

Europäische Leitlinien zur molekulargenetischen Diagnostik der Charcot-Marie-Tooth Neuropathien

– Ergänzung –

Die vorliegenden Leitlinien sind das Resultat eines „Best Practice“ Workshops in Antwerpen, 7. Juli 2004, welcher mit Unterstützung durch den BVDH und das European Molecular Genetics Quality Network (EMQN) durchgeführt wurde.

Sie ergänzen die Leitlinien des Jahres 2000, die ebenfalls auf Basis eines „Best Practice“ Workshops in Amsterdam, 27. Mai 2000, mit Unterstützung durch das European Molecular Genetics Quality Network (EMQN) erstellt worden waren. Die damaligen Mittel stammten von der Europäischen Union, Vertrag Nr. SMT4-CT98-7515.

Die englischen Originalversionen sind auf der EMQN Homepage (www.emqn.org) verfügbar.

Diese Leitlinien wurden im Oktober 2009 aktualisiert. Die CMT4E konnte EGR2 zugeordnet werden, für CCFDN wurde das CTDP1-Gen identifiziert, die AR-CMT2B2 wird durch Mutationen im MED25-Gen verursacht, die DI-CMTC geht auf Mutationen des YARS genes zurück und die DI-CMTD konnte mit MPZ-Mutationen assoziiert werden.

1. Nomenklatur und Gene

Siehe hierzu [■ Tabelle 1](#).

Peripheres Myelin Protein 22 (PMP22; OMIM *601097)

70% der AD-CMT1 Patienten tragen eine 1.4 Mb Tandem Duplikation in Chromosom 17p12. Die reziproke Deletion dieser 1.4 Mb Region führt zu HNPP. Die CMT1A Duplikations/HNPP Deletions Region enthält das Dosis-sensitive PMP22 Gen. PMP22, ein 4-Transmembran Domänen Protein, ist eine strukturelle Komponente bei der Myelinbildung und -Erhaltung.

Punktmutationen in PMP22 sind mit sehr variablen klinischen Phänotypen assoziiert, z. B. CMT1, DSS (DSS wird traditionell als rezessive Erkrankung angesehen, wird aber auch zur Beschreibung von schweren Verlaufsformen einer CMT1 ungeachtet der Vererbung verwendet), CHN oder HNPP. Die meisten PMP22 Mutationen sind in der Transmembran Domäne lokalisiert.

Myelin Protein Zero (MPZ; OMIM *159440)

1993 wurden die ersten Mutationen in MPZ identifiziert, die mit einer demyelinisierenden peripheren Neuropathie assoziiert waren (klassifiziert als CMT1B). Die meisten Mutationen sind mit den demyelinisierenden Formen CMT1B, DSS

oder CHN assoziiert, in einigen Fällen wurden auch Zeichen einer primär axonalen Neuropathie ähnlich einer CMT2 beschrieben. MPZ wird durch myelinisierende Schwannzellen des PNS hoch exprimiert, es macht mehr als 50% des Gesamtproteins im peripheren Myelin aus. Das Protein besteht aus einer extrazellulären, immunoglobulin-verwandten Domäne, die eine homophile Adhäsion vermittelt, einer Transmembran Domäne und einer kurzen, basischen intrazellulär-Domäne. Die meisten Mutationen sind in der extrazellulären Domäne angeordnet.

Small integral membrane protein of lysosome/late endosome (SIMPLE)/Lipopolysaccharide-induzierter TNF factor (LITAF/SIMPLE; OMIM *603795)

CMT Typ 1C ist mit missense Mutationen im SIMPLE Gen assoziiert. Es spielt evtl. eine Rolle in Protein Degradation Pathways.

Early growth response 2 gene (EGR2; OMIM *129010)

Die Expression von EGR2 beginnt, bevor die Myelinisierung einsetzt, wenn Schwannzellen aus ihren Vorläuferzellen gebildet werden, persistiert durch das ganze Leben und spielt als Zink-Finger-Transkriptionsfaktor eine wesent-

Tabelle 1 Gegenwärtige genetische Subtypen, Loci und Gene für hereditäre motorische und sensible Neuropathien			
Typ	Vererbung	Locus	Gen
HMSN Typ I			
CMT1A	AD	17p12	<i>PMP22</i>
CMT1B	AD	1q22-q23	<i>MPZ</i>
CMT1C	AD	16p13.1-p12.3	<i>SIMPLE</i>
CMT1D	AD	10q21.1-q22.1	<i>EGR2</i>
CMT1E	AD	17p12	<i>PMP22</i>
CMT1F	AD	8p21	<i>NEFL</i>
CMT4A	AR	8q13q21	<i>GDAP1</i>
CMT4B1	AR	11q23	<i>MTMR2</i>
CMT4B2	AR	11p15	<i>SBF2</i>
CMT4C	AR	5q23-q33	<i>SH3TC2</i>
CMT4D (HMSN-L)	AR	8q24	<i>NDRG1</i>
CMT4E (HMSN-R)	AR	10q21-q22	<i>EGR2</i>
CMT4F	AR	19q13.1-q13.3	<i>PRX</i>
CMT4H	AR	12p11.2	<i>FGD4</i>
CCFDN	AR	18q23-qter	<i>CTDP1</i>
CMT1X	XR/XD	Xq13.1	<i>GJB1</i>
HMSN Typ II			
CMT2A	AD	1p35-p36	<i>MFN2/KIF1B</i>
CMT2B	AD	3q12-q22	<i>RAB7</i>
CMT2C	AD	12q23-q24	unbekannt
CMT2D	AD	7p14	<i>GARS</i>
CMT2E	AD	8p21	<i>NEFL</i>
CMT2F	AD	7q11-q21	<i>HSPB1</i>
CMT2	AD	1q22-q23	<i>MPZ</i>
AR-CMT2A (CMT2B1)	AR	1q21.2-q21.3	<i>LMNA</i>
AR-CMT2B (CMT2B2)	AR	19q13.3	<i>MED25</i>
AR-CMT2C + pyramidal signs	AR	8q21.3	unbekannt
AR-CMT2D + hoarseness	AR	8q21.1	<i>GDAP1</i>
CMT2X	XR	Xq24-q26	unbekannt
HMSN Typ III			
DSS/CHN	AD/AR	17p12	<i>PMP22</i>
DSS/CHN	AD/AR	1q22-q23	<i>MPZ</i>
DSS/CHN	AD/AR	10q21.1-q22.1	<i>EGR2</i>
DSS	AR	19q13.1-q13.3	<i>PRX</i>
AD-DSS	AD	8q23	unbekannt
HMSN intermediär			
DI-CMTA	AD	10q24.1-q25.1	unbekannt
DI-CMTB	AD	19p12-p13.2	<i>DNM2</i>
DI-CMTC	AD	1p34-p35	<i>YARS</i>
<i>DI-CMTD</i>	AD	1q22	<i>MPZ</i>
HMSN-P	AD	3p14.1-q13	unbekannt

Tabelle 1 Fortsetzung

Typ	Vererbung	Locus	Gen
Hereditäre rekurrende fokale Neuropathien			
HNPP	AD	17p12	<i>PMP22</i>
HNA	AD	17q25	<i>SEPT9</i>
Andere			
GAN	AR	16q24.1	GAN
AS	AR	15q13-q15	<i>SLC12A6</i>

AR: autosomal rezessiv; AD autosomal dominant; XD: X-gekoppelt dominant; XR X-gekoppelt rezessiv; DI-CMT dominant-intermediäre Charcot-Marie-Tooth Erkrankung; CCFDN "congenital cataracts, facial dysmorphism & neuropathy syndrome"; HNPP "hereditary neuropathy with liability to pressure palsies"; HNA Hereditäre Neuralgische Amyotrophie; CHN Congenitale Hypomyelinisierungs-Neuropathie; DSS Dejerine-Sottas Syndrom; AS Andermann Syndrom

liche Rolle bei der Entwicklung des peripheren Nervensystems. *EGR2* reguliert die Expression von Myelin Proteinen (z. B. *PMP22*, *MPZ*, *GJB1*, und *PRX*) sowie von Enzymen der Lipid-Synthese. *EGR2* Mutationen wurden bei schweren Verlaufsformen der CMT1, des DSS und der CHN gefunden. Mutationen in den DNA-bindenden Domänen von *EGR2* führen zu dominant vererbter CMT1. Im Gegensatz dazu sind Mutationen in der inhibitorischen R1 Domäne rezessiv. Der Schweregrad des Krankheitsverlaufs variiert sogar bei identischen *EGR2* Mutationen sehr stark.

Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 (GDAP1; OMIM *606598)

Mutationen in *GDAP1* wurden mit der demyelinisierenden CMT4A, der axonalen AR-CMT2 mit Stimmbandparese und AR-CMT sowohl mit demyelinisierenden als auch axonalen Formen assoziiert. *GDAP1* könnte eine Funktion bei der Signaltransduktion in der neuronalen Entwicklung haben.

Myotubularin-related-protein-2 (MTMR2; OMIM *603557)

Mutationen in *MTMR2* sind für die seltene CMT4B1 Form verantwortlich. CMT4B1 ist eine demyelinisierende motorische und sensorische Neuropathie, die durch lokal gefaltetes Myelin in N. suralis Biopsien gekennzeichnet ist. Der Krankheitsbeginn ist in früher Kindheit, Erwachsene sind schwer behindert und in der Regel Rollstuhlpflichtig. *MTMR2* gehört zu der Myotubularin Protein-Familie, die eine Domäne mit Ähnlichkeiten zu

dual-spezifischen Phosphatasen hat und in der diverse Mutationen die Proteinfunktion beeinträchtigen.

SET binding factor 2 (SBF2; OMIM *607697)

Mutationen in *SBF2* wurden mit CMT4B2 assoziiert, eine rezessive demyelinisierende, periphere Neuropathie mit lokal gefaltetem Myelin und einer Assoziation mit früh beginnendem Glaukom. *SBF2* gehört bei den Myotubularinen zu den Pseudo-Phosphatasen, da es inaktivierende Substitutionen der katalytischen Cysteine trägt.

SH3 domain and tetratricopeptide repeats 2 (SH3TC2; OMIM *608206)

In Patienten von 11 Familien sowie 1 sporadischen Patienten mit Charcot-Marie-Tooth Typ 4C Erkrankung wurden 11 verschiedene Mutationen im *SH3TC2* Gen identifiziert, 7 davon waren in Exon 11 lokalisiert. Das CMT4C Gen wird im Nervengewebe einschließlich des peripheren Nervensystems hoch exprimiert. Das Protein definiert eine neue Proteinfamilie mit noch unbekannter Funktion, aber putativen Orthologen bei Vertebraten. Vergleichende Sequenzanalysen ergaben multiple SH3 und TPR Domänen, die mit der Bildung von Proteinkomplexen in Verbindung gebracht werden.

N-myc downstream-regulated gene 1 (NDRG1; OMIM *605262)

Eine Nonsense Mutation in *NDRG1* ist mit hereditärer motorischer und sensorischer Neuropathie-Lom (HMSN-L; CMT4D) assoziiert. HMSN-L ist eine autosomal rezessive, schwer verlaufende Neuropathie

mit Taubheit und ungewöhnlichen neuropathologischen Befunden. Patienten einer HMSN-L tragen ein Stop codon innerhalb des *NDRG1* Genes, welches zu einem verkürzten Protein führt. Die Transkription von *NDRG1*, einer Phosphatase, wird durch verschiedene chemische Agenzien hochreguliert. Das *NDRG1* Protein enthält mehrere Phosphorylierungsstellen, die im endoplasmatischen Retikulum Stress induzieren.

Periaxin (PRX; OMIM *605725)

Mutationen in *PRX* wurden bei CMT Typ 4F identifiziert, eine rezessiv vererbte, schwere Form einer demyelinisierenden peripheren Neuropathie, sowie bei Patienten eines DSS. CMT4F Patienten leiden an starken neuropathischen Schmerzen zusätzlich zu den üblichen Symptomen einer ausgeprägten Neuropathie. *PRX* wird spezifisch in myelinisierenden Schwannzellen exprimiert. Alternatives Spleißen führt zu zwei verschiedenen Proteinen, S-Periaxin und L-Periaxin. L-Periaxin ist in embryonalen Schwannzellen im Nucleus lokalisiert, in myelinisierenden Schwannzellen tritt es an der Plasmamembran auf. S-Periaxin ist auf das Zytoplasma beschränkt. L-Periaxin formt einen Komplex mit dem Dystrophin-Related Protein-2 (DRP2) und mit Dystroglycan. Damit wird das Zytoskelett der Schwannzellen mit der extrazellulären Matrix in der abaxonalen Schwannzellmembran verbunden.

Gap junction protein beta 1 (GJB1; OMIM *304040)

GJB1, ein Protein mit 4 Transmembrandomänen, ist in den Paranodien und

Schmidt-Lanterman Inzisionen myelinisierender Schwannzellen lokalisiert. Es erlaubt eine verkürzte laterale Diffusion für Ionen und Verbindungen mit niedrigem Molekulargewicht zwischen adaxonalem und abaxonalem Schwannzell-Plasma. Bereits 1993 wurden die ersten Mutationen in *GJB1* gefunden und mit der X-chromosomalen CMT Form (CMTX) assoziiert. Variationen in *GJB1* sind die zweithäufigste Ursache einer HMSN nach der CMT1A Duplikation. Über 250 verschiedene *GJB2* Mutationen wurden beschrieben. Die Mutationen sind über das ganze Protein verteilt und nicht auf eine spezifische Domäne konzentriert. Electrophysiologische Befunde belegen einen signifikanten Beitrag zu einer axonalen Komponente der Neuropathie bei spezifischen *GJB1* Mutationen.

Mitofusin 2 (MFN2; OMIM *608507)

In sieben Familien mit Kopplung an den CMT2A Locus wurden Mutationen in *KIF1B* ausgeschlossen. Mutationanalysen anderer Gene in der gekoppelten Region ergaben missense Mutationen in *MFN2*. Daher sind *MFN2* Mutationen die primäre Ursache einer CMT2A. *MFN2* wird ubiquitär exprimiert, die mRNA ist im Rückenmark und peripheren Nerven nachweisbar. *MFN2* ist an der äußeren Mitochondrien Membran lokalisiert und reguliert die Architektur des mitochondrialen Netzwerkes durch Fusion von Mitochondrien.

Kinesin family member 1B (KIF1B; OMIM *605995)

Eine missense Mutation in *KIF1B* wurde in einer einzelnen Familie mit axonaler CMT Typ 2A gefunden. *KIF1B* ist ein Mitglied der Kinesin Superfamilie. Diese Superfamilie repräsentiert eine Gruppe von Proteinen, die für den Transport von Organellen und anderen Materialien entlang der Mikrotubuli innerhalb der Zellen wichtig ist. *KIF1B* α und *KIF1B* β , die zwei Isoformen, resultieren aus alternativem Spleißen. *KIF1B* α ist für den Mitochondrien Transport verantwortlich und zeigt ein breit gefächertes Expressionsmuster, wogegen *KIF1B* β spezifisch in Neuronen exprimiert wird, es ist hier für den Transport der synaptischen Vesikel verantwortlich.

Small GTP-ase late endosomal protein (RAB7; OMIM *602298)

Mutationen in *RAB7* sind mit CMT Typ 2B assoziiert, eine ulzerierende Neuropathie. *RAB* Proteine sind wichtige Regulatoren des vesikulären Transportes und sie sind in spezifischen intrazellulären Kompartimenten lokalisiert. *RAB7* wurde in späten Endosomen lokalisiert und gehört in den späten Endocytose Pathway.

Glycyl t-RNA Transferase (GARS; OMIM *600287)

Missense Mutationen in *GARS* wurden in Familien mit CMT2D und distaler HMN V (distale SMA V) gefunden. Aminoacyl-tRNA Synthetasen haben bei der Proteinsynthese eine essentielle Funktion. Sie katalysieren die Veresterung der Aminosäuren mit den zugehörigen tRNAs.

Neurofilament, light polypeptide (NEFL; OMIM *162280)

Mutationen in *NEFL* werden in Patienten mit CMT2, CMT1 und DSS gefunden. Die meisten Patienten haben einen frühen Krankheitsbeginn und eine schwere Verlaufsform mit moderat bis deutlich reduzierten NLGs. *NEFL* codiert für eine Untereinheit von Neurofilamenten, dem Haupttyp der intermediären Filamente in Neuronen. Die meisten Mutationen sind in der Kopfdomäne des Proteins lokalisiert.

Heat shock 27kDa protein 1 (HSPB1; OMIM *602195)

Mutationen in *HSPB1* sind mit CMT2F und der distalen hereditären motorischen Neuropathie (distale HMN) assoziiert. Die meisten Mutationen sind in der Hsp20-alpha-Crystallin Domäne lokalisiert. Neuronale Zellen, die mit mutiertem *HSPB1* transfeziert wurden, waren weniger lebensfähig als Wildtyp-exprimierende Zellen. Kotransfektion von Neurofilament light chain (*NEFL*) und mutiertem *HSPB1* resultierte in einer veränderten Neurofilament-Assemblierung in Zellen mit fehlenden zytoplasmatischen Intermediär-Filamenten.

Lamin A/C (LMNA; OMIM *150330)

Eine spezifische missense Mutation in *LMNA* wurde mit autosomal rezessiver, axonaler CMT (CMT2B1) gekoppelt. Un-

terschiedliche Mutationen in *LMNA* verursachen mehrere andere Erkrankungen einschliesslich der Emery-Dreyfuss Muskeldystrophie und der Hutchinson-Gilford Progerie. *LMNA* ist ein strukturelles Protein der Kernmembran.

Dynamin 2 (DNM2; OMIM *602378)

Mutationen in *DNM2* wurden in Patienten aus Familien mit dominant-intermediärer CMT Typ A (DI-CMTA) identifiziert. *DNM2* gehört zur Familie der großen GTPasen und ist Teil des zellulären Fusions-Spaltungs-Apparates. In transient transfezierten Zelllinien vermindern Mutationen von *DNM2* substantiell seine Bindung an Membranen durch Konformationsänderungen der beta3/beta4 Schleife der Pleckstrin Homologie Domäne.

Septin 9 (SEPT9; OMIM *604061)

Mutationen in *SEPT9* sind mit hereditärer neuralgischer Amyotrophie (HNA) assoziiert. HNA ist die erste monogene Erkrankung, die durch Mutationen in einem Gen der Septin Familie verursacht wird. Septine sind an der Bildung des Zytoskeletts, der Zellteilung und der Tumorgengese beteiligt.

Gigaxonin (GAN; OMIM *605379)

Mutationen in Gigaxonin (*GAN*) führen zu der seltenen und schweren, autosomal rezessiven Riesenaxon-Neuropathie. Diese Neuropathie betrifft das periphere und das zentrale Nervensystem. *GAN* ist an der dynamischen Organisation des Aktin-Netzwerkes beteiligt. *GAN* Defekte verursachen die Hauptstigmata der Erkrankung: ausgeprägte Neuropathie, Ataxie und stark gelocktes Haar.

Solute carrier 12 (potassium/chloride transporter), member 6 (SLC12A6; OMIM *604878)

Mutationen in *SLC12A6* sind mit peripheren Neuropathien und Agenesen des Corpus callosum, auch Andermann Syndrom genannt, assoziiert. Das Protein, ein K⁺-Cl⁻ Kotransporter, ist an der elektro-neutralen Bewegung von Ionen durch die Plasmamembran beteiligt.

Mediator of RNA Polymerase II transcription, subunit 25 (MED25; *610197)

Die ARCMT2B2 stellt eine klassische, primär axonale HMSN Erkrankung dar. Die Patienten zeigen eine distal beginnende, symmetrische Muskelatrophie, Hohlfüße sowie einen reduzierten Vibrations- und Positionssinn. Der Erkrankungsbeginn ist in der dritten bis vierten Dekade mit mildem, nur langsam progredienten Verlauf. MED25, synonym zu ARC92 und ACID1, stellt eine Untereinheit des "activator-recruited cofactor (ARC)" dar, einer Familie von umfangreichen Koaktivatoren der Transkription. Seine genaue physiologische Funktion ist unbekannt.

C-terminal domain of RNA Polymerase II subunit A (CTDP1; *604927)

Das Congenital-Cataract-Facial-Dysmorphism-Neuropathy-Syndrom (CCFDN) ist eine seltene autosomal rezessive Erkrankung, die bislang für die Bevölkerungsgruppe der Roma beschrieben wurde. Betroffene Patienten zeigen einen komplexen klinischen Phänotyp, der multiple Organsysteme betrifft. Dieser beinhaltet kongenitale Katarakte, Microcorneae, eine hypomyelinisierende periphere Neuropathie, einen Minderwuchs, faziale Dysmorphien und eine verzögerte psychomotorische Entwicklung. Eine parainfektiose Rhabdomyolyse wird als ernsthafte Komplikation beobachtet. Die Komplikationsrate bei Allgemeinanästhesie ist ebenfalls erhöht. Eine frühzeitige Katarakt-OP ist zur Vermeidung dauerhafter Sehstörungen angeraten. Bekannt ist eine intronische Founder-Mutation (c.863+389 C>T, Leu287fs) im Intron 6 des *CTDPI*-Gens.

Tyrosyl-tRNA Synthetase (YARS; *603623)

Die DI-CMT Neuropathie stellt eine Variante der klassischen CMT dar, die durch intermediäre Nervenleitgeschwindigkeiten sowie axonalen und demyelinisierenden Zeichen in der Histologie charakterisiert ist. Aminoacyl-tRNA Synthetasen katalysieren die Aminoacylierung einer tRNA mit der entsprechenden Aminosäure. Die YARS cDNA codiert für ein Polypeptide mit 528 Aminosäuren. Der

Carboxy-Terminus enthält eine Region mit 49% Ähnlichkeit zu einem „endothelialen monocytic-activating polypeptide II (EMAP II)“

2. Beschreibung der Erkrankung

Die Charcot-Marie-Toothsche Erkrankung (CMT) ist die verbreitetste, erbliche periphere Neuropathie mit einer Prävalenz von 10–40/100 000. Nach der Erstbeschreibung im Jahr 1886 wurde klar, dass es sich nicht um ein einzelnes Krankheitsbild handelt, sondern dass sowohl klinische als auch genetische Heterogenität vorliegt. Dyck und Lambert führten 1968 eine Klassifizierung der peripheren Neuropathien auf der Basis von genetischen, elektrophysiologischen und neuropathologischen Kriterien ein. Die hereditäre motorische und sensorische Neuropathie Typ I (HMSN I, CMT1) ist durch deutlich reduzierte motorische und sensorische Nervenleitgeschwindigkeiten (NLG) und Zeichen einer De- und Remyelinisierung in N. suralis Biopsien gekennzeichnet. Diese Erkrankung wird zumeist autosomal dominant (AD) vererbt, aber auch X-gekoppelte und autosomal-rezessive (AR) Vererbung sowie isolierte Patienten wurden beschrieben. Am häufigsten wird eine 1.4 Mb Tandem Duplikation (CMT1A Duplikation), die auch das *PMP22* Gen enthält, beobachtet, aber auch Mutationen des peripheren Myelin Proteins 22 (*PMP22*, 17p12) selbst, des Myelin Protein Zero (*MPZ*, *P0*, 1q22-q23), des Gap Junction Proteins Beta 1 (*GJB1*, *Cx32*, *Xq13.1*) und anderer Gene wurden berichtet.

HMSN II oder CMT2 ist durch normale oder leicht reduzierte motorische und sensorische NLGs charakterisiert. Sie ist genetisch heterogen mit AD oder AR Vererbung. Am häufigsten werden Mutationen im Mitofusin 2 (*MFN2*) Gen beobachtet, aber auch Variationen in *GJB1* und *MPZ* wurden mit dieser Neuropathie assoziiert.

HMSN III oder Dejerine-Sottas Syndrom (DSS) ist eine sehr schwer verlaufende Neuropathie mit extrem reduzierten NLGs und frühem Krankheitsbeginn. DSS Patienten können Mutationen in *PMP22*, *MPZ* und *EGR2* aufweisen.

Patienten mit einer hereditären Neuropathie mit Neigung zu Druckläsionen

(hereditary neuropathy with liability to pressure palsies, HNPP) entwickeln gewöhnlich eine Mononeuropathie nach mildem Trauma. Einige Patienten zeigen eine generalisierte Neuropathie. HNPP wird autosomal dominant vererbt. Am häufigsten wird eine Deletion reziprok zur CMT1A Duplikation beobachtet, aber auch Punktmutationen in *PMP22* werden gefunden.

3. Übliche Gründe für eine molekulargenetische Untersuchung

Obwohl der Phänotyp in einem weiten Bereich variieren kann, gibt es einige typische Gründe für Patienten, einen Arzt für eine Diagnosestellung zu konsultieren. Am verbreitetsten sind Gangbeschwerden und langsam progrediente Schwäche der Beine und/oder Hände, aber auch rekurrende Lähmungen oder Fuß-Deformitäten sind Gründe für eine klinische Konsultation. Messung der Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) und Elektromyographie, gelegentlich eine N. suralis Biopsie sowie eine familiäre Häufung der Erkrankung führen zu einer genetischen Konsultation. Der CMT Phänotyp überlappt manchmal mit anderen Erkrankungen wie DSS, Roussy-Levy Syndrom oder Friedreichscher Ataxie. In Zweifelsfällen kann eine molekulargenetische Analyse hilfreich sein. Die erblichen Neuropathien müssen sehr sorgfältig von den vielfältigen erworbenen (nicht-genetischen) Neuropathien, wie z. B. den immunvermittelten, toxischen und infektiösen Formen unterschieden werden.

4. Herangehensweise und Protokolle

4.1 Klinische Untersuchung

Das motorische und/oder sensorische System kann an der Neuropathie beteiligt sein. Eine Messung der NLG und EMG resultiert fast immer in abnormalen Werten. Die Sehneneigen-Reflexe sind oft wenig ausgeprägt, ein Erregungsverlust kommt häufig vor. Eine N. suralis Biopsie ist gelegentlich hilfreich, um die verschiedenen Neuropathie-Typen zu differenzieren, z. B. die chronische inflamm-

Tabelle 2 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) Überblick

Locus	Klon	Subklon	Klonierungsstelle	Insertionsgrösse	Methode	Lit.	Bruchpunktfragment
D17S122	pVAW409R3	pVAW409R3a	EcoRI-BamHI	1400 bp	SacII PFGE	1	500 kb CMT1A junction
					FspI PFGE	2	500 kb CMT1A junction
					AscI PFGE	3	500 kb CMT1A junction
CMT1A-REP	c20G2	pNEA102	EcoRI	1800 bp	SacII PFGE	4	500 kb CMT1A junction 820 + 770 kb HNPP junction
					EagI PFGE	5	150 kb CMT1A junction 320 (370) kb HNPP junction
CMT1A-REP	c56A5	cosH1	EcoRI	?	EagI PFGE	6	150 kb CMT1A junction 300 (350) kb HNPP junction

Tabelle 3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) Überblick

Locus	Lit.	Klon	Markierung	Methode
proximal CMT1A-REP	1	c74F4	FITC avidin	FISH
distal CMT1A-REP	1	c112C10	FITC avidin	FISH
CMT1A monomer unit	2	pVAW409R1	FITC avidin	interphase FISH
PMP22	3	c103B11, c132G8, c77F4	digoxigenin	interphase FISH
PMP22	4	c132G8	digoxigenin	interphase FISH

atorische demyelinisierende Polyneuropathy (CIDP) und CMT oder Subtypen der CMT.

4.2 Genetische Analysen

Eine große Bandbreite von Techniken steht für die molekulargenetische Testung der CMT zur Verfügung. Diese Leitlinien sollen nicht als Vorschrift dienen, sondern um Vor- und Nachteile für einige der Techniken zu erläutern.

Nachdem die große Mehrzahl der CMT1 Patienten eine 1.4 Mb Tandem Duplikation in Chromosom 17p12 trägt, ist die Bestätigung oder der Ausschluss dieser Mutation der erste diagnostische Schritt. HNPP Patienten weisen manchmal ähnliche oder identische Symptome einer CMT Typ 1 auf. Daher ist es wichtig, in das erste Methodenset auch einen Test auf diese Deletion einzuschliessen. Der HNPP Test erfordert in der Regel die selben Proben/Marker und Techniken wie die Untersuchung der CMT1A Duplikation. Die meisten Laboratorien führen Mikrosatelliten Analysen der CMT1A Region durch, die „Multilplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)“ wird immer populärer, aber auch die Southern Hybridisierung basierend auf Dosis Differenzen von Restriktions Fragment Längen Polymorphismen, Erkennung von Bruchpunktfragmenten und andere Techniken

wie FISH oder verschiedene PCR basierte Methoden werden angewendet. Nach Ausschluss oder Bestätigung der CMT1A Duplikation oder HNPP Deletion können weitere genetische Analysen und/oder klinische Nachuntersuchungen folgen. Dies schließt die Sequenzanalyse von MPZ, GJB1, PMP22 und anderen Genen in Abhängigkeit von Phänotyp und Familiengeschichte (AD versus AR Vererbung) ein.

Für die CMT2 ist in vielen Zentren die Sequenzanalyse von *MFN2*, *MPZ* und *GJB1* etabliert.

Die individuellen Laboratorien sollten die Einschränkungen der Methoden angeben bzw. ausführen, welche spezifischen CMT Typen untersucht werden, z. B. ob, basierend auf der Methode, nur eine Duplikations-Analyse oder auch eine Deletions-Analyse, oder ein weiteres Mutationscreening in anderen, bekannten Genen oder Kopplungsanalysen angeboten werden.

4.2.1 CMT1A Duplikations/HNPP Deletions Analysen

Im allgemeinen stehen für die CMT1A Duplikations/HNPP Deletions Analyse folgende Methoden zur Verfügung:

- Binäre Methoden mit einer „Ja“ oder „Nein“ Antwort.
- Dosis-sensitive und andere Methoden.

a. Binäre Methoden

In dieser Kategorie werden der Nachweis von Bruchpunktfragmenten durch Restriktion von genomischer DNA und Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) sowie die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) zusammengefasst.

PFGE (■ Tabelle 2)

PFGE wird in den USA in der Routine häufig verwendet, in Europa nur noch selten. Die Methode führt zu klaren Ergebnissen, hat aber Beschränkungen. Sie hängt von der Qualität der eingesandten Blutprobe sowie von der arbeitsintensiven Prozedur bis zum abschließenden Autoradiogramm ab. Die Fehlerrate (nicht-interpretierbare Ergebnisse) wird auf ca. 10% geschätzt.

FISH (■ Tabelle 3)

FISH basiert auf Cosmiden oder Klonen mit großen Insertionen (BACs, PACs), die aus der CMT1A Region abgeleitet sind und *PMP22* einschließen. Gegenwärtig ist keine kommerzielle Sonde verfügbar. Um die 1,4 Mb Duplikation nachzuweisen, muss in der Regel eine Interphase-FISH durchgeführt werden. Zur Vermeidung von Interpretationsfehlern aufgrund des Zellzyklus-Zustandes der Zelle ist die gleichzeitige Verwendung einer zweiten für das Chromosom 17 spezifischen Probe angebracht. Dies gewähr-

Tabelle 4 RFLP Southern blot Methoden zum Dosis-Differenz und Bruchpunkt-Fragment Nachweis								
Locus	Lit.	Klon	Subklon	Klonierungsstelle	Insertionsgrösse	Polymorphismus	Allelgrösse	Allelfrequenz
D17S122	1,2	pVAW409R1	PVAW409R1b	EcoRI-BamHI	2500 bp	MspI RFLP	5.3 kb	0,86
							2.7 + 2.6 kb	0,14
D17S122	1,2	pVAW409R3	PVAW409R3a	EcoRI-BamHI	1400 bp	MspI RFLP	2.8 kb	0,5
							2.7 kb	0,44
							1.9 kb	0,06
D17S125	2,3	pVAW412R3	pVAW412R3HEb	EcoRI-HindIII	1300 bp	MspI RFLP	10.5 kb	0,17
							5.4 kb	0,83
D17S125	2,3	pVAW412R3	pVAW412R3HEc	EcoRI-HindIII	800 bp	MspI RFLP	2.6 kb	0,83
							0.7 + 1.9 kb	0,17
D17S61	2,3,4	pEW401	pEW401HE	EcoRI-HindIII	850 bp	MspI RFLP	5.5 kb	0,24
							4.4 kb	0,76
							4.7 kb	rare
PMP22 (cDNA)	5	rat	pCD25F3			EcoRI/HinclI RFLP	11 kb	dosage
	6	human	p132-G8R1	FspI-EcoRI	10 kb	EcoRI/HinclI RFLP	9.6 kb	dosage
CMT1A-REP	7		pNEA101	EcoRI				dosage
CMT1A-REP7	7	c20G2	pNEA102	EcoRI	1.8 kb	EcoRI	7.8 + 6.0 kb	dosage
CMT1A-REP	8,9	pLR6.0	pLR6.0	EcoRI	6 kb	EcoRI/SacI/NsiI	7.8 kb	HNPP junction
							1.7 kb	CMT1A junction dosage
CMT1A-REP	8,9	pLR7.8	pLR7.8	EcoRI	7.8 kb	EcoRI/SacI	3.2 kb	CMT1A junction
							7.8 kb	HNPP junction dosage
CMT1A-REP	10,11	proximal CMT1A-REP	pHK1.0P	EcoRI/PstI	1 kb	EcoRI	2.3 + 3.2 kb	CMT1A dosage
CMT1A-REP	11	proximal CMT1A-REP	pHK5.2P			EcoRI/HindIII	3.2 + 3.4 kb	CMT1A dosage
CMT1A-REP	12	proximal CMT1A-REP	pJ7.8P	EcoRI	7.8 kb	EcoRI/SacI	3.2 kb	CMT1A junction
							7.8 kb	HNPP junction dosage
	12	proximal CMT1A-REP	pJ5P	EcoRI	5 kb	EcoRI/HindIII	3.3, 3.1, 1.8, 1.7 kb	dosage

leistet, dass tatsächlich eine Duplikation beobachtet wird und nicht falsch-positive Signale aufgrund der Replikation in der Interphase in die Bewertung eingehen. Daher empfiehlt sich ein zweifarbig-er Ansatz. Um diagnostische Sicherheit zu erzielen, sollen mindestens 50, besser 100 Kerne bezüglich der CMT1A Signale relativ zur Kontrollsonde aus-gezählt werden. Prinzipiell gilt dies auch für die HNPP Deletion, wobei die Deletion auf Metaphase-Chromosomen klar er-kenubar ist, so dass man mit 10–30 Meta-phasen auskommt. Auf den ersten Blick erscheint diese Methode ideal, aber die

Qualität und Verlässlichkeit der FISH Resultate hängen stark von den Blutproben ab. Obwohl FISH im Prinzip auf ver-schiedene Gewebetypen angewandt wer-den kann, werden die besten Resultate mit Heparin-Blut und einer kurzen Kul-tivierung nach Eingang der Blutprobe er-zielt. Auch diese Methode hat einen An-teil von 10–30% an nicht interpretierbaren Resultaten. Dies kann die verschiedens-ten Gründe haben, wie z. B. Verwendung der falschen Blutröhrchen (Serum) oder ein langer Transport einhergehend mit ei-ner abnehmenden Qualität der Kerne, in anderen Laboratorien werden mittlerwei-

le 99% der Blutproben erfolgreich analy-siert.

b. Dosis-sensitive und andere Methoden

Southern-Hybridisierung

Die in [Tabelle 4](#) gezeigten Southern Hybridisierungen werden noch ange-wendet. Einen Nachteil der *MspI* Blots stellt die häufig beobachtete Homozygo-tie dar, die dann zu nicht-informativen RFLP Mustern führt. Die Verwendung von zwei Sonden entweder nacheinan-der (pVAW409R3a und pEW401HE)

Tabelle 5 Short Tandem Repeat (STR) Analysen

Locus	Lit.	STR	STR Typ	Allelgrösse (bp)	Allel Anzahl	PIC	H
D17S122	1	RM11-GT	CA-repeat	153-167	8		0,74
D17S261	2	Mfd41	CA-repeat	157-171	6	0,44	
D17S921	3	AFM191xh12	CA-repeat	174-183	10	0,69	0,73
D17S1356	4	142E8ac1	CA-repeat	145-157	7		0,48
D17S793	3	AFM165zd4	CA-repeat	99-109	7		0,70
D17S839	3	AFM200yb12	CA-repeat	155-175	5	0,47	0,56
D17S955	3	AFM317yg1	CA-repeat	187-181	4	0,40	0,45
D17S1357	4	103B11ac1	CA-repeat	194-210	6		0,57
D17S1358	4	133C4ac1	CA-repeat	182-194	7		0,74

Multiplex-Methoden und weitere Marker siehe Literaturverzeichnis 5, 6.

Tabelle 6 Relative Anordnung der häufig verwendeten RFLP/STR Marker

↑	Proximales CMT1A-REP
	D17S261
	D17S122
	D17S1357
	D17S1356
	D17S125
	D17S839
	D17S1358
	D17S61
	D17S955
	D17S921
↓	Distales CMT1A-REP

oder gleichzeitig (pVAW412R3 und pE-W401HE) hilft hier gewöhnlich weiter. Bei der Verwendung dieser Sonden muss man sich darüber bewusst sein, dass es sich um anonyme Marker handelt, die u. U. rearrangiert sein können, ohne dass eine CMT1A Duplikation oder HNPP Deletion vorliegt. Die Verwendung der Sonde pNEA102 mit *EcoRI* verdauter genomischer DNA ist für diagnostische Zwecke nicht empfehlenswert, da die Dosisunterschiede der Duplikation/Deletion nur geringfügig sind (4->5 CMT1A, 4->3 HNPP). Als ergänzende Sonde und für wissenschaftliche Zwecke ist pNEA102 jedoch durchaus brauchbar. Die pLR7.8 Sonde zusammen mit *EcoRI/SacI* verdauter DNA ist im Falle des Nachweises eines Bruchpunktfragmentes sehr hilfreich. Die Dosisunterschiede für Rekombinationen außerhalb des „hotspot“ sind dagegen schwer interpretierbar und sollten daher nur als Indikator für eine Rekombination verwendet werden, die eine zweite Analyse notwendig macht. Wie jüngere Daten zeigen, sind die CMT1A-

REP Elemente polymorpher als erwartet, daher sollte auch der Nachweis eines Bruchpunktfragmentes mit einer weiteren Methode bestätigt werden. Dies gilt ebenfalls, wenn keine Veränderung nachweisbar ist, denn dies kann schlicht den Verlust einer Restriktionsstelle bedeuten.

PCR Methoden basierend auf STR Markern (■ Tabellen 5 und 6)

Für STR basierende Methoden sind vielfältige Protokolle mittels Multiplex PCRs verfügbar. Es ist nicht empfehlenswert, nur einen Marker zu verwenden, mindestens zwei der Marker sollten positiv für drei Allele sein, um von einer CMT1A Duplikation auszugehen. Eine HNPP Deletion kann angenommen werden, wenn mehrere Marker nur ein Allel zeigen (Hemi- oder Homozygotie). Sollten nur Dosisunterschiede erkennbar sein, so ist eine zweite Methode angeraten, um den Typ der Mutation mit diagnostischer Korrektheit zu bestimmen.

An den CMT1A-REP Elementen orientierte PCR Analysen (■ Tabelle 7)

Die PCR basierten Methoden für die CMT/HNPP Bruchpunktfragmente wurden in mehreren Laboratorien erprobt. Diese Anwendungen ergaben zwei verschiedene Probleme:

1. Die PCR ist schwierig durchführbar und die Ergebnisse sind nur eingeschränkt reproduzierbar.
2. Die CMT1A-REP Elemente sind polymorpher als erwartet; dies beeinträchtigt hin und wieder die Bindung der Primer.

Daher erscheinen diese PCR Methoden für wissenschaftliche Zwecke durchaus

sinnvoll, allerdings nicht für eine diagnostische Routine. Es darf dabei nicht übersehen werden, daß nur ca. 70% der CMT1A Duplikationsträger ein Bruchpunktfragment aufgrund der Rekombination innerhalb des „hotspots“ aufweisen.

Quantitative PCR von exonischer PMP22 DNA (■ Tabelle 8)

Quantitative Methoden zur direkten Dosis-Quantifizierung während der Amplifikation sind verfügbar. Diese Methoden sind jetzt mehr verbreitet, bei tiefergehendem Interesse sollte das entsprechende Labor kontaktiert werden. Bei diesen Methoden ist es wichtig, im jeweiligen Labor eine Validierung anhand einer größeren Zahl bekannter CMT1A Duplikation und HNPP Deletionen vorzunehmen.

Multiplex Ligation-dependent Probe Analysis (MLPA)

MLPA ist eine vielversprechende Methode, um Dosis-Differenzen für alle Exons von PMP22 zu bestimmen. Dies ermöglicht den Nachweis von partiellen Duplikation und Deletionen innerhalb der CMT1A Region. Im allgemeinen erscheint die Methode sehr geeignet und schnell. Ein wiederkehrendes Problem ist, daß hiermit in einigen Laboratorien fehlerhafte Resultate erzielt werden. Daher ist es bei dieser Methode ebenfalls wichtig, im jeweiligen Labor eine Validierung anhand einer größeren Zahl bekannter CMT1A Duplikation und HNPP Deletionen vorzunehmen. Falls diese Proben nicht vorhanden sind, sollte ein Referenzlabor kontaktiert werden, um diese Methode zu etablieren, bevor eine Routinediagnostik angeboten wird.

Tabelle 7 Übersicht zu CMT1A-REP spezifischen PCR-Analysen			
Locus	Lit.	Methode	Primer Name
CMT1A-REP sequence proximal and distal	1,2,3, 4	DNA Sequenzierung von 6 Kontrollen	keiner
CMT1A-REP	5	PCR Analyse von Bruchpunktfragmenten + EcoRI und Nsil Verdau	distF proxR proxF distR
CMT1A-REP	6	PCR Analyse von Bruchpunktfragmenten + Nsil Verdau	DF1 (pos 1781-1805, distales CMT1A-REP) DF2 (pos 2394 - 2418, distales CMT1A-REP) DR1 (pos 5077 - 5101, distales CMT1A-REP) DR2 (pos 3574 - 3598, distales CMT1A-REP) PR1 (pos 5069 - 5093, proximales CMT1A-REP) PR2 (pos 3560 - 3584, proximales CMT1A-REP)
CMT1A-REP	7,8	PCR Analyse von Bruchpunktfragmenten + Nsil und Accl Verdau	primer A (pos 1785 - 1806, distales CMT1A-REP) primer B (pos 5069 - 5093, proximales CMT1A-REP) primer C (pos 3751 - 3771, distales CMT1A-REP) primer D (pos 3489 - 3509, distales CMT1A-REP)
CMT1A-REP	9	PCR Analyse von Bruchpunktfragmenten + EcoRI Verdau	CMT1A-FOR und HNPP-FOR CMT1A-REV HNPP-REV
CMT1A-REP	10	PCR Analyse von Bruchpunktfragmenten + EcoRI und Nsil Verdau + EcoRI und SacI Verdau	Rdist1 (pos 1500-1523, Sequenz HSU41165) Rprox2 (pos 5177 - 5154 Sequenz HSU41166)

Tabelle 8 Quantitative PCR		
Fragment	Lit.	Primer, Proben und Markierung
PMP22 kodierendes Exon 3	1	5'-GCCACCATGATCCTGTGAT-3' (forward) 5'-CCCTTGGTGAGGGTGAAGAGT-3' (reverse) 5'-FAM-TTCAGCATTCTGTCTGTCTCTGTTCTTCTG-TAMRA-3'
Albumin Exon 12 (Reporterfragment)		5'-AATGCTGCACAGAATCCTTGGT-3' (forward) 5'-tcatcgactccagagctgaaa-3' (reverse) 5'-VIC-ACAGGCGACCATGC-3' non-fluorescent quencher
PMP22 kodierendes Exon 4	2	5'-TCCCCTGGCCCTTCTC-3' (forward) 5'-CTGGGCGCCTCATTGC-3' (reverse) 5'-6FAM-CGGTGTCTATGTGATCTTGCGGAAA-TAMRA-3'
PMP22 kodierendes Exon 3	3	5'-TCTGTCCAGGCCACCATGA-3' (forward) 5'-GAAGAGTTGGCAGAAGAACAGGA -3' (reverse)
Albumin Exon 12 (Reporterfragment)		5'-TGTTGCATGAGAAAACGCCA-3' (forward) 5'-GTCGCCTGTTACCAAGGAT -3' (reverse)

Perspektiven der CMT1A Duplikations- und HNPP Deletions-Analyse

Die Verfügbarkeit der Chip-Technologie eröffnet zwei Wege zur Analyse genomischer Rearrangements. Eine Methode verwendet BAC Klone und CGH Fluoreszenz Analysen, um größere Rearrangements sichtbar zu machen. Die Verfügbarkeit von SNP Chips hoher Dichte ermöglicht eine Auswertung auch mit Blick auf genomische Rearrangements. Diese Methoden sind in der Entwicklung und stehen wohl in naher Zukunft für eine Routine-Analyse zur Verfügung.

4.2.2 Nachweis von Punktmutationen

Sequenzanalysen

Nach dem Ausschluss einer CMT1A Duplikation oder HNPP Deletion bieten die meisten Laboratorien eine Sequenzanalyse einiger der bekannten Gene für CMT an. Die Anzahl der Neuropathie-assoziierten Gene hat in den letzten Jahren dramatisch zugenommen, daher gibt es große Unterschiede in der Auswahl der analysierten Gene in den verschiedenen Laboratorien.

Eine übliche diagnostische Prozedur nach dem Duplikations/Deletions-test ist die Sequenzierung von *GJB1*, *MPZ* und *PMP22*. *EGR2* Mutationen sind selten, sollten aber in Betracht gezogen werden. Sofern weitere Angaben zur Familiengeschichte und Vererbung verfügbar sind, sollten auch Mutationen für rezessiv vererbte Neuropathien in Betracht gezogen werden. Eine Kopplungsanalyse ist angezeigt, um die chromosomale Lokalisierung der jeweiligen Mutation einzugrenzen. In vielen Fällen ist das verantwortliche Gen bekannt und steht damit für eine Analyse zur Verfügung. In Industrieländern werden häufig compound heterozygote Mutationen für autosomal-rezessive Formen beobachtet, dies beeinflusst die genetische Beratung.

Für die CMT2 wird in der Regel *MFN2* gefolgt von *GJB1* und *MPZ* analysiert.

Für diagnostische Zwecke sollte die Sequenzanalyse für beide DNA Stränge erfolgen. Ein wiederkehrendes Problem ist ein Allelverlust z. B. aufgrund von SNPs in der Primerbindungsstelle. Es gibt mehr

und mehr öffentlich zugängliche Information, um derartige Variationen beim Primerdesign weitestgehend auszuschließen. Im Zweifelsfalle sollte ein zweites Primerset in größerer Entfernung vom Exon designed und verwendet werden. Gegenwärtig sind keine für derartige SNPs geprüfte PCR Primer kommerziell verfügbar. Daher sollte dies im einzelnen Laboratorium für eine Abschätzung der diagnostischen Verlässlichkeit durchgeführt werden. Für alle Kandidatengene der peripheren Neuropathien wurden PCR Primer publiziert, aber gegenwärtig sind noch keine Daten für einen Allelverlust dieser Gene verfügbar. Individuelle Primer Sequenzen für Sequenzanalysen werden daher in diesen Leitlinien noch nicht empfohlen.

Andere Methoden zum Nachweis von Sequenzvariationen

Heteroduplexanalysen, Single Strand Conformation Polymorphismus Analysen (SSCP), dHPLC und weitere Techniken werden zur Voruntersuchung verwendet. Die Auflösung dieser Methoden hängt von der Natur der DNA Probe, der Länge des PCR Produkts, den Reaktionsbedingungen etc. ab. Sollte hiermit keine Variation gefunden werden, bleibt eine gewisse Unsicherheit, daher wird häufig eine Sequenzierung durchgeführt. Erscheint andererseits ein auffälliges Muster, so ist eine Sequenzierung zur Bestätigung der Mutation angeraten. Aus diesem Blickwinkel erscheint die Sequenzierung als die Methode der Wahl, auch im Interesse des Patienten, der eine Diagnose in einem überschaubaren Zeitrahmen erwartet.

5. Untersuchungsmaterial

Üblicherweise wird DNA aus peripheren Lymphozyten extrahiert und für die weitere Analyse verwendet. Für die PFGE und FISH werden ganze Zellen oder Zellkerne benötigt, die Etablierung lymphoblastoider Zelllinien ist ebenfalls manchmal hilfreich. Für die DNA Extraktion sind unterschiedliche Methoden verfügbar, am verbreitetsten ist die Aussalz-Methode, es werden aber auch Silica-basierte Methoden berichtet.

Andere Gewebe sind in Abhängigkeit der Analysemethode ebenso geeignet, EPON eingebettete Biopsien sind jedoch für DNA-orientierte Analysen völlig ungeeignet.

6. Kontrollen

Für den Nachweis der CMT1A Duplikation / HNPP Deletion sollten DNA Proben mit typischer CMT1A Duplikation, HNPP Deletion und eine gesunde Kontrolle eingeschlossen werden. Diese Kontrollen helfen bei der Identifizierung von beispielsweise partiellen Verdaus oder von Polymorphismen der RFLPs. Auch für die Sequenzanalysen sind DNA Proben mit bekannten Mutationen empfehlenswert.

7. Pränatale Diagnose

Eine Pränataldiagnose wird von einigen CMT-Zentren angeboten. Nachdem die Pränataldiagnostik ähnlich zur Präimplantationsdiagnostik von nationalen Gesetzen geregelt wird und die Nachfrage gering ist, wird empfohlen, dass die individuellen Laboratorien/Länder zunächst ihre eigenen Regeln definieren bis eine europäische Gesetzgebung erfolgt. Allerdings gibt es für eine Pränataldiagnose einige grundlegende Unterschiede zur Individualdiagnose eines einzelnen Patienten. Für die CMT Erkrankung sollte einerseits die Mutation eines Elternteils bekannt sein, andererseits sollte bei einer erkrankten Mutter, wie üblich, eine maternale Kontamination der analysierten Amnionzellen bzw. Chorionzotten mittels Mikrosatelliten ausgeschlossen werden. Für eine paternale Vererbung sollte ebenfalls mittels Mikrosatelliten sichergestellt werden, dass tatsächlich embryonales Gewebe analysiert wurde.

8. Kopplungsanalyse

Eine Kopplungsanalyse kann nach wie vor für Patienten mit klarem Phänotyp ohne nachweisbare Mutation hilfreich sein. Dies kann der Fall sein, wenn keine CMT1A Duplikation gefunden wurde, eine PMP22 Mutation jedoch anzunehmen, aber nicht nachweisbar ist (z. B. intronische Mutationen).

9. Sonden

Alle in diesen Leitlinien erwähnten Sonden sind über das europäische CMT Konsortium sowie die nationalen Kontaktlaboratorien verfügbar, Bakterienstämme mit den entsprechenden Plasmiden können in jedem Labor gezüchtet werden, das die diagnostische Prozedur durchführt. Kommerziell verfügbare Proben für diagnostische Zwecke sind gegenwärtig nicht bekannt.

10. PCR Primer

Primersequenzen, PCR Bedingungen etc. sind auf mehreren homepages öffentlich zugänglich (vgl. Punkt 12.). Der MLPA PMP22 Kit ist bei MRC-Holland kommerziell verfügbar.

11. Interpretation

Der Nachweis einer CMT1A Duplikation oder einer HNPP Deletion kann als krankheitsverursachende Mutation für die Neuropathie des Patienten interpretiert werden. Allerdings kann eine Wiederholung der klinischen Untersuchung notwendig werden, da nicht alle Duplikationsträger eine NLG unterhalb des Schwellenwertes von 38 m/s haben. Ebenso können Träger einer HNPP Deletion einen CMT-ähnlichen Phänotyp haben. In seltenen Fällen kann die klinische Diagnose einer Friedreichschen Ataxie durch den Nachweis einer CMT1A Duplikation geändert werden.

Die Abwesenheit einer Duplikation/Deletion ist kein Ausschlusskriterium für eine CMT1A/HNPP. Nicht alle Methoden sind 100% sensitiv, mit einigen Methoden werden nur 70% der Duplikationen gefunden. Darüberhinaus kann eine CMT durch Mutationen in anderen Genen verursacht werden, eine HNPP auch durch Punktmutationen in PMP22 selbst.

Wenn eine klare klinische Diagnose CMT/HNPP vorliegt, ist eine weiterführende Analyse empfehlenswert. Der Nachweis einer Sequenzvariation kann als krankheitsverursachend interpretiert werden, sofern die Variation zusammen mit einem Phänotyp publiziert wurde. Sollte es eine noch unbekannt Variation sein, so sollte sie in 100 Kontrollen nicht nach-

weisbar sein. Im Zweifelsfalle sollte ein Referenzlabor kontaktiert werden.

12. Web Quellen

<http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/default.cfm>
<http://www.molgen.ua.ac.be/CMT/Protocols/DefaultProtocols.cfm>
<http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/nother/myelin.html>
<http://imgen.bcm.tmc.edu/molgen/lupski/>
<http://www.charcot-marie-tooth.org>
<http://www.mlpa.com/>

13. Literatur

CMT/HNPP Diagnostik im Allgemeinen

- De Visser, M. (1993) Diagnostic criteria for autosomal dominant hereditary motor and sensory neuropathy type 1a. *Neuromusc.Disord.* 3:77-79.
- Dyck, P.J., Chance, P., Lebo, R. and Carney, J.A. (1993) Hereditary motor and sensory neuropathies. In: *Peripheral Neuropathy*, edited by Dyck, P.J., Thomas, P.K., Griffin, J.W., Low, P.A. and Poduslo, J. F. Philadelphia: W.B. Saunders Company, p. 1094-1136.
- Lupski, J.R. (1996) DNA diagnostics for Charcot-Marie-Tooth disease and related inherited neuropathies. *Clin.Chem.* 42:995-998
- De Visser, M., Van Broeckhoven, C. and Nelis, E. (1997) Hereditary motor and sensory neuropathy or Charcot-Marie-Tooth disease types 1A and B. In: *Diagnostic criteria for neuromuscular disorders*, edited by Emery, A.E.H. London: Royal Society of Medicine Press, p. 49-52.
- Fuchs, C., Liehr, T., Oezbey, S., Ekici, A., Grehl, H., Rautenstrauss, B. (1998) Charcot-Marie-Tooth disease type 1A and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies: a SacI polymorphism in the proximal CMT1A-REP elements may lead to genetic misdiagnosis. *Neurogenetics* 2: 43-46
- Haites, N.E., Nelis, E. and Van Broeckhoven, C. (1998) 3rd workshop of the European CMT consortium: 54th ENMC international workshop on genotype/phenotype correlations in Charcot-Marie-Tooth type 1 and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies, 28-30 November 1997, Naarden, The Netherlands. *Neuromusc.Disord.* 8:591-603
- De Jonghe, P., Timmerman, V., Van Broeckhoven, C. (1998) and workshop participants. 2nd workshop of the European CMT consortium: 53rd ENMC international workshop on classification and diagnostic guidelines for Charcot-Marie-Tooth type 2 (CMT2 - HMSN II) and distal hereditary motor neuropathy (distal HMN - spinal CMT), 26-28 September 1997, Naarden - The Netherlands. *Neuromusc. Disord.* 8:426-431
- Martin, J.-J., Brice, A. and Van Broeckhoven, C. (1999) 4th Workshop of the European CMT-Consortium - 62nd ENMC International Workshop: Rare forms of Charcot-Marie-Tooth disease and related disorders, 16-18 October 1998, Soestdunien, The Netherlands. *Neuromusc.Disord.* 9:279-287
- Kashork CD, Chen KS, Lupski JR, Shaffer LG (1999). Prenatal diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A by interphase fluorescence in situ hybridization. *Prenat Diagn.* 19(5):446-449

- De Jonghe, P., Nelis, E., Timmerman, V., Löfgren, A., Martin, J.-J. and Van Broeckhoven, C. (1999) Molecular diagnostic testing in Charcot-Marie-Tooth disease and related disorders: approaches and results. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 883:389-396.
- Dubourg, O., Mouton, P., Brice, A., LeGuern, E. and Bouche, P. (2000) Guidelines for diagnosis of hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Neuromuscul Disord* 10(3):206-208
- Lupski, J. R. and Garcia, C.A. (2001) Charcot-Marie-Tooth peripheral neuropathies and related disorders. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases Eighth Edition* (Eds.: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, D. Valle, B. Vogelstein, and B. Childs) McGraw-Hill, New York.
- Bernard R, Boyer A, Negre P, Malzac P, Latour P, Vandenberghe A, Philip N, Levy N (2002) Prenatal detection of the 17p11.2 duplication in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: necessity of a multidisciplinary approach for heterogeneous disorders. *Eur J Hum Genet.* 10(5):297-302.
- Saifi GM, Szigeti K, Snipes GJ, Garcia CA, Lupski JR. (2003) Molecular mechanisms, diagnosis, and rational approaches to management of and therapy for Charcot-Marie-Tooth disease and related peripheral neuropathies *J Investig Med.* 51(5):261-283
- Kuhlenbäumer G, Stögbauer F, Ringelstein EB, Young P (eds) (2005) *Hereditary Peripheral Neuropathies*. Steinkopff Verlag, Darmstadt.
- Shy, M., Dyck, Peter J., Chance, Philipp F., Lupski, James R., Klein, Christopher J. (2005) *Hereditary Motor and Sensory Neuropathies. Peripheral Neuropathy, 4th Edition*, eds. Peter James Dyck, MD and P. K. Thomas, Elsevier Saunders, Philadelphia.

MLPA und Chip Technologie

- Slater H, Bruno D, Ren H, La P, Burgess T, Hills L, Nouri S, Schouten J, Choo KH (2004). Improved testing for CMT1A and HNPP using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) with rapid DNA preparations: comparison with the interphase FISH method. *Hum Mutat.* 24(2):164-171.
- Rauch A, Ruschendorf F, Huang J, Trautmann U, Becker C, Thiel C, Jones KW, Reis A, Nurnberg P (2004). Molecular karyotyping using a SNP array for genome-wide genotyping. *J Med Genet.* 41(12):916-922.
- Cheung SW, Shaw CA, Yu W, Li J, Ou Z, Patel A, Yatsenko SA, Cooper ML, Furman P, Stankiewicz P, Lupski JR, Chinault AC, Beaudet AL (2005). Development and validation of a CGH microarray for clinical cytogenetic diagnosis. *Genet Med.* 7(6):422-432.

Präimplantations-Diagnostik

- De Vos, A., Sermon, K., Van de Velde, H., et al. (1998) Pregnancy after preimplantation genetic diagnosis for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Mol.Hum.Reproduction* 4:978-984

Tabelle 2

1. Raeymaekers et al. (1992) *J. Med. Genet.*, 1:93-97.
2. Timmerman et al. (1992) *Nature Genet.*, 1: 171-175
3. Lorenzetti et al. (1995) *Am. J. Hum. Genet.*, 56:91-98
4. Roa et al. (1995) *LabMedica*, 12 (4):22-24.
5. Timmerman et al. (1996) *Hum. Genet.*, 97:26-34
6. Kennerson et al. (1995) *Clinical Chemistry*, 41:1534-1535.

Tabelle 3

1. Rautenstrauss et al. (1997) J. Per. Nerv. Syst., 2:319-322
2. Liehr et al. (1997) Acta. Neuropathol., 94:266-271
3. Shaffer et al. (1997) Am. J. Med. Genet. 69(3):325-331
4. Rautenstrauss et al. (1998) Int. J. Mol. Med., 1:333-337

Tabelle 4

1. Raeymaekers et al. (1991) Neuromusc. Dis., 1:93-97.
2. Wright et al. (1990) Genomics, 7:103-109.
3. Raeymaekers et al. (1992) J. Med. Genet., 1:93-97.
4. Bost et al. (1994) Clin. Genet., 46:380-381
5. Spreyer et al. (1991) EMBO J., 10:3661-3668
6. Patel et al. (1992) Nature Genet., 1:159-166
7. Lorenzetti et al. (1995) Am. J. Hum. Genet., 56:91-98
8. Reiter et al. (1996) Nature Genet., 12:288-297
9. Timmerman et al. (1997) J. Med. Genet., 34:43-49
10. Ikegami et al. (1997) Hum. Mut., 9:563-566.
11. Yamamoto et al. (1997) Hum. Genet. 99:151-154.
12. Lopes et al. (1996) Am. J. Hum. Genet., 58:1223-1230

Tabelle 5

1. Lupski et al. (1991) Cell, 66:219-232
2. Weber et al. (1990) Nucl. Acids Res., 18:4640
3. Cudrey et al. (1995) J. Med. Genet., 32:231-233
4. Blair et al. (1995) Clin. Chem., 41:1105-1108
5. Seeman et al. (2000) Int J Mol Med. 6(4):421-426
6. Latour et al. (2001) Clin Chem. 47(5):829-837

Tabelle 7

1. <http://www.bcm.tmc.edu/molgen/lupski>
2. GenBank nr. U41165 (distal) and U41166 (proximal)
3. Reiter et al. (1996) Nature Genet., 12:288-297
4. Reiter et al. (1998) Am. J. Hum. Genet., 62:1023-1033
5. Haupt et al. (1997) Hum. Genet. 99:688-691
6. Yamamoto et al. (1998) Hum. Mut. 11:109-113
7. Chang et al. (1998) Clin. Chem., 44:270-274
8. Stronach et al. (1999) J. Per. Nerv. Syst., 4:117-122
9. Bernard et al. (2000) Eur. J. Hum. Genet., 8:229-235

Tabelle 8

1. Thiel et al. (2002) Eur J Hum Genet 11:170-178
2. Patitucci et al. (2005) Neuromusc Disord; 15:488-492
3. Kim et al. (2003) J Korean Med Sci; 18:727-732

Verfahren zur Konsensbildung

Die **Erstellung der vorangegangenen Version** dieser Leitlinie erfolgte unter Beteiligung folgender Institutionen und Personen:

„Best Practice“ Workshop in Amsterdam, 27. Mai 2000, mit Unterstützung durch das European Molecular Genetics Quality Network (EMQN). (Europäischen Union, Vertrag Nr. SMT4-CT98-7515)

Erstveröffentlichung: medgen 13 (2001) 309–314

1. Überarbeitung: „Best Practice“ Workshop in Antwerpen, 7. Juli 2004, mit Unterstützung durch den BVDH und European Molecular Genetics Quality Network (EMQN)
Autoren: Bernd Rautenstrauss, James R. Lubski, Vincent Timmerman

2. Überarbeitung: Oktober 2009

Autoren:

Bernd Rautenstrauss, Eva Nelis
MGZ Medizinisch Genetisches Zentrum
Bayerstraße 3–5
80335 München

Ludwig-Maximilians-Universität
Friedrich-Baur-Institut
Ziemssenstraße 1a
80336 München

T: +49-(0)89-3090886-0 (Durchwahl -520)

F: +49-(0)89-3090886-66

email: rautenstrauss@mgz-muenchen.de

Überprüfung geplant: September 2010