

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
ORIGINAL PAPER

**Μελέτη των κληρονομικών  
πολυνευροπαθειών  
(νόσος των Charcot-Marie-Tooth)  
στον ελληνικό πληθυσμό**

ΣΚΟΠΟΣ Η μοριακή μελέτη των κληρονομικών πολυνευροπαθειών (νόσος των Charcot-Marie-Tooth, CMT) στον ελληνικό πληθυσμό. ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ Μελετήθηκαν, συνολικά, 327 ασθενείς-δείκτες ελληνικής καταγωγής με πιθανή κληρονομική αισθητικοκινητική πολυνευροπάθεια, σε διάστημα 15 ετών. Αναλυτικότερα, 243 ασθενείς ήταν τύπου CMT1, 44 τύπου CMT2, ενώ 40 είχαν κληρονομική πολυνευροπάθεια με επιρρέπεια σε πιεστικές βλάβες (hereditary neuropathy with liability to pressure palsies, HNPP). Πραγματοποιήθηκε μοριακή ανάλυση με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) και της ανάλυσης προσδιορισμού αλληλουχίας DNA (sequencing), για τον εντοπισμό του διπλασιασμού (CMT1A) ή της έλλειψης (HNPP) του γονιδίου της περιφερικής πρωτεΐνης της μυελίνης *PMP22*, καθώς και σημειακών μεταλλαγών στα γονίδια *MPZ* της μηδενικής πρωτεΐνης της μυελίνης (CMT1B) και *GJB1* της κορνεξίνης 32 (CMTX). Σε ασθενείς με CMT1 ελέγχθηκαν επίσης για σημειακές μεταλλαγές τα γονίδια *PMP22* (CMT1E), *EGR2* (CMT1D), *LITAF* (CMT1C) και *NEFL* (CMT1F). ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ Στους ασθενείς τύπου CMT1, τα ποσοστά κατανομής των υποτύπων CMT1A, CMTX, CMT1B, CMT1C, CMT1D, CMT1E και CMT1F υπολογίστηκαν σε 25,9%, 4,9%, 0,6%, 0%, 0,6%, 1,2% και 0%, αντίστοιχα. Πιο συγκεκριμένα, σε ασθενείς με CMT1 ανιχνεύτηκαν 10 διαφορετικές σημειακές μεταλλαγές στο γονίδιο *GJB1*, 5 από τις οποίες (c.110T>C, c.208C>T, c.462T>G, c.109G>T και c.42-43insT) είναι νέες μεταλλαγές. Επίσης, εντοπίστηκε μια νέα σημειακή μεταλλαγή στο γονίδιο *MPZ* (c.89T>C), δύο νέες μικρο-μεταλλαγές (c.296\_301del CTGGAA, c.328\_348dup21) στο γονίδιο *PMP22* και μία γνωστή μεταλλαγή στο γονίδιο *EGR2*. Σε ασθενείς τύπου CMT2 ανιχνεύτηκαν δύο περιπτώσεις με διπλασιασμό του γονιδίου *PMP22* και δύο με νέα μεταλλαγή στο γονίδιο *GJB1* (c.524A>G). Στους ασθενείς με HNPP ανιχνεύτηκε η παθογνωμονική μεταλλαγή σε ποσοστό 30,0%. Δεν ανιχνεύτηκαν μεταλλαγές στα γονίδια *LITAF* και *NEFL*. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ Στον ελληνικό πληθυσμό, ο συχνότερος γενετικός τύπος κληρονομικών πολυνευροπαθειών είναι ο CMT1A, ακολουθούμενος από τον CMTX, ενώ σπάνια ανευρίσκονται οι τύποι CMT1E, CMT1B και CMT1D. Η συχνότητα του τύπου CMT1A διαπιστώνεται χαμηλότερη απ' ό,τι στους περισσότερους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς, υποδηλώνοντας ιδιαίτερο πληθυσμιακό χαρακτηριστικό των Ελλήνων, ενδεχομένως οφειλόμενο στη μερική γενετική απομόνωση του ελληνικού πληθυσμού. Η συχνότητα κατανομής του τύπου CMT1B είναι από τις χαμηλότερες που έχουν αναφερθεί. Η συχνότητα του τύπου CMTX, καθώς και των τύπων CMT1E και CMT1D σε ασθενείς με CMT1 είναι ανάλογη με αυτή που αναφέρεται και σε άλλους πληθυσμούς. Η μη ανίχνευση ασθενών με τις μορφές CMT1C και CMT1F συνάδει με τη σπανιότητα των εν λόγω μεταλλαγών. Η παθογνωμονική μεταλλαγή της HNPP ανιχνεύτηκε σε ποσοστό χαμηλότερο από τα διεθνή βιβλιογραφικά δεδομένα. Συμπερασματικά, φαίνεται ότι ο ελληνικός πληθυσμός έχει σημαντικές ιδιαιτερότητες όσον αφορά στις κληρονομικές πολυνευροπάθειες.

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2013, 30(2):186-196  
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2013, 30(2):186-196

Γ. Καραδήμα,<sup>1</sup>  
Γ. Κούτσης,<sup>1,2</sup>  
Π. Φλωροσκούφη,<sup>1</sup>  
Η. Houlden,<sup>2</sup>  
Μ. Πάνας<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Μονάδα Νευρογενετικής,  
Α΄ Νευρολογική Κλινική, «Αιγινήτειο»  
Νοσοκομείο, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και  
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών,  
Αθήνα

<sup>2</sup>Department of Molecular Neuroscience,  
UCL Institute of Neurology, London, UK

A study of hereditary motor and  
sensory neuropathies (Charcot-  
Marie-Tooth disease) in the Greek  
population

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Ελλάδα  
Κληρονομικές πολυνευροπάθειες  
Πληθυσμιακή μελέτη

Υποβλήθηκε 1.10.2012  
Εγκρίθηκε 10.10.2012

Η παράθεση κάποιων γενικών πληροφοριών σχετικά με τις κληρονομικές πολυνευροπάθειες κρίνεται απαραίτητη προκειμένου να εξασφαλιστεί ένας κοινός λόγος. Η κληρονομική κινητική και αισθητική πολυνευροπάθεια ή νόσος των Charcot-Marie-Tooth (CMT) χαρακτηρίζεται κλινικά από προοδευτικά επιδεινούμενη μυϊκή αδυναμία και ατροφία των περιφερικών τμημάτων των άκρων και παρακλινικά από μεγάλη επιβράδυνση της ταχύτητας αγωγής ή του ύψους των προκλητών δυναμικών των κινητικών και των αισθητικών νEURΩΝ.<sup>1</sup> Συνήθως εκδηλώνεται κατά τις πρώτες δύο δεκαετίες της ζωής και εμφανίζεται με συχνότητα 1 ανά 2.500 κατοίκους.<sup>2</sup> Χαρακτηρίζεται από μεγάλη κλινική και γενετική ετερογένεια. Κληρονομείται και με τους τρεις μενδελιανούς τρόπους (επικρατητικό, υποχωρητικό και φυλοσύνδετο). Ιστολογικά, προσβάλλονται τόσο οι νευράξονες όσο και η μυελίνη.<sup>3</sup>

Η ταξινόμηση των κληρονομικών κινητικών και αισθητικών πολυνευροπαθειών πραγματοποιείται κυρίως με κριτήριο τις ταχύτητες αγωγής των περιφερικών νEURΩΝ. Με αυτό το κριτήριο διακρίνονται σε (α) απομυελινωτικές ή τύπου 1 (CMT1), που είναι οι συχνότερες και χαρακτηρίζονται από μεγάλη μείωση των κινητικών ταχυτήτων αγωγής (κινητική ταχύτητα αγωγής μέσου νEURΟΥ <38–40 m/s) και φυσιολογικά ύψη προκλητών δυναμικών και ιστολογικά από απομυελίνωση και «κρομμυοειδείς σχηματισμούς» και (β) αξονικές ή τύπου 2 (CMT2), που είναι πιο σπάνιες, χαρακτηρίζονται από ελάχιστη μείωση των κινητικών ταχυτήτων αγωγής (κινητική ταχύτητα αγωγής μέσου νEURΟΥ >38–40 m/s) και μείωση του ύψους των προκλητών δυναμικών, ενώ ιστολογικά διαπιστώνεται μείωση του αριθμού των εμμύελων ινών μεγάλης διαμέτρου και αύξηση των εμμύελων ινών μικρής διαμέτρου, με πρωτογενή βλάβη του νευράξονα.<sup>1,3</sup>

Στη σύγχρονη βιβλιογραφία, η νόσος CMT ταξινομείται βάσει ενός συνδυασμού κλινικών κριτηρίων και της εκάστοτε υπεύθυνης γονιδιακής βλάβης.<sup>2</sup> Στην αιτιοπαθογένεια της νόσου έχουν εμπλακεί μέχρι σήμερα >30 γονίδια. Στον πίνακα 1 παρατίθεται περιληπτικά η σύγχρονη ταξινόμηση της νόσου, καθώς και η συχνότητα των κυριότερων υποτύπων της νόσου.<sup>2,4</sup> Στις παραγράφους που ακολουθούν δίνονται περισσότερα στοιχεία για τις συχνότερες μορφές της νόσου CMT.

Ο συχνότερος τύπος της νόσου CMT είναι η CMT1A. Κληρονομείται με τον αυτοσωμικό επικρατητικό τρόπο και αφορά στο 40–50% του συνόλου των ασθενών.<sup>5–7</sup> Ποσοστό 60–80% των οικογενειών με CMT τύπου I (πίν. 1) παρουσιάζουν γενετική ανωμαλία στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 17 (17p11.2), η οποία συνίσταται σε διπλασιασμό τμήματος DNA, μεγέθους 1,5 Mb.<sup>5,6</sup> Η περι-

οχή αυτή περιλαμβάνει και το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη της περιφερικής μυελίνης *PMP22*, το οποίο επίσης διπλασιάζεται.<sup>8,9</sup> Σε ποσοστό <2% η νόσος μπορεί να οφείλεται, εκτός του διπλασιασμού, και σε σημειακές μεταλλαγές στο ίδιο γονίδιο. *De novo* μεταλλαγές ανευρίσκονται περίπου στο ένα πέμπτο των ασθενών.<sup>10,11</sup>

Δεύτερος σε συχνότητα τύπος CMT είναι η φυλοσύνδετη CMTX, η οποία αποτελεί το 7–12% όλων των περιπτώσεων νόσου CMT.<sup>7</sup> Χαρακτηριστικά, στο ιστορικό διαπιστώνεται ότι φαινομενικά υγιείς ή ολιγοσυμπτωματικές μητέρες μεταφέρουν τη νόσο στα άρρενα παιδιά τους.<sup>12,13</sup> Η CMTX οφείλεται σε σημειακές μεταλλαγές στο γονίδιο *GJB1* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη κοννεξίνη-32 και εδράζεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος X (Xq13.1).<sup>14</sup> Μέχρι σήμερα έχουν ανιχνευτεί >240 διαφορετικές σημειακές μεταλλαγές στο γονίδιο αυτό (Molgen CMT Mutation Database). Η κοννεξίνη-32 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που ανευρίσκεται τόσο στη μυελίνη των κυττάρων του Schwann όσο και στα γλοιακά κύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ).<sup>14</sup> Το γεγονός αυτό ερμηνεύει τη συνύπαρξη, σε κάποιους από τους ασθενείς, συμπτωμάτων που απορρέουν από βλάβη τόσο του περιφερικού όσο και του ΚΝΣ.<sup>15–20</sup>

Τρίτος σε συχνότητα τύπος CMT είναι, στους περισσότερους πληθυσμούς, ο τύπος CMT1B, που κληρονομείται με τον αυτοσωμικό επικρατητικό τρόπο και συνήθως δεν διαφέρει κλινικά ή ηλεκτροφυσιολογικά από τη CMT1A. Η CMT1B συσχετίζεται με μεταλλαγές στο γονίδιο *MPZ*, το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 1 (1q22-q23) και κωδικοποιεί μια άλλη πρωτεΐνη της μυελίνης των περιφερικών νEURΩΝ, τη myelin protein zero ή Po.<sup>21</sup> Οι μεταλλαγές στο γονίδιο *MPZ* υπολογίζονται σε <5% των περιπτώσεων CMT1.<sup>6</sup> Έως σήμερα είναι γνωστές >100 μεταλλαγές.<sup>22</sup>

Ένας ιδιαίτερος τύπος απομυελινωτικής πολυνευροπάθειας είναι η κληρονομική νευροπάθεια με επιρρέπεια στις πιεστικές βλάβες (hereditary neuropathy with liability to pressure palsies, HNPP). Η νόσος προκύπτει από γενετικό σφάλμα, το οποίο συνίσταται σε έλλειψη της ίδιας της χρωμοσωμικής περιοχής (17p11.2) που είναι διπλασιασμένη στη CMT1A και η οποία, όπως προαναφέρθηκε, περιλαμβάνει και το γονίδιο *PMP22*. Σημειακές μεταλλαγές στο γονίδιο *PMP22* έχουν επίσης αναφερθεί. Όπως η CMT1A, έτσι και η HNPP σχετίζεται με δομικές βλάβες της πρωτεΐνης *PMP22*.<sup>23</sup> Η συχνότητά της υπολογίζεται σε 1:10.000 άτομα. Κλινικά, εμφανίζεται με παροδικού χαρακτήρα παραλύσεις νEURΩΝ μετά από μικροτραυματισμό ή άσκηση πίεσης. Η αποκατάσταση της παράλυσης από πίεση είναι συνήθως καλή, αλλά η υποκείμενη πολυνευροπάθεια μπορεί να εξελίσσεται βραδέως.<sup>23</sup>

**Πίνακας 1.** Κλινική και γενετική ταξινόμηση των κληρονομικών κινητικών και αισθητικών πολυνευροπαθειών (νόσος Charcot-Marie-Tooth) με τη συνήθη συχνότητα σε αγγλοσαξονικούς πληθυσμούς.

Κλινικός τύπος CMT	Γενετική ταξινόμηση CMT	Συνήθης φαινότυπος	Κληρονομικότητα	Γονίδια	Συχνότητα
CMT1 (MCV <38 m/s)	<b>CMT1A</b>	Κλασική CMT με ετερογένεια ως προς τη βαρύτητα	Αυτοσωμική επικρατητική	Διπλασιασμός <i>PMP22</i>	60–80% της CMT1
	<b>CMT1B</b>	Κλασική CMT, βαριά CMT	Αυτοσωμική επικρατητική	<i>MPZ</i>	<5% της CMT1
	<b>CMT1C</b>	Κλασική CMT	Αυτοσωμική επικρατητική	<i>LITAF</i>	Σπάνια
	<b>CMT1D</b>	Κλασική CMT, βαριά CMT	Αυτοσωμική επικρατητική	<i>EGR2</i>	Σπάνια
	<b>CMT1E</b>	Κλασική CMT, βαριά CMT	Αυτοσωμική επικρατητική	Σημειακές μεταλλαγές <i>PMP22</i>	1–2% της CMT1
	<b>CMT1F</b>	Κλασική CMT	Αυτοσωμική επικρατητική	<i>NEFL</i>	Σπάνια
	<b>CMTX</b>	Κλασική CMT, βαρύτερη στους άνδρες	Φυλοσύνδετη	<i>GJB1</i>	7–12% όλων των CMT
CMT2 (MCV >38 m/s)	CMT4A, CMT4B, CMT4C, CMT4D, CMT4E, CMT4F, CMT4G, CMT4H, CMT4J	Συνήθως βαριά CMT	Αυτοσωμική υπολειπόμενη	<i>GDAP1, MTMR2/MTMR13, SH3TC2, NDRG1, EGR2, PRX, HK1, FGD4, FIG4</i>	Όλες οι μορφές σπάνιες
	CMT2A	Κλασική CMT	Αυτοσωμική επικρατητική	<i>MFN2</i>	20% της CMT2
	CMT2E, CMT2I, CMT2K	Κλασική CMT	Αυτοσωμική επικρατητική	<i>NEFL, MPZ, GDAP1</i>	Όλες οι μορφές σπάνιες
	CMT2B	Κυρίως αισθητική συμμετοχή (παρόμοια εικόνα με HSN1)	Αυτοσωμική επικρατητική	<i>RAB7</i>	Όλες οι μορφές σπάνιες
	CMT2C, CMT2D, CMT2F, CMT2L	Κυρίως κινητική συμμετοχή (παρόμοια εικόνα με dHMN)	Αυτοσωμική επικρατητική	<i>TRPV4, GARS, HSPB1, HSPB8</i>	Όλες οι μορφές σπάνιες
	<b>CMTX</b>	Κλασική CMT, ήπια στις γυναίκες με μορφή CMT2	Φυλοσύνδετη	<i>GJB1</i>	7–12% όλων των CMT
	CMT2B1, CMT2B2, CMT2H	Συνήθως κλασική ή βαριά CMT	Αυτοσωμική υπολειπόμενη	<i>LMNA, MED25, GDAP1</i>	Όλες οι μορφές σπάνιες
HNPP	<b>HNPP</b>	Κλασική HNPP	Αυτοσωμική επικρατητική	Έλλειψη <i>PMP22</i>	60–80% της HNPP
	HNPP	Κλασική HNPP, ενίοτε και με στοιχεία κλασικής CMT	Αυτοσωμική επικρατητική	Σημειακές μεταλλαγές <i>PMP22</i>	5–10% της HNPP

Σημείωση: Με έντονη γραφή παρατίθενται οι γενετικές μορφές που ελέγχθηκαν στην παρούσα μελέτη  
CMT: Charcot-Marie-Tooth disease, HSN: Hereditary sensory neuropathy, dHMN: Distal hereditary motor neuropathy

Η μορφή CMT2 είναι, γενικά, πιο σπάνια από τη CMT1. Ωστόσο, επειδή η γονιδιακή αιτία έχει ταυτοποιηθεί μόνο στο 40% των ασθενών, δεν είναι ακόμη απόλυτα γνωστός ο επιπολασμός της.<sup>2</sup> Συνολικά, ποσοστό 20% των ασθενών με CMT2 φέρουν μεταλλαγές στο γονίδιο *MFN2* (1p36) που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη mitofusín, μια μιτοχονδριακή πρωτεΐνη.<sup>2,4,5</sup> Με εξαίρεση τις μεταλλαγές του γονιδίου *GJB1*, που σε γυναίκες μπορεί να εμφανίζεται ως τύπος CMT2, όλες οι άλλες μορφές CMT2 είναι σπάνιες. Η κλινικογενετική προσέγγιση της CMT2 γίνεται με βάση το φαινότυπο, ο οποίος όμως μπορεί, πέραν της κλασικής μορφής, να ομοιάζει και με κληρονομική αισθητική νευροπάθεια (hereditary sensory neuropathy, HSN1) ή κληρονομική,

αιμιγώς κινητική νευροπάθεια (distal hereditary motor neuropathy, dHMN) (πίν. 1).<sup>2</sup>

Η συχνότητα και τα χαρακτηριστικά των κληρονομικών πολυνευροπαθειών στην Ελλάδα δεν έχουν, μέχρι σήμερα, μελετηθεί επαρκώς. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με το φαινόμενο της μερικής γενετικής απομόνωσης που χαρακτηρίζει τον ελληνικό πληθυσμό,<sup>24</sup> υπαγορεύουν την αναγκαιότητα της παρούσας μελέτης, σκοπός της οποίας ήταν η διερεύνηση των μοριακών γενετικών χαρακτηριστικών των κληρονομικών πολυνευροπαθειών CMT1A, CMTX, CMT1B, CMT1C, CMT1D, CMT1E, CMT1F και HNPP στον ελληνικό πληθυσμό.

## ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

### Προέλευση υλικού

Το υλικό της παρούσας μελέτης αποτελείται από ασθενείς-δείκτες με κλινική διάγνωση πιθανής κληρονομικής κινητικής και αισθητικής πολυνευροπάθειας που μελετήθηκαν στη Μονάδα Γενετικής του «Αιγινήτειου» Νοσοκομείου την περίοδο 1994–2008. Ως ασθενής-δείκτης ορίστηκε τυχαία ο πρώτος από τους ασθενείς κάθε οικογένειας που προσήλθε ή παραπέμφθηκε προς διερεύνηση. Το μεγαλύτερο τμήμα των συγκεκριμένων ασθενών νοσηλεύτηκε στη Νευρολογική Κλινική του «Αιγινήτειου» Νοσοκομείου Αθηνών ή εξετάστηκε στα ειδικά ιατρεία της Μονάδας Νευρογενετικής του νοσοκομείου, ενώ οι υπόλοιποι προέρχονταν από παραπομπές άλλων νοσοκομείων ή ιδιωτών ιατρών.

Το «Αιγινήτειο» ευρίσκεται γεωγραφικά σε κεντρική θέση στον ελλαδικό χώρο και κατά το διάστημα της μελέτης διέθετε τη μοναδική Μονάδα Νευρογενετικής, με δυνατότητες μοριακής γενετικής διερεύνησης των κληρονομικών πολυνευροπαθειών. Κατ' επέκταση, οι υπό μελέτη ασθενείς-δείκτες προέρχονταν από διάφορες περιοχές της Ελλάδας και το δείγμα μπορεί να θεωρηθεί αντιπροσωπευτικό για τον ελληνικό πληθυσμό.

### Χαρακτηριστικά υλικού

Συνολικά, μελετήθηκαν 327 ασθενείς-δείκτες. Όλοι οι ασθενείς εξετάστηκαν νευρολογικά και πληρούσαν τα κλινικά κριτήρια για πιθανή νόσο CMT ή HNPP.<sup>25–27</sup> Οι ασθενείς με κλασική εικόνα CMT κατατάχθηκαν με βάση τα ηλεκτροφυσιολογικά τους χαρακτηριστικά (κινητική ταχύτητα αγωγής μέσου νεύρου) ως CMT1 (ταχύτητα <40 m/s) και CMT2 (ταχύτητα >40 m/s).<sup>26</sup> Στον πίνακα 2 παρουσιάζεται η ταξινόμηση των ασθενών σύμφωνα με τα κλινικά και τα ηλεκτροφυσιολογικά χαρακτηριστικά τους.

**Πίνακας 2.** Ταξινόμηση των ασθενών-δεικτών με κλινικά και ηλεκτροφυσιολογικά κριτήρια.

Τύπος CMT	Αριθμός δεικτών	Ποσοστό (%)
CMT1	243	74,3
CMT2	44	13,5
HNPP	40	12,2
Σύνολο	327	100

CMT: Charcot-Marie-Tooth disease

### Μέθοδος

Αφού εξασφαλίστηκε η γραπτή συγκατάθεση κάθε ασθενούς, απομονώθηκε το DNA από τα λευκά αιμοσφαίρια του περιφερικού αίματος, σύμφωνα με τη μέθοδο του χλωριούχου νατρίου (NaCl).<sup>28</sup>

Η διάγνωση της CMT1A και της HNPP (διπλασιασμός και έλλειψη του γονιδίου *PMP22*, αντίστοιχα) έγινε με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (polymerase chain

reaction, PCR) σε συνδυασμό με τη χρήση του περιοριστικού ενζύμου *EcoRI*.<sup>29</sup>

Η μοριακή μελέτη των γενετικών υποτύπων CMTX, CMT1B, CMT1C, CMT1D, CMT1E και CMT1F για τον εντοπισμό σημειακών μεταλλαγών στα γονίδια *GJB1*, *MPZ*, *LITAF*, *EGR2*, *PMP22* και *NEFL* πραγματοποιήθηκε με ενίσχυση (PCR) της κωδικοποιούσας περιοχής των γονιδίων και στη συνέχεια με ανάγνωση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (Sanger sequencing) σε αυτοματοποιημένο σύστημα (ABI 310 Genetic Analyzer, Μονάδα Νευρογενετικής, «Αιγινήτειο» Νοσοκομείο και ABI 3730XL Genetic Analyzer, Department of Molecular Neuroscience, UCL Institute of Neurology).<sup>30–32</sup>

### Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία έγινε με τη δοκιμασία  $\chi^2$ , χρησιμοποιώντας το στατιστικό πρόγραμμα Statistical Package for Social Sciences (SPSS) v. 16.0.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από το σύνολο των 327 εξετασθέντων, το 74,3% είχαν κλινικό τύπο CMT1, το 13,5% κλινικό τύπο CMT2 και το 12,2% κλινικό τύπο HNPP (πίν. 2). Συνολικά, ταυτοποιήθηκε το γενετικό σφάλμα σε 95 άτομα, ποσοστό 29,1% του δείγματος (πίν. 3). Σε ασθενείς με CMT1 ανευρέθηκαν παθολογικές μεταλλαγές στο 32,5% του δείγματος, σε ασθενείς με CMT2 στο 9,1% και σε ασθενείς με HNPP στο 30% (πίν. 3). Κατά σειρά φθίνουσας συχνότητας, παρατηρήθηκαν μεταλλαγές στα γονίδια *PMP22*, *GJB1*, *MPZ* και *EGR2* (πίν. 4), ενώ δεν ανιχνεύθηκαν παθολογικές μεταλλαγές στα γονίδια *LITAF* και *NEFL*.

### Κλινικός τύπος CMT1

Από τους 243 ασθενείς-δείκτες με ένδειξη CMT1, ανιχνεύτηκε διπλασιασμός του γονιδίου *PMP22* (CMT1A) στους 63 (25,9%). Στους υπόλοιπους ασθενείς-δείκτες, μετά από την εξαίρεση 35 ατόμων που παρουσίαζαν μεταβίβαση της νόσου από άνδρα σε άνδρα, ανιχνεύτηκαν 12 (4,9%) άτομα με σημειακή μεταλλαγή στο γονίδιο *GJB1* της κοννεξίνης-32. Από τους εναπομείναντες CMT1 ασθενείς-δείκτες (αρνητικούς για CMT1A και CMTX) διερευνήθηκε σε 99 ασθενείς ο τύπος 1B. Ανιχνεύτηκε ένας ασθενής-δείκτης με σημειακή μεταλλαγή στο γονίδιο *MPZ* (0,6%). Από τους εναπομείναντες 98 ασθενείς-δείκτες (αρνητικούς για CMT1A, CMTX και CMT1B) διερευνήθηκαν οι τύποι CMT1C, CMT1D, CMT1E και CMT1F σε 86 ασθενείς. Ανιχνεύτηκαν δύο ασθενείς με μικρομεταλλαγές στο γονίδιο *PMP22* και ένας με σημειακή μεταλλαγή στο γονίδιο *EGR2*. Όλα τα παραπάνω συνοψίζονται στους πίνακες 3 και 4.

**Πίνακας 3.** Κατανομή των γενετικών μορφών της νόσου ανά κλινικό τύπο στους ασθενείς-δείκτες.

Κλινικός τύπος	Γενετικοί τύποι ασθενών-δεικτών										
	CMT1A (%)	CMTX (%)	CMT1B (%)	CMT1E (%)	CMT1D (%)	CMT1C (%)	CMT1F (%)	HNPP (%)	Όλοι οι τύποι (%)	MT (%)	Σύνολο
CMT1	63 (25,9)	12 (4,9)	1 (0,6)*	2 (1,2)†	1 (0,6)†	0	0	–	79 (32,5)	164 (67,5)	243
CMT2	2 (4,5)	2 (4,5)	–	–	–	–	–	–	4 (9,1)	40 (90,9)	44
HNPP	–	–	–	–	–	–	–	12 (30,0)	12 (30,0)	28 (70,0)	40
Σύνολο	65 (19,9)	14 (4,3)	1 (0,3)	2 (0,6)	1 (0,3)	0	0	12 (3,7)	95 (29,1)	232 (70,9)	327

CMT: Charcot-Marie-Tooth disease, MT: Μη ταυτοποιηθέντες. \*Μελετήθηκαν μόνο 99 ασθενείς-δείκτες με CMT1, που ήταν αρνητικοί για CMT1A και CMTX  
†Μελετήθηκαν μόνο 86 δείκτες από τους 98, που ήταν αρνητικοί για CMT1A, CMTX και CMT1B

**Πίνακας 4.** Χαρακτηριστικά των σημειακών μεταλλαγών που ανιχνεύτηκαν στα γονίδια *GJB1*, *MPZ*, *PMP22* και *EGR2*.

Κλινικός τύπος	Φαινότυπος	Γονίδιο/εξώνιο	Νουκλεοτιδική μεταλλαγή	Αμινοξική αλλαγή	Τοπολογία της μεταλλαγής	Βιβλιογραφικές αναφορές
CMT1	Κλασική CMT1	<i>GJB1/2</i>	c.556 G>A	Glu186Lys	EC2	Bergoffen et al <sup>30</sup>
CMT1	Κλασική CMT1 με διαταραχή ακοής	<i>GJB1/2</i>	c.113 T>C*	Val38Ala	TM1	Karadima et al <sup>33</sup>
CMT1	Κλασική CMT1	<i>GJB1/2</i>	c.208C>T*	Pro70Phe	EC1	Karadima et al <sup>34</sup>
CMT1	Κλασική CMT1	<i>GJB1/2</i>	c.462T>G*	Tyr154stop	EC2	Karadima et al <sup>34</sup>
CMT1	Κλασική CMT1	<i>GJB1/2</i>	c.109G>T*	Val37Leu	TM1	Karadima et al <sup>34</sup>
CMT2	Κλασική CMT2 με συμμετοχή ΚΝΣ	<i>GJB1/2</i>	c.524A>G*	Asn175Ser	EC2	Karadima et al <sup>34</sup>
CMT1	Κλασική CMT1 με συμμετοχή ΚΝΣ	<i>GJB1/2</i>	c.359T>A	Val120Glu	IC	Panas et al <sup>35</sup>
CMT1	Κλασική CMT1	<i>GJB1/2</i>	c.381C>G	Ile127Met	IC2	Nicolson et al <sup>36</sup>
CMT1	Κλασική CMT1	<i>GJB1/2</i>	c.472C>G	Pro158Ala	EC2	Cherryson et al <sup>37</sup>
CMT1	Κλασική CMT1 με συμμετοχή ΚΝΣ	<i>GJB1/2</i>	c.491 G>A	Arg164Gln	EC2	Bone et al <sup>38</sup>
CMT1	Βαριά CMT1	<i>MPZ/2</i>	c.89 T>C*	Ile30Thr	EC	Floroskufi et al <sup>39</sup>
CMT1	Βαριά CMT1	<i>PMP22/4</i>	c.296_301del CTGGAA*	99_100del ThrGly	TM	Koutsis et al <sup>40</sup>
CMT1	Κλασική CMT1	<i>PMP22/5</i>	c.328_348dup21*	110_116dup7	TM	Koutsis et al <sup>40</sup>
CMT1	Βαριά CMT1	<i>EGR2/2</i>	c.1142G>A	Arg381His	Zinc-finger	Pareyson et al <sup>41</sup>
CMT1	Κλασική CMT1	<i>GJB1/2</i>	c.42_43insT*	Asn14fs	N	Karadima et al <sup>42</sup>

ΚΝΣ: Κεντρικό νευρικό σύστημα, TM: Διαμεμβρανική περιοχή, EC: Εξωκυτταρική περιοχή, N: Αμινοξικό άκρο, IC: Ενδοκυτταρική περιοχή, CMT: Charcot-Marie-Tooth disease  
\* Νέες μεταλλαγές

### Κλινικός τύπος CMT2

Από τους 44 ασθενείς-δείκτες με ένδειξη CMT2, ο διπλασιασμός του γονιδίου *PMP22* (CMT1A) ανιχνεύτηκε σε 2 (4,5%) ασθενείς. Μεταξύ των υπολοίπων 42 δεικτών, μια μεταλλαγή του γονιδίου *GJB1* της κοννεξίνης-32 ανιχνεύτηκε σε δύο ασθενείς (4,5%). Στους εναπομείναντες ασθενείς-δείκτες, η διερεύνηση για μεταλλαγή στο γονίδιο *MPZ* (CMT1B) απέβη αρνητική. Τα παραπάνω συνοψίζονται στους πίνακες 3 και 4.

### Κλινικός τύπος HNPP

Από τους 40 ασθενείς-δείκτες με κλινική ένδειξη «νευροπάθεια με επιρρέπεια σε πιεστικές βλάβες», η χαρακτηριστική μεταλλαγή της HNPP (έλλειψη *PMP22*) εντοπίστηκε στους 12 (30,0%) (πίν. 3). Δεν πραγματοποιήθηκε έλεγχος για σημειακές μεταλλαγές στην *PMP22* στους υπόλοιπους ασθενείς.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### CMT1 (απομυελινωτική μορφή)

*Γενετικός τύπος CMT1A.* Η μοριακή γενετική μελέτη των πολυνευροπαθειών με κλινικό τύπο CMT1 έδειξε ότι το ποσοστό εμφάνισης του τύπου CMT1A στο δείγμα της μελέτης ανέρχεται σε 25,9%.<sup>42</sup> Το ποσοστό αυτό είναι από τα χαμηλότερα στη διεθνή βιβλιογραφία. Όπως παρουσιάζεται αναλυτικότερα στους πίνακες 5 και 6, σε συμφωνία βρίσκονται μόνο τα αντίστοιχα ευρήματα της Ιαπωνίας, της Κορέας και της Τουρκίας.

Η μειωμένη αυτή συχνότητα του τύπου CMT1A στο δείγμα της μελέτης έχει ισχυρή πιθανότητα να αντανakλά την πραγματική συχνότητα του τύπου CMT1A στον ελληνικό πληθυσμό, καθώς δεν υπήρχαν συγχυτικοί παράγοντες (ηλεκτροφυσιολογικά κριτήρια επιλογής των ασθενών, ποσοστό παρουσίας μη οικογενών μορφών, ευαισθησία της μεθόδου γονοτύπησης) σε αυτό, που να αλλοιώνουν τα αποτελέσματα (πίν. 6). Το γεγονός αυτό ίσως υπαινίσσεται ιδιαίτερο πληθυσμιακό χαρακτηριστικό, ενδεχομένως οφειλόμενο στη μερική γενετική απομόνωση που χαρακτηρίζει τον ελληνικό πληθυσμό,<sup>24</sup> όπως έχει παρατηρηθεί και σε άλλους πληθυσμούς με μερική γενετική απομόνωση.<sup>53</sup> Θα είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον να διερευνηθεί κατά πόσον αυτό αποτελεί χαρακτηριστικό των πληθυσμών της ανατολικής μεσογείου. Η μείωση της σχετικής συχνότητας της μορφής CMT1A θα μπορούσε επίσης να αποδοθεί σε αυξημένη συχνότητα των άλλων τύπων που ενδέχεται να προκαλέσουν επικρατητική ή φυλοσύνδετη CMT1 (CMTX, CMT1B,

CMT1C, CMT1D, CMT1E και CMT1F). Ωστόσο, η ενδελεχής έρευνα όλων των εν λόγω γονιδίων στους ασθενείς μας με CMT1 απέκλεισε τη συγκεκριμένη περίπτωση.<sup>32,42</sup> Κάποια άλλη εξήγηση θα μπορούσε να είναι μια μεγαλύτερη συχνότητα υποχωρητικών τύπων CMT1 στον ελληνικό πληθυσμό. Ωστόσο, στους περισσότερους πληθυσμούς οι υπολειπόμενες μορφές είναι σπάνιες.<sup>2,5</sup> Τέλος, δεν μπορεί να αποκλειστεί και η παρουσία άγνωστων γονιδίων με υψηλή συχνότητα στον ελληνικό πληθυσμό, λόγω της μερικής γενετικής απομόνωσης.<sup>24</sup>

*Γενετικός τύπος CMTX.* Το ποσοστό της φυλοσύνδετης μορφής CMTX (4,9%) στο δείγμα της μελέτης συμφωνεί με τα αποτελέσματα που έχουν προκύψει από άλλες διεθνείς μελέτες, όπου τα ποσοστά κυμαίνονται από 5–10% (πίν. 5). Στην παρούσα μελέτη εντοπίστηκαν συνολικά 11 μεταλλαγές, από τις οποίες 6 είναι νέες μεταλλαγές (πίν. 4).

Μείζον ενδιαφέρον παρουσιάζει η προσβολή του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) στον ασθενή που έφερε τη μεταλλαγή c.524A>G, Asn175Ser. Η κοννεξίνη-32 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που ανευρίσκεται τόσο στη μυελίνη των κυττάρων του Schwann όσο και στα γλοιακά κύτταρα του ΚΝΣ, λόγω κοινής εμβρυϊκής προέλευσής τους. Το γεγονός αυτό ερμηνεύει την παράδοση συνύπαρξη, σε κάποιους από τους ασθενείς, συμπτωμάτων που απορρέουν από βλάβη τόσο του περιφερικού όσο και του ΚΝΣ.<sup>34</sup>

*Γενετικός τύπος CMT1B.* Στο δείγμα των 99 ασθενών-δεικτών που διερευνήθηκαν για CMT1B εντοπίστηκε μια νέα μεταλλαγή (c.89T>C, Ile30Thr). Αν και το ποσοστό του τύπου CMT1B (0,6%) είναι από τα χαμηλότερα που έχουν

**Πίνακας 5.** Συχνότητα εμφάνισης των τύπων CMT1A, CMTX και CMT1B σε ασθενείς με CMT1 στον ελληνικό πληθυσμό συγκριτικά με άλλους πληθυσμούς.

Εθνικότητα	CMT1A (%)	Τιμή p*	CMTX (%)	Τιμή p*	CMT1B (%)	Βιβλιογραφία
Βραζιλία	79,0 (42/56)	<0,001	–	–	–	Marques et al <sup>43</sup>
Ευρώπη	70,7 (579/819)	<0,001	–	–	–	Nelis et al <sup>6</sup>
Μ. Βρετανία	70,0 (168/240)	<0,001	–	–	3,8	Murphy et al <sup>5</sup>
Αμερική	68,2 (43/63)	<0,001	–	–	–	Wise et al <sup>26</sup>
Αυστραλία	61,0 (136/224)	<0,001	12 (27/224)	0,009	3,1	Nicholson et al <sup>44</sup>
Ταϊβάν	57,9 (33/57)	<0,001	–	–	8,7	Lee et al <sup>45</sup>
Ιταλία	57,6 (98/170)	<0,001	7,06	0,397	2,3	Mostacciolo et al <sup>46</sup>
Ρωσία	53,7 (58/108)	<0,001	7,4 (8/108)	0,454	4,6	Mersyanova et al <sup>47</sup>
Κορέα	46,8 (15/32)	0,205	6,3 (2/32)	0,671	3,1	Choi et al <sup>48</sup>
Ιαπωνία	31,2 (40/128)	0,275	10,9 (14/128)	0,052	6,2	Ikegami et al <sup>49</sup>
Ελλάδα	25,9 (63/243)	–	4,9 (12/243)	–	0,6	Karadima et al <sup>42</sup>
Τουρκία	15,6 (10/64)	0,099	4,6 (3/64)	1,000	–	Bissar-Tandamouri et al <sup>50</sup>
Νορβηγία	13,6 (11/81)	0,022	6,2 (5/81)	0,774	1,2	Braathen et al <sup>51</sup>

CMT: Charcot-Marie-Tooth disease. \*Δοκιμασία χ<sup>2</sup>

αναφερθεί σε μελέτη (πίν. 5), ο μονοψήφιος αριθμός παρατηρήσεων περιορίζει την αξιόπιστη στατιστική επεξεργασία του αποτελέσματος.

Οι ασθενείς που έφεραν την εν λόγω μεταλλαγή παρουσίαζαν βαριά, πρώιμης έναρξης απομυελινωτική πολυνευροπάθεια συμβατή με φαινότυπο Dejerine-Sottas ή αλλιώς πολύ βαριά CMT1.<sup>39</sup>

**Γενετικός τύπος CMT1D.** Στο δείγμα 86 ασθενών-δεικτών που διερευνήθηκαν για CMT1D εντοπίστηκε μία παθολογική μεταλλαγή στο γονίδιο *EGR2* σε ασθενή με βαριά, πρώιμης έναρξης μορφή CMT1 (c.1142G>A, p Arg381His). Η μεταλλαγή αυτή έχει αναφερθεί σε ασθενείς με βαριά CMT1 και σε ορισμένες περιπτώσεις έχει συνδεθεί με κρανιακές νευροπάθειες.<sup>41</sup> Το ποσοστό μεταλλαγών στο γονίδιο *EGR2* που ανευρέθηκε στον ελληνικό πληθυσμό (~1%) είναι συμβατό με τη σπανιότητα των μεταλλαγών που παρατηρείται σε άλλους πληθυσμούς.<sup>2</sup>

**Γενετικός τύπος CMT1E.** Στο δείγμα 86 ασθενών-δεικτών που διερευνήθηκαν για CMT1E εντοπίστηκαν δύο νέες μικρομεταλλαγές στο γονίδιο *PMP22* (c.296\_301delCTGGAA, p.99\_100delThrGly και c.328\_348dup21, p.110\_116dup7).<sup>40</sup> Οι ασθενείς που τις έφεραν εμφάνιζαν πρώιμης έναρξης νόσο, ο πρώτος βαριάς μορφής CMT1, ενώ ο δεύτερος κλασική CMT1.

**Γενετικοί τύποι CMT1C και CMT1F.** Στο δείγμα 86 ασθενών-δεικτών που διερευνήθηκαν για CMT1C και CMT1F δεν ανευρέθηκε κάποια μεταλλαγή στα γονίδια *LITAF* και *NEFL*. Το γεγονός αυτό δεν εκπλήσσει, δεδομένης της σπανιότητας μεταλλαγών στα εν λόγω γονίδια στους περισσότερους πληθυσμούς.<sup>2,4,5</sup>

**CMT2 (αξονική μορφή).** Κλασικός γενετικός τύπος (γονίδιο *MFN2*). Σε πολλούς πληθυσμούς, ποσοστό 20% των ασθενών με CMT2 φέρουν παθολογικές μεταλλαγές στο γονίδιο *MFN2* (1p36).<sup>2,4</sup> Το μεγάλο μέγεθος του γονιδίου (19 εξώνια) και η διάσπαρτη εντόπιση παθολογικών μεταλλαγών σε όλα τα εξώνια καθιστούν ιδιαίτερα χρονοβόρα και υψηλού κόστους τη συστηματική διερεύνησή του στη CMT2. Κατ' επέκταση, οι γενετικές πληροφορίες που προσφέρει η παρούσα μελέτη για την αξονική μορφή της νόσου είναι περιορισμένες.

**Γενετικός τύπος CMT1A.** Ο διπλασιασμός του γονιδίου *PMP22* ανευρίσκεται αποκλειστικά σε ασθενείς με CMT1.<sup>2,4,5</sup> Ως εκ τούτου, δεν αναμένεται η ανεύρεσή του στις αξονικές μορφές. Παρ' όλα αυτά, η μοριακή γενετική ανάλυση στους ασθενείς της παρούσας μελέτης με ένδειξη CMT2 ανέδειξε την παρουσία διπλασιασμού του γονιδίου *PMP22* σε δύο περιπτώσεις (ποσοστό 4,5%) (πίν. 5). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι τα ηλεκτροφυσιολογικά ευρήματα δεν αποτελούν απολύτως ασφαλές κριτήριο διάκρισης της απομυελινωτικής από την αξονική μορφή της νόσου και θα ήταν πιθανόν σωστό όλοι οι ασθενείς με CMT, ανεξαρτήτως απομυελινωτικού ή αξονικού τύπου, να ελέγχονται για διπλασιασμό του γονιδίου *PMP22*. Το εργαστήριό μας στο «Αιγινήτειο» ακολουθεί μέχρι σήμερα αυτό το πρωτόκολλο.

**Γενετικός τύπος CMTX.** Όπως είναι γνωστό, μεταλλαγές της κοννεξίνης-32 μπορούν σπάνια να οδηγήσουν σε πολυνευροπάθεια αξονικής μορφής, ιδίως σε γυναίκες.<sup>2,4,5</sup> Κατ' επέκταση, ήταν αναμενόμενο να αναδειχθούν στην ομάδα ασθενών με CMT2 ορισμένες μεταλλαγές στο γονίδιο *GJB1*. Πραγματικά, εντοπίστηκε μία μεταλλαγή (πίνακες 3, 4). Η

**Πίνακας 6.** Συγκριτική ανάλυση διεθνών πληθυσμιακών μελετών για τη συχνότητα της CMT1A σε ασθενείς με CMT1.

Εθνικότητα	Δείγμα (CMT1)	CMT1A (%)	MCV (m/sec)	Μη οικογενείς περιπτώσεις (%)	Βιβλιογραφία
Βραζιλία	53	79,0	<42	20,0	Marques et al <sup>43</sup>
Ευρώπη	819	70,7	<30	23,3	Nelis et al <sup>6</sup>
Μ. Βρετανία	240	70,0	<38	–	Murphy et al <sup>5</sup>
Αμερική	63	68,3	<40	3,17	Wise et al <sup>26</sup>
Αυστραλία	224	61,0	<50	–	Nicholson et al <sup>44</sup>
Ταϊβάν	57	57,9	<38	–	Lee et al <sup>45</sup>
Ιταλία	170	57,6	<38	20,3	Mostacciolo et al <sup>46</sup>
Ρωσία	108	53,7	<38	23,3	Mersiyanova et al <sup>47</sup>
Κορέα	32	46,9	–	0	Choi et al <sup>48</sup>
Ιαπωνία	128	31,3	<38	52,0	Ikegami et al <sup>49</sup>
Ελλάδα	243	25,9	<40	30,0	Karadima et al <sup>42</sup>
Τουρκία	64	15,6	<38	62,0	Bissar-Tadmouri et al <sup>50</sup>
Νορβηγία	81	13,6	<38	–	Braathen et al <sup>51</sup>

CMT: Charcot-Marie-Tooth disease

συγκεκριμένη μεταλλαγή ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά από την παρούσα ερευνητική ομάδα. Οι ασθενείς που έφεραν τη μεταλλαγή παρουσίαζαν εκτός από την πολυνευροπάθεια και προσβολή του ΚΝΣ.<sup>32</sup>

### HNPP (κληρονομική πολυνευροπάθεια με επιρρέπεια στις πιεστικές βλάβες)

Η συχνότητα ανίχνευσης από την παρούσα μελέτη της χαρακτηριστικής μεταλλαγής HNPP (έλλειψη *PMP22*) στους ασθενείς με φαινότυπο HNPP ήταν 30% (πίν. 7). Φαίνεται ότι στατιστικά υπάρχει σημαντική διαφορά από την ευρωπαϊκή (84%) και τη βρετανική μελέτη (59%), ενώ παρατηρείται συμφωνία με την τουρκική (35%). Είναι αξιοσημείωτο ότι με την τουρκική μελέτη υπάρχει συμφωνία και ως προς την κατανομή του τύπου CMT1A στη CMT1. Ενδεχομένως, θα είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον να διερευνηθεί κατά πόσον το εύρημα αυτό αποτελεί χαρακτηριστικό γειτονικών λαών με πιθανόν κάποιες κοινές γενετικές συνιστώσες.<sup>53-55</sup>

Εκτός από την κλασική μεταλλαγή της HNPP, είναι γνωστό ότι σε ποσοστό που μπορεί να φθάνει και το 10% των ασθενών ο φαινότυπος HNPP ενδεχομένως να οφείλεται και σε σημειακές μεταλλαγές στο γονίδιο *PMP22*.<sup>5</sup> Στον πληθυσμό της παρούσας μελέτης, δυστυχώς, δεν κατέστη δυνατό να πραγματοποιηθεί συστηματικός έλεγχος για σημειακές μεταλλαγές στο γονίδιο *PMP22* σε ασθενείς με HNPP.

**Πίνακας 7.** Σύγκριση συχνότητας εμφάνισης του τύπου HNPP στο δείγμα της μελέτης προς άλλες διεθνείς μελέτες.

Εθνικότητα	Δείγμα	Τύπος HNPP		Βιβλιογραφία
		(%)	Τιμή p*	
Ευρώπη	131/156	84,0	<0,0001	Nelis et al <sup>6</sup>
Μ. Βρετανία	27/46	58,7	0,008	Murphy et al <sup>5</sup>
Τουρκία	14/39	35,9	0,6367	Bissar-Tadmouri et al <sup>50</sup>
Ελλάδα	12/40	30,0	–	Παρούσα μελέτη

HNPP: Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. \*Δοκιμασία  $\chi^2$

Το χαμηλό ποσοστό των ασθενών με την κλασική μεταλλαγή HNPP ενδέχεται εν μέρει να οφείλεται στην πολυπλοκότητα των κλινικών-ηλεκτροφυσιολογικών διαγνωστικών κριτηρίων της νόσου, που μπορεί να οδηγήσουν σε υπέρβαση του αιτήματος για μοριακό έλεγχο.<sup>27</sup> Συνεπώς, το εύρημα της παρούσας μελέτης ενδέχεται να υποτιμά την πραγματική συχνότητα της έλλειψης του γονιδίου της *PMP22* στον ελληνικό πληθυσμό με HNPP.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αναδεικνύουν ότι, στον ελληνικό πληθυσμό, ο συχνότερος γενετικός τύπος κληρονομικών πολυνευροπαθειών είναι ο CMT1A, ακολουθούμενος από τον CMTX, ενώ σπάνια ανευρίσκονται οι τύποι CMT1E, CMT1B και CMT1D. Η συχνότητα του τύπου CMT1A, ωστόσο, φαίνεται να είναι χαμηλότερη απ' ό,τι στους περισσότερους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς. Το εύρημα αυτό πιθανόν υποδηλώνει ιδιαίτερο πληθυσμιακό χαρακτηριστικό οφειλόμενο στη μερική γενετική απομόνωση που χαρακτηρίζει τον ελληνικό πληθυσμό. Η χαμηλή συχνότητα CMT1A δεν φαίνεται να οφείλεται σε δυσανάλογα υψηλό ποσοστό άλλων γονιδίων που σπανιότερα προκαλούν επικρατητικές μορφές CMT1. Ενδέχεται λοιπόν στον ελληνικό πληθυσμό είτε να συνεισφέρουν άλλα γνωστά γονίδια που μπορεί να προκαλέσουν υπολειπόμενη CMT1 είτε να υπάρχουν γονίδια, η συνεισφορά των οποίων στην εκδήλωση της νόσου CMT δεν έχει αποκαλυφθεί ακόμη.

Η παράθεση των γενετικών επιδημιολογικών στοιχείων που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη αναμένεται να χρησιμεύσει αφ' ενός στην πληρέστερη ανάδειξη του προβλήματος των κληρονομικών πολυνευροπαθειών στην Ελλάδα, ώστε να υπάρχουν δεδομένα για έναν καλύτερο κεντρικό σχεδιασμό με στόχο τη διάγνωση, την πρόληψη, την αντιμετώπιση και την αποκατάσταση αυτών των ασθενών, και αφ' ετέρου στην παροχή πληρέστερης συμπτωματικής, προσυμπτωματικής και προγεννητικής διάγνωσης των κληρονομικών κινητικών και αισθητικών νευροπαθειών στον ελληνικό πληθυσμό, καθώς και στην καλύτερη κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών που τις διέπουν.



## ABSTRACT

**A study of hereditary motor and sensory neuropathies (Charcot-Marie-Tooth disease) in the Greek population**

G. KARADIMA,<sup>1</sup> G. KOUTSIS,<sup>1,2</sup> P. FLOROSKUFU,<sup>1</sup> H. HOULDEN,<sup>2</sup> M. PANAS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Neurogenetics Unit, First University Department of Neurology, "Eginition" Hospital, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, <sup>2</sup>Department of Molecular Neuroscience, UCL Institute of Neurology, London, UK

*Archives of Hellenic Medicine 2013, 30(2):186–196*

**OBJECTIVE** Molecular analysis of hereditary motor and sensory neuropathy, Charcot-Marie-Tooth disease (CMT) in the Greek population. **METHOD** In total, 327 Greek index patients investigated for possible hereditary motor and sensory neuropathy at the Neurogenetics Unit of "Eginition" Hospital over a period of 15 years were included in the study, of which 243 had CMT1, 44 CMT2, and 40 hereditary neuropathy with liability to pressure palsies (HNPP). Mutational analysis was carried out using polymerase chain reaction (PCR) and Sanger sequencing, for the detection of the *PMP22* duplication (CMT1A) or deletion (HNPP), and point mutations in *GJB1* coding for connexin-32 (CMTX) and *MPZ* coding for myelin protein zero (CMT1B). In patients with CMT1, sequencing for the detection of point mutations was also carried out in *PMP22* (CMT1E), *EGR2* (CMT1D), *LITAF* (CMT1C) and *NEFL* (CMT1F). **RESULTS** In patients with CMT1 the mutation frequencies of CMT1A, CMTX, CMT1B, CMT1C, CMT1D, CMT1E and CMT1F were 25.9%, 4.9%, 0.6%, 0%, 0.6%, 1.2% and 0%, respectively. Specifically, in patients with CMT1 10 different *GJB1* pathogenic mutations were detected, 5 of them novel (c.110T>C, c.208C>T, c.462T>G, c.109G>T, c.42-43insT), one novel *MPZ* mutation (c.89T>C), two novel *PMP22* micromutations (c.296\_301del CTGGAA, c.328\_348dup21) and one known *EGR2* mutation. In patients with CMT2, two cases were detected with the *PMP22* duplication and two with a novel mutation in *GJB1* (c.524A>G). The *PMP22* deletion was present in 30% of the patients with HNPP. **CONCLUSIONS** In the Greek population, among the genetic subtypes of CMT investigated, CMT1A is the most common, followed by CMTX. CMT1E, CMT1B and CMT1D appear to be rare. The CMT1A duplication frequency is significantly lower in Greek patients with CMT than most other European populations. This may imply a special genetic characteristic of the Greek population, possibly resulting from partial genetic isolation. The frequencies of CMTX, CMT1E and CMT1D in Greek patients with CMT1 are similar to those reported in other ethnic populations. The overall frequency of MPZ mutation in Greek patients with CMT1 is one of the lowest observed to date. The *PMP22* deletion frequency appears to be lower in Greek patients with HNPP than in other European populations. The absence of CMT1C and 1F in Greek patients with CMT1 is not a surprise given the rarity of these mutations in other populations.

**Key words:** Charcot-Marie-Tooth, CMT, Greece, Hereditary motor sensory neuropathy, HMSN, Population study

### Βιβλιογραφία

1. DYCK PJ. Inherited neuronal degeneration and atrophy affecting peripheral motor, sensory and autonomic neurons. In: Dyck PJ, Thomas PK, Lambert EH, Bunge R (eds) *Peripheral neuropathy*. 2nd ed. Saunders WB, Philadelphia, 1984:1600–1642
2. REILLY MM, MURPHY SM, LAURA M. Charcot-Marie-Tooth disease. *J Periph Nervous Syst* 2011, 16:1–14
3. IONASESCU VV. Charcot-Marie-Tooth neuropathies: From clinical description to molecular genetics. *Muscle Nerve* 1995, 18:267–275
4. SAPORTA AS, SOTTILE SL, MILLER LJ, FEELY SM, SISKIND CE, SHY ME. Charcot-Marie-Tooth disease subtypes and genetic testing strategies. *Ann Neurol* 2011, 69:22–33
5. MURPHY SM, LAURA M, FAWCETT K, PANDRAUD A, LIU YT, DAVIDSON GL ET AL. Charcot-Marie-Tooth disease: Frequency of genetic subtypes and guidelines for genetic testing. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012, 83:706–710
6. NELIS E, VAN BROECKHOVEN C, DE JONGHE P, LÖFGREN A, VANDENBERGHE A, LATOUR P 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. *Eur J Hum Genet* 1996, 4:25–33
7. BOERKOEL CF, TAKASHIMA H, GARCIA CA, OLNEY RK, JOHNSON J, BERRY K ET AL. Charcot-Marie-Tooth disease and related neuropathies: Mutation distribution and genotype-phenotype correlation. *Ann Neurol* 2002, 51:190–201
8. RAEYMAEKERS P, DE JONGHE P, SWERTS L, DE WINTER G, GHEUENS J, MARTIN JJ ET AL. Exclusion analysis of Charcot-Marie-Tooth neuropathy (CMT1) with chromosome 1p markers. *Cytogen-*

- et Cell Genet* 1989, 50:178–180
9. VANCE JM, NICHOLSON GA, YAMAOKA LH, STAJICH J, STEWART CS, SPEER MC ET AL. Linkage of Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a to chromosome 17. *Exp Neurol* 1989, 104:186–189
  10. VALENTIJN LJ, BAAS F, WOLTERMAN RA, HOOGENDIJK JE, VAN DEN BOSCH NH, ZORN I ET AL. Identical point mutations of PMP-22 in Trembler-J mouse and Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet* 1992, 2:288–291
  11. THOMAS PK, MARQUES W Jr, DAVIS MB, SWEENEY MG, KING RH, BRADLEY JL ET AL. The phenotypic manifestations of chromosome 17p11.2 duplication. *Brain* 1997, 120:465–478
  12. RESSOT C, BRUZZONE R. Connexin channels in Schwann cells and the development of the X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain Res Brain Res Rev* 2000, 32:192–202
  13. BONE LJ, DESCHÉNES SM, BALICE-GORDON RJ, FISCHBECK KH, SCHERER SS. Connexin 32 and X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurobiol Dis* 1997, 4:221–230
  14. BERGOFFEN J, SCHERER SS, WANG S, SCOTT MO, BONE LJ, PAUL DL ET AL. Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* 1993, 262:2039–2042
  15. PANAS M, KARADIMAS C, AVRAMOPOULOS D, VASSILOPOULOS D. Central nervous system involvement in four patients with Charcot-Marie-Tooth disease with connexin 32 extracellular mutations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998, 65:947–948
  16. KAWAKAMI H, INOUE K, SAKAKIHARA I, NAKAMURA S. Novel mutation in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease associated with CNS impairment. *Neurology* 2002, 59:923–926
  17. SCHELHAAS HJ, VAN ENGELEN BG, GABREËLS-FESTEN AA, HAGEMAN G, Vlieggen JH, VAN DER KNAAP MS ET AL. Transient cerebral white matter lesions in a patient with connexin 32 missense mutation. *Neurology* 2002, 59:2007–2008
  18. HANEMANN CO, BERGMANN C, SENDEREK J, ZERRES K, SPERFELD AD. Transient, recurrent, white matter lesions in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease with novel connexin 32 mutation. *Arch Neurol* 2003, 60:605–609
  19. TAYLOR RA, SIMON EM, MARKS HG, SCHERER SS. The CNS phenotype of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease: More than a peripheral problem. *Neurology* 2003, 61:1475–1478
  20. PAULSON HL, GARBERN JY, HOBAN TF, KRAJEWSKI KM, LEWIS RA, FISCHBECK KH ET AL. Transient central nervous system white matter abnormality in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Ann Neurol* 2002, 52:429–434
  21. HAYASAKA K, HIMORO M, WANG Y, TAKATA M, MINOSHIMA S, SHIMIZU N ET AL. Structure and chromosomal localization of the gene encoding the human myelin protein zero (MPZ). *Genomics* 1993, 17:755–758
  22. BARISIC N, CLAEYS KG, SIROTKOVIĆ-SKERLEV M, LÖFGREN A, NELIS E, DE JONGHE P ET AL. Charcot-Marie-Tooth disease: A clinico-genetic confrontation. *Ann Hum Genet* 2008, 72:416–441
  23. LI J, KRAJEWSKI K, SHY ME, LEWIS RA. Hereditary neuropathy with liability to pressure palsy: The electrophysiology fits the name. *Neurology* 2002, 58:1769–1773
  24. VASSILOPOULOS D, SCARPALEZOS S. Caractères génétiques de la population Hellenique. *Archives de l'Union Medicale Balcanique* 1980, 18:295–296
  25. DE VISSER M. Diagnostic criteria for autosomal dominant hereditary motor and sensory neuropathy type Ia. *Neuromuscul Disord* 1993, 3:77–79
  26. WISE CA, GARCIA CA, DAVIS SN, HEJU Z, PENTAO L, PATEL PI ET AL. Molecular analysis of unrelated Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease patients suggest a high frequency of the CMT1A duplication. *Am J Hum Genet* 1993, 93:853–863
  27. DUBOURG O, MOUTON P, BRICE A, LeGUERN E, BOUCHE P. Guidelines for diagnosis of hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Neuromuscul Disord* 2000, 10:206–208
  28. MILLER SA, DYKES DD, POLESKY HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988, 16:1215
  29. STRONACH EA, CLARK C, BELL C, LÖFGREN A, MCKAY NG, TIMMERMAN V ET AL. Novel PCR-based diagnostic tools for Charcot-Marie-Tooth type 1A and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *J Peripher Nerv Syst* 1999, 4:117–122
  30. BERGOFFEN J, SCHERER SS, WANG S, SCOTT MO, BONE LJ, PAUL DL ET AL. Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* 1993, 262:2039–2042
  31. NELIS E, TIMMERMAN V, DE JONGHE P, VANDENBERGHE A, PHAM-DINH D, DAUTIGNY A ET AL. Rapid screening of myelin genes in CMT1 patients by SSCP analysis: Identification of new mutations and polymorphisms in the P0 gene. *Hum Genet* 1994, 94:653–657
  32. KOUTSIS G, PANDRAUD A, KARADIMA G, PANAS M, REILLY M, FLOROSKUFI P ET AL. Mutational analysis of PMP22, EGR2, LITAF and NEFL in Greek Charcot-Marie-Tooth type 1 patients. *Clin Genet* 2012 (in press)
  33. KARADIMA G, PANAS M, FLOROSKUFI P, KALFAKIS N, VASSILOPOULOS D. A V38A mutation in X-linked Charcot-Marie-Tooth neuropathy with unusual clinical features. *J Neurol* 2004, 251:222–223
  34. 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
  35. PANAS M, KARADIMAS C, AVRAMOPOULOS D, VASSILOPOULOS D. Central nervous system involvement in four patients with Charcot-Marie-Tooth disease with connexin 32 extracellular mutations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998, 6:947–948
  36. NICHOLSON GA, YEUNG L, CORBETT A. Efficient neurophysiologic selection of X-linked Charcot-Marie-Tooth families: Ten novel mutations. *Neurology* 1998, 51:1412–1416
  37. CHERRYSON AK, YEUNG L, KENNERSON ML, NICHOLSON GA. Mutational studies in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Montreal. *Am J Hum Genet* 1994, 55(Suppl):A216
  38. BORT S, NELIS E, TIMMERMAN V, SEVILLA T, CRUZ-MARTÍNEZ A, MARTÍNEZ F 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
  39. FLOROSKUFI P, PANAS M, KARADIMA G, VASSILOPOULOS D. New mutation of the MPZ gene in a family with the Dejerine-Sottas disease phenotype. *Muscle Nerve* 2007, 35:667–669
  40. KOUTSIS G, PANDRAUD A, POLKE JM, WOOD NW, PANAS M, KARADIMA G ET AL. Novel peripheral myelin protein 22 (PMP22) micro-

- mutations associated with variable phenotypes in Greek patients with Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain* 2012, 135:e217, 1–6
41. PAREYSON D, TARONI F, BOTTI S, MORBIN M, BARATTA S, LAURIA G ET AL. Cranial nerve involvement in CMT disease type 1 due to early growth response 2 gene mutation. *Neurology* 2000, 54:1696–1698
  42. KARADIMA G, FLOROSKUFU P, KOUTSIS G, VASSILOPOULOS D, PANAS M. Mutational analysis of *PMP22*, *GJB1* and *MPZ* in Greek Charcot-Marie-Tooth type 1 neuropathy patients. *Clin Genet* 2011, 80:497–499
  43. MARQUES W Jr, FREITAS MR, NASCIMENTO OJ, OLIVEIRA AB, CALIAL, MELO A ET AL. 17p duplicated Charcot-Marie-Tooth 1A: Characteristics of a new population. *J Neurol* 2005, 252:972–979
  44. NICHOLSON GA. Mutation testing in Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Ann N Y Acad Sci* 1999, 883:383–388
  45. LEEYC, SOONG BW, LIN KP, LEE HY, WU ZA, KAO KP. Myelin protein zero gene mutations in Taiwanese patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 1. *J Neurol Sci* 2004, 219:95–100
  46. MOSTACCIUOLO ML, RIGHETTI E, ZORTEA M, BOSELLO V, SCHIAVON F, VALLO L ET AL. Charcot-Marie-Tooth disease type I and related demyelinating neuropathies: Mutation analysis in a large cohort of Italian families. *Hum Mutat* 2001, 18:32–41
  47. MERSIYANOVA IV, ISMAILOV SM, POLYAKOV AV, DADALI EL, FEDOTOV VP, NELIS E ET AL. Screening for mutations in the peripheral myelin genes *PMP22*, *MPZ* and *Cx32* (*GJB1*) in Russian Charcot-Marie-Tooth neuropathy patients. *Hum Mutat* 2000, 15:340–347
  48. CHOI BO, LEE MS, SHIN SH, HWANG JH, CHOI KG, KIM WK ET AL. Mutational analysis of *PMP22*, *MPZ*, *GJB1*, *EGR2* and *NEFL* in Korean Charcot-Marie-Tooth neuropathy patients. *Hum Mutat* 2004, 24:185–186; erratum in: *Hum Mutat* 2004, 24:350
  49. IKEGAMI T, LIN C, KATO M, ITOH A, NONAKA I, KURIMURA M ET AL. Four novel mutations of the connexin 32 gene in four Japanese families with Charcot-Marie-Tooth disease type 1. *Am J Med Genet* 1998, 80:352–355
  50. BISSAR-TADMOURI N, PARMAN Y, BOUTRAND L, DEYMEER F, SERDAROGLU P, VANDENBERGHE A ET AL. Mutational analysis and genotype/phenotype correlation in Turkish Charcot-Marie-Tooth type 1 and HNPP patients. *Clin Genet* 2000, 58:396–402
  51. BRAATHEN GJ, SAND JC, LOBATO A, HØYER H, RUSSELL MB. Genetic epidemiology of Charcot-Marie-Tooth in the general population. *Eur J Neurol* 2011, 18:39–48
  52. HOLMBERG BH, HOLMGREN G, NELIS E, VAN BROECKHOVEN C, WESTERBERG B. Charcot-Marie-Tooth disease in northern Sweden: Pedigree analysis and the presence of the duplication in chromosome 17p11.2. *J Med Genet* 1994, 31:435–441
  53. HAN LL, KELLER MP, NAVIDI W, CHANCE PF, ARNHEIM N. Unequal exchange at the Charcot-Marie-Tooth disease type 1A recombination hot-spot is not elevated above the genome average rate. *Hum Mol Genet* 2000, 9:1881–1889
  54. LUPSKI JR, DE OCA-LUNA RM, SLAUGENHAUPT S, PENTAO L, GUZZETTAV, TRASK BJ ET AL. DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell* 1991, 66:219–232
  55. ROA BB, GARCIA CA, LUPSKI JR. Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: Molecular mechanisms of gene dosage and point mutation underlying a common inherited peripheral neuropathy. *Int J Neurol* 1991–1992, 25–26:97–107
- Corresponding author:*
- G. Karadima, “Eginition” Hospital, 72 Vassilisis Sofias Ave., GR-115 28 Athens, Greece  
 e-mail: gkaradim@eginitio.uoa.gr