

مقاله پژوهشی

بررسی مولکولی پدیده مضاعف شدگی در ژن PMP22 در بیماران شارکوت ماری توث به روش MLPA و PCR-RFLP

اسماعیل محمدی پرگو^۱، امید آریانی^۲، سید حسن تنکابنی^۳، پریچهر یغمایی^۱،
مجید صادقی زاده^۴، مسعود هوشمند^{۵*}

- ۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
- ۲- مرکز پزشکی خاص، دپارتمان ژنتیک پزشکی، تهران، ایران
- ۳- بیمارستان مفید، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- ۴- دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۵- مرکز ملی و مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی، تهران، ایران

چکیده

نوروپاتی حسی و حرکتی ارثی (HMSN) را بیماری شارکوت-ماری-توث نامیده اند که در گروه نوروپاتی هنتروژنوس است که با ضعف پیشرونده عضلات، تحلیل عضلات دیستال و اغلب با فقدان حسی متوسط و خفیف، بد شکلی یا همچون قوس بیش از حد کف پا و کف پای صاف، اختلال در راه رفتن و کاهش تاندون‌های رفلکسی عمقی مشخص می‌شود. این ناهنجاری را می‌توان براساس یافته‌های الکتروفیزیولوژیکال (به شکل ناهنجاری‌ها غلاف میلین، آکسون یا ترکیبی از این دو ناهنجاری) ویا براساس الگوی توارث (اتوزومال غالب، اتوزومال مغلوب و وابسته به X) می‌توان تقسیم بندی کرد. از ۶۷ فرد مبتلا به این بیماری، که براساس الگوی توارث، فنوتیپ و یافته‌های الکتروفیزیولوژیکال برای بررسی مولکولی مضاعف شدگی در ژن PMP22 کاندید شدند. برای تشخیص ناحیه مضاعف شدگی در ژن PMP22 از روش PCR-RFLP شد. لازم به ذکر است بدلیل اینکه در این روش مولکولی حدود ۳۰٪ از بیماران، به علت هموزیگوت بودن و همچنین وجود جهش‌های جدید در ناحیه مضاعف شدگی قادر به تشخیص نبوده بنابراین تعدادی از نمونه‌ها برای بررسی کامل تر با استفاده از تکنیک MLPA که بهترین روش تشخیصی برای مضاعف شدگی و حذف‌ها می‌باشد مورد بررسی قرار گرفتند. یافته‌ها حاکی از آن است که از ۶۷ بیمار مورد بررسی برای مضاعف شدگی، ۳۶٪ از بیماران مثبت گزارش داده شدند.

واژگان کلیدی: PMP22؛ CMT1A؛ PCR-RFLP؛ MLPA.

مقدمه

شدند. در این میان شارکوت ماری توث بیش از ۹۰٪ نوروپاتی‌های محیطی ژنتیکی را شامل می‌شود. به همین دلیل این بیماری را شایعترین نوروپاتی حرکتی و حسی ارثی در سیستم عصبی محیطی انسان نیز می‌نامند. میزان شیوع این بیماری^۴ در ۲۵۰۰ تولد گزارش شده است (۱).

نوروپاتی‌های محیطی وراثتی، اولین بار در سال ۱۸۸۶ توسط جان مارتین شارکوت^۱ که کاشف دو بیماری ALS و MS نیز می‌باشد و پیر ماری^۲ از فرانسه وهاوارد هنری توث^۳ از انگلستان شرح داده

* مسعود هوشمند، PhD

بخش ژنتیک پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک، تهران، ایران
تلفن: ۰۲۱-۴۴۵۸۰۳۹۰

پست الکترونیک: massoudh@nigeb.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۴/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۶/۱۶

1. Jean Martin Charcot
2. Pierre Marie
3. Howard Henry Tooth
4. Median Nerve Conduction Velocity

وابسته به X ناهنجاری‌های آکسونی همراه با تغییرات ثانویه میلین را منجر می‌شود. لازم به ذکر است که الگوی نحوه توارث، در انواع مختلف CMT غالباً به صورت اتوزومال غالب بوده، در صورتی که در CMT4 غالباً نحوه توارث به صورت اتوزومال مغلوب و در پاره ای از موارد به صورت اتوزومال غالب می‌باشد و همچنین CMTX به صورت وابسته به جنس می‌باشد(۲). جدول زیر خلاصه ای از ژن‌های درگیر، نحوه توارث، روش بررسی مولکولی و درصد فراوانی بیماران در انواع مختلف CMT طبق الگوی استاندارد جهانی می‌باشد.

علائم بیماری شارکوت ماری توت

در حالت کلاسیک، بیماری CMT با تحلیل عضلانی عضلات دیستال اندام تحتانی شروع می‌شود که منجر به ایجاد نمای پای لک لک^۵ در ساق پای بیماران می‌گردد، به همین دلیل این بیماری را آتروفی پرونتال پا می‌نامند.

به دنبال ضعف و آتروفی عضلات خارج ساق پا، بیمار دچار افتادگی پا می‌شود و به دلیل اینکه عضلات مخالف در ساق پای بیمار همچنان قوی مانده اند، کف پا افزایش قوس پیدا کرده و پای High Arch

اولین بار در سال ۱۹۸۰ بیماری CMT از لحاظ کلینیکی براساس مقدار سرعت انتقال عصبی در فیبرهای حرکتی اعصاب محیطی طبقه بندی شد (MNCV)، این ناهنجاری را می‌توان براساس یافته‌های الکتروفیزیولوژیکی (به شکل ناهنجاری‌ها غلاف میلین، آکسون یا ترکیبی از این دو ناهنجاری) و یا براساس الگوی توارث (اتوزومال غالب، اتوزومال مغلوب و وابسته به X) تقسیم‌بندی کرد. اگر چه در سال‌های اخیر پیشرفت‌های بسیاری در شناخت پایه ژنتیکی این بیماری حاصل گشته است ولی همچنان این تقسیم بندی کاربردی خود را جهت نزدیک‌تر شدن به تشخیص حفظ کرده است. در تقسیم بندی انواع CMT می‌توان به فرم دمیلینه شونده با MNCV کمتر از ۳۸ m/sec که در بررسی عصب پشت ساق پا دیده می‌شود، که به CMT1 معروف است و همچنین فرم آکسونوپاتی با MNCV بیشتر از ۳۸ m/sec که به آن CMT2 نیز می‌گویند. CMT3 یک نوروپاتی دمیلینه کننده شدید است که در نوزادی شروع می‌شود. لازم به ذکر است حد نرمال MNCV، ۴۵ m/sec می‌باشد. CMT حدواسط نیز ترکیبی از ناهنجاری‌های آکسونی و میلینی را ایجاد می‌کند. CMT4 ناهنجاری‌های آکسونی یا میلینی و CMT

CMT انواع	الگوی توارث	زیر گونه CMT	نام ژن	روش بررسی مولکولی	در CMT درصد فراوانی نقاط مختلف دنیا
CMT1	AD	CMT1A	PMP22 duplication	PCR-RFLP & MLPA	~% ۵۰
		CMT1E	PMP22	PCR-Sequencing	
		CMT1B	MPZ	PCR-Sequencing	
		CMT1D	EGR2	PCR-Sequencing	
CMT2	AD	CMT2A2	MFN2	PCR-Sequencing	~% ۲۰-۴۰
CMT4	AR>>AD	CMT4A	GDAP1	PCR-Sequencing	نادر
CMTX	XLD	CMTX1	GJB1	PCR-Sequencing	~% ۱۰-۲۰

دیگری در نسل بالاتر بوده و در پاره ای از موارد به صورت تک موردی نیز مشاهده شدند) که بیماران پس از بررسی شجره نامه و آزمایشات پاراکلینیکی جهت رد کردن سایر نوروپاتی‌های مزمن به تشخیص رسیدند. سپس از هر بیمار به میزان ۱۰ میلی‌لیتر خون گرفته و داخل لوله‌های حاوی ده درصد EDTA ریخته شد. استخراج DNA به روش فنل کلروفرم صورت گرفت. پرایمرهای مورد استفاده در این طرح با استفاده از نرم افزار موجود در سایت NCBI و در قسمت Primer Blast مورد آزمایش قرار گرفت و بعد از صحت توالی پرایمرهای با استفاده از دستگاه ترموسایکلر، قطعات مورد نظر PCR شد (۹۵C°، ۵ دقیقه به میزان یک چرخه، ۹۵C°، ۱ دقیقه، ۵۷C°، ۱ دقیقه و ۷۲C°، ۲ دقیقه به میزان ۳۲ چرخه و ۷۲C°، ۱۰ دقیقه به میزان یک چرخه و در نهایت ۵ دقیقه برای رساندن دمای ۷۲C° به دمای محیط).

نحوه تشخیص بیماران CMT1A با روش مولکولی PCR-RFLP

نقطه داغ^{۱۲} برای نواحی انفصال^{۱۳} در ۳/۲ کیلوبازی ناحیه تکراری CMT1A که حدود ۷۵٪ موارد بازآرایی را در این بیماری به خود اختصاص می‌دهد. نقطه داغ کراسینگ اور نوع ۱ که اکثر موارد کراسینگ نابرابر در این ناحیه صورت پذیرفته و نقطه داغ کراسینگ اور نوع ۲ با احتمال کراسینگ اور نابرابر کمتر که در قسمت دیستال توالی تکراری CMT1A قرار گرفته است. ژن PMP22 بین دو توالی تکراری که بسیار به هم مشابهند، قرار گرفته که اصطلاحاً به آنها نواحی دیستال و پروکسیمال توالی تکراری CMT1A می‌گویند (۸).

روش مولکولی در این تحقیق PCR-RFLP می‌باشد که از دو جفت پرایمر با توالی خاص استفاده شد. پرایمر (3'AGGAGCCCTCAATCAGTGGAA) که نوکلئوتید A نزدیک 3'OH پرایمر منجر به اتصال اختصاصی آن به ناحیه دیستال توالی تکراری شده و پرایمر مکمل آن یعنی پرایمر C

(پس کاووس) ایجاد می‌گردد. به دنبال این تغییر شکل، راه رفتن بیمار نیز دچار اختلال گشته و فرد به صورت استیپاژ^۶ گام بر خواهد داشت. همراه با افزایش قوس کف پای بیمار و به دنبال ضعف عضلات کوچک در انگشتان پای وی حالت انگشت چکشی^۷ ایجاد می‌گردد، که بر اثر آن مفصل میانی انگشتان پا به سمت بالا خم می‌شود. با پیشرفت سیر بیماری ضعف و آتروفی عضلات ممکن است در قسمت دیستال اندام فوقانی (دستها) هم بروز یابد.

در این حالت افتادگی مچ دست^۸ و نمای دست چنگ شده^۹ ایجاد و در نتیجه بیمار بیشتر دچار اختلال در انجام امور ظریف مثل باز و بسته کردن دکمه‌ها، نوشتن و ... خواهد بود. در این نوروپاتی ارثی در مراحل اولیه بیماری عمدتاً فیبرهای حرکتی اعصاب محیطی درگیر می‌شوند ولی با پیشرفت بیماری به درجاتی فیبرهای حسی نیز درگیر خواهند شد.

ناهمگونی ژنتیکی CMT1

CMT1، در اثر ناهنجاری در غلاف میلین ایجاد می‌شود و تاکنون در ۵ ژن ایجاد کننده شارکوت ماری توت تیپ ۱ با توارث اتوزومال غالب جهش گزارش شده است. رایج ترین جهش با فرکانس تقریبی ۶۰٪ در تمام موارد CMT، مضاعف شدگی^{۱۰} ناحیه ۱/۵ Mb در ناحیه 17p11.2-p12 می‌باشد (۳و۴). اگرچه حدود ۷۰ ژن در ناحیه 17p11.2-p12 وجود دارد ولی فقط ژن پروتئین میلین محیطی (PMP22) نقش اصلی را در بیماری CMT1A بازی می‌کند. ژن PMP22 دارای ۴ اگزون^{۱۱} می‌باشد و یک پروتئین ۲۲ کیلو دالتونی را کد می‌کند که ۲ تا ۵٪ میلین سیستم عصبی را تشکیل می‌دهد. بطور عمده سلولهای شوان این پروتئین را تولید می‌کنند. این ژن در بخش فشرده همه فیبرهای میلینه سیستم عصبی محیطی بیان می‌شود. زیاد شدن این ژن موجب غیر طبیعی شدن ساختار و عملکرد غلاف میلین می‌گردد که در این حالت بیماران ضعف و تحلیل عضلانی را در آغاز نوجوانی تجربه می‌کنند (۵). جالب توجه آنکه جهش‌های نقطه‌ای در ژن PMP22 نیز می‌توانند فنوتیپ CMT1A را ایجاد سازند (۶و۷).

مواد و روش

از ۶۷ فرد مشکوک به CMT1A (غالباً به جز پروباند فرد درگیر

5. Stork leg
6. High stepped gait
7. Hammer toes
8. Drop wrist
9. Claw hand
10. Duplication
11. Exon
12. Hot spot
13. Breakpoint

آنزیمی محصولات بدست آمده را روی ژل آگارز برای تشخیص بهتر روی ژل آکريل آميد (۸٪ و ۱۲٪) برده و از روی الگوی متفاوت برش به تشخیص فرد بیمار اقدام شد. همانطوری که در شکل ۲-۳ مشاهده می‌شود در محصول PCR الی فرد سالم بعد از هضم آنزیمی هیچ برشی صورت نگرفته (۱۹۸۶ جفت باز) ولی در محصول PCR بیماران CMT1A از نوع ۱ آنزیم اثر کرده و در ژل علاوه بر باند ۱۹۸۶ جفت بازی باندهای ۱۹۷ و ۱۷۸۹ جفت بازی حاصل هضم آنزیمی دیده می‌شود (شکل ۱).

برای بررسی بیماران CMT1A نوع ۲ از هضم آنزیمی محصول PCR حاصل از جفت پرایمر B و D (۱۶۰۴ جفت باز) که علاوه بر ناحیه پروکسیمال، منطقه نوترکیبی در این ناحیه را پوشش می‌دهد، استفاده شد. الگوی باندی که حاصل از هضم آنزیمی توسط دو آنزیم Nsi1 و Acc1 می‌باشد، بدین صورت است که در الی فرد بیمار فقط یک جایگاه شناسایی برای آنزیم Acc1 وجود دارد (باندهای ۳۳۶ و ۱۲۵۸ را ایجاد می‌کند) ولی در محصول PCR الی فرد سالم هر دو جایگاه برشی برای این آنزیم‌ها موجود می‌باشد و بعد از هضم علاوه بر باند ۱۲۵۸، باندهای ۲۶۵ و ۷۱ که حاصل عمل آنزیم Nsi1 می‌باشد را نیز مشاهده می‌کنیم. (شکل ۲).

در این روش حدود ۳۰٪ از افراد مبتلا به این بیماری به علت نوترکیبی‌های جدید در این ناحیه و همچنین افراد مبتلایی که برای این بیماری هموزیگوت می‌باشند را نمی‌توان با این روش تشخیص داد. در این موارد از روش‌های تشخیصی مكملی همچون MLPA (برای انجام این آزمایش نمونه‌ها به خارج از کشور ارسال گردید و سپس توسط کیت MPLA شرکت SALSA) MRC Holland (MLPA KIT P033-B2 CMT1) مورد بررسی قرار گرفتند.

CMT1 تقریباً ۵۰٪ کل انواع CMT را تشکیل داده و منجر به ایجاد ناهنجاری‌های غلاف میلین می‌شوند. از ۶۷ بیمار مورد بررسی با استفاده از روش PCR-RFLP تنها در ۱۶ بیمار پدیده مضاعف شدگی در ژن PMP22 تشخیص داده شد. لازم به ذکر است که به دلیل نوترکیبی‌های جدید در ناحیه مضاعف شدگی و همچنین هموزیگوت بودن افراد مورد مطالعه این روش تشخیصی تا ۷۰٪ قابل اطمینان بوده و برای ۳۰٪ باقی مانده از روش تشخیصی مكمل MLPA (برای انجام این آزمایش نمونه‌ها به خارج از کشور ارسال گردید) استفاده شد. روش PCR-RFLP مورد استفاده بدلاپی

(ACAAGAGTTCAAGTAACTTGC) می‌باشد. این جفت پرایمر ناحیه دیستال توالی تکراری الی سالم و همچنین ناحیه نوترکیب الی فرد بیمار نوع ۱ را پوشش می‌دهد. جفت دیگر پرایمر مورد استفاده که نوع ۲ کراسینک اور در این بیماری را شناسایی می‌کند از پرایمری به نام B (3' ACAGATGGAATAGTAGAGCTCACTC 5') که ۶ باز انتهایی نزدیک به OH ۳ آن منجر به اختصاصی شدن این پرایمر برای ناحیه پروکسیمال می‌شود و پرایمر مكمل آن یعنی پرایمر D (TGCTTCGTTGAGAGAAACAG) ناحیه پروکسیمال الی فرد سالم و همچنین ناحیه نوترکیبی الی فرد بیمار نوع ۲ را نیز پوشش می‌دهد. در این روش برای تمیز دادن فرد نرمال از بیمار از آنزیم‌های محدود الاثر بر روی محصولات PCR این جفت پرایمر می‌توان بهره جست (۸).

محصولات بدست آمده از PCR را روی آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز شدند و پس از مشاهده باندهای حدود ۲ کیلوباز (برای B و D) ۱۶۰۴ جفت باز (و برای A و C) ۱۹۸۶ جفت باز)) نمونه‌ها پس از تأیید باند برای هضم آنزیمی (برای محصول PCR حاصل از پرایمرهای B و D) طبق دستور زیر آماده شدند:

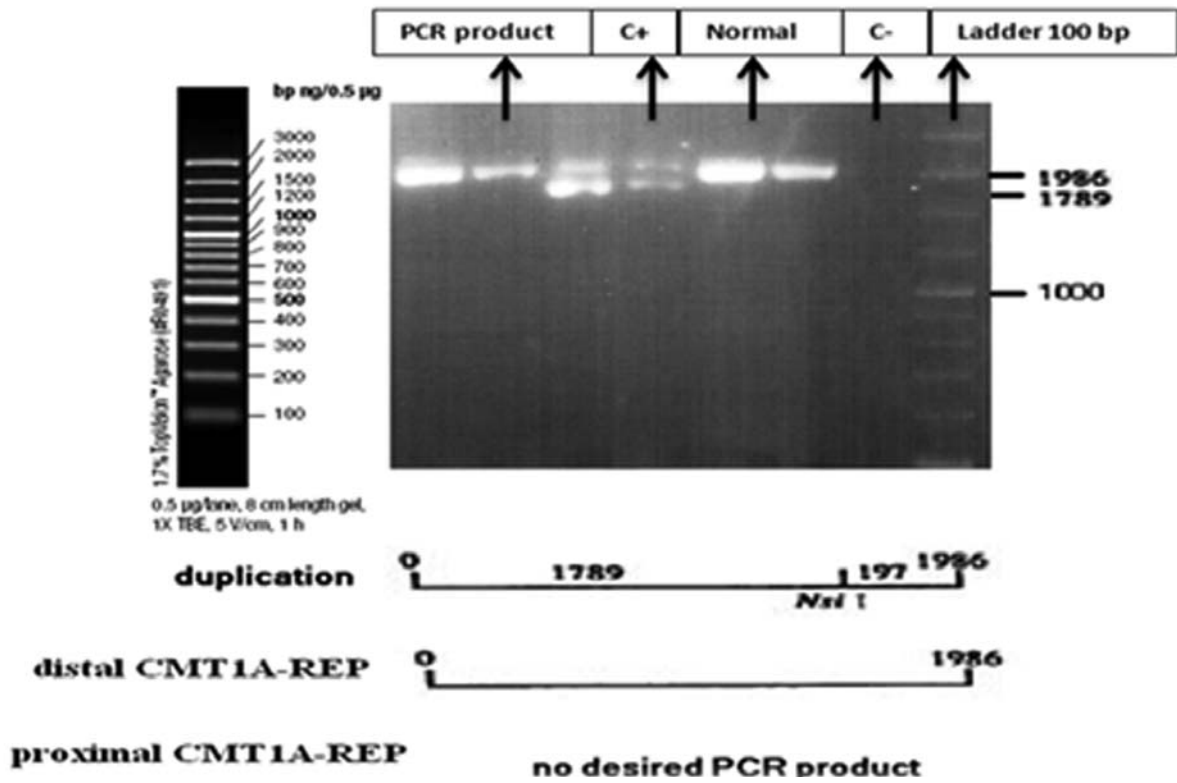
10 µl PCR Product + 1 µl Nsi1 + 2 µl buffer Nsi1 + 7 µl H2o = 20 µl

برای محصول PCR حاصل از پرایمرهای A و C طبق دستور زیر عمل شد:

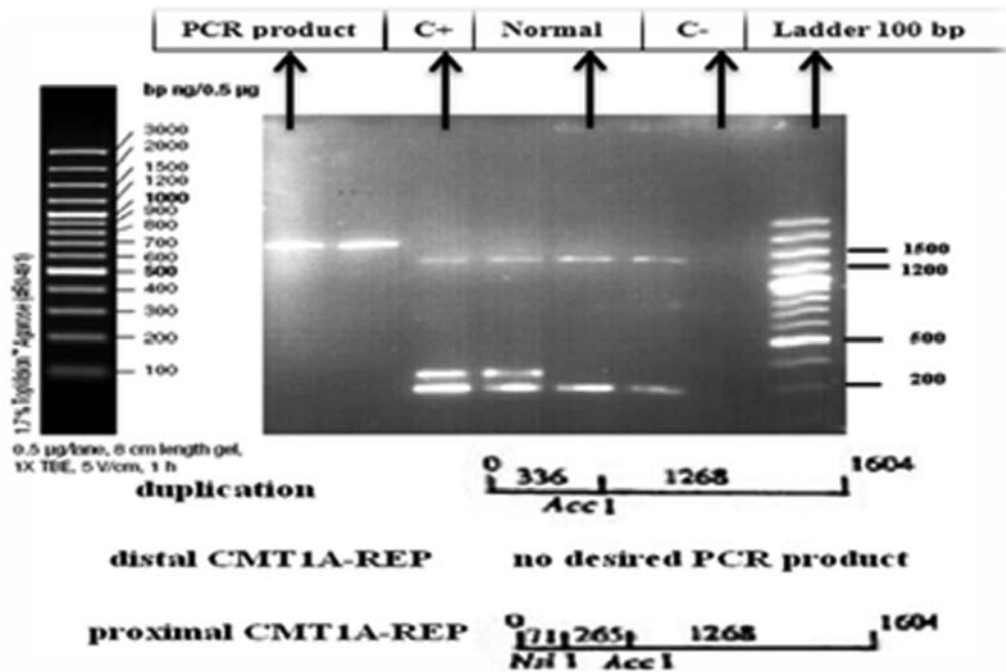
10 µl PCR Product + 1 µl Nsi1 + 2 µl buffer Nsi1 + 1 µl Acc1 + 2 µl buffer Acc1 + 4 µl H2o = 20 µl

نکته مهم این که در روشی که از دو آنزیم همزمان برای هضم آنزیمی استفاده می‌شود حتماً باید دو بافر و آنزیم‌های مورد استفاده از یک شرکت خریداری شوند بدین دلیل که هر دو آنزیم همزمان بتوانند در دو بافر بخوبی عمل کنند. سپس این محصولات به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد.

در این روش علاوه بر افراد مورد ما همواره از یک فرد سالم و بیمار به ترتیب به عنوان کنترل منفی و مثبت استفاده گردید. پس از انجام PCR به وسیله جفت پرایمرهای مورد نظر برای تشخیص نوترکیبی در ناحیه دیستال از آنزیم Nsi1 استفاده شد. بعد از هضم



شکل ۱- الگوی محصول PCR الی سالم و بیماران CMT1A از نوع ۱ بعد از هضم آنزیمی



شکل ۲- الگوی محصول PCR الی سالم و بیماران CMT1A از نوع ۲ بعد از هضم آنزیمی

همچون: ۱- ارزان بودن ۲- تشخیص سریع ۳- احتیاج نداشتن به خون افراد مبتلای دیگر در خانواده فرد مورد مطالعه، استفاده شد. تاکنون بهترین روش شناخته شده برای تشخیص موارد مضاعف شدگی و حذف‌های بزرگ روش MLPA می‌باشد.

بدلیل هزینه بالای روش MLPA تعداد معدودی از افرادی که برای روش PCR-RFLP منفی گزارش شده بودند، برای مطالعه بیشتر به خارج از کشور فرستاده شدند. از تعداد افراد مورد مطالعه به روش MLPA تقریباً ۸۰٪ مضاعف شدگی را در ژن PMP22 نشان دادند (در ۸ بیمار به پاسخ مثبت رسیدیم) و در ۲۰٪ موارد باقی مانده تصور می‌شود بدلیل هتروژن بودن این بیماری باید نواحی آگرونی و اینترونی ژن‌هایی که جهش نقطه ای در آنها می‌توانند فنوتیپی مشابه بیماران مبتلا به CMT1A (همچون PMP22، MPZ و EGR2) ایجاد کنند را با روش PCR-Sequencing مورد مطالعه قرار داد.

بحث:

شارکوت ماری توت (CMT) یک بیماری هتروژن در دستگاه عصبی محیطی انسان با شیوع ۱:۲۵۰۰ می‌باشد. مانند بسیاری دیگر از بیماری‌های ژنتیکی، تشخیص مولکولی در CMT در اکثر کشورها به انواع شایع بیماری مانند CMT1A که در اثر مضاعف شدگی 17p11.2-p12 و بیماری HNPP که در اثر حذف 17p11.2-p12 ایجاد می‌شود، محدود می‌گردد. با وجودیکه میانگین فراوانی مضاعف شدگی 17P11.2-P12 در بیماران مبتلا به CMT1 در اروپا ۷/۷۰٪ تخمین زده شده است، فراوانی آن از ۳/۳۴٪ در اسپانیا تا ۵/۳۷٪ در سوئد و ۷/۶۹٪ در بلژیک متفاوت می‌باشد. به نظر می‌رسد که فراوانی پائین مضاعف شدگی‌های

تشخیص مولکولی خاص ضروری به نظر می‌رسد. در بیماران CMT1A از لحاظ فنوتیپی در تمامی بیماران سن شروع بیماری از کودکی تا نوجوانی متغیر بود. در همگی ضعف پیشرونده عضلات دیستال، تحلیل عضله دیستال، و کاهش رفلکس مشاهده شد. طبق جدیدترین مطالعاتی که بر روی ارتباطات فنوتیپی و ژنوتیپی بیماران مبتلا به CMT انجام شده است (۱۰). نتایج حاصل از بررسی فنوتیپی بیماران مبتلا در ایران، با نتایج جهانی حاصل شده همخوانی دارد و می‌توان نتیجه گرفت که تغییرات در بیماران ایرانی نیز فنوتیپی مشابه را ایجاد می‌نماید. در تمامی مضاعف شدگی PMP22 بیماران متوجه افت پیشرونده قدرت بدنی، تحمل و توانایی دویدن و راه رفتن خود شده بودند. آنها از دشواری در گام گذاشتن بر روی اشیاء و بالا رفتن از پله‌ها شکایت می‌کنند. در بیماران مورد بررسی ابتلاء به آتروفی ساق پا، ضعف خفیف در خم و راست کردن مچ پا، فقدان رفلکس مچ پا، کاهش رفلکس کف پای، راه رفتن استیپاژ و بزرگ شدن اعصاب پرونتال دیده شد. سرعت هدایت عصبی (NCV) بیماران از ۲۰-۱۵ m/s متغیر بود (حالت طبیعی بالای ۴۳ متر بر ثانیه است).

در بررسی‌های نتایج حاصله شیوع پائینی از مضاعف شدگی در این مطالعه، در مقایسه با سایر کشورهای مشاهده شد که به نظر می‌رسد بدلیل وجود فراوانی از دواج‌های فامیلی، ژن‌هایی که نحوه توارث شان به صورت اتوزومال مغلوب می‌باشد، در کشور عزیزمان با در صدی بیشتر از حد معمول وجود داشته باشند.

References

1. Shy ME. Charcot-Marie-Tooth disease: an update. *Curr Opin Neurol* 2004; 17: 579-585.
2. Harding AE, Thomas PK. The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain* 1980; 103: 259-280.
3. Wise CA, Garcia CA, Davis SN, Heju Z, Pentao L, Patel PJ, Lupski JR. Molecular analyses of unrelated Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease patients suggests a high frequency of the CMT1A Duplication. *Am J Hum Genet* 2003; 53: 853-863.

4. Raeymaekers P, Timmerman V, Nelis E, De Jonghe P, Hoogendijk JE, Baas F, Barker DF, Martin JJ, De Visser M, Bolhuis PA. Duplication in chromosome VIpl 1.2 in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type Ia (CMT1a). *Neuromusc Disord* 2002; 1: 93-97.
5. Lupski JR, Montes de Oca-Luna R, Slaugenhaupt S, Pentao L, Guzzetta V, Trask BJ, Saucado-Cardenas O, Barker DF, Killian JM, Garcia CA. DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type IA. *Cell* 1991; 66:

2 19-232.

6. Roa BR, Garcia CA, Suter U, Kulpa DA, Wise CA, Mueller J, Weleher AA, Snipes GJ, Shooter EM, Patel PJ. Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. Association with asponaneous point mutation in the PMP22 gene. *N Engl J Med* 1993; 329: 96-101.

7. Kochanski A, Kabzinska D. Two de novo Ser72Leu mutations In the peripheral Myelin Protein 22 gene in two Polish patients. *ActaBiochimPol* 2004; 51:1047-1050.

8. Chang JG, Jong YJ, Wang WP, Wang JC, Hu CJ, Lo MC, Chang CP. Rapid detection of a recombinant hotspot associated with Charcot-Marie-Tooth disease type IA duplication by a PCR-based DNA test. *Clin Chem* 1998;

44:270-4.

9. Holmberg BH, Holmgren G, Nelis B, Van Broeckhoven C, Westerberg B. ChareotMarie-Tooth disease in northern Sweden: Pedigree analysis and the presence of the duplication within chromosome YIpl 1.2. *J Med Genet* 2004; 31: 435-441.

10. Boerkoel CF, Takashrnia H, Garcia CA, Olney RK, Johnson J, Berry K, Russo P, Kennedy 5, Teebi AS, Scavina M, Williams LU, Mancias P, Butler IJ, Krajewski K, Shy M, Uupski JR. Charcot-Marie-TOoth disease and related neuropathies: mutation distribution and genotype-phenotype correlation. *Ann Neurol* 2002; 51: 190-201.