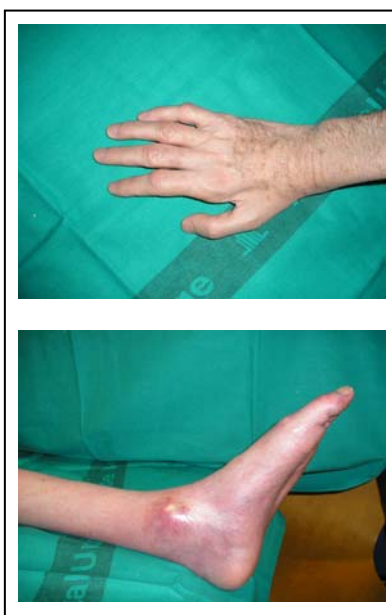
En relación con el estudio del gen *GJB-1* también se detallan fenotípicamente las familias CMT-96, CMT-97 y CMT 353. La CMT-96 es una familia de dos generaciones con herencia dominante y sin evidencia de transmisión varón - varón. En ella, únicamente los miembros de la familia afectados presentan la mutación que no estaba previamente descrita Cis179Tyr (**Figura 3 en apartado 1 de Resultados**). En las familias CMT-97 y CMT 353 se evidencian VCN en el rango desmielinizante en ellas el análisis molecular de gen *GJB-1* de los probandos pone de manifiesto la presencia de las mutaciones no previamente descritas tipo *missense* Glu47Gly y Cys201Phe respectivamente. Estos cambios están situados en zonas altamente conservadas del gen *GJB-1* sugiriendo una función crítica en la unión tipo gap (**Tabla 2 en apartado 1 de Resultados**). La familia CMT-613, presenta una neuropatía desmielinizante y la mutación previamente descrita Cys201Arg. Los probandos presentan la mutación en estado homocigoto mientras que sus madres, con una clínica más leve presentan la mutación en estado heterocigoto. No se evidenció la presencia de mutación en el pedigrí paterno, que no mostraba síntomas ni signos clínicos o electrofisiológicos de CMT.

Ninguno de los miembros afectados de las familias estudiadas con mutaciones en el *GJB-1* presentaba sordera ni retraso mental. Ninguno de ellos había nunca referido episodios de encefalopatía espontáneos o desencadenados por la altura, infecciones o ejercicio físico intenso.

#### *Estudio de gen MFN2. Mutaciones descritas previamente*

En el estudio de la segunda cohorte, en primer lugar destaca, entre las mutaciones previamente descritas, la descripción clínica y electrofisiológica de la familia MFN 06-15 con la mutación Arg94Gln. El inicio de la clínica es en la primera década de la

vida. Los dos miembros afectados son padre e hijo. El padre (06-15) es un varón de 56 años con pérdida de fuerza y atrofia de extremidades de curso progresivo. El inicio de los síntomas fue a los 3 años. Es dependiente de silla de ruedas desde los 40 años de edad. La exploración física (**Tabla 2 en apartado 2 de Resultados, Figuras 26 y 27**) pone de manifiesto una tetraparesia arrefléctica con atrofia de las cuatro extremidades. El paciente presentó un cuadro subagudo de déficit visual que se instauró en tres meses y que se siguió de una lenta recuperación a lo largo de los siguientes años. El paciente no presentaba temblor, parkinsonismo ni espasticidad. Por otro lado, el otro miembro de la familia afecto (07-02), hijo del paciente 06-15. Se trata de un varón de 24 años de edad que presenta una marcha en *steppage* y, aunque no depende de silla de ruedas, necesita del uso de férulas antiequino desde la edad de 14 años. Este paciente presentó un cuadro de déficit visual a la edad de 17 años que se mantuvo durante 6 meses. Se orientó como una neuritis retrobulbar y recibió tratamiento con megadosis de corticoides sin una clara mejoría. En la exploración de fondo de ojo a los 7 años del inicio del déficit visual se evidencia la presencia de AO (**Figura 1, 2 y Tabla 2 de apartado 2 de Resultados**)

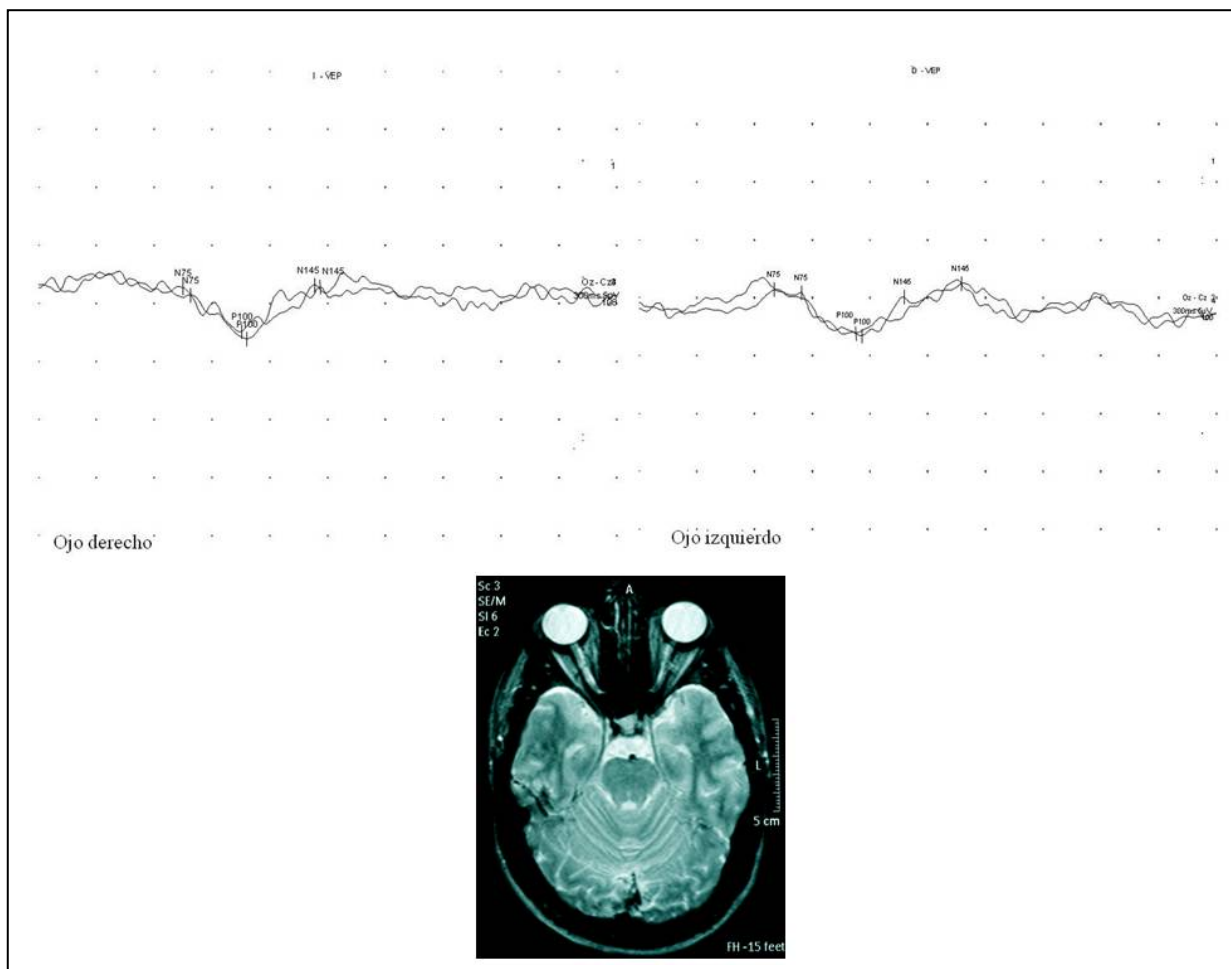


**Figura 26:** Familia MFN 06-15 (CMT2 y atrofia óptica y mutación Arg94Gln en la *MFN2*). Se pone de manifiesto la severa atrofia distal en paciente 06-15



**Figura 27:** Familia MFN 06-15. Se pone de manifiesto una menor atrofia distal en paciente 07-2 (hijo de 06-15)

Los estudios electrofisiológicos de esta familia demuestran la presencia de una neuropatía axonal sensitiva y motora de carácter grave (**Tabla 3 en apartado 2 de Resultados**). Los potenciales evocados visuales ponen de manifiesto una onda P100 retrasada en los dos nervios ópticos del paciente 07-02 (**Figura 28a**). Los potenciales evocados de tronco no mostraron ninguna anormalidad.



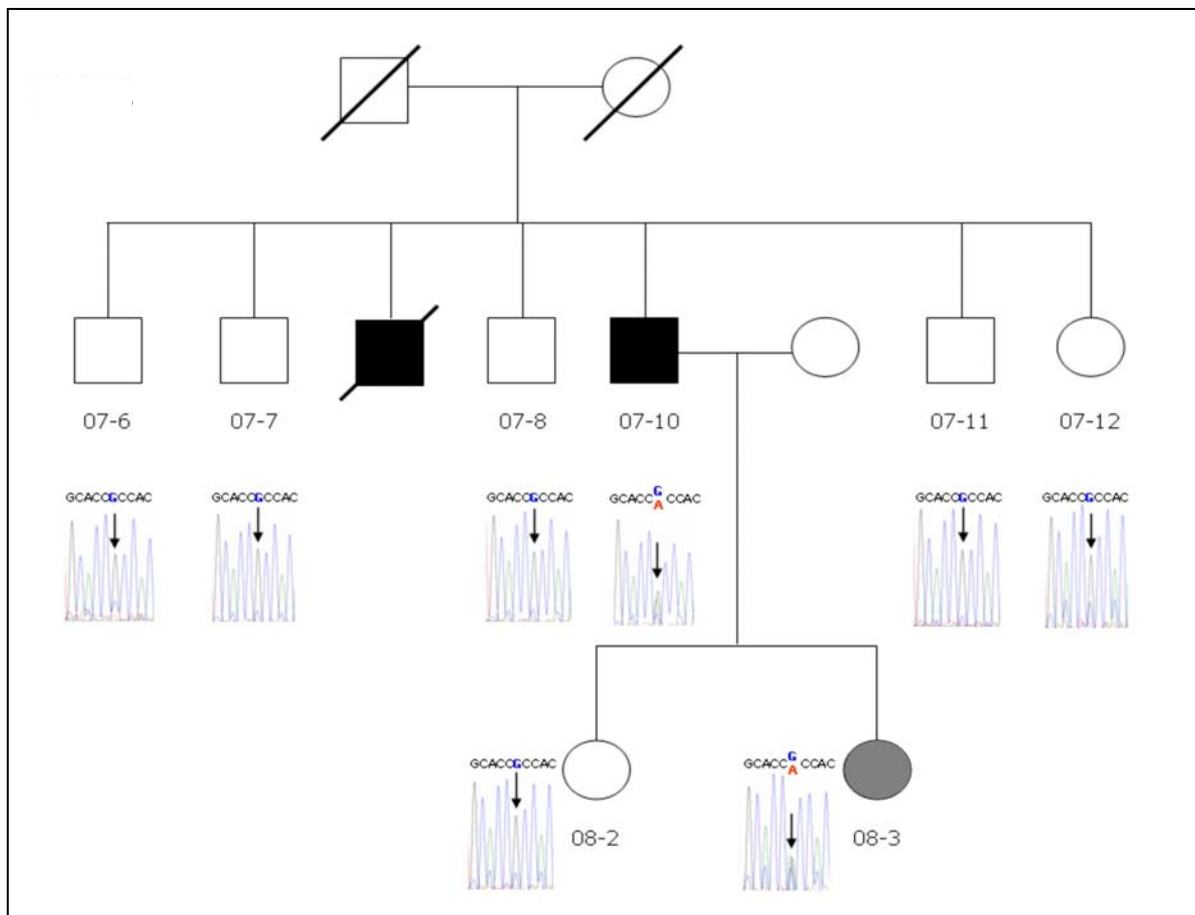
**Figura 28:** a. Potenciales evocados visuales en paciente 07-2 que muestran un aumento de la latencia de la onda p-100 (Imagen cortesía de la Dra. I Moreno. Sección de Neurofisiología. Servicio Neurología. HUB).  
b. Secuencia T2 de RMN craneal a los 8 años del inicio de la disminución de AV sin alteraciones patológicas valorables

El estudio de resonancia magnética del paciente 07-02 mostraba mínima captación de contraste en el nervio óptico sin evidencia de otras lesiones de sustancia blanca (**Figura 28b**).

Otras familias con mutaciones previamente descritas son las MFN 06-7 y CMT 1344, que presentan un CMT2 puro sin otros rasgos clínicos adicionales, aunque varía en edad de inicio de la clínica siendo en la primera y segunda década respectivamente.

En los miembros afectados encontramos las mutaciones Arg94Trp y Gly298Arg respectivamente (**Tabla 2 en apartado 3 de Resultados**).

Las familias MFN 06-16, CMT 1045, CMT II-6, CMT 1088, CMT II-21 y MFN 06-9, presentan una neuropatía axonal leve o moderada, de inicio tardío (De tercera a 5ª década de vida). Dos de ellas únicamente tienen un miembro afecto. El estudio pone de manifiesto la presencia del cambio Arg468His (**Tabla 1 en apartado 3 de Resultados, Figuras 29a, 29b, 29c y 29d**).



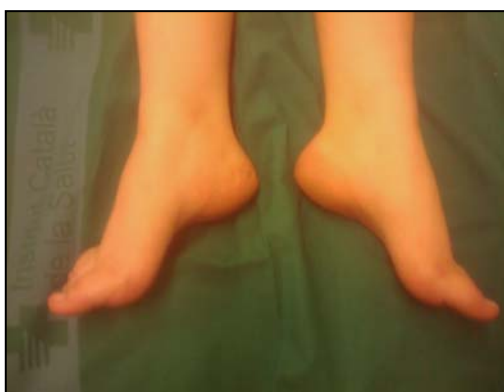
**Figura 29a:** Familia 06-9. Secuencia donde se pone de manifiesto el cambio Arg468His

Paciente	MFN 08-3	MFN 07-10
Edad	16	68
Sexo	F	M
Edad de inicio	-	4-5ª década de vida
MRCSS	60	56
Debilidad de EESS	-	-
Debilidad EEII	-	+
Atrofia distal	-	-
Reflejos	Todos presentes	Aquileos abolidos
Afectación sensitiva EESS	-	-
Afectación sensitiva EEII	-	+
Dedos en martillo	-	+
Pies cavos	+/-	+
Dependencia	NO	NO
Otros síntomas adicionales	NO	NO

**Figura 29b:** Familia 06-9. Resumen de los hallazgos clínicos en los miembros 07-10 y 08-3

Paciente	MFN 08-3	MFN 07-10
ENG SENSITIVA (Amplitud ( $\mu$ V)/VCN (m/s))		
Sural derecho	NR	NR
Sural Izquierdo	NR	NR
Mediano derecho (dedo 2)	NR	16,6/47,8
ENG MOTORA (Amplitud (mV)/VCN)		
Ciatico politeo derecho (en pedio)	NR	2,8/41,4
Mediano derecho	NR	6,2/51,4

**Figura 29c:** Familia 06-9. Resumen de los hallazgos electrofisiológicos en los pacientes 08-3 y 07-10 (Parámetros normales publicados en Valls & Valls).



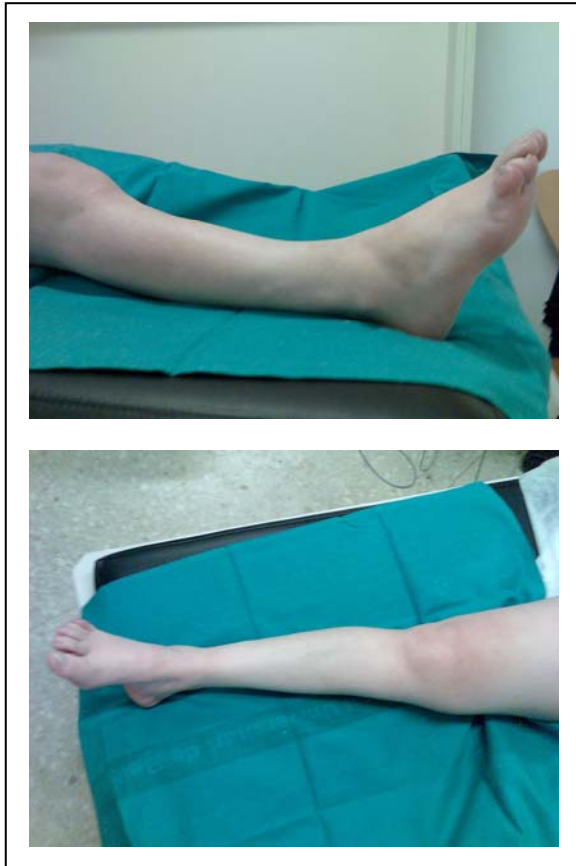
**Figura 29d:** Pie discretamente cavo en el paciente 08-3. Como se comenta en el próximo apartado discusión. El miembro afecto 08-3 corresponde a un paciente presintomático

*Mutaciones no previamente descritas en el gen MFN2*

Se han encontrado cinco familias con mutaciones que no estaban previamente descritas de gen *MFN2*: En la CMT II-2, los miembros afectados iniciaban los síntomas en la Segunda década y con temblor de intención. En ellos, se encuentra la mutación Ile203Met. (**Tabla 1 en apartado 3 de Resultados**). En la familia CMT-560, que tiene un inicio precoz en la segunda década de vida. El probando presenta una debilidad para la abducción del ojo derecho. El estudio molecular demuestra la presencia del cambio Asn252Lys. El resto de las familias con mutaciones no descritas CMTII-4, CMT 364 y MFN 06-6 presentan CMT2 puro sin otros rasgos clínicos adicionales de inicio en la tercera década (**Figura 30**). En los estudios moleculares se ponen de manifiesto los cambios Gln276His y Met376Val, y Arg364Gln respectivamente.

A los miembros afectados de la familia MFN 06-6 con la mutación Arg364Gln se ha realizado un estudio evolutivo clínico y electrofisiológico durante 17 años. (**Tabla 1 y figura 1 en apartado 2 de Resultados**).





**Figura 30:** Moderada atrofia distal en paciente 06-6 perteneciente a la familia MFN 06-06 con la CMT2 puro sin otros rasgos clínicos añadidos y mutación Arg364Gln en la *MFN2*

#### *Fenotipos sin mutaciones en el gen MFN2*

No se encontraron cambios patológicos en la *MFN2* en los 5 casos esporádicos de CMT2 y retraso mental ni en los dos casos esporádicos de CMT2 y neuromiotonía.

#### *Polimorfismos en los genes GJB-1 y MFN2*

Los cambios no patológicos encontrados en el gen GJB1 se detallan en la **tabla 1 y figura 1 en el apartado 1 de Resultados**. Los cambios no patológicos encontrados en el estudio del gen *MFN2*, junto con sus frecuencias se describen en la **tabla 2 y figura 1a en apartado 3 de Resultados**.

#### 5.4. Estudios funcionales en fibroblastos del paciente con la mutación **Arg468His**

##### *Disminución de la eficiencia en la síntesis de ATP*

El estudio de la actividad de los complejos mitocondriales del paciente no mostró ninguna diferencia significativa al compararlo con la actividad de los controles (**Tabla 3 en apartado 3 de Resultados**).

Sin embargo, los fibroblastos del paciente mostraron déficit bioenergético que es similar al que previamente se ha descrito en 12 pacientes con CMT2A con seis mutaciones distintas. Se obtiene una disminución de la ratio ATP/O en el paciente (0.97 vs.  $2.58 \pm 0.17$  para los controles (**Figura 2B en apartado 3 de Resultados**)). Esta baja eficiencia en el acoplamiento de la forforilación oxidativa (OXPHOS) está asociado con una disminución de la producción del 50% de ATP mitocondrial (**Figura 2A en apartado 3 de Resultados, Tabla 8**).

Síntesis de ATP			
Paciente (X3)	Controles	Mutaciones <i>MFN2</i>	
<b>Total</b>	<b>8,63</b>	<b>17,3+/-2,98</b>	<b>12,83+/-3</b>

Ratio ATP/O			
Paciente (X3)	Controles	Mutaciones <i>MFN2</i>	
<b>Total</b>	<b>0,97</b>	<b>2,37+/-0,39</b>	<b>1,16+/-0,51</b>

**Tabla 8:** Resultados de la síntesis de ATP y la ratio ATP/O. Las mediciones se repitieron 3 veces y se obtuvo el valor medio que fue comparado con controles sanos y los pacientes con *MFN2* publicados previamente (Loisseau et al, 2007 y Guillet et al, 2009)

#### *Cambio en el equilibrio entre La tasa respiratorias ligadas a los complejos I y II*

En primer lugar, malato, piruvato y succinato se usan para establecer la respiración acoplada y la síntesis de ATP (**Tabla 3 en apartado 3 de Resultados**). Cuando se utiliza únicamente piruvato y malato, o solo succinato, el ciclo de Krebs no está funcionalmente cerrado, mientras que el transporte de electrones (Complejos I + II) corresponde al aporte sustrato in vivo, permitiéndose así, la medida de la tasa de respiración máxima.

Entonces se analiza el estado III de la respiración mitocondrial debida a la respiración dependiente del complejo I (con malato y piruvato) o al complejo II (con succinato y rotenona) para investigar si el decremento de un solo sustrato

puede explicar la disminución de la síntesis de ATP. No se encontró decremento alguno en las respiraciones ligadas a los complejos I o II en los fibroblastos del paciente, sino que lo que se observó fue un aumento en la respiración relacionada con el complejo II (**Figura 2C en apartado 3 de Resultados**). Esto conlleva un cambio en el equilibrio en el uso de los sustratos del paciente si los comparamos con los controles (Ratios MP/SR: 0.53 en el paciente versus  $1.11 \pm 0.26$  para los controles; (**Figura 2D en apartado 3 de Resultados y Tablas 2, 3, 4 y Figura 1 de Anexos**)).

#### *Red mitocondrial*

La red mitocondrial no se encontraba fragmentada de forma similar a como se encontró en los controles.

## **DISCUSIÓN**

## **1. Estudio molecular del gen GJB-1**

### *Resultado del estudio*

Aportamos a la literatura la descripción de 28 familias con mutaciones previamente publicadas (lo que representan 48 pacientes) y seis familias con mutaciones que no habían sido descritas anteriormente (un total de 11 pacientes más). Se reportan los codones que con más frecuencia se alteran y que afectan a los distintos dominios de la proteína Cx32 y también la relación fenotipo - genotipo con los datos clínicos y electrofisiológicos disponibles.

### *Estudio de la frecuencia de afectación de los dominios de la proteína Cx32*

A pesar de que el dominio extracelular 2 (EC2) de la Cx32 representa aproximadamente tan solo el 13% del total del tamaño de la Cx32 (**Tabla 2 en apartado 1 de Resultados**), se ha encontrado afectado en el 44.1 +/- 16.6% de las familias de esta serie. Las bases que con más frecuencia se han encontrado alteradas son la número 490 (4 familias con la mutación Arg164Trp) y la número 491 (6 familias que presentan la mutación Arg164Gln), ambas están en el codón 164.

De hecho, es en los dominios extracelulares de la conexina 32 donde se encuentra el mayor número de mutaciones. Un 64.6% de las familias del estudio tiene la mutación en alguno de los dominios extracelulares (44% en EC2 y 20.6% en el EC1). Esto resalta la importancia de estos dominios, que son los responsables, como se comentó en el apartado de introducción, de la unión de dos conexinas expresadas en la membrana de células adyacentes para formar una unión tipo gap. De hecho, el dominio EC2 es la región de la Cx32 más sensible a aceptar

mutaciones lo que podría sugerir que se trataría de la zona de la unión tipo gap más importante desde el punto de vista funcional. Además el codón 164 sería una zona del DNA que podría ser considerado un *hot spot* para mutaciones (*Bort S, 1997*)

Por otro lado, en los dominios TM3 y IC, que representan en su conjunto el 19.4% del tamaño total de la proteína, no se ha encontrado ninguna mutación en nuestro estudio (**Figura 1 y Tabla 1 en apartado 1 de Resultados**). Hasta el momento de la publicación del trabajo, había muy pocos estudios describiendo las frecuencias de las distintas localizaciones de las mutaciones en la Cx32, y todos ellos describiendo un número menor de familias. En 1997, Latour et al, describieron 8 nuevas mutaciones y revisó la literatura de 57 mutaciones previamente descritas en el gen GJB1, incluyendo 21 familias de origen francés. En su trabajo, los autores ya ponían de manifiesto la presencia de una alta frecuencia de cambios en los dominios extracelulares (*Latour et al, 1997*). En 2004, *Kochanski et al*, describieron 6 mutaciones, tres de ellas (50%) estaban localizadas en el dominio EC 2 (*Kochanski et al, 2004*).

## **2. Estudio molecular del gen MFN2**

### *Resultados de estudio*

La búsqueda de mutaciones en el *MFN2* en 85 familias con CMT2 puso de manifiesto la presencia de 14 de ellas con 9 mutaciones distintas en el gen, sumando un total de 24 pacientes. Cinco de las mutaciones no estaban previamente descritas (una se describe en el **Trabajo 2** y las otras cuatro en el **trabajo 3**) (un total de 11 pacientes).

Doce de las 14 familias con mutación en la *MFN2*, presentaban un patrón de herencia dominante conocida y una edad variable de inicio de los síntomas (entre la primera y la quinta década de vida). Dos de las familias presentaban alguna característica añadida (temblor y atrofia óptica). El único miembro afecto de una de ellas tenía un déficit para la abducción de un ojo.

#### *Homogeneidad molecular*

Todas las mutaciones eran de tipo *missense* y se encontraron en estado de heterocigosis. Ninguna de las mutaciones fue encontrada en homocigosis a pesar de que se han reportado casos de CMT2A con mutaciones en el gen que codifica para la *MFN2* causando CMT2 en homocigosis o en heterocigosis compuesta (*Nicholson et al., 2008*). Tampoco ninguna de las mutaciones encontradas en la *MFN2* era de tipo *nonsense* ni debida a deleciones o inserciones de nucleótidos. No se encontró ningún cambio patógeno en la región promotora del gen.

Dos de las mutaciones se localizaron en el exón 4, una en el exón 7, una en el 8, dos mutaciones en los exones 9 y 11 y una en el exón 14. Parece que en nuestra población se pondría también de manifiesto un patrón de distribución de las distintas mutaciones con tendencia a localizarse en el dominio GTPasa de la *MFN2* o adyacente a él.



### **3. Relación fenotipo-genotipo de las mutaciones halladas en el gen GJB-1**

#### *VCN en las mutaciones del gen GJB-1*

En nuestro estudio hemos hallado que el 58.8 % de los probandos de las familias con mutaciones en el gen GJB 1 presentaban en los exámenes electrofisiológicos, velocidades de conducción disminuidas mientras que el 14.7 % de los probandos presentaban unas VCN en el rango intermedio. El 77 % de las de familias con VCN en el rango intermedio presentaban la mutación en los dominios TM2 o EC2 (**Tabla 1 en apartado 1 de Resultados**). Por otro lado, el 66.6% de los probandos de las familias con mutaciones en los dominios transmembrana o intracelulares tenían la VCN en el rango desmielinizante (**Tabla 1 en apartado 1 de Resultados**).

#### *Mutación Tyr211His y delección en la familia CMT-61*

En los miembros afectados de la familia CMT-61 se pone de manifiesto una neuropatía con fenotipo CMT y herencia dominante sin transmisión varón a varón. No se disponen de datos del inicio de la clínica pero las VCN en los estudios electrofisiológicos estaban en rangos desmielinizantes. Se evidenció una delección de una G en la base 633 (codón 211) que comporta un cambio en la pauta de lectura. Un cambio en el mismo codón que la familia CMT-61 (**Figura 2 en apartado 1 de Resultados**) ya había sido previamente descrito en una familia también con neuropatía desmielinizante causando la sustitución de un aminoácido, y la mutación *nonsense* Tyr211His (Bissar-Tadmouri et al, 2000). En nuestro estudio se reportan dos familias con esta mutación (CMT-469 y CMT-532) ambas con VCN disminuidas en los estudios electrofisiológicos. Es decir, las cuatro familias descritas en la

---

literatura con mutaciones en este codón, dos con mutaciones tipo *missense*, una *nonsense* y una con delección de un nucleótido, provocan el cambio en el dominio intracelular carboxi terminal, producen un CMT con VCN disminuidas.

*La mutación no descrita previamente Leu39fs*

Describimos a continuación un cambio encontrado en la familia CMT-75 (**Tabla 1 en apartado 1 de Resultados**). El único miembro afecto es una mujer que presenta un CMT moderado-grave. El cambio encontrado en el presente estudio es debido a la presencia de una delección.

En este caso describimos a una mujer que, a pesar de ser heterocigótica, presentó el inicio de los síntomas a final de la primera década de vida y es dependiente de férulas antiequino desde los 21 años. En los estudios electrofisiológicos se pone de manifiesto la presencia de una VCN de 37 m/s en el nervio cubital izquierdo y se trata de un caso De Novo y sin descendencia. Ella es el único miembro con el cambio y el único miembro de la familia con signos clínicos y electrofisiológicos de CMT.

En los estudios moleculares se evidencia una nueva mutación por una delección de un nucleótido (C) que causa un cambio de la pauta de lectura y la aparición de un codón de stop prematuro. La posibilidad de la presencia de cambios en la PMP22 y en el GDAP1 que pudieran justificar la clínica fue descartada por los métodos habituales. Pensamos que la mutación es patógena ya que causa un cambio en la pauta de lectura y ningún otro miembro de la familia presenta el cambio.

Se había descrito previamente en otras familias, varios cambios en el mismo codón 39 que en la familia CMT-75. El cambio de una alanina por una prolina (Ala39Pro) había sido publicado causando una neuropatía sensitivo motora con VCN en rangos desmilinizantes (*Inherited Peripheral database*. <http://www.molgen.ua.ac.be>

---

*/CMTMutations/Mutations/Mutations.cfm; Ekici et al, 2000*). Otro cambio había sido previamente publicado en el mismo codon pero en este caso por una delección de una C y produciendo fenotipo CMT también con VCN disminuidas (Dubourg et al, 2001).

Llama la atención el cambio Ala39Val que ha sido relacionado con afectación de sistema nervioso central (*Marques Jr et al, 1998*) y temblor postural (*Sendereck et al, 1999*). En el caso de la familia que describimos, el paciente presenta un fenotipo CMT sin otros rasgos clínicos adicionales.

Únicamente dos mutaciones han sido previamente descritas produciendo formas graves de CMT en mujeres debido a mutaciones del *GJB-1* (Ionasescu VV, 1996; Lin GS, 1999). Únicamente el 15% de mujeres afectas presentan el inicio de la clínica en la primera década (*Dubourg O, 2001*). Esta nueva mutación que produce la aparición de un fenotipo CMT de intensidad moderada-grave y de inicio en la infancia, junto con los casos previamente descritos, debe hacer recordar a los clínicos la posibilidad diagnóstica de CMT X y descartar mutaciones en el GJB1 aunque se trate de una mujer con fenotipo CMT de inicio precoz.

#### *Nuevas mutaciones con un fenotipo homogéneo*

En el estudio se han encontrado 3 familias más con mutaciones que no estaban previamente descritas, estas mutaciones, causan sustituciones de aminoácidos y están situadas en zonas altamente conservadas del gen *GJB-1* sugiriendo una función crítica en la unión tipo gap (**Tabla 2 en apartado 1 de Resultados**).

Ninguno de los miembros afectados de las familias estudiadas con mutaciones en el *GJB-1* presentaba sordera ni retraso mental. Ninguno de ellos había nunca referido episodios de encefalopatía espontáneos o desencadenados por la altura, infecciones o ejercicio físico intenso.

Nuestros hallazgos sugieren un fenotipo relativamente homogéneo interfamiliar. Sin evidencia de familias con rasgos clínicos adicionales, aunque sí diferencias en cuanto a la gravedad de la neuropatía. Otros autores habían publicado únicamente un 7% de casos índice hombres con algún rasgo añadido (*Dubourg O, 2001*).

#### ***4. Relación fenotipo-genotipo de las mutaciones halladas en el gen MFN2***

Hasta el momento de la publicación del manuscrito en *Neuromuscular Disorders*, 2008, no se había descrito todavía en la literatura ninguna familia de origen español con mutaciones en el gen *MFN2*. Las familias MFN06-6 y MFN06-15 han sido las dos primeras publicadas y que presentan los síntomas y signos clínicos así como los hallazgos electrofisiológicos típicos del CMT2A y un patrón de herencia autosómico dominante.

##### *Las mutaciones no descritas Arg364Gln, Gln276His y Met376Val*

En la familia MFN06-6, encontramos la mutación Arg364Gln en heterocigosis en los miembros afectados. Estos, tienen una neuropatía axonal sensitivo-motora y velocidades de conducción conservadas. Este cambio no se encontró en los miembros no afectados de la familia. En esta familia con una nueva mutación del gen *MFN2*, hemos tenido la oportunidad de seguirla desde el punto de vista clínico y electrofisiológico durante 17 años. Tras ese tiempo de evolución, los miembros afectados de la familia presentan un discreto empeoramiento clínico y electrofisiológico de la neuropatía axonal. Las VCN se mantuvieron siempre en un rango proporcional a la pérdida de axones reflejada en la disminución de las amplitudes en los estudios de electroneurografía tanto sensitiva (SNAP) como

---

motora (CMAP). En esta familia se evidencia una correlación entre los hallazgos clínicos y los electrofisiológicos de la neuropatía axonal sensitivo motora leve-moderada que presentan los miembros afectados durante el seguimiento (**Tabla 1 en apartado 2 de Resultados**).

Otros cambios han sido reportados previamente en el mismo codón, por ejemplo, la mutación Arg364Trp ha sido descrita con un cambio en la base 1090 asociada al fenotipo con neuropatía axonal de inicio precoz e identificada en varios individuos, algunos de los cuales presentan asociada, además, la presencia de AO (*Chung et al, 2006; Züchner et al, 2006*).

Las familias CMTII-4 y CMT 364 también presentan CMT2 puro sin otros rasgos clínicos adicionales. Estas dos con inicio de los síntomas en la tercera década. En los estudios moleculares se ponen de manifiesto los cambios Gln276His y Met376Val respectivamente. Todas estas con mutaciones que no se habían descrito previamente.

Todos los miembros afectados de estas familias presentaban un CMT2 puro y en ninguno de ellos encontramos otros signos clínicos previamente asociados al CMT con mutaciones del gen *MFN2*, como son la AO, sordera, parkinsonismo, temblor o signos piramidales. Ninguno de los miembros afectados de estas familias ha llegado a ser dependiente de silla de ruedas.

#### *La mutación no descrita Asn252Lys*

Otra familia con una mutación no previamente descrita Asn252Lys es la CMT-560. El único miembro de la familia accesible para la exploración neurológica presentaba fenotipo CMT2 grave y un déficit para la abducción en el ojo derecho. Dada la frecuencia de afectaciones de la motilidad ocular extrínseca, y al hecho de que no haya otros miembros de la familia accesibles a la exploración, no podemos

descartar que este hallazgo sea casual y que este hallazgo no esté relacionado con la mutación causante de su CMT2A. El cambio se encuentra en el dominio GTPasa de la proteína MFN2

#### *La mutación no descrita Ile203Met*

En la CMT II-2, los cinco miembros afectados de esta familia, iniciaron los síntomas en la segunda década de la vida y, en todos ellos se asocia un discreto pero evidente temblor de intención, no se observaron síntomas de parkinsonismo, afectación de la vía piramidal ni atrofia óptica. Ninguno de los miembros de la familia afectados ha llegado a ser dependiente de silla de ruedas. En todos ellos, se encuentra la mutación Ile203Met. (**Tabla 1 en apartado 3 de Resultados**). El cambio se sitúa, como en el paciente portadora de la mutación perteneciente a la familia CMT-560 descrita anteriormente, en el dominio GTPasa de la MFN2, la región funcionalmente más importante de la proteína.

Todas estas mutaciones que no estaban previamente descritas, no se hallaron en los estudios poblacionales que se realizaron en un total de 100 cromosomas (procedentes de 50 controles anónimos) ni en 60 cromosomas procedentes de 30 controles clínica y electrofisiológicamente sanos. El estudio de secuencias del gen *MFN2* en distintas especies demuestra que el cambio se encuentra en una región altamente conservada de DNA (**Figura 1b en apartado 3 de Resultados**). Además entre los aminoácidos originales y los generados a causa del cambio de nucleótido existen unas moderadas diferencias físico – químicas (**Tabla 9**).

Todos estos hallazgos sugieren fuertemente que estas mutaciones son patógenas.

<b>Mutación</b>	<b>AA Original</b>	<b>AA generado</b>
<b>Arg364Gln</b>	Cadena lateral alifática Grupo reactivo guanidío Polar ionizable Acepta y dona puentes de H	Cadena lateral alifática Apolar No forma puentes de H
<b>Gln276His</b>	Cadena lateral alifática Apolar No forma puentes de H	Cadena lateral heterociclo alifático Grupo reactivo imidazol Polar ionizable Acepta y dona puentes de H
<b>Met376Val</b>	Cadena lateral alifática Grupo reactivo tioeter Apolar Acepta puentes de H	Alifática Apolar No forma puentes de H
<b>Asn252Lys</b>	Cadena lateral alifática Grupo reactivo amida Polar sin carga Acepta y dona puentes de H	Cadena alifática Grupo reactivo amino Polar ionizable Acepta y dona puentes de H
<b>Ile203Met</b>	Cadena lateral alifática Apolar No forma puentes de H	Cadena lateral alifática Grupo reactivo tioeter Apolar Acepta puentes de H

**Tabla 9:** Propiedades físico-químicas de los aminoácidos originales y los generados por las 5 mutaciones no descritas encontradas en el estudio de diagnóstico de mutaciones en el gen *MFN2*  
AA: Aminoácido; H: Hidrógeno

---

### *La mutación Arg94Gln y la atrofia óptica en el CMT2A*

La otra familia que junto a la MFN06-6 es la primera en describirse en España, es la familia de inicio precoz (MFN06-15), los miembros afectados presentaron un cuadro de inicio subagudo de pérdida de agudeza visual seguido de una lenta mejoría en los siguientes años. No es sorprendente que el paciente 07-02 fuera inicialmente diagnosticado de neuritis retrobulbar a la edad de 17 años. Por ese motivo inicio tratamiento con altas dosis de metil-prednisolona endovenosa aunque sin una clara mejoría. Se le realizó un *screening* de mutaciones de DNA mitocondrial descartándose la atrofia de Leber. El padre de este paciente también presentó a la edad de 16 años un episodio de pérdida de agudeza visual que se fue recuperando en los siguientes años. Ello sugiere que el padre también presentó una neuropatía óptica (**Figura 2 en apartado 2 de Resultados**)

Los hallazgos clínicos y electrofisiológicos de los dos pacientes se encuentran resumidos en las **Tablas 2 y 3 en apartado 2 de Resultados**

En ambos pacientes se encuentra la mutación Arg94Gln en el exon 4 del gen *MFN2* (**Figura 2 en apartado 2 de Resultados**). Esta mutación había sido previamente descrito como CMT2A "puro", es decir, sin otras características clínicas añadidas, o asociado a temblor (*Züchner et al, 2004; Kijima et al, 2005; Verhoeven et al, 2006; <http://www.molgen.ua.ac.be>*). En este caso, esta es la primera familia con CMT2A debido a esta mutación de la *MFN2* y en la que se relaciona con AO.

La AO es una entidad que se presenta con deterioro de la agudeza visual y puede llegar a ser grave, sin embargo, las opciones terapéuticas son limitadas. Existen diferentes variantes clínicas cuyos síntomas varían desde episodios que cursan de forma subaguda, ocasionalmente con mejorías espontáneas, hasta la enfermedad crónica y progresiva (*Züchner et al, 2006*). El dominio GTPasa de la *MFN2* pertenece a la misma familia de proteínas que OPA1 (atrofia óptica autosómico dominante-1).



Ambos factores actúan en concierto para mediar en la fusión de la doble membrana de las mitocondrias (*Zhu et al, 2005; Züchner et al, 2006*). La recuperación espontánea del déficit visual, se ha descrito en pacientes con atrofia óptica hereditaria de Leber, y, de hecho, en 6 de 10 pacientes con AO y mutaciones en la *MFN2* descritos por Züchner en 2006 (*Züchner et al, 2006*) también presentaban algún grado de recuperación de la agudeza visual en los años posteriores al inicio de la clínica de AO. En el presente estudio, describimos una familia en la que los dos miembros afectados presentaron una recuperación espontánea y lenta de la agudeza visual en los años siguientes al inicio de la clínica visual.

#### Las mutaciones Arg94Trp y Gly298Arg

Las familias MFN 06-7 y CMT 1344 también presentan un CMT2 puro. La familia 06-7 es una extensa familia con herencia dominante en la que ninguno de los miembros afectados de CMT2 presenta otros signos adicionales de CMT2A y todos con inicio de los síntomas en la primera edad de vida. A pesar de ese inicio precoz, la evolución de la enfermedad dentro de esta familia es lenta y ninguno de sus miembros es dependiente de silla de ruedas. Por otro lado, la familia CMT 1344 presenta CMT2 de inicio en la segunda década de la vida.

En los miembros afectados de estas dos familias encontramos las mutaciones previamente descritas Arg94Trp y Gly298Arg respectivamente (**Tabla 1 en apartado 3 de Resultados**).

### **5. La mutación Arg468His en la MFN2. Estudio bioenergético en fibroblastos**

*El cambio Arg468His es el cambio en la MFN2 más frecuente*

El cambio Arg468His se encuentra en 6 de las 14 familias con mutaciones en la MFN2. Es el cambio más prevalente encontrado en nuestro estudio. Sin embargo, no solo ya se había descrito previamente en un paciente con CMT2, sino que, además se había encontrado en uno de los alelos en los estudios poblacionales realizados en 260 cromosomas procedentes de 130 controles anónimos (*Engelfried et al, 2006*).

Desde entonces, no se le ha podido atribuir un papel patológico a este cambio en referencia al CMT2A, y se había considerado un posible polimorfismo.

*Estudio bioenergético en fibroblastos*

Dada la alta prevalencia de este cambio en nuestro estudio y a la duda razonable sobre su posible papel patogénico en el CMT2, decidimos llevar a cabo estudios funcionales en fibroblastos procedentes de biopsia de piel de uno de los pacientes con la mutación Arg468His. En este estudio se ha puesto de manifiesto la presencia de una disminución de la eficiencia en la síntesis de ATP que conlleva una disminución de la cantidad de ATP producida en los fibroblastos de nuestro paciente. Esta alteración en el metabolismo mitocondrial ha sido probado como una alteración común en los fibroblastos de los pacientes con CMT2A (*Loiseau D, 2007*). Además, estudios bioquímicos también mostraron que los complejos OXPHOS no estaban implicados de igual manera en la ratio máxima de acoplamiento, de hecho,

las células del paciente usan de forma preferente los sustratos unidos al complejo II comparado con controles, sin ningún aumento de la actividad máxima de la succinato ubiquinona reductasa (complejo II). Este cambio en el equilibrio entre el uso del sustrato (succinato versus malato y piruvato) ha sido observado también en fibroblastos de pacientes con CMT2A (*Loiseau et al, 2007, Guillet et al, 2009*).

Sin embargo, hay que reconocer que estas alteraciones bioenergéticas halladas, podrían ser unos hallazgos indirectos y que, podrían ser, por ejemplo, el resultado del malfuncionamiento de la fusión mitocondrial. Por otro lado, algunos estudios sugieren que la fusión mitocondrial tendría un papel independiente. Y otros, apoyan que el transporte anormal de mitocondrias en las neuronas sería independiente del defecto de producción de energía (*Baloh et al, 2007*). Otros autores han publicado que, la sobreexpresión de una forma truncada de *MFN2* que respete el dominio transmembrana, sería incapaz de afectar a la morfología mitocondrial, aunque el potencial de membrana de la mitocondria estaría sustancialmente aumentado (*Pich et al, 2009*). En todo caso, aún no está claro como se realiza esta fusión mitocondrial independiente de la *MFN2* (*Cartoni et al, 2009*).

#### *Significado patogénico real de la mutación Arg468His*

El defecto en el acoplamiento en las mitocondrias de los fibroblastos del paciente con la mutación Arg468His, la presencia del cambio que está localizado en una región altamente preservada y los estudios poblacionales realizados, sugieren que la mutación es realmente patógena. En nuestra opinión, es posible que el control anónimo con la mutación Arg468His encontrado en el estudio llevado a cabo por Engelfried et al., 2006 (*Engelfried et al, 2006*) podría representar en realidad un paciente con CMT2A con mínimos síntomas de CMT que todavía no hubieran sido detectados, o un control joven que no hubiera alcanzado todavía la edad de inicio

de los síntomas de CMT2. De hecho, en nuestro estudio hemos encontrado una familia (MFN 06–16) donde el padre presenta discretos síntomas de neuropatía axonal que se iniciaron en la quinta década de vida, mientras que en una de sus hijas, de 16 años, y que presenta también la mutación Arg468His, en los estudios electrofisiológicos se observan unos potenciales de acción sensitivos en los límites bajos de la normalidad y la exploración física únicamente puso de manifiesto la presencia de discretos pies cavos. Esta hija no presentaba otros síntomas asociados previamente con la enfermedad como podrían ser, arreflexia, atrofia distal de extremidades, pérdida de fuerza distal, escoliosis, RM o AO (**Figuras 29 A, 29B, 29C y 29D**). Pensamos que es posible que la presencia de esta mutación represente un factor de riesgo adicional para esta paciente de desarrollar síntomas de CMT2 así como hallazgos electrofisiológicos de neuropatía axonal con el paso de los años.

### **6. Heterogeneidad clínica del CMT2**

Ya se han publicado previamente estudios describiendo la heterogeneidad en la edad de presentación y en la gravedad de la semiología en las familias con distintas mutaciones de la *MFN2* e incluso en distintos individuos que presentan la misma mutación (Zhu et al, 2005; Kijima et al, 2005; Verhoeven et al, 2006; Chung et al, 2006; Züchner et al, 2006). En nuestro estudio demostramos también la presencia de esta heterogeneidad entre distintas mutaciones de la *MFN2* e incluso distintas mutaciones encontradas en el mismo codón. De todas las familias estudiadas, tan solo otra presenta neuropatía axonal congénita con atrofia óptica, aunque en esta, no se evidenciaron cambios en la *MFN2*. Ambas familias presentaban CMT2 grave con patrón de herencia dominante conocido. Parece que la presencia de AO podría

estar relacionada con la posibilidad de identificar mutaciones en la *MFN2*, ya que se han encontrado cambios en la *MFN2* en 1 de las dos familias estudiadas con CMT2 y AO.

Por otro lado, hemos recogido la presencia de RM en 5 de las 85 familias con CMT2 estudiadas. Ninguna de las familias presentaba otros miembros, excepto el probando, con neuropatía axonal y AO. Sin embargo no se encontraron cambios patológicos en la *MFN2* en ninguna de las 5 familias. Nuestro estudio podría sugerir que la búsqueda de *MFN2* en pacientes con CMT2 y RM no parece ser especialmente productivo, al menos, cuando el patrón de herencia es desconocido. Tampoco parece que tenga una rentabilidad alta el estudio de la *MFN2* en casos de CMT y neuromiotonía en los estudios electrofisiológicos, al menos, en caso de ausencia de un patrón esporádico de herencia.

### **7. Frecuencia de mutaciones en los genes *GJB1* y *MFN2***

La búsqueda de mutaciones del gen *GJB1* que codifica para la Cx32 y que son la causa más frecuente de CMT ligado al cromosoma X fue llevado a cabo en 498 familias que fueron referidas al Centro de Diagnóstico Genético y Molecular de Enfermedades Hereditarias con la sospecha diagnóstica de CMT. En todas ellas se descartó la presencia de duplicación o delección de fragmento 17p11.2. En nuestro estudio encontramos un total de 34 mutaciones (lo que representa un 6.82 +/- 2.2% de las familias estudiadas) y dos polimorfismos. Hasta la fecha de la realización del análisis molecular del gen *GJB1* se había puesto de manifiesto la presencia de 283 mutaciones. Nuestra serie es la, que reporta el mayor número de mutaciones del gen *GBJ-1* publicada hasta el momento (López-Bigas et al, 2001;

---

Hattori et al, 2003; Vondracek et al, 2005; Yoshimura et al, 1996; Boerkoel et al, 2002 ; Bort et al, 1997 ; Bissar-Tadmouri et al, 2000).

Por otro lado, los datos sobre mutaciones de *MFN2* en estudios poblacionales, son todavía, limitados. En un estudio en población coreana la *MFN2* resulto ser la causa de CMT2 en el 24.2% del las 62 familias estudiadas (*Chung et al, 2006*). En familias de pedigrí americano las mutaciones de la *MFN2* fueron la causa de CMT2 en 3 de las 13 familias estudiadas (*Lawson et al, 2005*). Estudios moleculares en población Japonesa mostraron una frecuencia menor en la que solo 7 de las 81 familias estudiadas presentaron cambios en la *MFN2* (*Kijima et al, 2005*), aunque, de todas formas, las bajas frecuencia de mutaciones identificadas en el estudio podrían ser debidas a las técnicas empleadas. En nuestro estudio reportamos 24 pacientes procedentes de 14 familias que presentan un total de 9 mutaciones distintas. Esto representa el  $16\% \pm 7.7\%$  del total de las 85 familias estudiadas. Sin embargo, ni nos centramos en el patrón de herencia, el  $30.0\% \pm 14.2\%$  (12/40) de las familias con herencia dominante conocida presentaban la mutación en la *MFN2* y el 85% (12/14) de las familias en las que se identificaron cambios tenían herencia dominante. Por otro lado, únicamente dos familias (4.8%) de los 42 casos en que el patrón de herencia era esporádico presentaron mutaciones en la *MFN2* (**Tabla 1 en apartado 3 de Resultados**). Esto constituye una diferencia estadísticamente significativa con una  $p=0.002$  cuando se aplica el test  $\chi^2$ . Estos hallazgos difieren de los datos publicados previamente que encuentran hasta el 30% de mutaciones de novo (*Verhoeven et al, 2006*). Cuando los hallazgos moleculares de correlacionaron con la severidad de la neuropatía, se observó que se encontraron mutaciones de la *MFN2* en el 14.7% de las familias que presentaban neuropatía leve (5/34), en el 19.3% de las familias con neuropatía de intensidad moderada (6/31), y en el 37.5% de las familias que presentaban neuropatía de

intensidad grave (3/8). Diez de las 39 familias con neuropatía de intensidad moderada a grave (25.6% ± 13.2%) presentaban mutaciones en la *MFN2*. Además, si únicamente consideramos las familias que se presentan con neuropatía grave y con un patrón de herencia dominante conocido encontramos un 60% (3/5) que tienen mutaciones de la *MFN2*.

### **8. Polimorfismos en los genes *GJB-1* y *MFN2***

El estudio del gen *GJB-1* pone de manifiesto la presencia de dos polimorfismos que estaban previamente descritos y el estudio del gen *MFN2* aporta el mayor número de polimorfismos hasta ahora publicados. Es destacable el cambio c.-372\_387del, en el exón 1 (**Tabla 2 en apartado 3 de Resultados**). Este cambio fue encontrado en tres de las 85 familias estudiadas y no se encontró en ninguno de los controles anónimos y sanos en los estudios poblacionales realizados. Sin embargo, estudios de segregación y RNA de este cambio en una de las familias demostró que no era patógeno a pesar de ser un cambio encontrado muy cercano al área promotora del gen.

---

## **9. Aplicación del conocimiento de las frecuencias de mutaciones.**

### **Protocolos diagnósticos**

Fruto del conocimiento de las frecuencias de cada una de estas mutaciones, se han podido elaborar mejores protocolos aplicados a nuestra población. Estos protocolos están explicados en los diagramas diagnósticos en **Figuras 2 y 3 en el apartado 4 de Resultados.**

La función de estos diagramas diagnósticos estaría enfocada a conseguir el diagnóstico molecular de los pacientes en la práctica clínica de la manera más eficiente y rápida posible. Estos diagramas, que a continuación se describen, estarían basados, básicamente, en las frecuencias de las mutaciones, y serían modificados según la presencia o no de características clínicas particulares de las familias.

#### *Protocolo diagnóstico del CMT1*

El protocolo de diagnóstico de CMT desmielinizante y dominante (CMT1) está resumido en la Figura 1, modificado de *England et al. (England et al, 2009)* Dado que los datos que disponemos sugieren que la duplicación de la PMP 22 es la causa más frecuente de CMT 1, y que, además la PMP 22 es la variedad más frecuente de CMT 1 esporádico, (*Berciano et al, 1989; Lupski et al, 1991; Hoogendijk et al, 1992; Timmerman et al, 1992; Nelis et al, 1996; Bort et al, 1997; Janssen et al, 1997; Silander et al, 1998; Colomer-Oferil et al, 2002; Kurihara et al, 2002; Szigeti et al, 2009*) proponemos iniciar el estudio de CMT desmielinizante descartando la duplicación del fragmento que contiene la PMP22. Si se descarta la duplicación, En casos esporádicos o sin transmisión varón - varón proponemos proseguir el estudio buscando mutaciones puntuales del gen GJB 1, que puede diagnosticar hasta el



---

12% de casos). En caso de ausencia de cambios en GJB1 seguiríamos el estudio buscando mutaciones puntuales en los genes MPZ y, posteriormente, el propio PMP22. En casos seleccionados buscaríamos cambios en genes que producen CMT de forma mucho menos frecuente, EGR2, NEFL y el gen LITAF.

**(Figura 2 en apartado 4 de Resultados)**

#### *Protocolo diagnóstico de CMT2*

Proponemos iniciar estudio de CMT axonal con la búsqueda de mutaciones puntuales de *MFN2* (England et al, 2009) que es probablemente la causa más frecuente de CMT2 con hasta el 33% de casos en familias con herencia dominante conocida. Los datos de que se disponen actualmente sugieren que el estudio del gen *GJB-1* puede explicar hasta el 12% de CMT (axonales o desmielinizantes). Por ese motivo proponemos descartar la presencia de mutaciones en ese gen en los casos de CMT axonal en que no se evidencian mutaciones en la *MFN 2* y que sean esporádicos o no tengan transmisión varón-varón conocida. Posteriormente, y en casos seleccionados se podría plantear proseguir el estudio buscando mutaciones en el gen MPZ y NEFL (en caso de dominantes) o en el *GDAP1* (en caso de esporádicos o recesivos). Otros genes estudiables en casos seleccionados serían el *RAB7*, *GARS* y *HSPB1* (Timmerman et al, 1992; Hoogendijk et al, 1992; Nelis et al, 1996; Bort et al, 1997; Züchner et al, 2006; Verhoeven et al, 2006; Züchner et al, 2006; Szigeti et al, 2009).

**(Figura 3 en apartado 4 de Resultados)**

### **10. Limitaciones de estudio**

Muchos de las familias carecen de información clínica o electrofisiológica suficiente. Ello es debido a que, en la gran mayoría de ellas fueron derivadas al centro, desde otros hospitales, en algunos casos con informes escuetos.

Además, las familias derivadas de otros centros, fueron exploradas tanto clínica como electrofisiológicamente por otros grupos lo que comporta una cierta heterogeneidad en las conclusiones de estas exploraciones.

Esto se hace más evidente en el primer trabajo publicado en *Clinical Genetics* donde se describen un número muy alto de pacientes entre los cuales se encuentran 34 familias con mutaciones en el GJB-1. En este estudio, se eligen las familias en base a su patrón de herencia y la ausencia de la duplicación en la PMP22.

En ellas tan solo dos fueron clínica y electrofisiológicamente exploradas por mi. Y en el resto tuvimos que confiar en los informes de derivación. Esta experiencia hizo que en el siguiente estudio en busca de mutaciones en la *MFN2* se eligieran los hallazgos clínicos y electrofisiológicos para la selección de las familias, así que, en este trabajo publicado en *Journal of Medical Genetics*, únicamente fueron seleccionadas las familias con un mínimo de información.

En este trabajo se da, además el caso que 21 de las 85 familias fueron clínica y electrofisiológicamente estudiadas por mi con lo que el estudio gana en homogeneidad.

En el estudio del *GJB1* se utilizó la técnica de SSCA para hacer un primer *screening* de mutaciones. Esta técnica se ha mostrado menos sensible que la secuenciación directa ya que es posible que algunos cambios que producen un cambio de aminoácido no lleguen a cambiar las características eléctricas del DNA de forma suficiente como para que se altere su patrón de migración a la electroforesis. Por lo que es posible que algunas mutaciones pasaran desapercibidas.

Como ya se expuso en el apartado de Introducción, la Cx32 que se transcribe en el nervio periférico es principalmente iniciada por la región promotora P2 que se localiza muy cerca del Exón 2, que contienen la zona codificante del gen en su totalidad.

En el estudio del *GJB-1*, se amplificaron mediante PCR y posteriormente fueron secuenciados los dos fragmentos del exón 2 (exón codificante) del gen. Esto significa que es posible que alguna familia presentara algún cambio en la zona promotora del gen (región P2), y que no fue estudiada y pasara desapercibida. De todas formas parece que las mutaciones fuera de la zona codificante que causen CMTX serían muy poco frecuentes.

Todo lo anteriormente expuesto se hace evidente en una de las conclusiones de los estudios, la referente a la frecuencia total de familias que presentan cambios, mientras que en el primer estudio únicamente encontramos 6.8% de familias con mutación, muy por debajo de lo esperado y de los resultados publicados previamente, el estudio de la *MFN2* presenta unas frecuencias esperables y solapables a anteriores estudios, incluso discretamente por encima, y, además se

aportan datos clínicos "negativos", como la ausencia de mutaciones en caso esporádicos de retraso mental o neuromiotonía en CMT2.

En el estudio del *GJB1* no se describieron familias con características clínicas peculiares ni este tipo de resultados negativos.

Los criterios de VCN que se eligieron en el primer estudio fueron los clásicos de 38 m/s. Velocidades por debajo fueron catalogadas de desmielinizantes. Como he expuesto en el trabajo el patrón de VCN en familias con mutaciones del *GJB1* es más complejo y, desde luego no se ajusta a la división de Harding y Thomas del 1983. De todas formas, el criterio de selección de familias para entrar en el estudio no se basó en VCN por lo tanto esto no bajó la sensibilidad del estudio.

**CONCLUSIONES**

1. Se han encontrado 59 pacientes con pertenecientes a 34 familias con 20 mutaciones diferentes del gen *GJB-1*. Representa un 6,8 % de las familias estudiadas
2. Se confirma la presencia de mutaciones en el gen *GJB-1* como la segunda causa de CMT con VCN bajas o intermedias en nuestra población tras la duplicación de *PMP22*
3. Los dominios extracelulares de la conexina 32, especialmente el EC2 son los que con más frecuencia presentan mutaciones, lo que sugiere que son los dominios funcionalmente más importantes de la proteína.
4. El codón 164 del gen *GJB-1* podría ser considerado un *Hot Spot* para mutaciones
5. Se describen 6 mutaciones por primera vez en el gen *GJB-1*:  
c.115delG, Glu47Gly, c.459\_460delTT, Cys179Tyr, Cys201Phe y c.633delC
6. Se han encontrado 24 pacientes de 14 familias con 9 mutaciones en el gen *MFN2*. Representa el 16% de las familias estudiadas.
7. Se confirma que el CMT2A es la causa más frecuente de CMT2 también en nuestra población y que la rentabilidad del estudio del gen *MFN2* en familias con CMT axonal es mayor si la herencia es dominante conocida y la neuropatía es grave.
8. La mutación Arg94Gln de la *MFN2* se describe como causa de *CMT2 con atrofia óptica*. Demostramos la patogeneicidad de la mutación Arg468His que es la causa más frecuente de CMT2A en nuestra población.

9. Se describen 5 mutaciones por primera vez en el gen *MFN2* :  
Ile203Met, Asn252Lys, Gln276His, Arg364Gln y Met376Val. Se describen el mayor número de polimorfismos de este gen hasta el momento
  
10. Se han diseñado protocolos diagnósticos más eficientes en base a las frecuencias reales de mutaciones en la población española

## **REFERENCIAS**



---

## A

**Amiott EA, Lott P, Soto J, Kang PB, McCaffery JM, DiMauro S, Abel ED, Flanigan KM, Lawson VH, Shaw JM.** Mitochondrial fusion and function in Charcot-Marie-Tooth type 2A patient fibroblasts with mitofusin 2 mutations. *Exp Neurol.* 2008;211(1):115-27

## B

**Bach D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Baumgartner B, Oriola J, Daugaard JR, Lloberas J, Camps M, Zierath JR, Rabasa-Lhoret R, Wallberg-Henriksson H, Laville M, Palacín M, Vidal H, Rivera F, Brand M, Zorzano A.** Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J Biol Chem.* 2003;9;278(19):17190-7

**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; 10;27(2):422-30

**Baxter RV, Ben Othmane K, Rochelle JM, Stajich JE, Hulette C, Dew-Knight S, Hentati F, Ben Hamida M, Bel S, Stenger JE, Gilbert JR, Pericak-Vance MA, Vance JM.** Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nat Genet.* 2002 Jan;30(1):21-2.

**Bell C, Haites N.** Related Articles, Links Genetic aspects of Charcot-Marie-Tooth disease. *Arch Dis Child.* 1998; 78(4): 296-300.

**Ben Othmane K, Middleton LT, Loprest LJ, Wilkinson KM, Lennon F, Rozear MP, Stajich JM, Gaskell PC, Roses AD, Pericak-Vance MA, 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(2):370-5.

**Berciano J, Combarros O, Calleja J, Polo JM, Leno C.** The application of nerve conduction and clinical studies to genetic counseling in hereditary motor and sensory neuropathy type I. *Muscle nerve* 1989; 12:302-306

- 
- Berciano J, Combarros O.** Hereditary neuropathies. *Curr Opin Neurol* 2003; 16: 613-622
- Bergoffen J, Scherer SS, Wang S, Scott MO, Bone LJ, Paul DL, Chen K, Lensch MW, Chance PF, Fischbeck KH.** Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* 1993; 262:2039-2042
- Bissar-Tadmouri N, Parman Y, Boutrand L, Deymeer F, Serdaroglu P, Vandenberghe A, Battaloglu E.** Mutational analysis and genotype/phenotype correlation in Turkish Charcot-Marie-Tooth Type 1 and HNPP patients. *Clin Genet* 2000;58(5): 396-402.
- Boerkoel CF, Takashima H, Garcia CA, Olney RK, Johnson J, Berry K, Russo P, Kennedy S, Teebi AS, Scavina M, Williams LL, Mancias P, Butler IJ, Krajewski K, Shy M, Lupski JR.** Charcot-Marie-Tooth Disease and Related Neuropathies: Mutation Distribution and Genotype-Phenotype Correlation. *Ann Neurol* 2002; 51: 190-201.
- Bolino A, Muglia M, Conforti FL, LeGuern E, Salih MA, Georgiou DM, Christodoulou K, Hausmanowa-Petrusewicz I, Mandich P, Schenone A, Gambardella A, Bono F, Quattrone A, Devoto M, Monaco AP.** Charcot-Marie-Tooth type 4B is caused by mutations in the gene encoding myotubularin-related protein-2. *Nat Genet.* 2000 May;25(1):17-9
- Bolino A, Levy ER, Muglia M, Conforti FL, LeGuern E, Salih MA, Georgiou DM, Christodoulou RK, Hausmanowa-Petrusewicz I, Mandich P, Gambardella A, Quattrone A, Devoto M, Monaco AP.** Genetic refinement and physical mapping of the CMT4B gene on chromosome 11q22. *Genomics.* 2000 Jan 15;63(2):271-8.
- Buniello A, Montanaro D, Volinia S, Gasparini P, Marigo V.** An expression atlas of connexin genes in the mouse. *Genomics.* 2004 May;83(5):812-20.
- Bort S, Nelis E, Timmerman V, Sevilla T, Cruz-Martínez A, Martínez F, Millán JM, Arpa J, Vélchez JJ, Prieto F, Van Broeckhoven C, Palau F.** Mutational analysis of the MPZ, PMP22 and Cx32 genes in patients of Spanish ancestry with Charcot-Marie-Tooth disease and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Hum Genet.* 1997 ;99(6):746-54.

---

**Buchthal F, Behse.** Peroneal muscular atrophy (PMA) and related disorders. I. Clinical manifestations as related to biopsy findings, nerve conduction and electromyography. *Brain*. 1977 Mar;100 Pt 1:41-66.

## C

**Cassereau J, Chevrollier A, Gueguen N, Malinge MC, Letournel F, Nicolas G, Richard L, Ferre M, Verny C, Dubas F, Procaccio V, Amati-Bonneau P, Bonneau D, Reynier P.** Mitochondrial complex I deficiency in GDAP1-related autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMT2K). *Neurogenetics*. 2009;10(2):145-50.

**Cartoni R, Martinou JC.** Role of mitofusin 2 mutations in the physiopathology of Charcot-Marie-Tooth disease type 2A. *Exp Neurol*. 2009;218(2):268-73.

**Cleland JC, Logigian EL, Thaisetthawatkul P, Herrmann DN.** Dispersion of the distal compound muscle action potential in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy and carpal tunnel syndrome. *Muscle Nerve*. 2003 Aug;28(2):189-93.

**Charcot JM, Marie P.** Sur une forme particulière d'atrophie musculaire progressive, souvent familiale, debutant par les pieds et les jambes atteignant plus tard les mains. *Revue de Médecine, Paris* 1886; 6:97-138

**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;20;160(2):189-200.

**Christodoulou K, Kyriakides T, Hristova AH, Georgiou DM, Kalaydjieva L, Yshpekova B, Ivanova T, Weber JL, Middleton LT.** Mapping of a distal form of spinal muscular atrophy with upper limb predominance to chromosome 7p. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 1629-1632

**Chung KW, Kim SB, Park KD, Choi KG, Lee JH, Eun HW, Suh JS, Hwang JH, Kim WK, Seo BC, Kim SH, Son IH, Kim SM, Sunwoo IN, Choi BO.** Early onset severe and late-onset mild Charcot-Marie-Tooth disease with mitofusin 2 (MFN2) mutations. *Brain*. 2006;129(Pt 8):2103-18.

**Claeys KG, Züchner S, Kennerson M, Berciano J, Garcia A, Verhoeven K, Storey E, Merory JR, Bienfait HM, Lammens M, Nelis E, Baets J, De Vriendt E, Berneman ZN, De Veuster I, Vance JM, Nicholson G, Timmerman V, De Jonghe P.** Phenotypic spectrum of dynamin 2 mutations in Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Brain*. 2009 Jul;132(Pt 7):1741-52.

**Colomer-Oferil J.** Aspectos clínicos y abordaje diagnóstico y terapéutico de las neuropatías hereditarias sensitivo-motoras. *Rev Neurol* 2002; 35:239-245

**Cuesta A, Pedrola L, Sevilla T, García-Planells J, Chumillas MJ, Mayordomo F, LeGuern E, Marín I, Vélchez JJ, Palau F.** The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nat Genet*. 2002;30(1):22-5.

## D

**Database of Transcriptional Start Sites.** <http://dbtss.hgc.jp>, último acceso 1 de Enero el 2010

**Detmer SA, Vande Velde C, 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(3):367-75.

**Detmer SA, Chan DC.** Complementation between mouse Mfn1 and Mfn2 protects mitochondrial fusion defects caused by CMT2A disease mutations. *J Cell Biol*. 2007 Feb 12;176(4):405-14.

**Dejerine J, Sottas J.** Sur la nevríté interstielle, hypertrophique et progressive de l'enfance. *Comptes Rendus de la Société de Biologie* 1893; 45:63-96

**De Sandre-Giovannoli A, Delague V, Hamadouche T, Chaouch M, Krahn M, Boccaccio I, Maisonobe T, Chouery E, Jabbour R, Atweh S, Grid D, Mégarbané A, Lévy N.** Homozygosity mapping of autosomal recessive demyelinating Charcot-Marie-Tooth neuropathy (CMT4H) to a novel locus on chromosome 12p11.21-q13.11. *J. Med. Genet*.2005;42, 260-265.

**Del Bo R, Locatelli F, Corti S, Scarlato M, Ghezzi S, Prella A, Fagiolari G, Moggio M, Carpo M, Bresolin N, Comi GP.** Coexistence of CMT-2D and distal SMA-V phenotypes in an Italian family with a GARS gene mutation. *Neurology*. 2006 Mar 14;66(5):752-4

**Del Bo R, Moggio M, Rango M, Bonato S, D'Angelo MG, Ghezzi S, Airoidi G, Bassi MT, Guglieri M, Napoli L, Lamperti C, Corti S, Federico A, Bresolin N, Comi GP.** Mutated mitofusin 2 presents with intrafamilial variability and brain mitochondrial dysfunction. *Neurology*. 2008.; 9;71(24):1959-66

**Dubourg O, Tardieu S, Birouk N, Gouider R, Léger JM, Maisonobe T, Brice A, Bouche P, LeGuern E.** Clinical, electrophysiological and molecular genetic characteristics of 93 patients with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain*. 2001 Oct;124(Pt 10):1958-67.

**Dubourg O, Azzedine H, Verny C, Durosier G, Birouk N, Gouider R, Salih M, Bouhouche A, Thiam A, Grid D, Mayer M, Ruberg M, Tazir M, Brice A, LeGuern E.** Autosomal-recessive forms of demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med*. 2006;8(1-2):75-86. Review.

**Dyck Pj, Chance P, Lebo R.** Hereditary Motor and Sensory Neuropathies. In Dick Pj editors. *Peripheral Neuropathy*, 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co.; 1993 pp. 1094-1136

## E

**Ekici AB, Schweitzer D, Park O, Lorek D, Rautenstrauss B, Krüger G, Friedl W, Uhlhaas S, Bathke K, Heuss D, Kayser C, Grehl H.** Charcot-Marie-Tooth disease and related peripheral neuropathies: novel mutations in the peripheral myelin genes connexin 32 (Cx32), peripheral myelin 22 (PMP22), and peripheral myelin protein zero (MPZ). *Neurogenetics* 2000; 3: 49-50.

**Emery AE.** Population frequencies of inherited neuromuscular diseases – a world survey. *Neuromuscul Disord* 1991; 1:19-29

**Emery AE.** Review: The nosology of the spinal muscular atrophies. *J Med Genet* 1971; 8:481-495.

**England JD, Gronseth GS, Franklin G, Carter GT, Kinsella LJ, Cohen JA, Asbury AK, Szigeti K, Lupski JR, Latov N, Lewis RA, Low PA, Fisher MA, Herrmann DN, Howard JF, Lauria G, Miller RG, Polydefkis M, Sumner AJ;** American Academy of Neurology; American Association of Neuromuscular and Electrodiagnostic Medicine; American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation. Practice Parameter: evaluation of distal symmetric polyneuropathy: role of laboratory and

---

genetic testing (an evidence-based review). Report of the American Academy of Neurology, American Association of Neuromuscular and Electrodiagnostic Medicine, and American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation. *Neurology*. 2009;13;72(2):185-92.

**England JD, Gronseth GS, Franklin G, Carter GT, Kinsella LJ, Cohen JA, Asbury AK, Szigeti K, Lupski JR, Latov N, Lewis RA, Low PA, Fisher MA, Herrmann D, Howard JF, Lauria G, Miller RG, Polydefkis M, Sumner AJ;** American Academy of Neurology; American Association of Neuromuscular and Electrodiagnostic Medicine; American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation. Evaluation of distal symmetric polyneuropathy: the role of laboratory and genetic testing (an evidence-based review). *Muscle Nerve*. 2009;39(1):116-25.

**Engelfried K, Vorgerd M, Hagedorn M, Haas G, Gilles J, Epplen JT, Meins M.** Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A: novel mutations in the mitofusin 2 gene (MFN2). *BMC Med Genet*. 2006; 8;7:53

**Estivill-Pallejà X, Volpini-Bertrán V, Milà-Recasens M, Real-Arribas Morral-Còdol N.** 1995. *Genética Médica*. En Ferreras/Rozman *Medicina Interna* 13a edició. Madrid, Mosby-Doyma Libros SA

## F

**Fairweather N, Bell C, Cochrane S, Chelly J, Wang S, Mostacciuolo ML, Monaco AP, Haites NE.** Mutations in the connexin 32 gene in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMTX1). *Hum Mol Genet*. 1994; 3(1) :29-34

## G

**Gemignani F, Marbini A.** Charcot-Marie-Tooth disease (CMT): distinctive phenotypic and genotypic features in CMT type 2. *J Neurol Sci*. 2001 Feb 15;184(1):1-9.

**Goodenough DA, Paul DL.** Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Apr;4(4):285-94.

**Grace S, Liang L, De Miguel M, Gomez-Hernandez JM, Glass J, Scherer S.** Severe Neuropathy with Leaky Connexin32 Hemichannels. *Ann Neurol* 2005; 57:749-754

---

**Greenberg S, Walsh R.** Molecular diagnosis of inheritable neuromuscular disorders. Part I: Genetic determinants of inherited disease and laboratory detection. *Muscle Nerve* 2005; 31: 418-430.

**Greenberg S, Walsh R.** Molecular diagnosis of inheritable neuromuscular disorders. Part II: Application of genetic testing in neuromuscular disease. *Muscle Nerve* 2005; 31: 431-51

**Guillet V, Gueguen N, Chevrollier A, Verny C, Loiseau D, Ferre M, Procaccio V, Amati-Bonneau P, Bonneau D, Reynier P.** ATP/ADP Translocase is involved in mitochondrial coupling defect in Charcot-Marie-Tooth Type 2A Disease related to MFN2 mutations. *Neurogenetics*. 2009 Jul 18.

## H

**Hahn AF.** Hereditary motor and sensory neuropathy: HMSN type II (neuronal type) and X-linked HMSN *Brain Pathol.* 1993 Apr;3(2):147-55.

**Hahn AF, Bolton CF, White CM, Brown WF, Tuuha SE, Tan CC, Ainsworth PJ.** Genotype/phenotype correlations in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1999 Sep 14;883:366-82.

**Hattori N, Yamamoto M, Yoshihara T, Koike H, Nakagawa M, Yoshikawa H, Ohnishi A, Hayasaka K, Onodera O, Baba M, Yasuda H, Saito T, Nakashima K, Kira J, Kaji R, Oka N, Sobue G;** Study Group for Hereditary Neuropathy in Japan. Demyelinating and axonal features of Charcot-Marie-Tooth disease with mutations of myelin-related proteins (PMP22, MPZ and Cx32): a clinicopathological study of 205 Japanese patients. *Brain.* 2003 Jan;126(Pt 1):134-51

**Harding AE, Thomas PK.** Distal and scapuloperoneal distributions of muscle involvement occurring within a family with type I hereditary motor and sensory neuropathy. *J Neurol.* 1980;224(1):17-23

**Harding AE, Thomas PK.** Hereditary distal spinal muscular atrophy. A report on 34 cases and a review of the literature. *J Neurol Sci.* 1980 Mar;45(2-3):337-48

**Harding AE, Thomas PK.** The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain.* 1980 Jun;103(2):259-80.

---

**Harding AE, Thomas PK.** Genetic aspects of hereditary motor and sensory neuropathy (types I and II). *J Med Genet.* 1980 Oct;17(5):329-36.

**Harding AE.** Inherited neuronal atrophy and degeneration predominantly of lower motor neurons. In: Dyck PJ, Thomas PK, Griffin JW, Low PA, Podouslo JF, eds. *Peripheral neuropathy.* 3er ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1993: 1051-1064.

**Hoogendijk JE, Hensels GW, Gabreëls-Festen AA, Gabreëls FJ, Janssen EA, de Jonghe P, Martin JJ, van Broeckhoven C, Valentijn LJ, Baas F.** De-novo mutation in hereditary motor and sensory neuropathy type I. *Lancet.* 1992;2;339(8801):1081-2.

**Houlden H, King RH, Hashemi-Nejad A, Wood NW, Mathias CJ, Reilly M, Thomas PK.** A novel TRK A (NTRK1) mutation associated with hereditary sensory and autonomic neuropathy type V. *Ann Neurol.* 2001 Apr;49(4):521-5

**Houlden H, Girard M, Cockerell C, Ingram D, Wood NW, Goossens M, Walker RW, Reilly MM.** Connexin 32 Promoter P2 Mutations: A Mechanism of peripheral Nerve Dysfunction. *Ann Neurol* 2004; 56: 730-734.

**Houlden H, Reilly MM.** Molecular genetics of autosomal-dominant demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med.* 2006;8(1-2):43-62

**Huehne K, Benes V, Thiel C, Kraus C, Kress W, Hoeltzenbein M, Ploner CJ, Kotzian J, Reis A, Rott HD, Rautenstrauss BW.** Novel mutations in the Charcot-Marie-Tooth disease genes PMP22, MPZ, and GJB1. *Hum Mutat.* 2002; Mutation in Brief#572 On line

## I

**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; 47(2): 541-4.

**Inherited Peripheral database.** <http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/Mutations/Mutations.cfm>. Último acceso 1 de Enero del 2010



---

**Ishihara N, Eura Y, Mihara K.** Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J Cell Sci.* 2004 Dec 15;117(Pt 26)

## J

**Janssen EA, Kemp S, Hensels GW, Sie OG, de Die-Smulders CE, Hoogendijk JE, de Visser M, Bolhuis PA.** Connexin32 gene mutations in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMTX1). *Hum Genet.* 1997;99(4):501-5

**Jordanova, A.; Thomas, F. P.; Guergueltcheva, V.; Tournev, I.; Gondim, F. A. A.; Ishpekova, B.; De Vriendt, E.; Jacobs, A.; Litvinenko, I.; Ivanova, N.; Buzhov, B.; De Jonghe, P.; Kremensky, I.; Timmerman, V.** Dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth type C maps to chromosome 1p34-p35. *Am. J. Hum. Genet.* 73: 1423-1430, 2003.

**Jordanova A, Irobi J, Thomas FP, Van Dijck P, Meerschaert K, Dewil M, Dierick I, Jacobs A, De Vriendt E, Guergueltcheva V, Rao CV, Tournev I, and 12 others.** Disrupted function and axonal distribution of mutant tyrosyl-tRNA synthetase in dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Nature Genet.* 38: 197-202, 2006.

## K

**Karadima G, Panas M, Floroskufi P, Kalfakis N, Vassilopoulos D.** Four novel connexin 32 mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease with phenotypic variability. *J Neurol.* 2006 Feb;253(2):263-4.

**Kijima K, Numakura C, Izumino H, Umetsu K, Nezu A, Shiiki T, Ogawa M, Ishizaki Y, Kitamura T, Shozawa Y, Hayasaka K.** Mitochondrial GTPase mitofusin 2 mutation in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Hum Genet.* 2005 Jan;116(1-2):23-7.

**Kleopa KA, Scherer SS.** Molecular genetics of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med.* 2006;8(1-2):107-22.

**Kochanski A, Nowakowski A, Kawulak M, Kabzinska D, Hausmanowa-Petrusewicz I.** Somatic mosaicism in Charcot-Marie-Tooth type X disease. *Neurology.* 2004; 62(2): 336-337.

---

**Kochanski A, Kabzinska D.** Molecular genetic analysis of the GJB1 gene: a study of six mutations. *J. Appl. Genet.* 2004; 45(1): 95-100.

**Knott A, Perkins G, Schwarzenbacher R, Bossy-Wetzel E.** Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience* 2008; 9, 505-518

**Kuhlenbaumer G, Young P, Hunermund G, Ringelstein B, Stogbauer F.** Clinical features and molecular genetics of hereditary peripheral neuropathies. *J Neurol* 2002; 249: 1629-1650

**Kumar N, Gilula N.** The Gap Junction Communication Channel. *Cell.* 1996 Feb 9;84(3):381-8.

**Kurihara S, Adachi Y, Wada K, Awaki E, Harada H, Nakashima K.** An epidemiological genetic study of Charcot-Marie-Tooth disease in Western Japan. *Neuroepidemiology.* 2002 Sep-Oct;21(5):246-50.

## L

**Lapresle J, Salisachs P.** Onion bulbs in a nerve biopsy specimen from an original case of Roussy-Lévy disease. *Arch Neurol* 1973; 29: 346-348.

**Latour P, Lévy N, Paret M, Chapon F, Chazot G, Clavelou P, Couratier P, Dumas R, Ollagnon E, Pouget J, Setiey A, Vallat JM, Boucherat M, Fontes M, Vandenberghe A.** Mutations in the X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease in the French population. *Neurogenetics.* 1997; 1(2): 117-23.

**Laurà M, Milani M, Morbin M, Moggio M, Ripolone M, Jann S, Scaioli V, Taroni F, Pareyson D.** Rapid progression of late onset axonal Charcot-Marie-Tooth disease associated with a novel MPZ mutation in the extracellular domain *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2007;78(11):1263-6

**Lawson VH, Graham BV, Flanigan KM.** Clinical and electrophysiologic features of CMT2A with mutations in the mitofusin 2 gene. *Neurology.* 2005 Jul 26;65(2):197-204.

**LeGuern E, Guilbot A, Kessali M, Ravisé N, Tassin J, Maisonobe T, Grid D, Brice A.** Homozygosity mapping of an autosomal recessive form of demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease to chromosome 5q23-q33. *Hum Mol Genet.* 1996 Oct;5(10):1685-8.

---

**Li J, Krajewski K, Shy ME, Lewis RA.** Hereditary neuropathy with liability to pressure palsy: the electrophysiology fits the name. *Neurology*. 2002 Jun 25;58(12):1769-73

**Lin GS, Glass JD, Shumas S, Scherer SS, Fischbeck KH.** A unique mutation in connexin32 associated with severe, early onset CMTX in a heterozygous female. *Ann N Y Acad Sci*. 1999 Sep 14;883:481-4.

**Loiseau D, Chevrollier A, Verny C, Guillet V, Gueguen N, Pou de Crescenzo MA, Ferré M, Malinge MC, Guichet A, Nicolas G, Amati-Bonneau P, Malthièry Y, Bonneau D, Reynier P.** Mitochondrial coupling defect in Charcot-Marie-Tooth type 2A disease. *Ann Neurol* 2007;61(4):315-23

**López-Bigas N, Olivé M, Rabionet R, Ben-David O, Martínez-Matos JA, Bravo O, Banchs I, Volpini V, Gasparini P, Avraham KB, Ferrer I, Arbonés ML, Estivill X.** Connexin 31 (GJB3) is expressed in the peripheral and auditory nerves and causes neuropathy and hearing impairment. *Hum Mol Genet*. 2001; 10(9): 947-952

**Lupski JR, de Oca-Luna RM, Slaugenhaupt S, Pentao L, Guzzetta V, Trask BJ, Saucedo-Cardenas O, Barker DF, Killian JM, Garcia CA, Chakravarti A, Patel PI.** DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell*. 1991 Jul 26;66(2):219-32.

## M

**Magot A, Latour P, Mussini JM, Mourtada R, Guiheneuc P, Pereon Y.** A new MPZ mutation associated with a mild CMT1 phenotype presenting with recurrent nerve compression. *Muscle Nerve*. 2008 Aug;38(2):1055-9

**Marques Jr W, Sweeney MG, Wroe SJ, Wood NW.** Central Nervous system involvement in a new Connexin 32 mutation affecting identical twins. *Abstractbook Third International Symposium on Charcot-Marie-Tooth Disorders* : P21, 1998

**Medical Research Council.** Aids to the Examination of the Peripheral Nervous System. London, England: Her Majesty's Stationary Office; 1976.

- Meuleman J, Pou-Serradell A, Löfgren A, Ceuterick C, Martin JJ, Timmerman V, Van Broeckhoven C, De Jonghe P.** A novel 3'-splice site mutation in peripheral myelin protein 22 causing hereditary neuropathy with liability to pressure palsies *Neuromuscular Disorders* 2001;11:400-403
- Mersiyanova I.V., Ismailov S.M., Polyakov A.V., Dadali E.L., Fedotov V.P., Nelis E., Loefgren A., Timmerman V., Van Broeckhoven C., Evgrafov O.V.** Screening for mutations in the peripheral myelin genes PMP22, MPZ and Cx32 (GJB1) in Russian Charcot-Marie-Tooth neuropathy patients. *Hum Mutat.* 15:340-347(2000)
- Miltenberger-Miltenyi, G.; Janecke, A. R.; Wanschitz, J. V.; Timmerman, V.; Windpassinger, C.; Auer-Grumbach, M.; Loscher, W. N.** Clinical and electrophysiological features in Charcot-Marie-Tooth disease with mutations in the NEFL gene. *Arch. Neurol.* 64: 966-970, 2007.
- Mostacciolo M.L., Righetti E., Zortea M., Bosello V., Schiavon F., Vallo L., Merlini L., Siciliano G., Fabrizi G.M., Rizzuto N., Milani M., Baratta S., Taroni F.** Charcot-Marie-Tooth disease type I and related demyelinating neuropathies: mutation analysis in a large cohort of Italian families. *Hum Mutat.* 18:32-41(2001)
- Murru MR, Vannelli A, Marrosu G, Cocco E, Corongiu D, Tranquilli S, Cherchi MV, Mura M, Barberini L, Mallarini G, Marrosu MG.** A novel Cx32 mutation causes X-linked Charcot-Marie-Tooth disease with brainstem involvement and brain magnetic resonance spectroscopy abnormalities. *Neurol Sci.* 2006;27(1):18-23
- ## N
- Naef R, Suter U.** Many facets of the peripheral myelin protein PMP22 in myelination and disease. *Microsc Res Tech.* 1998 Jun 1;41(5):359-71.
- Namakura C., Lin C., Ikegami T., Guldborg P., Hayasaka K.** Molecular analysis in Japanese patients with Charcot-Marie-Tooth disease: DGGE analysis for PMP22, MPZ, and Cx32/GJB1 mutations. *Hum. Mutat.* 20:392-398(2002)
- Nelis E, Van Broeckhoven C, De Jonghe P, Löfgren A, Vandenberghe A, Latour P, Le Guern E, Brice A, Mostacciolo ML, Schiavon F, Palau F, Bort S, Upadhyaya M, Rocchi M, Archidiacono N,**

---

**Mandich P, Bellone E, Silander K, Savontaus ML, Navon R, Goldberg-Stern H, Estivill X, Volpini V, Friedl W, Gal A.** Estimation of the mutation frequencies in Charcot-Marie-Tooth disease type 1 and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies: a European collaborative study. *Eur J Hum Genet.* 1996;4(1):25-33.

**Nelis E, Berciano J, Verpoorten N, Coen K, Dierick I, Van Gerwen V, Combarros O, De Jonghe P, Timmerman V.** Autosomal dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease type 2 (CMT2G) maps to chromosome 12q12-q13.3. *J Med Genet.* 2004 Mar;41(3):193-7

**Nelis E, Haites N, Van Broeckhoven.** Mutations in the peripheral myelin genes and associated genes in inherited peripheral neuropathies. *Hum Mutat.* 1999; 13 (1):11- 2

**Nicholson GA, Yeung L, Corbett A.** Efficient neurophysiologic selection of X-linked Charcot-Marie-Tooth families: ten novel mutations. *Neurology.* 1998 Nov;51(5):1412-6.

**Nicholson GA** Mutation testing in Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;14;883:383-8.

**Nicholson GA, Magdelaine C, Zhu D, Grew S, Ryan MM, Sturtz F, Vallat JM, Ouvrier RA.** Severe early-onset axonal neuropathy with homozygous and compound heterozygous MFN2 mutations. *Neurology.* 2008;6;70(19):1678-81.

## O

**Othmane KB, Johnson E, Menold M, Graham FL, Hamida MB, Hasegawa O, Rogala AD, Ohnishi A, Pericak-Vance M, Hentati F, Vance JM.** Identification of a new locus for autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease with focally folded myelin on chromosome 11p15. *Genomics.* 1999 Dec 15;62(3):344-9.

## P

**Paternostro-Sluga T, Grim-Stieger M, Posch M, Schuhfried O, Vacariu G, Mittermaier C, Bittner C, Fialka-Moser V.** Reliability and validity of the Medical Research Council (MRC) Scale and a Modified Scale for testing muscle strength in patients with radial palsy. *J Rehabil Med* 2008; 40: 665–671

---

**Pareyson D**, Differential diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease and related neuropathies. *Neurol Sci* 2004;25:72-82

**Pareyson D, Scaioli V, Laurà M**. Clinical and electrophysiological aspects of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med.* 2006;8(1-2):3-22.

**Pich S, Bach D, Briones P, Liesa M, Camps M, Testar X, Palacín M, Zorzano A**. The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Hum Mol Genet.* 2005;14(11):1405-15

**Pleasure D**, Genetics of Charcot-Marie-Tooth Disease. *Arch Neurol* 2003; 60:481-482

## R

**Roa BB, Warner LE, Garcia CA, Russo D, Lovelace R, Chance PF, Lupski JR**. Myelin protein zero (MPZ) gene mutations in nonduplication type 1 Charcot-Marie-Tooth disease. *Hum Mutat.* 1996;7(1):36-45.

**Rojo M, Legros F, Chateau D, Lombés A**. Membrane topology and Mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J Cell Sci* 2002; 115:1663-1674

**Rogers T, Chandler D, Angelicheva D, Thomas PK, Youl B, Tournev I, Gergelcheva V, Kalaydjieva L**. A novel locus for autosomal recessive peripheral neuropathy in the EGR2 region on 10q23. *Am J Hum Genet.* 2000 Sep;67(3):664-71

**Rossi, A.; Paradiso, C.; Cioni, R.; Rizzuto, N.; Guazzi, G.** Charcot-Marie-Tooth disease: study of a large kinship with an intermediate form. *J. Neurol.* 232: 91-98, 1985.

**Rotthier A, Baets J, De Vriendt E, Jacobs A, Auer-Grumbach M, Lévy N, Bonello-Palot N, Kilic SS, Weis J, Nascimento A, Swinkels M, Kruyt MC, Jordanova A, De Jonghe P, Timmerman V**. Genes for hereditary sensory and autonomic neuropathies: a genotype-phenotype correlation. *Brain.* 2009 Oct;132(Pt 10):2699-711.



---

**Rouger H, LeGuern E, Birouk N, Gouider R, Tardieu S, Plassart E, Gugenheim M, Vallat JM, Louboutin JP, Bouche P, Agid Y, Brice A.** Charcot-Marie-Tooth disease with intermediate motor nerve conduction velocities: characterization of 14 CX32 mutations in 35 families. *Hum Mutat.* 1997; 10(6): 443-52.

**Roussy G, Lévy G.** Sept cas d'une maladie familiale particulière. *Rev Neurol (Paris)* 1926; 1:427-450

## S

**Sander HW, Latov N.** Research criteria for defining patients with CIDP. *Neurology.* 2003 Apr 1;60(8 Suppl 3):S8-15.

**Santel A, Fuller MT.** Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci* 2001;114:867-874

**Scherer SS, Xu YT, Nelles E, Fischbeck K, Willecke K, Bone LJ.** Connexin32-null mice develop demyelinating peripheral neuropathy. *Glia.* 1998 Sep;24(1):8-20.

**Schiavon F, Fracasso C, Mostacciuolo ML.** Novel missense mutation of the connexin32 (GJB1) gene in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Hum Mutat.* 1996; 8(1): 83-4.

**Senderek J, Hermanns B, Bergmann C, Boroojerdi B, Bajbouj M, Hungs M, Ramaekers VT, Quasthoff S, Karch D, Schröder JM.** X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth neuropathy: clinical, electrophysiological, and morphological phenotype in four families with different connexin32 mutations(1). *J Neurol Sci.* 1999 Aug 15;167(2):90-101.

**Senderek J, Bergmann C, Stendel C, Kirfel J, Verpoorten N, De Jonghe P, Timmerman V, Chrast R, Verheijen MH, Lemke G, Battaloglu E, Parman Y, Erdem S, Tan E, Topaloglu H, Hahn A, Müller-Felber W, Rizzuto N, Fabrizi GM, Stuhmann M, Rudnik-Schöneborn S, Züchner S, Michael Schröder J, Buchheim E, Straub V, Klepper J, Huehne K, Rautenstrauss B, Büttner R, Nelis E, Zerres K.** Mutations in a gene encoding a novel SH3/TPR domain protein cause autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth type 4C neuropathy. *Am J Hum Genet.* 2003 Nov;73(5):1106-19.



---

**Sevilla T, Vilchez JJ.** Diferentes fenotipos del síndrome de Charcot-Marie-Tooth causados por mutaciones del mismo gen: ¿siguen siendo útiles los criterios de clasificación clásicos? *Neurología* 2004; 19:264-271

**Sevilla T, Cuesta A, Chumillas MJ, Mayordomo F, Pedrola L, Palau F, Vilchez JJ.** Clinical, electrophysiological and morphological findings of Charcot-Marie-Tooth neuropathy with vocal cord palsy and mutations in the GDAP1 gene. *Brain*. 2003;126(Pt 9):2023-33

**Sillen A, Anneren G, Dahl N.** Related Articles, Links A novel mutation (C201R) in the transmembrane domain of connexin 32 in severe X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Hum Mutat*. 1998; Suppl 1:S8-9.

**Sivakumar K, Kyriakides T, Puls I, Nicholson GA, Funalot B, Antonellis A, Sambuughin N, Christodoulou K, Beggs JL, Zamba-Papanicolaou E, Ionasescu V, Dalakas MC, Green ED, Fischbeck KH, Goldfarb LG.** Phenotypic spectrum of disorders associated with glycyI-tRNA synthetase mutations. *Brain*. 2005 Oct;128(Pt 10):2304-14.

**Silander K, Meretoja P, Juvonen V, Ignatius J, Pihko H, Saarinen A, Wallden T, Herrgård E, Aula P, Savontaus ML.** Spectrum of mutations in Finnish patients with Charcot-Marie-Tooth disease and related neuropathies. *Hum Mutat*. 1998;12(1):59-68

**Snipes GJ, Suter U, Welcher AA, Shooter EM** Characterization of a novel peripheral nervous system myelin protein (PMP-22/SR13). *J Cell Biol*. 1992 Apr;117(1):225-38.

**Shy ME, Scavina MT, Clark A, Krajewski KM, Li J, Kamholz J, Kolodny E, Szigeti K, Fischer RA, Saifi GM, Scherer SS, Lupski JR.** T118M PMP22 mutation causes partial loss of function and HNPP-like neuropathy (p 358-364). *Ann Neurol* 2006;59:358-364

**Shy ME, Jáni A, Krajewski K, Grandis M, Lewis RA, Li J, Shy RR, Balsamo J, Lilien J, Garbern JY, Kamholz J.** Phenotypic clustering in MPZ mutations. *Brain*. 2004;127(Pt 2):371-84.

**Shy ME, Blake J, Krajewski K, Fuerst DR, Laura M, Hahn AF, Li J, Lewis RA, Reilly M.** Reliability and validity of the CMT neuropathy score as a measure of disability. *Neurology*. 2005;12;64(7):1209-14.

Skre H. Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie, Tooth disease. *Clin Genet* 1974;6:98-1998

- Sorour E., Upadhyaya M.** Mutation analysis in Charcot-Marie-Tooth disease type 1 (CMT1). *Hum. Mutat. Suppl.* 1:S242-S247(1998)
- Street VA, Meekins G, Lipe HP, Seltzer WK, Carter GT, Kraft GH, Bird TD.** Charcot-Marie-Tooth neuropathy: clinical phenotypes of four novel mutations in the MPZ and Cx 32 genes. *Neuromuscul Disord.* 2002;12(7-8):643-50
- Sołtysińska E, Kabzińska D, Kochański A.** Mutations in the mitofusin 2 gene are the most common cause of Charcot-Marie-Tooth type 2 disease. *Neurol Neurochir Pol.* 2007;41(4):350-4.
- Söhl G, Willecke K.** Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular Research* 2004 62(2):228-232
- Southern EM.** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 1975; 98: 503-517.
- Stanton M, Pannoni V, Lewis RA, Logigian EL, Naguib D, Shy ME, Cleland J, Herrmann DN.** Dispersion of compound muscle action potential in hereditary neuropathies and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Muscle Nerve.* 2006 Oct;34(4):417-22.
- Suter L, Scherer S.** Disease mechanisms in inherited neuropathies *Nature Reviews Neuroscience* 2003; 4, 714-726
- Szigeti K, Lupski JR.** Charcot-Marie-Tooth disease. *Eur J Hum Genet.* 2009 Jun;17(6):703-10

## T

- Takahashi E, Takeda O, Himoro M, Nanao K, Takada G, Hayasaka K.** Localization of PMP-22 gene (candidate gene for the Charcot-Marie-Tooth disease 1A) to band 17p11.2 by direct R-banding fluorescence in situ hybridization. *Jpn J Hum Genet.* 1992 Dec;37(4):303-6.
- Tan CC, Ainsworth PJ, Hahn AF, MacLeod PM.** Related Articles, Links Novel mutations in the connexin 32 gene associated with X-linked Charcot-Marie tooth disease. *Hum Mutat.* 1996; 7(2): 167-71.

---

**Taylor R, Simon E, Marks H, Scherer S.** The CNS phenotype of X-Linked Charcot-Marie-Tooth disease. More than a peripheral problem. *Neurology* 2003; 61; 61: 1475-1478

**Thaisetthawatkul P, Logigian EL, Herrmann DN.** Dispersion of the distal compound muscle action potential as a diagnostic criterion for chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology*. 2002 Nov 26;59(10):1526-32.

**Thomas PK, Kalaydjieva L, Youl B, Rogers T, Angelicheva D, King RH, Guergueltcheva V, Colomer J, Lupu C, Corches A, Popa G, Merlini L, Shmarov A, Muddle JR, Nourallah M, Tournev I.** Hereditary motor and sensory neuropathy-russe: new autosomal recessive neuropathy in Balkan Gypsies. *Ann. Neurol.* 2001;50, 452-457.

**Timmerman V, De Jonghe P, Simokovic S, Löfgren A, Beuten J, Nelis E, Ceuterick C, Martin JJ, Van Broeckhoven C.** Distal hereditary motor neuropathy type II (distal HMN II ): mapping of a locus to chromosome 12q24. *Hum Mol Gen* 1996; 5:1065-1069.

**Timmerman V, Nelis E, Van Hul W, Nieuwenhuijsen BW, Chen KL, Wang S, Ben Othman K, Cullen B, Leach RJ, Hanemann CO.** The peripheral myelin protein gene PMP22 is contained within the Charcot-Marie-Tooth disease type 1A duplication. *Nat Genet* 1992; 1:171-175

**Tooth HH.** The peroneal type of progressive muscular atrophy. London, H.K. Lewis & Co., Ltd., 1886.

## U

**Uhlenberg B, Schuelke M, Rüschemdorf F, Ruf N, Kaindl AM, Henneke M, Thiele H, Stoltenburg-Didinger G, Aksu F, Topaloğlu H, Nürnberg P, Hübner C, Weschke B, Gärtner J.** Mutations in the gene encoding gap junction protein alpha 12 (connexin 46.6) cause Pelizaeus-Merzbacher-like disease. *Am J Hum Genet.* 2004 Aug;75(2):251-60.

**V**

**Vallat JM.** Dominantly inherited peripheral neuropathies. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2003 Jul;62(7):699-714.

**Verhoeven K, Claeys KG, Züchner S, Schröder JM, Weis J, Ceuterick C, Jordanova A, Nelis E, De Vriendt E, Van Hul M, Seeman P, Mazanec R, Saifi GM, Szigeti K, Mancias P, Butler IJ, Kochanski A, Ryniewicz B, De Bleecker J, Van den Bergh P, Verellen C, Van Coster R, Goemans N, Auer-Grumbach M, Robberecht W, Milic Rasic V, Nevo Y, Tournev I, Guergueltcheva V, Roelens F, Vieregge P, Vinci P, Moreno MT, Christen HJ, Shy ME, Lupski JR, Vance JM, De Jonghe P, Timmerman V.** MFN2 mutation distribution and genotype/phenotype correlation in Charcot-Marie-Tooth type 2. *Brain.* 2006;129(Pt 8):2093-102

**Verhoeven, K, Villanova, M, Rossi, A, Malandrini, A, De Jonghe, P, Timmerman, V.** Localization of the gene for the intermediate form of Charcot-Marie-Tooth to chromosome 10q24.1-q25.1. *Am. J. Hum. Genet.* 69: 889-894, 2001.

**Verny C, Ravisé N, Leutenegger AL, Pouplard F, Dubourg O, Tardieu S, Dubas F, Brice A, Genin E, LeGuern E.** Coincidence of two genetic forms of Charcot-Marie-Tooth disease in a single family. *Neurology.* 2004 Oct 26;63(8):1527-9.

**Villanova, M.; Timmerman, V.; De Jonghe, P.; Malandrini, A.; Rizzuto, N.; Van Broeckhoven, C.; Guazzi, G. G.; Rossi, A.** Charcot-Marie-Tooth disease: an intermediate form. *Neuromusc. Disord.* 8: 392-393, 1998.

**Vondracek P, Seeman P, Hermanova M, Fajkusiva L.** X-linked Charcot-Marie-Tooth disease: Phenotypic Expression of a Novel Mutation Ile127Ser In The GJB1(Connexin 32) Gene. *Muscle Nerve* 2005; 31: 252-255.

---

## Y

**Yoshimura T, Ohnishi A, Yamamoto T, Fukushima Y, Kitani M, Kobayashi T.** Related Articles, Links Two novel mutations (C53S, S26L) in the connexin32 of Charcot-Marie-Tooth disease type X families. *Hum Mutat.* 1996; 8(3): 270-2.

**Yum SW, Kleopa KA, Shumas S, Scherer SS.** Diverse trafficking abnormalities of connexin32 mutants causing CMTX. *Neurobiol Dis.* 2002 Oct;11(1):43-52.

## Z

**Zhao C, Takita J, Tanaka Y, Setou M, Nakagawa T, Takeda S, Yang HW, Terada S, Nakata T, Takei Y, Saito M, Tsuji S, Hayashi Y, Hirokawa N.** Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. *Cell.* 2001 Jun 1;105(5):587-97.

**Zhou L, Hoke A,** A Novel Insertional mutation in Connexin 32 gene causes demyelinating polyneuropathy with predominantly motor axonal loss. *Journal of the Peripheral Nervous System* 2004; 9: 1994-1995.

**Zhu D, Kennerson ML, Walizada G, Züchner 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(3):496-7

**Züchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, Zappia M, Nelis E, Patitucci A, Senderek J, Parman Y, Evgrafov O, Jonghe PD, Takahashi Y, Tsuji S, Pericak-Vance MA, Quattrone A, Battaloglu E, Polyakov AV, Timmerman V, Schröder JM, Vance JM.** Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet.* 2004;36(5):449-51

**Züchner S, Vance JM.** Molecular genetics of autosomal-dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med.* 2006;8(1-2)

**Züchner S, De Jonghe P, Jordanova A, Claeys KG, Guergueltcheva V, Cherninkova S, Hamilton SR, Van Stavern G, Krajewski KM, Stajich J, Tournev I, Verhoeven K, Langerhorst CT, de Visser M, Baas F, Bird T, Timmerman V, Shy M, Vance JM.** Axonal neuropathy with optic atrophy is caused by mutations in mitofusin 2. *Ann Neurol.* 2006;59(2):276-81

**ANEXOS**

### Anexo 1: CMT neuropathy score

Parámetro	Puntuación				
	0	1	2	3	4
Síntomas sensitivos	Ninguno	Limitado a dedos pie	Incluye hasta tobillo	Incluye hasta rodilla	Más allá de rodilla
Síntomas Motores					
Piernas	Ninguno		Férula antiequino	Apoyo/cirugía tobillo	Silla de ruedas
Brazos	Ninguno	Dificultad para botones	Incapaz de apretar Botones. Puede escribir	No puede escribir o usar teclado	Debilidad proximal EESS
Sensibilidad tacto	Normal	Reducida en dedos	Incluye hasta tobillo	Incluye hasta rodilla	Más allá de rodilla
Vibratoria	Normal	Reducida en dedos	Incluye hasta tobillo	Incluye hasta rodilla	Más allá de rodilla
Fuerza					
Piernas	Normal	4- o 4+ a la extensión del pie	Menos de 3 a la extensión del pie	Menos de 3 flexión y extensión del pie	Debilidad proximal
Brazos	Normal	4 o 4+ en intrínsecos o extensor dedos	Menos de 3 en intrín o ext dedos	Menos de 5 en extensor muñeca	Debilidad sobre el codo
CMAP Cubital (Mediano)	Más de 6mV Más de 4	4-5.9 mV 2.9-3.9	2.0 a 3.9 mV 1.2-2.7	0.1 a 1.9 0.1-1-1	Sin respuesta
SNAP cubital (Mediano)	más de 9 Más de 22	6-8.9 14-21.9	3.0-5.9 7.0-13.9	0.1-2.9 0.1-6.9	Sin respuesta Sin respuesta
TOTAL (max 36)					



**Anexo 2: Tablas a2, a3, a4.** Resultado de la medición de sustratos MP, SR y MPS (cuatro mediciones en el paciente). Se muestran comparados con el resultado de los controles y de los paciente con mutación de la MFN2 publicados previamente (Loisseau 2007, Guillet 2009)

TABLA A2

MP			
	Paciente (X3)	Controles	Mutaciones MFN2
	18,43		
	25,23		
	13,24		
	15,99		
<b>Total</b>	<b>8,08</b>	<b>10,36</b>	<b>11,42</b>

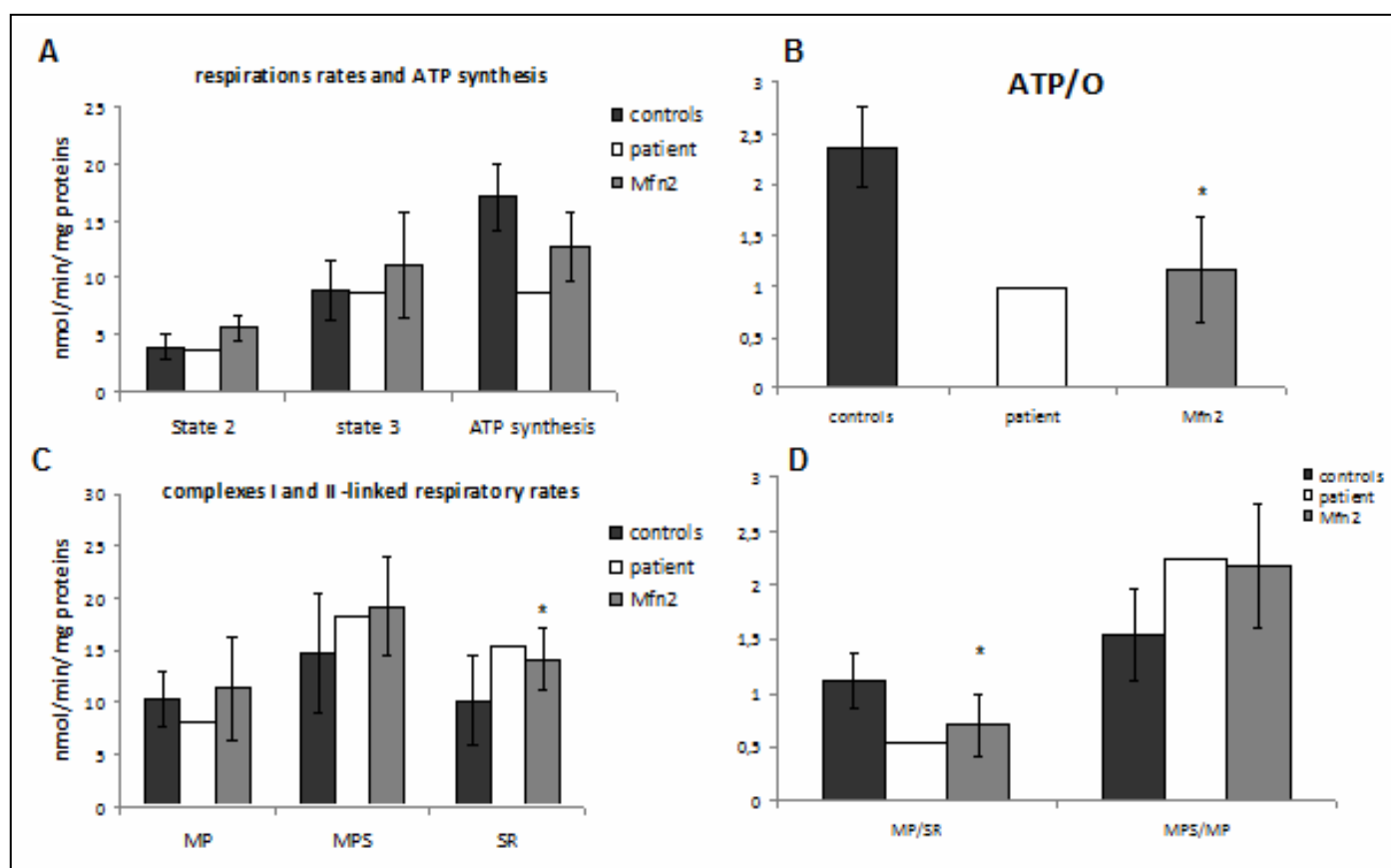
TABLA A3

MPS			
	Paciente (X3)	Controles	Mutaciones MFN2
	7,95		
	8,20		
	9,55		
	6,60		
<b>Total</b>	<b>18,22</b>	<b>14,76</b>	<b>19,33</b>

TABLA A4

SR			
	Paciente (X3)	Controles	Mutaciones MFN2
	14,90		
	19,10		
	12,26		
	15,31		
<b>Total</b>	<b>15,39</b>	<b>10,15</b>	<b>14,17</b>

**Figura 1:** Resumen de los hallazgos en la tasa de respiración asociada a los complejos I y II y el uso de ATP en los distintos estados de la respiración mitocondrial



---

**Anexo 3:** Tablas de la *Medical Reserach Sum Score*


---

**Table I.** *Medical Research Council scale* original extraida de: *Aids to examination of the peripheral nervous system. Memorandum no. 45. London: Her Majesty's Stationery Office; 1976*

---

- |   |  |
|---|--|
| 0 | No contracción                                     |
| 1 | Se observa contracción, sin movimiento activo      |
| 2 | Movimiento activo, al eliminar la gravedad         |
| 3 | Movimiento activo en contra de la gravedad         |
| 4 | Movimiento activo en contra gravedad y resistencia |
| 5 | Fuerza normal                                      |

**Table II.** *Medical Research Council scale* modificada según *Paternostro-Sluga et al.*

---

- |     |   |
|-----|---|
| 0   | No contracción  |
| 1   | Se observa contracción, sin movimiento activo   |
| 2   | Movimiento activo, al eliminar la gravedad  |
| 2-3 | Movimiento activo, al eliminar la gravedad menor al 50% del total normal  |
| 3   | Movimiento activo, al eliminar la gravedad mayor al 50% del total normal  |
| 3-4 | Movimiento activo en contra de la gravedad menor al 50% del total normal  |
| 4   | Movimiento activo en contra de la gravedad mayot al 50% del total normal  |
| 4-5 | Movimiento activo en contra de resitencia fuerte pero claramente más debil respecto con la extremidad contralateral |
| 5   | Fuerza normal   |

