

# Клинико-генетические особенности моторно-сенсорной невропатии IIА типа

Е.Л. Дадали<sup>1</sup>, О.А. Шагина<sup>1</sup>, В.П. Федотов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Медико-генетический научный центр РАМН, Москва;

<sup>2</sup>Воронежский областной клинический диагностический центр и межобластная медико-генетическая консультация, Воронеж

В работе проанализированы клинические проявления наследственной моторно-сенсорной невропатии типа IIА (НМСН IIА, или болезнь Шарко–Мари–Тута 2А) у 22 больных, причиной заболевания которых стали различные мутации гена *MFN2*. Молекулярно-генетический анализ показал, что в обследованной выборке российских семей с аксональной формой наследственной моторно-сенсорной невропатии случаи НМСН IIА составили 17%. Восемнадцать из 22 наблюдавшихся больных с НМСН IIА были членами трех больших семей с сегрегацией заболевания в двух и более поколениях, что позволило определить размах клинического полиморфизма НМСН IIА, а также оценить внутри- и межсемейную вариабельность клинических признаков и проследить динамику формирования клинического фенотипа по мере прогрессирования заболевания.

**Ключевые слова:** наследственная моторно-сенсорная невропатия, аксональный тип, митофузин 2, клинико-генетическая характеристика.

**Н**аследственные моторно-сенсорные невропатии (НМСН) – большая группа генетически гетерогенных заболеваний, характеризующихся прогрессирующим поражением различных структур периферических нервов [3, 6, 10]. К настоящему времени идентифицировано более 25 генетических вариантов НМСН, которые еще до недавнего времени описывались как единая нозологическая форма – болезнь Шарко–Мари–Тута [28].

Принято выделять два основных типа НМСН. Первый представлен миелинопатиями, характеризующимися изменением структуры миелиновой оболочки периферических нервов, а ко второму типу относят аксонопатии, обусловленные нарушением функционирования различных структур осевых цилиндров аксонов (нейрофиламентов, микротрубочек и др.) [9, 19]. Дифференциация этих двух типов НМСН осуществляется при проведении элетро-нейромиографического обследования больного на основании показателей скоростей проведения импульса (СПИ) по срединному нерву. В качестве порогового значения для дифференциации I и II типа НМСН принята величина 38 м/с [1, 4, 5]. Установлено, что при миелинопатиях этот показатель существенно снижен, в то время как при аксонопатиях соответствует нормальным значениям или незначительно снижается.

Клинические симптомы всех генетических вариантов НМСН имеют существенное сходство, и их диагностика осуществляется на основании проведения ДНК-анализа, направленного на идентификацию мутаций в различных генах [7, 8]. Существенное значение при формировании алгоритма молекулярно-генетической диагностики НМСН I и II типов имеют различия в частотах встречаемости отдельных генетических вариантов этих групп заболеваний. Установлено, что наиболее частым генетическим вариантом НМСН I типа является НМСН IA, обусловленная дупликацией участка короткого плеча хромосомы 17 в области локализации гена *PMP22*. На долю этого варианта

приходится около 70% всех случаев НМСН, что предполагает проведение первоочередного исследования указанной мутации при наличии клинических признаков полиневропатии и снижения СПИ по периферическим нервам [17, 19, 28].

Что касается НМСН II типа, то в литературе имеются лишь единичные работы, посвященные изучению частот встречаемости отдельных генетических вариантов невралных аксонопатий. К настоящему времени известно 11 генов, мутации которых ответственны за развитие данного фенотипа [28, 29]. Продуктами этих генов являются белки, участвующие либо в построении нейронального цитоскелета и аксональном транспорте, либо принадлежащие к семейству динаминов, обеспечивающих процессы слияния и разделения клеточных мембран. Исследованиями ряда авторов показано, что одним из наиболее распространенных вариантов этой группы является НМСН типа IIА2 (которую в дальнейшем мы будем называть НМСН IIА); ее причиной являются мутации в гене митофузина 2 (*MFN2*) [15, 16, 18, 22, 26, 27]. Ген *MFN2* локализован на коротком плече первой хромосомы в области 1р36.22, содержит 19 экзонов, 17 из которых являются кодирующими; его длина составляет 33 156 пар нуклеотидов. Продуктом гена является белок митофузин 2 типа, локализованный на наружной мембране митохондрий, основной функцией которого является образование и поддержание функционирования митохондриальных сетей (так называемого хондриома) в аксонах периферических нервов [23]. Митофузин 2 состоит из нескольких доменов, которым отводится различная роль в обеспечении его функционирования. Показано, что третий и четвертый экзоны гена кодируют N-концевую часть белковой молекулы, экзоны с 5-го по 9-й – ГТФ-азный домен, обеспечивающий связывание и гидролиз молекулы АТФ, 10-й и 11-й экзоны – срединный домен, 13–17-й – трансмембранный домен, а 12-й и 18-й экзоны кодируют два кольцевых (CC1 и CC2) домена, необходимых для обеспечения правильной пространственной ориентации остальных доменов. Считается, что сохранение

структуры этих доменов чрезвычайно важно для правильной мембранной топологии митофузина 2, которая обеспечивается путем взаимодействия СС1 и СС2 доменов с трансмембранным доменом. Экзон 19-го гена *MFN2* кодирует С-концевой домен, являющийся эффектором ГТФ-азы и участвующий вместе со срединным доменом в процессах олигомеризации белковой молекулы [20, 23].

Цель настоящей работы – изучение частоты встречаемости НМСН ПА типа, спектра мутаций в гене *MFN2* и клинико-генетических характеристик в выборке больных, проживающих на территории Российской Федерации.

### Характеристика больных и методов исследования

Под нашим наблюдением находились 110 больных из 72 неродственных семей (52 мужчины и 58 женщин) в возрасте от 4 до 60 лет с НМСН II типа. В 28 семьях наблюдалась аутосомно-доминантная сегрегация заболевания в двух и более поколениях, в трех семьях предполагалось аутосомно-рецессивное наследование, а в 41 семье зарегистрирован единственный больной. Диагностика заболевания проводилась на основании клинического осмотра, электромиографического обследования и молекулярно-генетического анализа, направленного на идентификацию мутаций в гене митофузина 2 (*MFN2*).

Клиническая диагностика осуществлялась в соответствии с критериями Европейского консорциума по изучению нервно-мышечных заболеваний [28]. Электромиографическое обследование проводилось с использованием 4-канального электромиографа "Нейро-МВП" фирмы "Нейро-софт" по стандартной методике.

Выделение геномной ДНК из лейкоцитов периферической крови выполняли с помощью набора реактивов для выделения DIAtom™ DNA Prep100 ("Isogene Lab. Ltd.", Россия) по протоколу производителя.

Аmplификацию всех исследуемых фрагментов ДНК проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на программируемом термоциклере МС2 фирмы "ДНК-технология" (Россия) с использованием оригинальных олигонуклеотидных праймеров, которые синтезировались в НПФ "Литех" или НПО "SYNTOL".

Для выявления изменений нуклеотидной последовательности гена *MFN2* использовался метод анализа конформационного полиморфизма одноцепочечной ДНК (SSCP) со щелочной денатурацией и автоматическое секвенирование, которое проводилось согласно протоколу фирмы-производителя на приборе ABI Prism 3100 ("Applied Biosystems", США). В качестве матрицы для секвенирования использовали фрагменты ДНК, полученные после проведения ПЦР. Анализ результатов секвенирования осуществлялся с помощью программ Chromas и BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

### Результаты и обсуждение

В результате проведенного исследования мутации в гене митофузина, ответственные за возникновение НМСН ПА, были выявлены в 12 из 72 семей (17% всех обследованных семей с аксональной формой НМСН). Интересно отме-

тить, что этот показатель был значительно выше в выборке семей с аутосомно-доминантной сегрегацией, среди которых мутация обнаружена в 25% семей. Полученные результаты в целом соответствуют литературным данным, основанным на исследовании выборок из других популяций, в которых на долю НМСН типа ПА приходилось от 11% до 25% всех наследственных аксонопатий, а в группе больных с аутосомно-доминантной сегрегацией – около 30% [15, 16, 18, 20, 22].

Спектр выявленных мутаций в гене *MFN2* представлен в таблице 1. Как видно из таблицы, наиболее частой причиной возникновения НМСН ПА в обследованной выборке больных явилась замена аминокислоты аргинина в 94-м положении полипептидной цепи митофузина 2. На долю двух замен Arg94Gln и Arg94Trp приходилось 58% всех выявленных мутаций. Таким образом, в гене *MFN2* имеется "горячая точка" возникновения мутаций, что позволяет значительно оптимизировать ДНК-диагностику этой формы наследственных невропатий.

Нами проанализированы клинические проявления НМСН ПА у 22 больных обследованной выборки, 18 из которых были членами трех больших семей с сегрегацией заболевания в двух и более поколениях. Это позволило определить не только размах клинического полиморфизма заболевания, но и проследить динамику формирования клинического фенотипа по мере прогрессирования болезни.

Клинические проявления у всех больных с НМСН ПА были типичными для наследственных моторно-сенсорных невропатий и характеризовались сочетанием комплекса моторных, сенсорных и координаторных расстройств. Возраст манифестации заболевания варьировал от 2 до 27 лет и в среднем составил  $9,3 \pm 5,7$  лет. Первыми в патологический процесс вовлекались мышцы перонеальной группы голени и стоп, что клинически проявлялось вальным парезом стоп, снижением мышечной силы в сгибателях голени и появлением специфической "степпажной" походки. У всех больных отмечалось раннее выпадение ахиллова рефлекса и у большинства отмечено также выпадение карпорадиального рефлекса. Карпорадиальный рефлекс оставался сохранным лишь у двух пациентов в возрасте 14 и 27 лет, не имеющих деформаций и слабости мышц кисти. Снижение или отсутствие коленного рефлекса отмечено лишь у 58% больных. Еще более длительное время сохранялся рефлекс двуглавых мышц, угнетение которого выявлено только у 7 больных

таблица 1: Спектр выявленных мутаций в гене *MFN2*

Экзон	Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена	Клинический фенотип	Тип наследования	Число семей
4	с.280С>Т	Arg94Trp	НМСН II	АД, de novo	2
4	с.281G>А	Arg94Gln	НМСН II, НМСН II с глухотой	АД	5
7	с.617С>Т	Thr206Ile	НМСН II с ранним началом	de novo	2
8	с.745С>G	Ser249Cys	НМСН II	АД	1
18	с.2113G>А	Val705Ile	НМСН II	АД	1
18	с.2065G>А	Leu724Pro	НМСН II	АД	1

(38%) с длительностью заболевания от 17 до 54 лет. У 16 из 22 больных в патологический процесс вовлекались мышцы кистей (межкостные, а также мышцы тенара и гипотенара), у остальных 7 больных в возрасте от 6 до 27 лет с длительностью заболевания от 2 до 14 лет дистальные мышцы рук были интактны.

Поражение дистальных мышц ног достаточно быстро приводило к формированию "полой" стопы, в то время как деформация кистей по типу "когтистой лапы" наблюдалась лишь у 4 больных. По мере прогрессирования заболевания у 7 больных возникла более выраженная генерализация процесса с распространением поражения на мышцы бедер, что клинически проявлялось возникновением приемов Говерса. Расстройства чувствительности в зоне пораженных мышц ног отмечены у 15 больных, причем у 6 наблюдалось нарушение только поверхностной чувствительности, а у 3 – только глубокой чувствительности. Одновременное выпадение всех видов чувствительности отмечено лишь у 6 больных с длительностью заболевания от 17 до 54 лет. Интересно отметить, что расстройство глубокой чувствительности зарегистрировано лишь у 9 больных, в то время как координаторные нарушения в виде неустойчивости в пробе Ромберга и дисметрии отмечены у 16 больных. Принимая во внимание тот факт, что расстройство поверхностной чувствительности возникает при поражении тонких, слабомиелинизированных волокон, а появление признаков сенситивно-мозжечковой атаксии возникает лишь в том случае, когда расстройства глубокой чувствительности достигают некоего критического уровня, можно предположить, что при НМСН ПА нет четкой синхронизации процессов дегенерации различных аксональных структур.

Характерным симптомом заболевания был тремор постурально-кинетического характера, который отмечен у 17 больных (77%). Существует несколько гипотез, объясняющих возникновение тремора у больных с аксонопатиями. Так, одни авторы связывают его появление с ретроградным поражением мотонейронов передних рогов спинного мозга, в то время как другие объясняют его происхождение селективной деафферентацией, при которой ограничивается импульсация от мышечных веретен, но сохраняется импульсация от суставов.

У двух больных в возрасте 54 и 60 лет с длительностью заболевания от 44 до 54 лет отмечалось снижение глоточного и небного рефлекса и двусторонняя нейросенсорная тугоухость. Ни у одного из обследованных нами больных с НМСН ПА не было выявлено атрофии дисков зрительных нервов, которая иногда описывается в других популяциях [16, 29].

При электромиографическом обследовании у всех больных отмечались признаки аксонального поражения в виде снижения амплитуд сенсорных потенциалов и М-ответов, появления потенциалов фибрилляций. Показатели СПИ по срединному нерву варьировали от 41,6 до 66,8 м/с и в среднем составляли  $53,6 \pm 8,2$  м/с.

Анализ значений возраста манифестации заболевания и особенностей клинических проявлений в трех больших семьях показал отсутствие их значимой межсемейной вариабельности. Интересно отметить наличие феномена антиципации в двух из трех обследованных семей – более раннего возраста манифестации и большей тяжести болез-

ни в каждом последующем поколении. Наличие этого феномена отмечалось рядом других авторов при обследовании семей из европейских популяций [16, 27], однако в настоящее время нет адекватной гипотезы для его объяснения.

Суммируя полученные результаты, можно сделать следующие заключения:

1) В российской популяции, как и в большинстве популяций мира, НМСН типа ПА является наиболее распространенным вариантом наследственных аксональных невропатий, на долю которого приходится не менее 17% аксональных невропатий.

2) Наибольшую вероятность обнаружения мутации в гене митофузина 2 можно ожидать у больных из семей с аутосомно-доминантной сегрегацией заболевания.

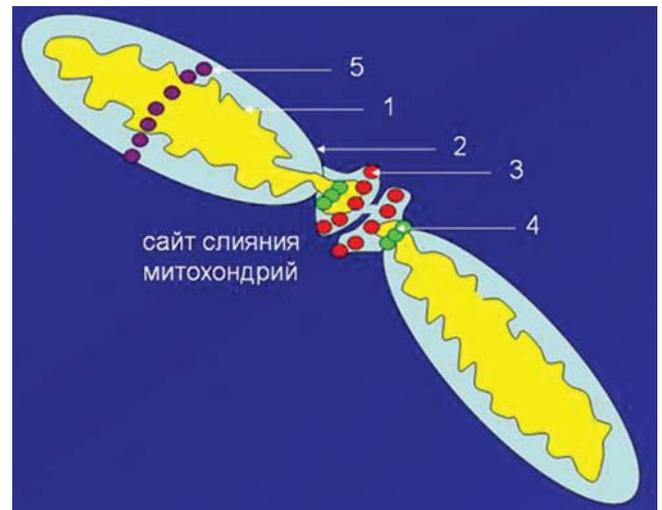


рис. 1: Сайт слияния митохондрий  
1 – внутренняя мембрана митохондрии; 2 – наружная мембрана митохондрии; 3 – митофузин 2; 4 – белок ОРА1, выполняющий во внутренней мембране митохондрий те же функции, что и митофузин 2 в наружной мембране; 5 – динамин 2.

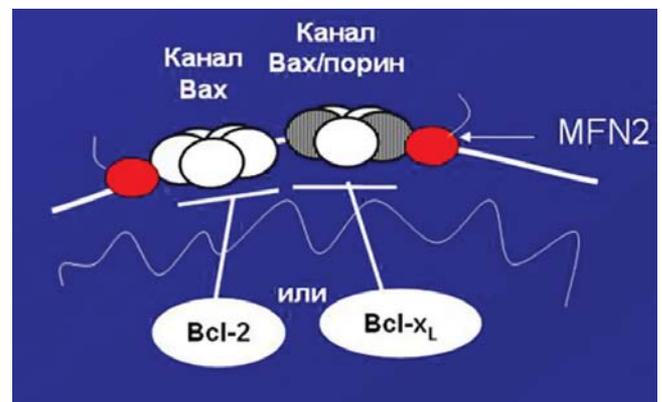


рис. 2: Колокализация митофузина 2 с белками наружных мембран митохондрий  
В наружной мембране митохондрий митофузин 2 (MFN2) локализуется совместно с белками, образующими каналы, регулирующие выход в цитоплазму проапоптотического медиатора цитохрома С.

3) Клинико-электромиографические показатели у больных с НМСН ПА соответствуют тяжелой аксональной полиневропатии, особенностями которой являются одновременное поражение передних и задних мышц голени, преобладание двигательных нарушений над расстройствами чувствительности в зоне пораженных мышц, отсутствие выраженных расстройств чувствительности на ранних стадиях заболевания, деформация стоп по типу "полых", рано возникающие координаторные расстройства, а также тремор пальцев вытянутых рук постурально-кинестического характера. У ряда больных отмечается распространение слабости на мышцы бедер, а также появление нейросенсорной тугоухости.

Анализируя литературные данные о структуре и функциях митофузина 2, патогенетические механизмы развития НМСН ПА можно представить следующим образом. Известно, что снижение концентрации или изменение функций митофузина 2 в аксонах периферических нервов приводит к нарушению динамических процессов в хондриоме (митохондриальных сетях) аксонов (рис. 1). Митохондриальная сеть аксонов периферических нервов выполняет роль своеобразного "электрического кабеля", четкое функционирование которого способствует быстрому синтезу в любом

участке молекул АТФ, а также транспорту ионов  $H^+$ ,  $Ca^{2+}$ , молекулярного кислорода, жирных кислот и ацилкарнитина, необходимых для эффективного функционирования клеток [14]. Появление фрагментации митохондриальной сети при мутации в гене *MFN2* приводит к уменьшению интенсивности энергетического обеспечения аксонов и нарушению соотношения концентрации динаминов различных классов. Это, в свою очередь, приводит к снижению резистентности клеток к апоптотическим сигналам и стимуляции программы запрограммированной клеточной гибели. К настоящему времени все детали сложного процесса стимуляции механизма апоптоза клеток с участием митофузина окончательно не выяснены. Установлено, что в норме митофузин 2 ингибирует переход проапоптотического белка Вах из цитоплазмы в мембрану митохондрий (рис. 2). Рассматриваются два возможных механизма такого ингибирования: 1) митофузин препятствует встраиванию белка Вах в наружную мембрану митохондрий; 2) митофузин, колокализованный с встроенным в наружную мембрану митохондрий белком Вах, ингибирует его функциональную активность. Увеличение концентрации Вах приводит к интенсификации формирования комплексов Вах/Вах и Вах/Вах, выходу в цитоплазму цитохрома С и запуску каспазного цикла, являющегося ключевым механизмом реализации апоптоза [24].

## Список литературы

1. Бадалян Л.О., Скворцов И.А. Клиническая электронейромиография. М.: Медицина, 1986.
2. Брам К.Б., Сузин С.А. Митохондрии в программированной гибели клетки: различные механизмы гибели. Биохимия 2005; 2: 284–293.
3. Гехт Б.М., Ильина Н.А. Нервно-мышечные болезни. М.: Медицина, 1982.
4. Гехт Б.М., Меркулова Д.М. Практические аспекты клиники и лечения полиневропатий. Неврол. журн. 1997; 2: 4–9.
5. Гехт Б.М., Меркулова Д.М., Касаткина Л.Ф. Клиника, диагностика и лечение демиелинизирующих полиневропатий. Неврол. журн. 1996; 1: 12–17.
6. Гринберг Д.А., Аминофф М.Д., Саймон Р.П. Клиническая неврология. М.: Мед-пресс-информ, 2004.
7. Дадали Е.Л. Наследственные нервно-мышечные заболевания: диагностика и медико-генетическое консультирование. Дис. ... докт. мед. наук. М., 1999.
8. Дадали Е.Л., Узаров И.В., Шаркова И.В., Кириленко Н.Б. Проблемы классификации наследственных нейропатий. Мед. генетика 2003; 5: 194–200.
9. Левин О.С. Полиневропатии. М.: МИА, 2005.
10. Петрухин А.С. Неврология детского возраста. М.: Медицина, 2004.
11. Поляков В.Ю., Файс Д. Как сливаются, фрагментируются и делятся митохондрии. Биохимия 2003; 8: 1026–1039.
12. Скулачев В.П. Биоэнергетика. Мембранные преобразователи энергии. Биохимия мембран. М.: Высшая школа, 1989.

13. Ченцов С.А. Введение в клеточную биологию. М.: Академкинга, 2004.
14. Baloh R.H., Schmidt R.E., Pestronk A. et al. Altered axonal mitochondrial transport in the pathogenesis of Charcot–Marie–Tooth disease from mitofusin 2 mutations. J. Neurosci. 2007; 27: 422–430.
15. Cho H.J., D. Sung B., Kim B. et al. Mitochondrial GTPase mitofusin 2 mutations in Korean patients with Charcot–Marie–Tooth neuropathy type 2. Clin. Genet. 2007; 71: 267–272.
16. Chung K.W., Kim S.B., Park K.D. et al. Earlyonset severe and lateonset mild Charcot–Marie–Tooth disease with mitofusin 2 (*MFN2*) mutations. Brain 2006; 129: 2103–2118.
17. De Jonghe P., Timmerman V., Nelis E. et al. Charcot–Marie–Tooth disease and related peripheral neuropathies. J. Peripher. Nerv. Syst. 1997; 2: 370–387.
18. Engelfried K., Vorgerd M., Hagedorn M. et al. Charcot–Marie–Tooth neuropathy type 2A: novel mutations in the mitofusin 2 gene (*MFN2*). BMC Med. Genet. 2006; 7: 53.
19. Harding A.E., Thomas P.K. Genetic aspects of hereditary motor and sensory neuropathy (types I and II). J. Med. Genet. 1980; 17: 329–336.
20. Kijima K., Numakura C., Izumino H. et al. Mitochondrial GTPase mitofusin 2 mutation in Charcot–Marie–Tooth neuropathy type 2A. Hum Genet. 2005; 116: 23–27.
21. Kluck R.M., Bossy–Wetzel E., Green D.R., Newmeyer D.D. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. Science 1997; 275: 1132–1136.
22. Lawson V.H., Graham B.V., Flanigan K.M. Clinical and electrophysiologic features of CMT2A with mutations in the mitofusin 2 gene. Neurology 2005; 65: 197–204.
23. Mozdy A.D., Shaw J.M. A fuzzy mitochondrial fusion apparatus comes into focus. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2003; 4: 468–478.

24. Sugioca R., Shimizu S., Tsujimoto Y. Fzo1, a protein involved in mitochondrial fusion, inhibits apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 52726–52734.

25. van der Heiden M.J., Thompson G.B. BCL-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat. Cell Biol.* 1999; 1: 209–216.

26. Zuchner S., De Jonghe P., Jordanova A. et al. Axonal neuropathy with optic atrophy is caused by mutations in mitofusin 2. *Ann. Neurol.* 2006; 59: 276–281.

27. Zuchner S., Mersiyanova I.V., Muglia M. et al. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot–Marie–Tooth neuropathy type 2A. *Nat. Genet.* 2004; 36: 449–451.

28. <http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/time/hmsn.html>. NEUROMUSCULAR DISEASE CENTER.

29. <http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/DataSource/MutByGene.cfm>. CMT mutation data base.

## Clinical and genetic characteristics of hereditary motor and sensory neuropathy type IIA

O.A. Schagina<sup>1</sup>, E.L. Dadali<sup>1</sup>, V.P. Fedotov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Research Centre for Medical Genetics, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

<sup>2</sup>Voronezh Regional Clinical and Diagnostic Centre and Genetics Consulting Centre, Voronezh

**Key words:** hereditary motor and sensory neuropathy, axonal type, mitofusin 2, clinical and genetic characteristics.

In this study, clinical manifestations of hereditary motor and sensory neuropathy type IIA (HMSN IIA, or Charcot–Marie–Tooth disease type 2A) were analyzed in 22 patients with the disease caused by different mutations of the *MFN2* gene. Molecular genetic analysis showed that in the examined cohort of Russian families with axonal form of hereditary motor and sensory neuropathy, HMSN IIA accounted for

17% cases. Eighteen from 22 patients under observation were members of three large families with the disease segregating in two or more generations, which enabled us to determine the scope of clinical polymorphism of HMSN IIA, as well as to assess intra- and interfamilial variability of clinical features and follow up the dynamics of clinical phenotype formation upon the disease progression.