



ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΑΣ &
ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΥΠΡΟΥ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΑΣ & ΑΙΣΘΗΤΗΡΙΩΝ ΟΡΓΑΝΩΝ
ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
&
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΥΠΡΟΥ
ΤΜΗΜΑ ΝΕΥΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΑΣΧΑΛΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΥ
Χημικός

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΗΣ
ΠΟΛΥΝΕΥΡΟΠΑΘΕΙΑΣ CHARCOT-MARIE-TOOTH (CMT)**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

(Η έναρξή της εγκρίθηκε από την Γ.Σ. του Ιατρικού Τμήματος - 4ης/12-04-2006 και υποστηρίχθηκε ενώπιον της 7-μελούς Επιτροπής στις 6 Ιουλίου 2011)

ΛΑΡΙΣΑ 2011

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

Γεώργιος Χατζηγεωργίου

Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας Π.Θ.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Αλέξανδρος Παπαδημητρίου**
Καθηγητής Νευρολογίας Π.Θ.
2. **Κυπούλα Χριστοδούλου**
Διευθύντρια του Τμήματος Νευρογενετικής του Ινστιτούτου Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου
3. **Γεώργιος Χατζηγεωργίου**
Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας Π.Θ.

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Αλέξανδρος Παπαδημητρίου**
Καθηγητής Νευρολογίας Π.Θ.
2. **Πασχάλης-Αδάμ Μολυβδάς**
Καθηγητής Φυσιολογίας
3. **Αναστάσιος Γερμενής**
Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας Π.Θ.
4. **Κυπούλα Χριστοδούλου**
Διευθύντρια του Τμήματος Νευρογενετικής του Ινστιτούτου Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου
5. **Ιωάννης Στεφανίδης**
Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας Π.Θ.
6. **Γεώργιος Χατζηγεωργίου**
Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας Π.Θ.
7. **Ευθύμιος Δαρδιώτης**
Λέκτορας Νευρολογίας Π.Θ.

«Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα»
(Νόμος 5343/32, άρθρο 202 παρ. 2)

ΔΗΜΟΣΙΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΡΑΧΘΕΝΤΟΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΥ ΕΡΓΟΥ

Δημοσιεύσεις:

1. **Nicolaou P.**, Zamba-Papanicolaou E., Koutsou P., Kleopa A.K., Georghiou A, Hadjigeorgiou G., Papadimitriou A., Kyriakides Th, Christodoulou K. Charcot-Marie-Tooth disease in Cyprus: epidemiological, clinical and genetic characteristics. *Neuroepidemiology*. 2010;35(3):171-7. Epub 2010 Jun 23. PMID: 20571287

Συμμετοχή σε συνέδρια & σεμινάρια :

1. «2ο Διεθνές συνέδριο της Εταιρείας Ανθρώπινης Γενετικής Κύπρου (ΕΑΓΕΚ-CSHG) », Λευκωσία, Κύπρος, 26-27 Νοεμβρίου 2010.
2. «Third International Charcot-Marie-Tooth Consortium Meeting», Αμβέρσα, Βέλγιο, 9-11 Ιουλίου 2009.
3. «9th Congress of the Mediterranean Society of Myology», Λευκωσία, Κύπρος, 20-22 Μαρτίου 2009.
4. «1ο Διεθνές συνέδριο της Εταιρείας Ανθρώπινης Γενετικής Κύπρου (ΕΑΓΕΚ CSHG) », Λευκωσία, Κύπρος, 3-4 Οκτωβρίου 2008.

Παρουσιάσεις Posters:

1. **Paschalis Nicolaou**, Eleni Zamba-Papanicolaou, Domna-Maria Georgiou, Pantelitsa Koutsou, Anthi Georghiou, Kleopas Kleopa, Theodoros Kyriakides, Lefkos T. Middleton, Kyroula Christodoulou. Molecular genetic studies of Charcot-Marie-Tooth disease in the Cypriot population. 2nd International Conference of the Cyprus Society of Human Genetics, Λευκωσία, Κύπρος, 26-27 Νοεμβρίου 2010.
2. **P. Nicolaou**, E. Zamba-Papanicolaou, D.M. Georgiou, P. Koutsou, A. Georghiou, K. Kleopa, T. Kyriakides, L.T. Middleton, K. Christodoulou. Clinical and genetic findings of Charcot-Marie-Tooth disease in the island of Cyprus. Third International CMT Consortium Meeting, Αμβέρσα, Βέλγιο, 9-11 Ιουλίου 2009.
3. **Paschalis Nicolaou**, Eleni Zamba-Papanicolaou, Domna-Maria Georgiou, Pantelitsa Koutsou, Anthi Georghiou, Kleopas Kleopa, Theodoros Kyriakides, Lefkos T. Middleton, Kyroula Christodoulou. Molecular genetic studies of Charcot-Marie-Tooth disease in the Cypriot population. 9th Congress of the Mediterranean Society of Myology, Λευκωσία, Κύπρος, 20-22 Μαρτίου 2009.
4. Eleni Zamba-Papanicolaou, **Paschalis Nicolaou**, Domna-Maria Georgiou, Pantelitsa Koutsou, Anthi Georghiou, Kleopas Kleopa, Lefkos T. Middleton, Kyroula Christodoulou. Charcot-Marie-Tooth disease in the Cypriot population. 1ο συνέδριο της Εταιρείας Ανθρώπινης Γενετικής Κύπρου (ΕΑΓΕΚ), Λευκωσία-Κύπρος, 3-4 Οκτωβρίου 2008.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή με τίτλο: "Μοριακή γενετική μελέτη της κληρονομικής πολυνευροπάθειας CHARCOT-MARIE-TOOTH (CMT)", εκπονήθηκε στο Τμήμα Νευρογενετικής του Ινστιτούτου Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου με τη συνεχή επίβλεψη και σε συνεργασία με τη Νευρολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής Δρ. Γεώργιο Χατζηγεωργίου Αναπληρωτή Καθηγητή και Δρ. Αλέξανδρο Παπαδημητρίου Καθηγητή του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας οι οποίοι στήριξαν την προσπάθεια αυτή, καθώς επίσης τη Δρ. Κυπρούλα Χριστοδούλου Διευθύντρια του Τμήματος Νευρογενετικής του Ινστιτούτου Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου (ΙΝΓΚ), στο εργαστήριο της οποίας έγινε το πειραματικό μέρος της διατριβής. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συνεργάτες μου στο Ινστιτούτο Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου, στο Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και γενικά όλους όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της διδακτορικής αυτής διατριβής. Ιδιαίτερες ευχαριστίες στη Δρ. Ελένη Ζαμπά-Παπανικολάου η οποία ήταν η βασική συνεργάτιδα στην κλινική και ηλεκτροφυσιολογική αξιολόγηση των Κύπριων ασθενών.

*Στη μνήμη του πατέρα μου
Στη μητέρα μου
Στη σύζυγο μου και στο γιό μου*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΚΑΙ ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	1
1.2 ΓΕΝΙΚΑ - ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ	2
1.3 ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	3
1.4 ΝΕΥΡΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ	6
1.4.1 Νευρική ώση και ταχύτητα αγωγής νεύρου	6
1.4.2 Ταχύτητα αγωγής κινητικών και αισθητικών νεύρων.....	7
1.4.3 Βιοψία μύος και νεύρου	9
1.5 ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΕΣ ΝΕΥΡΟΠΑΘΕΙΕΣ	10
1.6 ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΕΣ ΝΕΥΡΟΠΑΘΕΙΕΣ	12
1.7 ΠΟΛΥΝΕΥΡΟΠΑΘΕΙΑ CHARCOT – MARIE – TOOTH (CMT).....	14
1.7.1 Περιγραφή της CMT.....	18
1.7.2 Ταξινόμηση της CMT.....	19
1.7.2.1 CMT1 (HMSN I): Επικρατητικός απομυελινωτικός αυτοσωματικός τύπος.....	19
1.7.2.2 CMT2 (HMSN II): Επικρατητικός αξονικός αυτοσωματικός τύπος.....	23
1.7.2.3 DI-CMT: Επικρατητικός μεικτός τύπος	27

1.7.2.4 CMTX1: Επικρατητικός απομυελινωτικός φυλοσύνδετος τύπος στο χρωμόσωμα Χ.....	29
1.7.2.5 HMSN III η CMT3: Σύνδρομο Dejerine-Sottas (DSS)	29
1.7.2.6 CMT4: Υπολειπόμενος απομυελινωτικός αυτοσωματικός τύπος	31
1.7.2.7 CMT4C ή AR-CMT2: Υπολειπόμενος αξονικός αυτοσωματικός τύπος.....	35
1.7.2.8 CMTX: Υπολειπόμενος αξονικός φυλοσύνδετος τύπος στο χρωμόσωμα Χ	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	43
2.1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ	43
2.1.1 Οικογένειες και γενεαλογικά δέντρα	44
2.1.2 Δημογραφικά δεδομένα	50
2.1.3 Κλινική εξέταση	50
2.1.4 Γενετική ανάλυση	51
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ	53
2.2.1 Απομόνωση του DNA.....	53
2.2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	54
2.2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	55
2.2.4 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR για περαιτέρω ανάλυση	56
2.2.5 Προσδιορισμός της αλληλουχίας προϊόντος της PCR σε αυτόματο αναλυτή	57

2.2.6 Πέψη προϊόντος της PCR με ενδονουκλεάσες περιορισμού	59
2.2.7 Διπλασιασμός του γονιδίου <i>PMP22</i> (CMT duplication)	60
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	65
3.1 ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΣ ΤΗΣ CMT	65
3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΝΕΥΡΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ.....	65
3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	67
3.3.1 Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με απομυελινωτικό τύπο CMT	67
3.3.2 Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με αξονικό τύπο CMT	67
3.3.3 Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με μεικτό τύπο CMT	67
3.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	68
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ	76
4.1 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ	76
4.1.1 Επιπολασμός της CMT	77
4.2 ΝΕΥΡΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	79
4.3 ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ.....	81
4.4 ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ.....	87
4.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	101
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	102
ABSTRACT	104

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 106

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ 118

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1: Εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των
γονιδίων..... 119

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΚΑΙ ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή έχει ως αντικείμενο μελέτης τη διερεύνηση οικογενειών και σποραδικών ασθενών με κληρονομική, κινητική και αισθητική νευροπάθεια Charcot-Marie-Tooth (CMT). Οι οικογένειες και σποραδικοί ασθενείς που μελετήθηκαν στα πλαίσια της έρευνας αυτής αφορούν τον Κυπριακό πληθυσμό, καθώς και ορισμένες οικογένειες και σποραδικούς ασθενείς από την Ελλάδα.

Ο σκοπός της διδακτορικής αυτής διατριβής είναι αρχικά η ταξινόμηση των οικογενειών, που δεν είναι ήδη ταξινομημένες, με βάση κλινικά, ηλεκτροφυσιολογικά και ιστοπαθολογικά κριτήρια. Σε επόμενο στάδιο είναι η ολοκλήρωση των γενεαλογικών δέντρων των οικογενειών, όπου αυτό είναι εφικτό και στη συνέχεια η μοριακή γενετική ανάλυση σύνδεσης των οικογενειών με ικανοποιητικό αριθμό ατόμων για ταξινόμηση τους στους ήδη γνωστούς τύπους CMT ή στις περιπτώσεις που αυτές δεν συνδεθούν με περιοχή γνωστού τύπου είναι ο εντοπισμός νέων γονιδιακών περιοχών. Τέλος ο σκοπός είναι η εύρεση του υπεύθυνου γονιδίου και της παθογόνου μετάλλαξης των οικογενειών και των σποραδικών ασθενών. Επίσης, όσον αφορά τον Κυπριακό πληθυσμό, στόχος μας είναι να παρουσιαστεί μια όσο το δυνατό πιο ολοκληρωμένη επιδημιολογική μελέτη για τη συχνότητα της πολυνευροπάθειας CMT στην Κύπρο, τη συχνότητα των διαφόρων τύπων της πολυνευροπάθειας καθώς και τη συχνότητα των μεταλλάξεων στα διάφορα γονίδια που αφορούν τη νόσο.

1.2 ΓΕΝΙΚΑ - ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η διαχρονική μελέτη της Νευρολογίας εστιάζεται από τα αρχαία χρόνια μέχρι σήμερα στην προσπάθεια κατανόησης των διαταραχών του νευρικού συστήματος. Οι πρώτες μελέτες διεξάχθηκαν τον 3ο π.Χ. αιώνα και αφορούσαν τη νευροανατομία, όπου έγιναν και οι πρώτες επιστημονικές περιγραφές για τα ημισφαίρια του εγκεφάλου και την αφθονία των ελίκων που διαφοροποιεί τον άνθρωπο από τα ζώα, την παρεγκεφαλίδα, το νωτιαίο μυελό και τα νεύρα, τα οποία διέκριναν σε κινητικά και αισθητικά (το 280 π.Χ. ο Ερασίστρατος της Χίου σημειώνει τμήματα του εγκεφάλου). Πρωτοποριακή παρατήρηση για την τότε εποχή ήταν επίσης το γεγονός ότι τα νεύρα ξεκινούν από τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό (Ηρόφιλος 335-280 π.Χ.), πράγμα που υποστήριξαν προγενέστεροι (όπως ο Ιπποκράτης 460-379 και ο Πλάτωνας το 387 π.Χ.) με την "εγκεφαλοκεντρική" θεωρία και όχι από την καρδιά, όπως δίδασκε μέχρι τότε ο Αριστοτέλης το 335 π.Χ.(Adams 1939).

Εντούτοις, η Νευρολογία καθιερώθηκε ως ένας ξεχωριστός τομέας της ιατρικής γύρω στα μέσα του 19^{ου} αιώνα, όταν οι έρευνες στην Ιατρική σχετικά με το νευρικό σύστημα παρουσιάζουν μεγάλη πρόοδο. Αυτό είχε ως επακόλουθο τη σύσταση τμημάτων Νευρολογίας, τη διοργάνωση εξειδικευμένων συνεδρίων και την έκδοση επιστημονικών περιοδικών στον τομέα της Νευρολογίας. Παρόλα αυτά όμως, η ταξινόμηση των διαφόρων νευρολογικών νοσημάτων έγινε κατορθωτή με την ανάπτυξη της Νευροφυσιολογίας (άρχιζε με τον Brown-Sequard το 1846), της Βιοχημείας και της Μοριακής Βιολογίας (Finger and Buckingham 1994; Steinberg 2002). Η ανάπτυξη των κλάδων αυτών σε συνδυασμό με τη ραγδαία εξέλιξη της Νευρολογίας έδωσε και τις πρώτες προσπάθειες ολοκληρωμένης ταξινόμησης των διαφόρων νευρολογικών νοσημάτων.

1.3 ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Το νευρικό σύστημα είναι ένα σύμπλεγμα κυττάρων που ρυθμίζει και ελέγχει τη λειτουργία όλων των οργάνων του ανθρωπίνου σώματος, καθώς επίσης και τη μεταξύ τους αρμονική συνεργασία. Λόγω της πολυπλοκότητας του, στην παρούσα διδακτορική διατριβή θα περιγράψουν μόνο ορισμένες βασικές έννοιες που θα βοηθήσουν στην καλύτερη κατανόηση της εργασίας που παρουσιάζεται.

Το νευρικό σύστημα (Ν.Σ.) δέχεται ερεθίσματα τα οποία αξιολογεί και ανταποκρίνεται ανάλογα. Το Ν.Σ. στον άνθρωπο διακρίνεται σε:

- Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (Κ.Ν.Σ.)
- Περιφερικό Νευρικό Σύστημα (Π.Ν.Σ).

Το Κ.Ν.Σ. που αποτελείται από τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό, λαμβάνει τις πληροφορίες από το Π.Ν.Σ. και τις αισθήσεις, συντονίζει την κίνηση και είναι το κέντρο της μνήμης, της συνειδητής σκέψης, των εκούσιων δραστηριοτήτων όπως το βάδισμα, τις κινήσεις των χεριών και άλλων βασικών σωματικών λειτουργιών. Το Π.Ν.Σ. αποτελείται από τα εγκεφαλικά και τα νωτιαία νεύρα, που εξέρχονται από το Κ.Ν.Σ. και διακλαδίζονται σε όλο το σώμα. Τα νευρικά ερεθίσματα μεταδίδονται ως νευρικές ώσεις από και προς το Κ.Ν.Σ. και άλλα μέρη του σώματος. Το Π.Ν.Σ. αποτελείται από:

- Το Σωματικό Νευρικό Σύστημα
- Το Αυτόνομο Νευρικό Σύστημα

Το Σωματικό Νευρικό Σύστημα είναι υπεύθυνο για εκούσιες λειτουργίες και το Αυτόνομο Νευρικό Σύστημα (Α.Ν.Σ), το οποίο διαιρείται σε Συμπαθητικό και Παρασυμπαθητικό νευρικό σύστημα, λειτουργεί ακούσια.

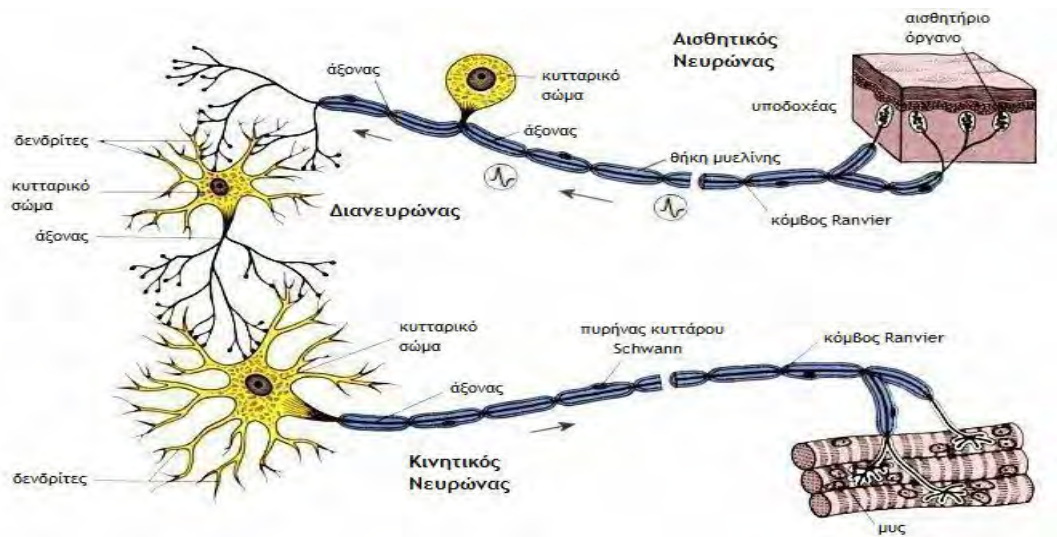
Το νευρικό σύστημα αποτελείται από δυο βασικές κατηγορίες κυττάρων:

- τα νευρικά κύτταρα (νευρώνες)
- τα νευρογλοιακά κύτταρα

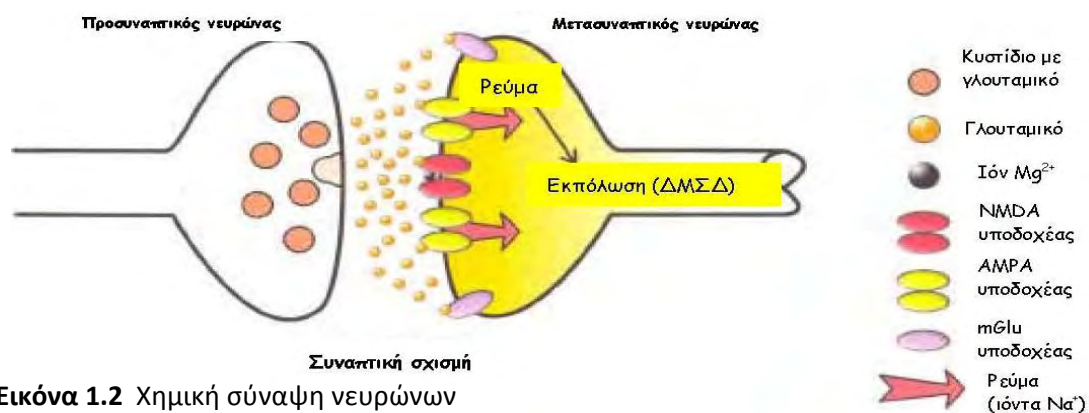
Τα νευρικά κύτταρα (νευρώνες) αποτελούνται από:

- το κυτταρικό σώμα
- τους δενδρίτες
- τον άξονα

Μέσω των δενδριτών δέχεται πληροφορίες από άλλους νευρώνες (Εικόνα 1.1), τις επεξεργάζεται και τις μεταδίδει μέσω του άξονα και των συνάψεων σε άλλα κύτταρα (Εικόνα 1.2). Τα ερεθίσματα αυτά μεταφέρονται διαμέσου των συνάψεων από κύτταρο σε κύτταρο.



Εικόνα 1.1 Αισθητικός και κινητικός νευρώνας με τα κύρια ανατομικά χαρακτηριστικά του σύμφωνα με τη λειτουργία τους (πηγή: <http://universe-review.ca/R10-16-ANS.htm>).



Εικόνα 1.2 Χημική σύναψη νευρώνων (πηγή: <http://panacea.med.uoa.gr/topic.aspx?id=892>).

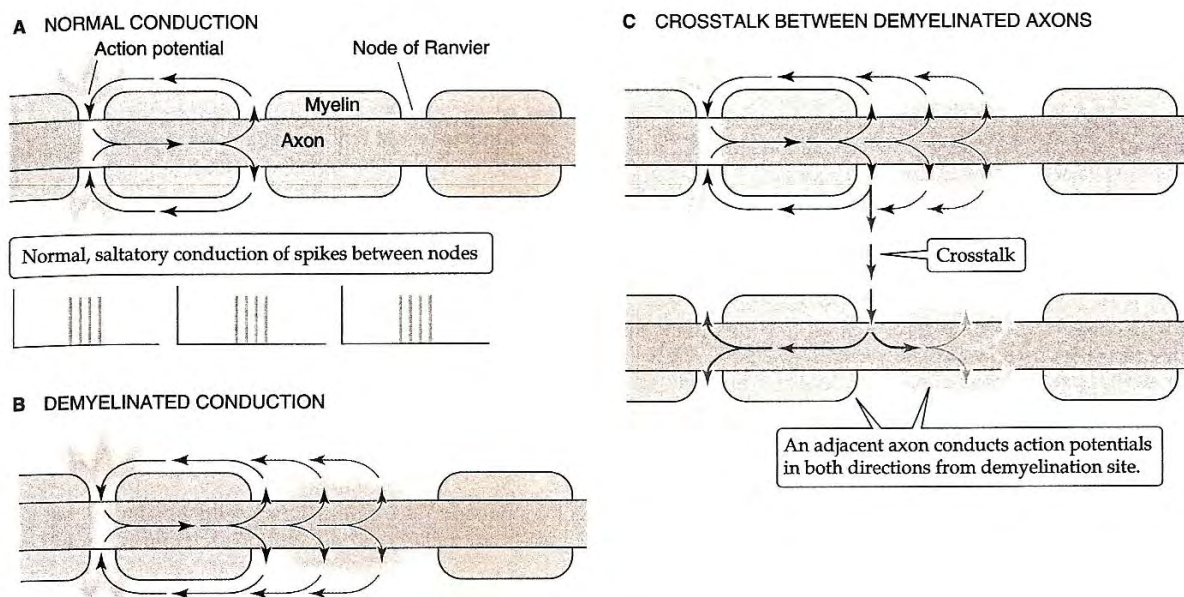
Ο άξονας του νευρώνα περιβάλλεται από μία χαρακτηριστική ουσία, τη μυελίνη, η οποία καθορίζει και την αγωγιμότητά του. Η μυελίνη παίζει ρόλο μονωτή αποτρέποντας τη διαρροή ιόντων στη μεμβράνη του άξονα. Οι νευρώνες κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τη λειτουργία τους σε αισθητικούς (κεντρομόλους, μεταφέρουν πληροφορίες σχετικά με τις αισθήσεις), κινητικούς (φυγόκεντρους, νευρώνουν μύες) και συνδετικούς (ή διάμεσους). Τα νευρογλοιακά κύτταρα (εξειδικευμένα μη νευρικά στηρικτικά κύτταρα του νευρικού συστήματος) αναλαμβάνουν βοηθητικές λειτουργίες, έχουν δηλαδή υποστηρικτικό ρόλο και βοηθούν στη διατήρηση του περιβάλλοντος των νευρώνων. Τα αστροκύτταρα (είδος νευρογλοιακών κυττάρων) στηρίζουν τους νευρώνες στο χώρο, μεταφέρουν θρεπτικές ουσίες στους νευρώνες, αποδομούν τα μέρη των νεκρών νευρώνων και ρυθμίζουν το περιεχόμενο του εξωκυτταρικού χώρου. Τα μικρογλοιακά κύτταρα (είδος νευρογλοιακών κυττάρων – φαγοκύτταρα του ΚΝΣ) αποδομούν τα μέρη των νεκρών νευρώνων. Τα ολιγοδενδρογλοιακά κύτταρα (νευρογλοιακά κύτταρα) σχηματίζουν τη μυελίνη (μονωτικό υλικό) του κεντρικού νευρικού συστήματος, ενώ τα κύτταρα του Schwann (στηρικτικά κύτταρα του ΠΝΣ) σχηματίζουν τη μυελίνη του περιφερικού νευρικού συστήματος.

1.4 ΝΕΥΡΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

1.4.1 Νευρική ώση και ταχύτητα αγωγής νεύρου.

Η λειτουργία του νευρικού συστήματος οφείλεται κατά κύριο λόγο στη ροή ηλεκτρικού ρεύματος που δημιουργείται λόγω διαφοράς δυναμικού. Τα νευρικά σήματα από και προς τον εγκέφαλο είναι αποτέλεσμα της ροής ηλεκτρικού ρεύματος. Όταν ένας νευρώνας βρίσκεται σε ηρεμία, εμφανίζει διαφορά δυναμικού (δυναμικό ηρεμίας) 60 – 90 mV μεταξύ της εξωτερικής και της εσωτερικής επιφάνειας της κυτταρικής του μεμβράνης, που οφείλεται κυρίως στη δράση μιας αντλίας ιόντων Na^+/K^+ . Όταν επιδράσει κάποιο ερέθισμα στην επιφάνεια ενός νευρικού κυττάρου, τότε έχουμε μετακίνηση ιόντων (εκπόλωση), μεταβολή της διαφοράς δυναμικού (δυναμικό ενέργειας) και στη συνέχεια αποκατάσταση του δυναμικού ηρεμίας (επαναπόλωση). Η μετάδοση του δυναμικού ενέργειας (**νευρικός παλμός**) κατά μήκος της νευρικής ίνας αποτελεί τη **νευρική ώση** (Εικόνα 1.3). Η νευρική ώση μπορεί να αξιολογηθεί με τη μέτρηση της **ταχύτητας αγωγής νεύρου** (nerve conduction velocity), εφόσον ο βαθμός διεγερσιμότητας, το ύψος του δυναμικού ενέργειας και κατά συνέπεια η ταχύτητα αγωγής της νευρικής ίνας είναι συνάρτηση της διαμέτρου της. Η διάμετρος της νευρικής ίνας είναι αντιστρόφως ανάλογη της διεγερσιμότητας και ανάλογη του δυναμικού ενέργειας και της ταχύτητας αγωγής. Όπως προαναφέρθηκε, η μυελίνη λειτουργεί ως μονωτής των νευρικών ινών που μειώνει σημαντικά την ηλεκτρική χωρητικότητα αποτρέποντας τη διαρροή ιόντων στη μεμβράνη του άξονα. Γενικά στις εμμύελες ίνες οι ταχύτητες κυμαίνονται από λίγα μέτρα έως και 120 μέτρα το δευτερόλεπτο

(m/s), ενώ στις αμύελες δεν υπερβαίνουν τα λίγα μέτρα το δευτερόλεπτο. Με τον τρόπο αυτό η μέτρηση της ταχύτητας αγωγής βοηθά στη διάγνωση νευρολογικών παθήσεων τόσο του ΚΝΣ όσο και του ΠΝΣ.



Εικόνα 1.3 Τα στάδια της νευρικής ώσης
(πηγή: Medical Physiology: A Cellular and Molecular Approach. W.F. Boron & E.L. Boulpaep. Saunders Ed 2003)

1.4.2 Ταχύτητα αγωγής κινητικών και αισθητικών νεύρων

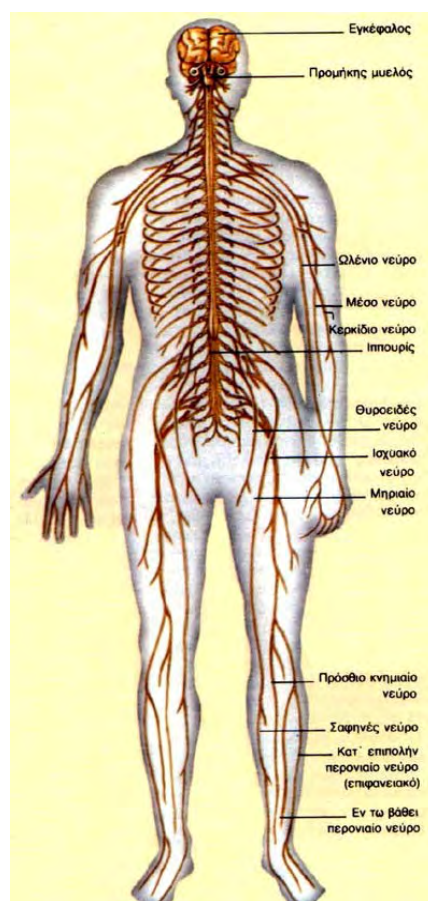
Για τη μέτρηση των ταχυτήτων αγωγής κινητικών νεύρων (ΚΤΑ) (Motor nerve conduction velocity - MNCV) ερεθίζουμε ηλεκτρικά ένα κινητικό νεύρο και καταγράφουμε την έλευση του ερεθίσματος είτε με επιφανειακό ή ενδομυϊκό ηλεκτρόδιο. Συνήθως ελέγχονται τα νεύρα: μέσο, ωλένιο, κερκιδικό, περονιαίο, κνημιαίο και προσωπικό ανάλογα με το κλινικό πρόβλημα.

Για τη μέτρηση της ταχύτητας αγωγής αισθητικών νεύρων (ΑΤΑ) (Sensory conduction velocity -SCV) ερεθίζουμε ηλεκτρικά ένα αισθητικό νεύρο σ' ένα σημείο και καταγράφουμε την έλευση του ερεθίσματος σ' ένα άλλο σημείο του νεύρου.

Συνήθως ελέγχονται τα νεύρα: μέσο, ωλένιο, επιπολής κερκιδικό, επιπολής περνιαίο και γαστροκνημιαίο ανάλογα με το κλινικό πρόβλημα (Εικόνα 1.4).

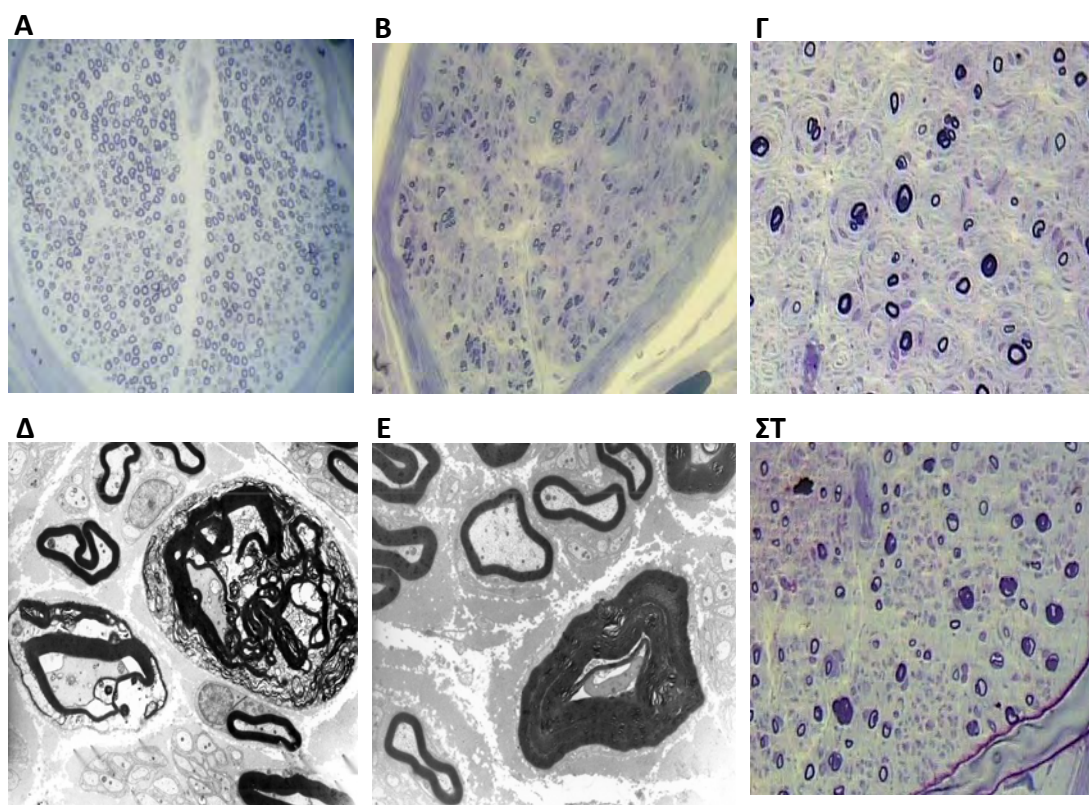
Στις περιπτώσεις που έχουμε παθολογικές καταστάσεις παρουσιάζεται μεταβολή των ταχυτήτων αγωγής κινητικών και αισθητικών νεύρων. Στα άνω άκρα οι ταχύτητες έχουν ως κατώτερο φυσιολογικό όριο τα 50 m/s, ενώ στα κάτω άκρα τα 40 m/s. Η απομυελίνωση προκαλεί σημαντική μείωση των ταχυτήτων αγωγής (<38 m/s) με μικρή ή καθόλου μείωση του ύψους των προκλητών δυναμικών, ενώ στην αξονική εκφύλιση προκαλείται πολύ μικρή ή καθόλου μείωση των ταχυτήτων αγωγής (>38 m/s) με σημαντική μείωση του ύψους των προκλητών δυναμικών.

Εικόνα 1.4 Νευρικό Σύστημα του ανθρώπου
(πηγή: Γενική Βιολογία - Εκδοτική Αθηνών 1989).



1.4.3 Βιοψία μύος και νεύρου

Η βιοψία μύος διεξάγεται στις περιπτώσεις νευρομυϊκών παθήσεων για να εξακριβωθεί ο τύπος της νόσου. Η βιοψία νεύρου δίνει ακόμα πιο συγκεκριμένα αποτελέσματα για τα επίπεδα της απομυελίνωσης καθώς και γενικά της βλάβης των νευρικών κυττάρων (Εικόνα 1.5). Η διαγνωστική αξία της βιοψίας νεύρου, περιορίζεται σε σχετικά λίγους ασθενείς που βρίσκονται υπό διερεύνηση για περιφερική νευροπάθεια. Η εξέταση εκτελείται σε ορισμένα μόνο κέντρα από ειδικούς με εμπειρία στη λήψη και την παθολογική μελέτη του νεύρου.



Εικόνα 1.5 Βιοψία νεύρου: **(Α)** υγιές ατόμου, **(Β)** ασθενή CMT με διάχυτη αξονική βλάβη, **(Γ)** ασθενή CMT με κρεμμυδοειδείς σχηματισμούς (onion bulbs), **(Δ)** ασθενή CMT με εκφυλισμό της μυελίνης, **(Ε)** ασθενή CMT με τμηματική απομυελίνωση (tomacula), **(ΣΤ)** ασθενή CMT με περισσή εναπόθεση μυελίνης (πηγή: Εργαστήριο Παθολογίας Ινστιτούτο Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου).

1.5 ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΕΣ ΝΕΥΡΟΠΑΘΕΙΕΣ

Οι παθήσεις του ΠΝΣ (περιφερικές νευροπάθειες) οφείλονται στην αλλαγή της δομής και κατά συνέπεια τη δυσλειτουργία των κινητικών, αισθητικών και αυτόνομων νευρώνων του ΠΝΣ. Τα αίτια εμφάνισης νευροπαθειών ποικίλουν και μπορεί να είναι είτε κληρονομικά, είτε επίκτητα. Οι περιφερικές νευροπάθειες ανάλογα με τον αριθμό των νευρώνων που πλήττονται κατατάσσονται σε:

- μονό - νευροπάθειες
- πολύ - νευροπάθειες

Η ταξινόμηση των περιφερικών νευροπαθειών με βάση τα κυριότερα αίτια που τις προκαλούν μπορεί να γίνει ως εξής:

- Κληρονομικές νευροπάθειες (αισθητικοκινητικές νευροπάθειες, αισθητικές και αυτόνομες νευροπάθειες, οικογενείς αμυλοειδικές πολυνευροπάθειες κ.α.)
- Νευροπάθειες λόγω μεταβολικών/ενδοκρινικών νοσημάτων (σακχαρώδης διαβήτης, χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, πορφυρία, αμυλοείδωση, ηπατική ανεπάρκεια, υποθυρεοειδισμός κ.α.)
- Νευροπάθειες λόγω έκθεσης σε τοξικές ουσίες (λήψη φαρμάκων, κατανάλωση οινοπνεύματος, έκθεση σε διαλύτες, βαρέα μέταλλα και φυτοφάρμακα κ.α.)
- Νευροπάθειες λόγω μολυσματικών ασθενειών (ιοί, βακτηρίδια κ.α.)
- Φλεγμονώδης Νευροπάθεια (σύνδρομο Guillain – Barre)
- Νευροπάθειες λόγω έλλειψης βιταμινών (βιταμίνη B₁₂, βιταμίνη Α κ.α.)
- Νευροπάθειες λόγω πίεσης, ή τραυματισμού

- Νευροπάθειες λόγω παρουσίας κακοήθειας (παρaneoπλασματικά νοσήματα)

Επίσης οι περιφερικές νευροπάθειες μπορούν να ταξινομηθούν με βάση την παθοφυσιολογία τους ως εξής:

- Νευρωνοπάθειες: Οφείλονται σε βλάβη του κυτταρικού σώματος του νεύρου και κατά συνέπεια εκφύλιση του περιφερικού και του κεντρικού άξονα. Οι νευρωνοπάθειες μπορούν να διαχωριστούν σε:

- Κινητικές, όπου παρουσιάζεται βλάβη των κυττάρων των προσθίων κεράτων του νωτιαίου μυελού και εμφανίζουν μυϊκή αδυναμία, ατροφία των μυών και μείωση των αντανακλαστικών.

- Αισθητικές, όπου παρουσιάζεται βλάβη των κυττάρων των νωτιαίων γαγγλίων και των γαγγλίων του αυτονόμου και εμφανίζουν μείωση της αισθητικότητας, αισθητική αταξία, μείωση των αντανακλαστικών και παραισθήσεις.

- Αξονικές νευροπάθειες: Παρατηρείται βλάβη στους νευράξονες των νευρικών ινών και παρουσιάζεται τόσο σε κινητικούς όσο και σε αισθητικούς νευρώνες. Χαρακτηρίζεται από την έναρξη της εκφύλισης από το περιφερικότερο τμήμα του άξονα με δευτερογενή απομυελίνωση. Κλινικά και ηλεκτροφυσιολογικά παρουσιάζουν παρόμοια εικόνα με τις νευρωνοπάθειες.

- Απομυελινωτικές νευροπάθειες: Παρουσιάζεται εκφύλιση του ελύτρου της μυελίνης των κυττάρων του Schwann και έχει σαν αποτέλεσμα την καταστροφή της μυελίνης των περιφερικών νεύρων με σχετική διατήρηση του άξονα. Κλινικά εκφράζεται με μυϊκή αδυναμία και ήπιες διαταραχές της αισθητικότητας και ηλεκτροφυσιολογικά παρατηρείται μεγάλη μείωση των ταχυτήτων αγωγής. Η αποκατάσταση εξαρτάται από την απομυελίνωση που λόγω της σχετικής

διατήρησης του άξονα συνήθως γίνεται με γρήγορους ρυθμούς (εβδομάδες ή μήνες). Επαναλαμβανόμενη απομυελίνωση – επαναμυελίνωση οδηγεί σε πολλαπλασιασμό των συγκεντρικών στιβάδων των κυττάρων του Schwann, γύρω από τον περιφερικό άξονα. Ο σχηματισμός που προκύπτει ονομάζεται τύπου «βολβού κρεμμυδιού» («onion bulb») και συναντάται κυρίως σε χρόνιες και κληρονομικές απομυελινωτικές πολυνευροπάθειες.

- **Μεικτές νευροπάθειες:** Στις νευροπάθειες αυτές παρατηρείται τόσο αξονική όσο και απομυελινωτική εκφύλιση. Αυτό συμβαίνει επίσης και σε απομυελινωτικές αλλά κυρίως σε αξονικές νευροπάθειες, όπου συχνά σε προχωρημένο στάδιο εμφανίζουν στοιχεία μικτής νευροπάθειας. Κλινικά και ηλεκτροφυσιολογικά παρουσιάζονται ως ένας συνδυασμός αξονικής και απομυελινωτικής νευροπάθειας.

1.6 ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΕΣ ΝΕΥΡΟΠΑΘΕΙΕΣ

Οι κληρονομικές νευροπάθειες μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες: (α) νευροπάθειες στις οποίες η νευροπάθεια είναι το μοναδικό ή το κύριο χαρακτηριστικό γνώρισμα της πάθησης και (β) νευροπάθειες στις οποίες η νευροπάθεια είναι δευτερεύων γνώρισμα μιας πιο γενικής νευρολογικής ή άλλης διαταραχής. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή θα ασχοληθούμε με την πρώτη ομάδα νευροπαθειών, οι οποίες αποτελούν μοναδικό ή κύριο χαρακτηριστικό γνώρισμα της πάθησης. Η ταξινόμηση με βάση τους κυριότερους τύπους των νευροπαθειών αυτών μπορεί να γίνει ως εξής (Reilly 2007):

- **Κληρονομική κινητική και αισθητική νευροπάθεια (Hereditary motor and sensory neuropathy - HMSN).** Η νευροπάθεια αυτή είναι ίσως ευρέως πιο

γνωστή ως **πολυνευροπάθεια Charcot-Marie-Tooth (CMT)**. Αποτελεί την πιο συχνή κληρονομική νευρομυϊκή διαταραχή με συχνότητα προσβολής 1 στις 2.500. Αν και η CMT χαρακτηρίζεται από μεγάλη κλινική ετερογένεια, τα βασικά κλινικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα είναι η περιφερική αδυναμία των μυών, τα μειωμένα ή κατηργημένα τενόντια αντανακλαστικά, η περιφερική απώλεια αισθητικότητας και σε πολλές περιπτώσεις οι παραμορφώσεις των ποδιών. Η νευροπάθεια αυτή οφείλεται σε ένα μεγάλο αριθμό μεταλλάξεων που παρουσιάζονται σε περισσότερα από 25 υπεύθυνα γονίδια.

- **Κληρονομική νευροπάθεια με παρέσεις από πίεση νεύρου (Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies - HNPP)**. Η κληρονομική αυτή νευροπάθεια είναι μια αυτοσωματική επικρατητική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από τις επαναλαμβανόμενες παραλύσεις σε σημεία που παρουσιάζουν ευαισθησία στην αυξημένη πίεση. Οφείλεται συνήθως σε έλλειψη ενός αλληλίου του γονιδίου PMP22 του χρωμοσώματος 17 (διπλασιασμός του προκαλεί CMT1A) και πιο σπάνια σε σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου PMP22.
- **Κληρονομικές αισθητικές και αυτόνομες νευροπάθειες (Hereditary sensory and autonomic neuropathy – HSAN/HSN)**. Η νευροπάθεια αυτή είναι λιγότερο συχνή από τη CMT και αποτελείται από πέντε τύπους που χαρακτηρίζονται από διαφορετική αισθητική και αυτόνομη δυσλειτουργία. Με βάση τον τρόπο κληρονόμησης διαχωρίζονται σε αυτοσωμικές επικρατητικές και υπολειπόμενες μορφές και τα περισσότερα από τα υπεύθυνα γονίδια έχουν ήδη προσδιοριστεί.
- **Περιφερική κληρονομική κινητική νευροπάθεια (Distal hereditary motor neuropathy – dHMN)**. Οι ασθενείς με αυτού του είδους νευροπάθεια παρουσιάζουν ένα κλασσικό κλινικό φαινότυπο CMT χωρίς αισθητική διαταραχή.

Κλινικά είναι δύσκολη η διάκριση μεταξύ τους, αλλά με νευροφυσιολογική μελέτη γίνεται επιβεβαίωση της φυσιολογικής αισθητικής λειτουργίας στην περιφερική κληρονομική κινητική νευροπάθεια. Η κινητική νευροπάθεια χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια και αποτελείται από δώδεκα τύπους στους οποίους τα περισσότερα υπεύθυνα γονίδια έχουν ανευρεθεί.

- **Κληρονομική νευραλγική μυατροφία (Hereditary neuralgic amyotrophy - HNA).**

Η νευραλγική μυατροφία είναι μια επικρατητική αυτοσωματική κληρονομική διαταραχή που οφείλεται σε επαναλαμβανόμενα επεισόδια προσβολής του βραχιονίου πλέγματος, λόγω μεταλλάξεων στο γονίδιο *Septin9*.

1.7 ΠΟΛΥΝΕΥΡΟΠΑΘΕΙΑ CHARCOT–MARIE–TOOTH (CMT)

Η πολυνευροπάθεια Charcot-Marie-Tooth (CMT) ή Κληρονομική ΑισθητικόΚινητική Νευροπάθεια (Hereditary motor and sensory neuropathy –HMSN) ή Περονιαία Μυϊκή Ατροφία (peroneal muscular atrophy), περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1886 από τους Jean-Martin Charcot και Pierre Marie στο Παρίσι και Howard Henry Tooth στο Κέμπριτζ, από τους οποίους πήρε και το όνομα της (Charcot 1886; Tooth 1886). Οι Charcot, Marie και Tooth επιχείρησαν να δώσουν μια συνοπτική περιγραφή της νόσου με τα εξής γενικά χαρακτηριστικά:

- Είναι κληρονομική νόσος.
- Η έναρξη των συμπτωμάτων της νόσου αρχίζει από την πρώτη μέχρι την τρίτη δεκαετία της ζωής των ασθενών.

- Παρουσιάζεται κατά κύριο λόγο με αδυναμία και ατροφία στους περνιαίους μύες παρά στους μύες των περιφερικών τμημάτων των άκρων.
- Συχνά συνυπάρχουν αισθητικές διαταραχές και μείωση ή εξάλειψη των τενόντιων αντανακλαστικών.
- Παρουσιάζεται έντονη ποδική καμάρα - κοιλοποδία (pes cavus)
- Έχει αργή προοδευτική πορεία.

Στη συνέχεια και με την ανάπτυξη της Νευρολογίας, η πολυνευροπάθεια CMT απασχόλησε ξανά τον χώρο της Νευρολογίας όταν οι Lambert (1958) και Dyck (1968a, 1968b) διαπίστωσαν την παρουσία μειωμένων ταχυτήτων αγωγής νεύρων στους ασθενείς με CMT (Dyck et al. 1961; Dyck and Lambert 1968; Dyck and Lambert 1968). Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι το 1961 οργανώθηκε από τον Serratrice στη Μασσαλία το πρώτο διεθνές συνέδριο με θέμα τις μειωμένες ταχύτητες αγωγής νεύρων σε ασθενείς με CMT.

Οι Dyck και Lambert (1968a, 1968b) μετά από περαιτέρω μελέτη, με βάση τα νέα δεδομένα που παρατήρησαν στις ταχύτητες αγωγής νεύρων, ταξινόμησαν την CMT σε τέσσερις τύπους (Dyck and Lambert 1968; Dyck and Lambert 1968):

- Κληρονομική Αισθητικοκινητική Νευροπάθεια Τύπου 1 (Hereditary Motor and Sensory Neuropathy-1 - HMSN1 ή CMT1). Ο τύπος αυτός είναι απομυελινωτικός, επικρατητικός ή υπολειπόμενος αυτοσωματικός και παρουσιάζει μειωμένες ταχύτητες αγωγής νεύρων (<38m/s).
- Κληρονομική Αισθητικοκινητική Νευροπάθεια Τύπου 2 (Hereditary Motor and Sensory Neuropathy-2 - HMSN2 ή CMT2). Ο τύπος αυτός είναι αξονικός,

επικρατητικός ή υπολειπόμενος αυτοσωματικός και παρουσιάζει κανονικές ταχύτητες αγωγής νεύρων (>38m/s).

- Κληρονομική Αισθητικοκινητική Νευροπάθεια Τύπου 3 (Hereditary Motor and Sensory Neuropathy-3 - HMSN3 ή DSS - Dejerine – Sottas Syndrome). Ο τύπος αυτός είναι απομυελινωτικός, επικρατητικός ή υπολειπόμενος αυτοσωματικός, εμφανίζεται σε νηπιακή ηλικία με βαριά μορφή και παρουσιάζει μειωμένες ταχύτητες αγωγής νεύρων (<38m/s).
- Κληρονομική Κινητική Νευροπάθεια φυλοσύνδετη στο χρωμόσωμα X (Hereditary Motor Neuropathy X- HMNX). Ο τύπος αυτός είναι απομυελινωτικός, επικρατητικός ή υπολειπόμενος φυλοσύνδετος και παρουσιάζει μειωμένες ταχύτητες αγωγής νεύρων (<38m/s).

Το 1983 έγινε διαχωρισμός του τύπου HMSN1 σε δύο υποτύπους (HMSN1a και HMSN1b). Στον τύπο HMSN1a δεν υπάρχει γενετική σύνδεση με το αντιγονικό σύστημα Duffy (Fy γλυκοπρωτεΐνη), ενώ στον τύπο HMSN1b υπάρχει γενετική σύνδεση (ο γενετικός τόπος του DUFFY εδράζεται στο χρωμόσωμα 1q22-23) (Bird et al. 1982; Bird et al. 1983).

Με βάση τα ηλεκτροφυσιολογικά και παθολογικά κριτήρια η CMT διαχωρίζεται σε δύο μεγάλες κατηγορίες. (α) Ο πρώτος τύπος είναι ο απομυελινωτικός (demyelinating), στον οποίον οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων (MNCV) των περιφερικών τμημάτων είναι συνήθως μικρότερες από 38 m/s και (β) ο δεύτερος τύπος είναι ο αξονικός (axonal), στον οποίο οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων (MNCV) έχουν κανονικές ή ελαφρά μειωμένες τιμές (Bird 1989; Berger et al. 2002).

Πρόσφατα περιγράφηκε και ο μικτός τύπος ο οποίος είναι ένας συνδυασμός

απομυελινωτικού και αξονικού τύπου με ενδιάμεσες ταχύτητες αγωγής νεύρου (Mastaglia et al. 1999).

Ο απομυελινωτικός τύπος χαρακτηρίζεται κυρίως από εκφυλισμό της μυελίνης που περιβάλλει τον άξονα των περιφερικών νεύρων, της οποίας η κύρια λειτουργία είναι η αύξηση των ταχυτήτων αγωγής νεύρων. Αποτέλεσμα των πιο πάνω είναι να παρουσιάζονται μειωμένες ταχύτητες στα ηλεκτοφυσιολογικά ευρήματα για τον τύπο αυτόν. Ο αξονικός τύπος χαρακτηρίζεται κυρίως από εκφυλισμό του ίδιου του άξονα και ως εκ τούτου οι ταχύτητες αγωγής νεύρων διατηρούνται σχετικά σε φυσιολογικές τιμές παρά τις αισθητικοκινητικές αδυναμίες που παρατηρούνται.

Με βάση τον τρόπο κληρονόμησης η CMT διαχωρίζεται σε επικρατητικό αυτοσωματικό (autosomal dominant - AD) (Dyck and Lambert 1968), υπολειπόμενο αυτοσωματικό (autosomal recessive - AR) (Harding and Thomas 1980b) και φυλοσύνδετο (X-linked) τύπο (Fischbeck et al. 1986).

Αποτέλεσμα των πιο πάνω διαχωρισμών ήταν η ταξινόμηση της πολυνευροπάθειας CMT στους τύπους: **CMT1**, **CMT2**, **CMT3**, **CMT4** και **CMTX** (Harding and Thomas 1980a; Harding and Thomas 1980b; Rozear et al. 1987). Στη συνέχεια έγιναν διάφορες προσπάθειες ταξινόμησης της νόσου μέχρι να καταλήξουμε στη σημερινή δομή ταξινόμησης όπως θα περιγραφεί πιο κάτω (Ben Othmane et al. 1993; Bolino et al. 1996; Kalaydjieva et al. 1996; LeGuern et al. 1996; Bouhouche et al. 1999; Othmane et al. 1999; Delague et al. 2000).

1.7.1 Περιγραφή της CMT

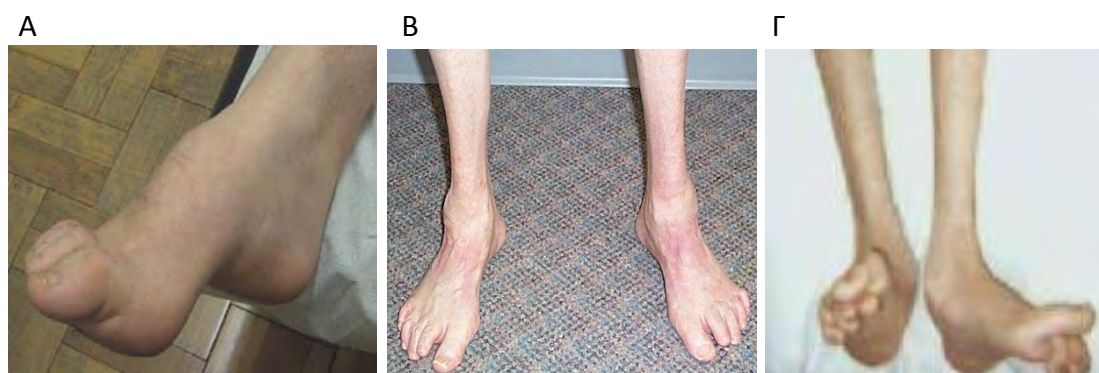
Η νόσος των Charcot-Marie-Tooth (CMT) είναι η πιο συχνή κληρονομική νευρολογική πάθηση με συχνότητα 17-40 ανά 100,000 κατοίκους.

Τα κύρια κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου είναι η ατροφία ή η αδυναμία των περιφερικών μυών των κάτω άκρων, με τη χαρακτηριστική παραμόρφωση του άκρου ποδός - της κοίλοποδίας (pes cavus), η περιφερική αδυναμία των μυών των άνω άκρων συνήθως σε μεταγενέστερο στάδιο της εξέλιξης της νόσου και σε μικρότερο βαθμό οι αισθητικές διαταραχές (υπαισθησίες). Η προσβολή στα κάτω άκρα αφορά τους μύες του άκρου ποδός, τους μύες της κνήμης (ιδιαίτερα τους περνιαίους) και τους μύες του κάτω τριτημορίου του μηρού. Στα άνω άκρα η προσβολή αρχίζει από τους μύες της άκρας χειρός και συνεχίζει προς τα πάνω μέχρι πριν από τους αγκώνες. Χαρακτηριστικό της νόσου είναι επίσης το καλπαστικό βάδισμα. Στα προσβεβλημένα άνω και κάτω άκρα παρατηρείται ακόμη μείωση ή εξάλειψη των αντανακλάσεων των τενόντων (Εικόνα 1.6).

Σε νευροφυσιολογικές μελέτες συνήθως βρίσκουμε επιβράδυνση της κινητικής ταχύτητας αγωγής στα περιφερικά νεύρα, ενώ οι βιοψίες νεύρων δείχνουν ελάττωση των μεγάλων αισθητικό-κινητικών ινών με αύξηση του ενδονευρικού συνδετικού ιστού. Προσβάλλονται τόσο οι νευράξονες όσο και η μυελίνη και κατά κανόνα η βλάβη αφορά πολύ περισσότερο τα περιφερικά απ' ό τι τα κεντρικά τμήματα των νεύρων.

Η πολυνευροπάθεια αυτή έχει χρόνια προοδευτική εξελικτική πορεία και συχνά οδηγεί τα άτομα αυτά σε κινητική αναπηρία ποικίλης σοβαρότητας. Μέχρι σήμερα δεν έχει γίνει κατορθωτή ουσιαστική θεραπεία της νόσου και το μόνο που μπορεί

να προσφερθεί στους ασθενείς είναι φυσιοθεραπεία και ορθοπεδικά μέσα ή ορθοπεδικές διορθωτικές επεμβάσεις που βοηθούν στη βελτίωση της βάρδισης.



Εικόνα 1.6 Ασθενείς με CMT: **(Α)** Χαρακτηριστική ποδική καμάρα - κοιλοποδία (pes cavus) σε ασθενή με CMT (πηγή: (Reilly 2009)). **(Β)** Αδυναμία των περιφερικών μυών των κάτω άκρων σε ασθενή με CMT2 (πηγή: <http://www.myfootshop.com/detail.asp?Condition=Charcot-Marie%20Tooth%20Disease>). **(Γ)** Παραμόρφωση του άκρου ποδός σε ασθενή με CMT1A (πηγή: <http://www.monastyr.info/article/charot-marie-tooth-disease>).

1.7.2 Ταξινόμηση της CMT

Η πολυνευροπάθεια CMT όπως έχουμε ήδη προαναφέρει παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια με αποτέλεσμα να δυσκολεύει τις προσπάθειες ταξινόμησης της νόσου. Παρόλα αυτά με βάση τα κλινικά, νευροφυσιολογικά, νευροπαθολογικά, ιστοπαθολογικά και νευρογενετικά κριτήρια που παρουσιάζονται σύμφωνα με την πρόσφατη διεθνή βιβλιογραφία (Reilly 2007; Barisic et al. 2008; Reilly 2009; Szigeti and Lupski 2009), η νόσος ταξινομείται ως εξής:

1.7.2.1 CMT1 (HMSN I): Επικρατητικός απομυελινωτικός αυτοσωματικός τύπος

Ο CMT1 είναι ο πιο συχνός τύπος της CMT στους περισσότερους πληθυσμούς παγκοσμίως. Κλινικά οι ασθενείς αυτοί εμφανίζουν δυσκολία βάρδισης και παραμόρφωση του άκρου ποδός με τα πρώτα συμπτώματα να εμφανίζονται

συνήθως στις πρώτες δύο δεκαετίες της ζωής τους. Ο τύπος αυτός μπορεί να διαχωριστεί περαιτέρω στους εξής τύπους:

- **CMT1A** είναι ο συχνότερος τύπος, και το υπεύθυνο γονίδιο χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 17p11.2-12 (Vance et al. 1989). Η παθογένεια του συγκεκριμένου τύπου οφείλεται στην ύπαρξη διπλασιασμού του γονιδίου *PMP22* (Lupski et al. 1991; Raeymaekers et al. 1991; Valentijn et al. 1992). Οι de novo μεταλλάξεις (φυσιολογικοί γονείς και εμφάνιση για πρώτη φορά της μετάλλαξης σ' ένα παιδί τους) εμφανίζονται περίπου στο ένα πέμπτο των ασθενών με CMT1A. Το γονίδιο *PMP22* είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση της πρωτεΐνης 22 της περιφερικής μυελίνης (PMP22), η οποία είναι μια δομική γλυκοπρωτεΐνη που παίζει σημαντικό ρόλο στη μυελίνωση, την αύξηση και διαφοροποίηση των κυττάρων (Adlkofer et al. 1997; Martini and Schachner 1997). Η αυξημένη ποσότητα του γονιδίου έχει επιπτώσεις στην ενδοκυτταρική υποβάθμιση των μεμβρανών. Τα πρώτα συμπτώματα της νόσου παρατηρούνται κυρίως στην παιδική ηλικία με χαρακτηριστικό κλινικό φαινότυπο CMT και κυρίως ήπια μορφή. Εντούτοις ο βαθμός σοβαρότητας της νόσου μπορεί να διαφέρει ακόμα και στα άτομα της ίδιας οικογένειας. Σε αρκετές περιπτώσεις παρατηρείται επίσης υπερτροφία νεύρου (25%) και σε ορισμένες απώλεια ακοής (5%) (Barisic et al. 2008). Οι ταχύτητες αγωγής των περιφερικών κινητικών νεύρων (MNCV) ελαττώνονται (<38 m/s) από τα πρώτα κιόλας στάδια της πάθησης.
- **CMT1B** συνδέεται με σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *MPZ* το οποίο χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 1q21-23 και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη (MPZ ή P0) της μυελίνης. Η πρωτεΐνη αυτή είναι επίσης όπως και η PMP22 μια δομική

γλυκοπρωτεΐνη, που παίζει σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα της δομής της μυελίνης. Η MPZ είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη της περιφερικής μυελίνης και συνδέει τα έλυτρα της μυελίνης που είναι απαραίτητα για την κανονική δομή και τη λειτουργία της (Martini and Schachner 1997). Μεταλλάξεις του γονιδίου και κατά συνέπεια παθολογική πρωτεΐνη MPZ έχει επιπτώσεις στη αλληλεπίδραση των νευρώνων και των κυττάρων Schwann, με αποτέλεσμα την ελαττωματική μυελίνωση των περιφερειακών νεύρων. Οι περισσότερες μεταλλάξεις της MPZ προκαλούν έναν κλασσικό CMT1 κλινικό φαινότυπο με έναρξη της νόσου στην πρώτη δεκαετία της ζωής, την προοδευτική μυϊκή αδυναμία των άκρων και αισθητικές διαταραχές. Εντούτοις, μερικές μεταλλάξεις οδηγούν σε σοβαρότερες μορφές CMT όπως είναι το σύνδρομο Dejerine-Sottas (DSS) και η νευροπάθεια σύμφυτης υπομυελίνωσης (CHN), οι οποίες συνδέονται με CMT2 (Nelis et al. 1999). Ηλεκτροφυσιολογικά κριτήρια έδειξαν ότι σε μικρές ηλικίες έναρξης της νόσου (1^η δεκαετία της ζωής) παρουσιάζονται πολύ χαμηλές ταχύτητες αγωγής κινητικών νεύρων (<20 m/s), ενώ με την αύξηση της ηλικίας έναρξης της νόσου οι ταχύτητες αγωγής κινητικών νεύρων αυξάνονται και σε πολύ μεγάλες ηλικίες έναρξης παρουσιάζονται ταχύτητες μέσα στα όρια του αξονικού τύπου (Reilly 2007; Reilly 2009).

- **CMT1C** συνδέεται με σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *LITAF/SIMPLE* (lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor/small integral membrane protein of lysosomelate endosome) που χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 16p13.1–p12.3, του οποίου η αντίστοιχη πρωτεΐνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην οργάνωση άλλων πρωτεϊνών του περιφερικού νεύρου συμπεριλαμβανομένης και της PMP22 (Street et al. 2003). Τα πρώτα

συμπτώματα της νόσου εμφανίζονται στη δεύτερη δεκαετία της ζωής των ασθενών με κλασικό CMT1 κλινικό φαινότυπο. Εξαιρεση αποτελεί ένας ασθενής με μετάλλαξη στο γονίδιο *LITAF* που παρουσίαζε κλινικό φαινότυπο CMT2 (Street et al. 2003; Bennett et al. 2004; Saifi et al. 2005). Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων παρουσιάζονται αρκετά μειωμένες (16–25 m/s).

- **CMT1D** συνδέεται με σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *EGR2* (early growth response element 2) το οποίο χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 10q21.1-q22.1 (Warner et al. 1998). Η πρωτεΐνη *EGR2* αποτελεί παράγοντα μεταγραφής που ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων μυελίνης (Torilko et al. 1994; Nagarajan et al. 2001). Ο κλινικός φαινότυπος αυτού του τύπου είναι παρόμοιος του CMT1 με επιπλέον δυσλειτουργία κρνιακών νεύρων με αποτέλεσμα τη διπλωπία και την πάρεση των φωνητικών χορδών (Pareyson et al. 2000). Εντούτοις όπως και στον τύπο CMT1B κάποιες μεταλλάξεις του γονιδίου μπορεί να οδηγήσουν σε DSS και CHN (Warner et al. 1998; Timmerman et al. 1999). Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων συνήθως είναι μειωμένες και σπανίως μπορεί να είναι εντός των φυσιολογικών ορίων (9–42 m/s).
- **CMT1E** συνδέεται με σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *PMP22* (Lupski et al. 1991; Raeymaekers et al. 1991; Valentijn et al. 1992). Ο τύπος αυτός παρουσιάζει κλινικό φαινότυπο CMT1A σοβαρής μορφής. Σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *PMP22* μπορεί επίσης να προκαλέσουν διάφορους άλλους κλινικούς φαινότυπους όπως DSN, CHN και HNPP.
- **CMT1F** συνδέεται με σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *NEFL* το οποίο χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 8q21 και είναι σημαντική στην οργάνωση των

νευροϊνωματωδών και αξονικών μεταφορών (Jordanova et al. 2003a). Τα συμπτώματα της νόσου εμφανίζονται στην πρώτη δεκαετία της ζωής και είναι συνήθως πολύ σοβαρά. Παρουσιάζονται και στον τύπο αυτό μεταλλάξεις που οδηγούν σε DSS καθώς επίσης και σε CMT2E. Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων είναι μειωμένες (15–38 m/s).

1.7.2.2 CMT2 (HMSNII): Επικρατητικός αξονικός αυτοσωματικός τύπος

Ο CMT2 δεν είναι τόσο συχνός τύπος όσο ο CMT1 και αποτελεί το 20% των ασθενών με CMT στους περισσότερους πληθυσμούς παγκόσμια. Ο κλινικός φαινότυπος των ασθενών αυτού του τύπου χαρακτηρίζεται από δυσκολία βάδισης και παραμόρφωση του άκρου ποδός στο 50% περίπου των ασθενών. Η ηλικία έναρξης της νόσου στο συγκεκριμένο τύπο είναι κάπως μεγαλύτερη από ότι στον τύπο 1. Ο CMT2 μπορεί να διαχωριστεί στους εξής τύπους:

- **CMT2A** είναι ο πιο συχνός τύπος CMT2 και το υπεύθυνο γονίδιο είναι το *MFN2* (mitofusin 2) το οποίο χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 1p36. Η πρωτεΐνη MFN2 παίζει σημαντικό ρόλο στη σύντηξη των μιτοχονδρίων. Η παθολογική MFN2 πρωτεΐνη οδηγεί σε ανεπαρκή μεταφορά μεταξύ των μιτοχονδρίων και των αξόνων των περιφερικών νεύρων. Στην ίδια χρωμοσωμική περιοχή με το γονίδιο *MFN2* βρίσκεται και το γονίδιο *KIF1B* (kinesin motor protein 1B gene). Μέχρι σήμερα έχει αναφερθεί μία μετάλλαξη σε Ιαπωνική οικογένεια με κλινικό φαινότυπο CMT2A (Zhao et al. 2001). Οι ασθενείς με CMT2A παρουσιάζουν ένα κλασικό αλλά σοβαρής μορφής κλινικό φαινότυπο CMT και ποσοστό 28% των ασθενών αυτών καταλήγουν σε αναπηρικό αμαξίδιο (Barisic et al. 2008). Τα συμπτώματα της νόσου εμφανίζονται την πρώτη δεκαετία της ζωής των

ασθενών. Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων στους περισσότερους από τους ασθενείς είναι φυσιολογικές ή ελαφρώς μειωμένες. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *MFN2* έχουν επίσης περιγραφεί και σε οικογένειες με περνιαία μυϊκή ατροφία και κληρονομική σπαστική παραπληγία (HMSN_V) καθώς επίσης σε οικογένειες με οπτική ατροφία (HMSN_{VI}), (Zhu et al. 2005; Zuchner et al. 2006). Τα συμπτώματα της νόσου εμφανίζονται την πρώτη δεκαετία της ζωής των ασθενών. Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων στους περισσότερους από τους ασθενείς είναι φυσιολογικές ή ελαφρώς μειωμένες.

- **CMT2B** συνδέεται με σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *RAB7* (RAS-associated GTP-binding protein gene) το οποίο χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 3q13–q22 (Kwon et al. 1995; Verhoeven et al. 2003). Η πρωτεΐνη RAB7 είναι μια GTPase που ενέχεται στην κανονική λειτουργία μετακίνησης ουσιών διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών καθώς και στα τελευταία στάδια της ενδοκυτταρικής οδού (Feng et al. 1995). Ο τύπος αυτός χαρακτηρίζεται κλινικά κυρίως από περιφερική αδυναμία καθώς και αισθητικές διαταραχές στα περιφερικά τμήματα κυρίως με σοβαρότερες συνέπειες στα κάτω άκρα. Η ηλικία έναρξης της νόσου για τον τύπο αυτό είναι από 13 έως 30 χρονών (Auer-Grumbach et al. 2000).
- **CMT2C** συνδέεται με σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *TRPV4* το οποίο χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 12q23–q24 (Dyck et al. 1994; Klein et al. 2003; Landouere et al. 2010). Το γονίδιο *TRPV4* εμπλέκεται στη λειτουργία ιοντικών καναλιών ασβεστίου. Κλινικά παρατηρείται αδυναμία των κεντρικών μυών, των μυών του διαφράγματος, των μεσοπλεύριων μυών, παράλυση των φωνητικών

χορδών και σε κάποιες περιπτώσεις η έκβαση είναι μοιραία. Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρου είναι φυσιολογικές (>50 m/s).

- **CMT2D** συνδέεται με σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *GARS* (glycyl-tRNA synthetase gene) το οποίο χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 7p15 (Ionasescu et al. 1996a). Η κωδικοποιούσα πρωτεΐνη συμμετέχει στις διαδικασίες μετάφρασης και μεταλλάξεις του γονιδίου επηρεάζουν τη σύνθεση της πρωτεΐνης που παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση και την καλή λειτουργία των κινητικών νεύρων (Antonellis et al. 2003). Η νόσος εκδηλώνεται σε ηλικίες μεταξύ 8 και 36 ετών. Αρχικά επηρεάζει τους μικρούς μύες των άνω άκρων και στη συνέχεια σε μικρότερη έκταση τα κάτω άκρα. Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων είναι φυσιολογικές.
- **CMT2E** συνδέεται με σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *NEFL* (neurofilament light chain gene) το οποίο χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 8p21 (Mersiyanova et al. 2000). Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *NEFL* προκαλούν αποδιοργάνωση της πρωτεΐνης και μείωση της αξονικής μεταφοράς. Η νόσος αρχίζει με κινητικά προβλήματα βάδισης συνήθως γύρω στην ηλικία 10-15 ετών. Η πάρεση στα κάτω άκρα ποικίλει από ήπια αδυναμία μέχρι και την πλήρη παράλυση. Οι αισθητικές διαταραχές και η ποδική καμάρα (pes cavus) είναι συχνά συμπτώματα του τύπου αυτού. Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων είναι μειωμένες.
- **CMT2F** συνδέεται με σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *HSPB1* (*HSP27*) το οποίο χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 7q11– q21 (Ismailov et al. 2001; Evgrafov et al. 2004). Το γονίδιο κωδικοποιεί την αντίστοιχη πρωτεΐνη (heat shock protein B1) η οποία συμβάλλει σε διάφορες σημαντικές λειτουργίες

συμπεριλαμβανομένης της προστασίας της δομής άλλων πρωτεϊνών. Η ηλικία έναρξης της νόσου είναι συνήθως μεταξύ 15 και 25 ετών με αργά προοδευτική πορεία. Οι ασθενείς με CMT2F παρουσιάζουν συμμετρική αδυναμία των μυών των κάτω άκρων με αποτέλεσμα την ατροφία και δυσμορφία των ποδιών (foot drop, foot deformities) και αισθητική δυσλειτουργία. Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων είναι φυσιολογικές ή ελαφρώς μειωμένες.

- **CMT2G** έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 12p12–13.3 (Nelis et al. 2004) χωρίς το υπεύθυνο γονίδιο να έχει ανευρεθεί. Η ηλικία έναρξης της νόσου ποικίλει μεταξύ 9 και 76 ετών και παρουσιάζει ήπια συμπτώματα. Κλινικά παρουσιάζεται δυσκολία στη βάρδιση. Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων είναι φυσιολογικές ή ελαφρώς μειωμένες.
- **CMT2H** συνδέεται με σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *GDAP1* το οποίο χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 8q13–q21.1 (Barhoumi et al. 2001; Cuesta et al. 2002; Boerkoel et al. 2003). Τα κλινικά συμπτώματα του τύπου αυτού εμφανίζονται κυρίως στην πρώτη δεκαετία μ' ένα κλασικό κλινικό φαινότυπο CMT. Κάποιοι από τους ασθενείς παρουσίασαν πυραμιδικά σημεία. Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων είναι φυσιολογικές ή ελαφρώς μειωμένες.
- **CMT2K** συνδέεται με σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *GDAP1* και παρουσιάζει παρόμοια κλινική εικόνα με τον τύπο CMT2H (Cuesta et al. 2002; Birouk et al. 2003; Boerkoel et al. 2003). Τα κλινικά συμπτώματα εμφανίζονται επίσης στην πρώτη δεκαετία ή λίγο νωρίτερα, με μια αργή προοδευτική πορεία που συνδέεται με την παράλυση των φωνητικών χορδών και περιστασιακά με

την οπτική ατροφία νεύρων. Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων είναι κανονικές ή ελαφρά μειωμένες.

- **CMT2I** συνδέεται με σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *MPZ* το οποίο χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 1q22. Τα πρώτα συμπτώματα εμφανίζονται σε μεγάλη ηλικία (47-60 ετών) με αδυναμία και ατροφία των περιφερικών μυών, παραμόρφωση των ποδιών και αισθητικές διαταραχές (Marrosu et al. 1998; De Jonghe et al. 1999; Auer-Grumbach et al. 2003). Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων είναι μειωμένες.
- **CMT2J** συνδέεται με σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *MPZ* με τα πρώτα συμπτώματα να εμφανίζονται και σε μικρότερες ηλικίες (18-60 ετών) απ' ότι στον τύπο CMT2I. Οι ασθενείς του τύπου αυτού παρουσιάζουν παρόμοια κλινική εικόνα με τον προηγούμενο τύπο και επιπλέον περιγράφονται προβλήματα όρασης και απώλεια ακοής (De Jonghe et al. 1999; Auer-Grumbach et al. 2003). Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων αρχικά είναι φυσιολογικές και μειώνονται προοδευτικά με την πορεία της νόσου.
- **CMT2L** συνδέεται με σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *HSPB8* (*HSP22*) το οποίο χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 12q24.3. Κλινικά παρουσιάζεται αδυναμία των κάτω άκρων, ήπια αισθητική απώλεια και σε μερικές περιπτώσεις σκολίωση (Tang et al. 2004). Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων είναι φυσιολογικές.

1.7.2.3 DI-CMT: Επικρατητικός μεικτός τύπος

Ο μεικτός τύπος CMT (DI-CMT) που έχει πρόσφατα περιγραφεί, χαρακτηρίζεται από ενδιάμεσες τιμές κινητικών ταχυτήτων αγωγής νεύρων (25 έως 45 m/s). Κλινικά

χαρακτηρίζεται από μέτριας βαρύτητας CMT. Ηλεκτροφυσιολογικά και παθολογοανατομικά οι ασθενείς παρουσιάζουν χαρακτηριστικά γνωρίσματα τόσο από αξονικό όσο και από απομυελινωτικό τύπο. Ο τύπος αυτός διαχωρίζεται ως εξής:

- **DI-CMTA** έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 10q24.1–q25.1, αλλά το υπεύθυνο γονίδιο παραμένει ακόμα άγνωστο (Verhoeven et al. 2001).
- **DI-CMTB** συνδέεται με σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *DNM2* (dynamin 2) το οποίο χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 19p12–13.2 (Zuchner et al. 2005). Το γονίδιο *DNM2* εμπλέκεται στον έλεγχο μεταφοράς ουσιών διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών καθώς και στην ενδοκυττάρωση.
- **DI-CMTC** συνδέεται με σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *YARS* (tyrosyl-tRNA synthetase) το οποίο χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 1p34–p35 (Jordanova et al. 2006). Το γονίδιο *YARS* διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πρωτεϊνική σύνθεση καθώς και στη μετάδοση σημάτων από τα νεύρα στους μύες.
- **DI-CMTD** συνδέεται με σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *MPZ* που όπως προαναφέραμε χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 1q22 (Mastaglia et al. 1999). Μεταλλάξεις του γονιδίου *MPZ* προκαλούν επίσης τον τύπο CMT1B, CMT2I και CMT2J που ήδη έχουμε περιγράψει.
- **DI-CMT** συνδέεται με σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *ARHGEF10* (rho Guanine-nucleotide exchange factor 10) το οποίο χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 8p23 (Verhoeven et al. 2003).
- **HMSN-P** έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 3q13.1 (Takashima et al. 1997) αλλά το υπεύθυνο γονίδιο παραμένει ακόμα άγνωστο.

1.7.2.4 CMTX1: Επικρατητικός απομυελινωτικός φυλοσύνδετος τύπος στο χρωμόσωμα X.

Ο CMTX1 είναι ο δεύτερος πιο συχνός απομυελινωτικός τύπος με συχνότητα 7-11% στο σύνολο των ασθενών με CMT (Boerkoel et al. 2002). Συνδέεται με σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *GJB1* (gap junction binding 1) και έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα Xq13.1 (Gal et al. 1985). Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μια συνδετική πρωτεΐνη, την Cx32 (connexin 32), που εντοπίζεται στους κόμβους Ranvier και συμμετέχει στη μεταφορά ουσιών χαμηλού μοριακού βάρους μεταξύ των κυττάρων (Bergoffen et al. 1993). Οι άντρες συνήθως παρουσιάζουν πιο σοβαρά συμπτώματα λόγω του ότι η νόσος είναι φυλοσύνδετη, ενώ οι ετερόζυγες γυναίκες παρουσιάζουν ήπια κλινική εικόνα ή είναι ασυμπτωματικές. Η ηλικία έναρξης της νόσου στους άντρες είναι περίπου 5 ετών, ενώ στις γυναίκες εμφανίζεται αργότερα. Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων κυμαίνεται στους άντρες στα 30–40 m/s και στις γυναίκες στα 30–50 m/s (Kleopa and Scherer 2006a).

1.7.2.5 HMSN III ή CMT3: Σύνδρομο Dejerine-Sottas (DSS)

Ο τύπος αυτός περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1889 από τον Gombault (Gombault 1889) και στη συνέχεια οι Dejerine και Sottas, από τους οποίους το σύνδρομο πήρε και το όνομα του, μελέτησαν περαιτέρω τον τύπο αυτό (Dejerine and Sottas 1893).

Ο τρόπος κληρονομησης του συνδρόμου Dejerine-Sottas μπορεί να είναι επικρατητικός, υπολειπόμενος αυτοσωματικός ή σποραδικός. Ο τύπος αυτός CMT διαχωρίζεται ως ακολούθως:

- **CMT3A (DSS-A)** είναι επικρατητικός αυτοσωματικός τύπος και συνδέεται με σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *PMP22* που όπως προαναφέραμε

χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 17p11.2–12 (Roa et al. 1993). Κλινικά παρουσιάζεται ως μια σοβαρή μορφή απομυελινωτικής πολυνευροπάθειας με εμφανή υπερτροφία των περιφερικών νεύρων. Οι ασθενείς μπορεί να εμφανίσουν αταξία και σκολίωση και σε μετέπειτα στάδιο παράλυση με αποτέλεσμα την καθήλωση σε αναπηρικό αμαξίδιο. Η ηλικία έναρξης της νόσου είναι πολύ πρώιμη (<3 ετών) και οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων είναι μειωμένες (<10 m / s).

- **CMT3B (DSS-B)** είναι επικρατητικός ή υπολειπόμενος αυτοσωματικός τύπος και συνδέεται με σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *MPZ* το οποίο χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 1q22 (Hayasaka et al. 1993b). Τα πρώτα κλινικά συμπτώματα εμφανίζονται στην παιδική ηλικία αρχίζοντας με υποτονία. Επίσης μπορεί να παρουσιαστεί αναπνευστική ανεπάρκεια που είναι και αιτία πρόκλησης πρόωρου θανάτου. Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων είναι μειωμένες (<15 m / s).
- **CMT3C (DSS-C)** χαρτογραφήθηκε ως επικρατητικός τύπος στο χρωμόσωμα 8q23–q24 σε μια οικογένεια από την Αϊόβα (Iowa) των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής (Ionasescu et al. 1996b). Οι ασθενείς του τύπου αυτού μπορεί να εκδηλώσουν νευροπαθητικές αρθροπάθειες (Charcot joints).
- **CMT3D (DSS-D)** χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 19q13.1–13.2 ως υπολειπόμενος τύπος και συνδέεται με σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο περιαξίνη (*PRX*) (Boerkoel et al. 2001). Κλινικά χαρακτηρίζεται από σοβαρές αισθητικές διαταραχές και αισθητική αταξία, την απώλεια ακοής και τα χαρακτηριστικά πρόσωπα.

- **DSS-EGR** συνδέεται με σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *EGR2* (early growth response 2) το οποίο χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 10q21–22 (Boerkoel et al. 2001). Είναι επικρατητικός τύπος και πολλές από τις μεταλλάξεις είναι νέες (de novo). Κλινικά συνήθως εμφανίζουν αναπνευστική δυσχέρεια και προσβολή κраниακών νεύρων. Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων είναι μειωμένες (<8m/s)

1.7.2.6 CMT4: Υπολειπόμενος απομυελινωτικός αυτοσωματικός τύπος

Ο CMT4 είναι ένας απομυελινωτικός τύπος με αυτοσωματικό υπολειπόμενο τρόπο κληρονόμησης (Kuhlenbaumer et al. 2002). Το 1990 προτάθηκε ο διαχωρισμός του τύπου CMT4 σε τρεις υποομάδες CMT4A, CMT4B και CMT4C (Ben Othmane 1990)

- **CMT4A** συνδέεται με σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *GDAP1* (Gangliosideinduced differentiation - associated protein 1) στο χρωμόσωμα 8q13–q21 (Ben Othmane et al. 1993). Μεταλλάξεις του γονιδίου αυτού, εκτός από τον απομυελινωτικό τύπο CMT4A, συνδέονται επίσης και με τον αξονικό τύπο AR-CMT2. Η πρωτεΐνη GDAP1 βρίσκεται στα μιτοχόνδρια (Pedrola et al. 2005) και πιθανώς η CMT4A να είναι μια μιτοχονδριακή νευροπάθεια. Κλινικά παρουσιάζονται σοβαρές κινητικές διαταραχές και σταδιακή εμφάνιση σκολίωσης. Η νόσος εμφανίζεται στην παιδική ηλικία και οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων βρίσκονται μεταξύ 25 με 35 m/s (Ammar et al. 2003).
- **CMT4B1** συνδέεται με σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *MTMR2* (myotubularin-related protein 2) το οποίο χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 11q22. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη, τυροσίνη – φωσφατάση, που επηρεάζει τη μεταγραφή και τον πολλαπλασιασμό κυττάρων (Bolino et al. 2000).

Τα πρώτα συμπτώματα της νόσου εμφανίζονται στην παιδική ηλικία. Η νόσος προκαλεί σοβαρή αδυναμία και συχνά επηρεάζονται τα κρανιακά νεύρα, ενώ σε μερικές περιπτώσεις παρατηρείται γλαύκωμα και τύφλωση. Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων είναι σημαντικά μειωμένες με τιμές που κυμαίνονται από 9 έως 22 m/s.

- **CMT4B2** συνδέεται με σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *MTMR13* (myotubularin related protein 13) ή *SBF2* (set binding factor 2) το οποίο χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 11p15. Ο τύπος CMT4B2 παρουσιάζει παρόμοιο κλινικό φαινότυπο με τον CMT4B1 (Azzedine et al. 2003; Senderek et al. 2003). Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων είναι επίσης σημαντικά μειωμένες με τιμές που κυμαίνονται από 15 έως 30 m/s.
- **CMT4C** συνδέεται με σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *KIAA1985/SH3TC2-SH3* το οποίο χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 5q23–33 (LeGuern et al. 1996; Gabreels-Festen et al. 1999). Η λειτουργία της πρωτεΐνης παραμένει άγνωστη παρόλο που πειράματα σε ποντικούς έδειξαν ότι πιθανό να συνδέεται με τη μυελίνωση και την προστασία του κόμβου Ranvier (Arnaud et al. 2009). Η νόσος εμφανίζεται στην παιδική ηλικία με διάφορες κλινικές εικόνες. Χαρακτηριστικά παρουσιάζεται σκολίωση, κινητικές διαταραχές και αναπνευστική ανεπάρκεια. Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων είναι μειωμένες 10 με 34 m/s.
- **CMT4D** (HMSN-Lom) συνδέεται με σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *NDRG1* (N-myc downstream-regulated gene 1) το οποίο χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 8q24.3 (Kalaydjieva et al. 1996). Η πρωτεΐνη NDRG1 παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Κλινικά

παρουσιάζεται μυϊκή αδυναμία των άκρων και μείωση ή απουσία νευρωνικού δυναμικού. Άλλα κλινικά χαρακτηριστικά που παρουσιάζονται είναι κώφωση και προβλήματα ομιλίας. Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων είναι μειωμένες με τιμές 9–20 m/s.

- **CMT4E** συνδέεται με σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *EGR2* το οποίο χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 10q21.1–q22.1 (Warner et al. 1998). Τα πρώτα συμπτώματα εμφανίζονται αμέσως μετά τον τοκετό και οι ασθενείς είναι εξ' αρχής καθηλωμένοι στο αναπηρικό αμαξίδιο. Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων είναι δραματικά μειωμένες με τιμές μικρότερες από 8 m/s.
- **CMT4F** συνδέεται με σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *PRX* (periaxin - περιαξίνη) το οποίο χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 9q13.1–q13.3 (Delague et al. 2000). Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί δύο πρωτεΐνες (L και S περιαξίνη) που είναι σημαντικές για τη σωστή συντήρηση της μυελίνης των περιφερικών νεύρων (Dytrych et al. 1998). Κλινικά παρουσιάζει σοβαρό κλινικό φαινότυπο CMT1 η DSS (Boerkoel et al. 2001; Takashima et al. 2002). Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων είναι πολύ μειωμένες με τιμές κάτω από 15 m/s.
- **CMT4G** (CMT-Russe η HSMNR) χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 10q23.2 χωρίς να έχει ανευρεθεί το υπεύθυνο γονίδιο στο παρόν στάδιο (Thomas et al. 2001). Τα συμπτώματα (μυϊκή αδυναμία άκρων) εμφανίζονται σε ευρύ φάσμα ηλικιών (8-43 έτη). Αρχικά παρουσιάζεται αδυναμία των μυών των κάτω άκρων, στη συνέχεια αισθητικές διαταραχές και παραμορφώσεις των άνω και κάτω άκρων. Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων είναι ελαφρώς μειωμένες με τιμές 30 - 35

m/s. Βιοψία νεύρων έδειξε να υπάρχουν μεγάλες ίνες μυελίνης χωρίς σημάδια απομυελίνωσης ή υπομυελίνωσης (Hantke et al. 2003).

- **CMT4H** χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 12p11.21 (De Sandre-Giovannoli et al. 2005) και το υπεύθυνο γονίδιο είναι το *FGD4* (Delague et al. 2007; Stendel et al. 2007). Ανάμεσα στα άλλα οι ασθενείς εμφανίζουν καθυστέρηση στην ανάπτυξη και σκολίωση. Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων είναι αισθητά μειωμένες με τιμές κάτω από 15 m/s.
- **CMT4J** συνδέεται με σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *FIG4* (*KIAA0274*) το οποίο χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 6q21 (Chow et al. 2007). Το γονίδιο αυτό είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση των κανονικών επιπέδων των φωσφολιπιδίων στις ενδοκυτταρικές μεμβράνες με αποτέλεσμα την κανονική διακίνηση των διαφόρων μορίων (π.χ. πρωτεΐνες) διαμέσου των μεμβρανών αυτών. Ο κλινικός φαινότυπος είναι σοβαρός με αταξικά φαινόμενα και σοβαρή νευροπάθεια. Η νόσος ξεκινάει στην παιδική ηλικία και οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων είναι πολύ χαμηλές (2 - 7 m/s).
- **CCFDN** (Cataract Congenital with Facial Dysmorphism and Neuropathy) συνδέεται με σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *CTDP1* το οποίο χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 18q23. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί την πρωτεΐνη FCP1 που ρυθμίζει τη λειτουργία των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη διαδικασία μεταγραφής του mRNA. Κλινικά οι ασθενείς εμφανίζουν εκ γενετής καταρράκτες, δυσμορφία προσώπου, καθυστέρηση ανάπτυξης, υπογοναδισμό, χορεία, τρόμο και υπομυελίνωση σε βιοψία νεύρων. Τα συμπτώματα αρχίζουν στη βρεφική ηλικία και οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων είναι 19–33 m/s.

1.7.2.7 CMT4C ή AR-CMT2: Υπολειπόμενος αξονικός αυτοσωματικός τύπος

Ο CMT4C είναι αξονικός τύπος με αυτοσωματικό υπολειπόμενο τρόπο κληρονομής και σχετικά σπάνιος.

- **CMT4C1** ή **AR-CMT2B1** συνδέεται με σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *LMNA* (lamin A/C) το οποίο χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 1q21.2-q21.3 (Bouhouche et al. 1999). Η ανεπάρκεια της πρωτεΐνης lamin A/C συνδέεται με τη δυσλειτουργία του μηχανισμού μεταγραφής γονιδίων που διεξάγεται στον πυρήνα (Lammerding et al. 2004). Η ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων είναι μεταξύ 6 και 27 ετών. Οι ασθενείς παρουσιάζουν σοβαρά συμπτώματα στη δεύτερη δεκαετία της ζωής τους με γρήγορη εξέλιξη που επεκτείνεται και στη συμμετοχή των κεντρικών μυών. Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων είναι φυσιολογικές ή ελαφρώς μειωμένες. Ιστοπαθολογικά εμφανίζεται απώλεια μεγάλων ινών μυελίνης, απομυελίνωση και υπομυελίνωση (De Sandre-Giovannoli et al. 2002).
- **CMT4C2** ή **AR-CMT2C** ή **AR-CMT2H** χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 8q21.3 χωρίς να έχει ανευρεθεί το υπεύθυνο γονίδιο στο παρόν στάδιο (Barhoumi et al. 2001). Τα πρώτα συμπτώματα εμφανίζονται στην πρώτη δεκαετία της ζωής. Κλινικά διακρίνεται από τους υπόλοιπους τύπους της CMT2 λόγω των αυξημένων τενόντιων αντανακλαστικών της επιγονατίδας και των άνω άκρων. Τα αχίλλεια τενόντια αντανακλαστικά είναι καταργημένα ενώ το πελματιαίο αντανακλαστικό δεν εκλύεται λόγω της σοβαρής ατροφίας. Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων είναι φυσιολογικές ή ελαφρώς μειωμένες. Στη βιοψία νεύρων παρατηρείται σοβαρή απώλεια των νευρικών αξόνων.

- **CMT4C3** ή **AR-CMT2B2** συνδέεται με σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *MED25* (*ARC92* ή *ACID1*) το οποίο χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 19q13.3 (Leal et al. 2001; Leal et al. 2009). Μόνο μια οικογένεια από την Costa Rica έχει βρεθεί με ηλικία έναρξης στην 3^η με 5^η δεκαετία της ζωής και με τυπικό CMT2 κλινικό φαινότυπο (Berghoff et al. 2004). Χαρακτηρίζεται από φυσιολογικές ή ελαφρώς μειωμένες κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων.
- **CMT4C4** ή **AR-CMT2K** συνδέεται με σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *GDAP1* το οποίο χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 8q13–21.1 (Cuesta et al. 2002; Birouk et al. 2003; Bernard et al. 2006). Τα πρώτα συμπτώματα εμφανίζονται κατά τη βρεφική ή την πρόωρη παιδική ηλικία με υποτονία, καθυστέρηση στην ανάπτυξη της κίνησης και κυφοσκολίωση (Cuesta et al. 2002). Αρχικά παρουσιάζεται αδυναμία των κάτω και στη συνέχεια των άνω άκρων. Σε ορισμένους ασθενείς παρουσιάζεται βράγχος φωνής ή ακόμα και φωνητική παράλυση κατά τη δεύτερη δεκαετία της ζωής τους. Αναπνευστική ανεπάρκεια έχει αναφερθεί σε μια οικογένεια από το Μαρόκο (Azzedine et al. 2003). Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων είναι φυσιολογικές ή ελαφρώς μειωμένες (>40 m/s). Η βιοψία νεύρων έδειξε σοβαρό αξονικό εκφυλισμό, απομυελίνωση και κρεμμυδοειδείς σχηματισμούς των περιφερικών νεύρων (Cuesta et al. 2002; Sevilla et al. 2003; Claramunt et al. 2005).

1.7.2.8 CMTX: Υπολειπόμενος αξονικός φυλοσύνδετος τύπος στο χρωμόσωμα X

Κλινικά οι άντρες ασθενείς με CMTX επηρεάζονται περισσότερο, παρουσιάζοντας συνήθως επιπρόσθετα και διανοητική καθυστέρηση. Οι γυναίκες ασθενείς επηρεάζονται λιγότερο ή είναι ασυμπτωματικές.

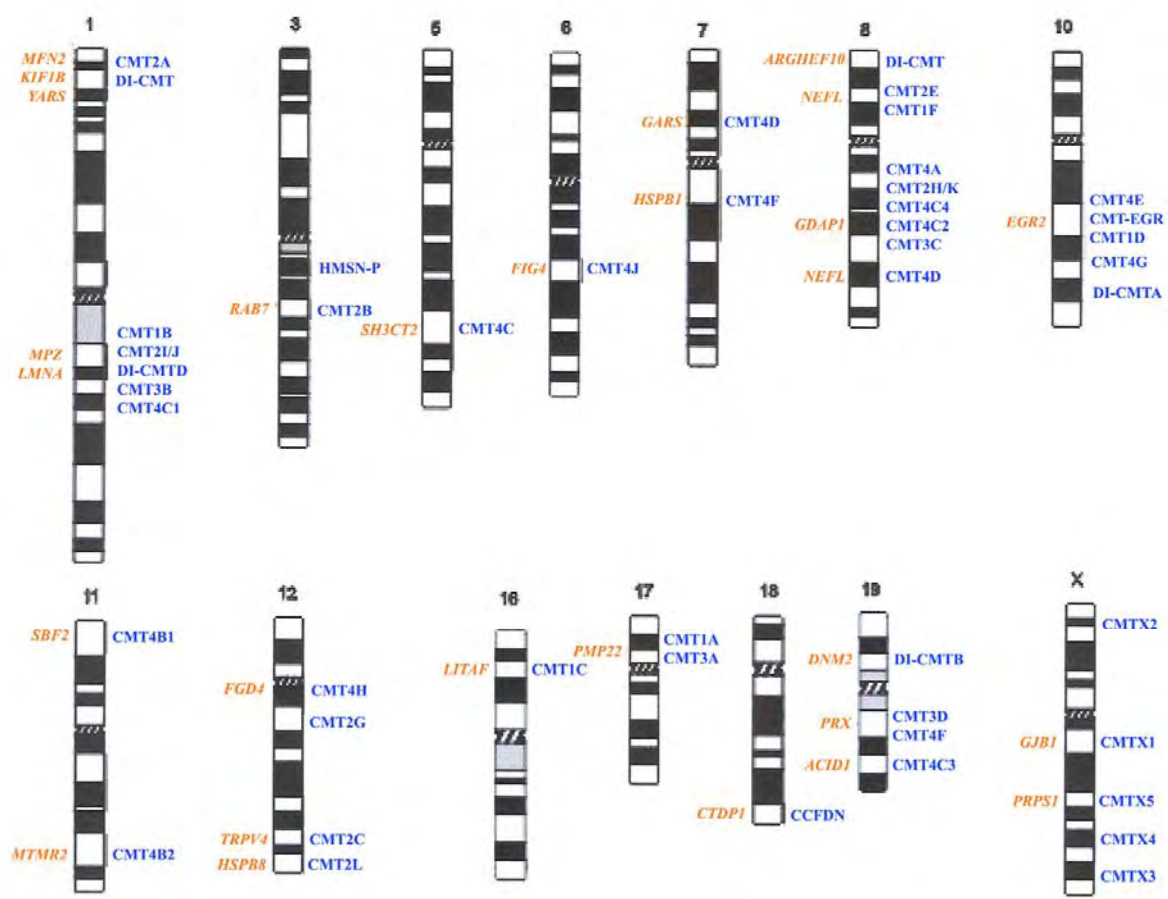
- **CMTX2** χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα Χρ22.2 χωρίς μέχρι τώρα να έχει βρεθεί το υπεύθυνο γονίδιο (Ionasescu et al. 1991)(Ionasescu et al. 1992; Ionasescu et al. 1995). Η νόσος αρχίζει κατά την παιδική ηλικία και χαρακτηρίζεται από την απουσία τενόντιων αντανακλαστικών, την κοιλοποδία (*pes cavus*) και τη νοητική καθυστέρηση. Νευροφυσιολογικά χαρακτηρίζονται από μεικτή βλάβη (απομυελινωτική και αξονική βλάβη).
- **CMTX3** χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα Χq26.3-q27.1 ενώ το παθογόνο γονίδιο παραμένει ακόμα άγνωστο (Huttner et al. 2006). Η ηλικία έναρξης της νόσου είναι μεταξύ 3 και 13 ετών και αρχίζει σταδιακά με αδυναμία των μυών των κάτω άκρων και μείωση των τενόντιων αντανακλαστικών περιφερικά (Ionasescu et al. 1991; Ionasescu et al. 1992). Η νοητική λειτουργία των ασθενών είναι φυσιολογική. Οι γυναίκες φορείς είναι είτε ασυμπτωματικές είτε παρουσιάζουν κοιλοποδία. Νευροφυσιολογικά χαρακτηρίζονται από εκφυλισμό των αξόνων και μερική απομυελίνωση. Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων είναι φυσιολογικές ή ελαφρώς μειωμένες (25-57 m/s).
- **CMTX4** χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα Χq24-q26.1 με το παθογόνο γονίδιο να παραμένει άγνωστο (Fischbeck et al. 1986; Priest et al. 1995). Τα πρώτα συμπτώματα παρουσιάζονται στην παιδική ηλικία με μυϊκή αδυναμία των άκρων. Παρουσιάζεται επίσης κώφωση και διανοητική καθυστέρηση στο 60% των ασθενών (Cowchock et al. 1985). Οι ετερόζυγες γυναίκες είναι ασυμπτωματικές. Η βιοψία νεύρων έδειξε αξονικό εκφυλισμό. Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων είναι φυσιολογικές ή ελαφρώς μειωμένες (33-57 m/s).

- **CMTX5** συνδέεται με σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *PRPS1* το οποίο χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα Xq21.32–q24 (Pauli 1984; Kim et al. 2005; Kim et al. 2007). Η ηλικία έναρξης της νόσου είναι 8 με 13 ετών με δυσκολία βάδισης, μείωση των τενόντιων αντανακλαστικών, απώλεια ακοής και οπτική νευροπάθεια (Rosenberg and Chutorian 1967; Kim et al. 2005). Οι γυναίκες φορείς είναι ασυμπτωματικές. Νευροφυσιολογικά χαρακτηρίζεται από αξονική νευροπάθεια. Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων είναι φυσιολογικές 43–51 m/s.

Πίνακας 1.1 Ταξινόμηση της πολυνευροπάθειας CMT						
Τύπος	Χρωμοσωμική Περιοχή	OMIM	Βιβλιογραφία	Γονίδιο	OMIM	Βιβλιογραφία
Επικρατητικός απομυελινωτικός τύπος						
CMT1A	17p11.2-12	#118220	(Vance et al. 1989)	<i>PMP22</i>	*601097	(Lupski et al. 1991; Raeymaekers et al. 1991)
CMT1B	1q22	#118200	(Bird et al. 1982)	<i>MPZ/PO</i>	*159440	(Hayasaka et al. 1993a)
CMT1C	16p13	#601098	(Street et al. 2002)	<i>LITAF / SIMPLE</i>	*603794	(Street et al. 2003)
CMT1D	10q21-22	#607678		<i>EGR2 / Krox20</i>	*129009	(Warner et al. 1998)
CMT1E	17p11.2-12	#118220	(Vance et al. 1989)	<i>PMP22</i>	*601097	(Lupski et al. 1991; Raeymaekers et al. 1991)
CMT1F	8p21	#607734	(Mersiyanova et al. 2000)	<i>NEFL</i>	*162280	(Jordanova et al. 2003b)
Επικρατητικός αξονικός τύπος						
CMT2A	1p33-36	#609260 #118210	(Ben Othmane et al. 1993)	<i>MFN2</i> <i>KIF1B</i>	*608507 *605995	(Zhao et al. 2001; Zuchner et al. 2004)
CMT AD with pyr. Features (HMSN V)	1p36.2	#600361	(Zuchner et al. 2004)	<i>MFN2</i>	*608507	(Zhu et al. 2005)
CMT with opt. atrophy (HMSN VI or CMT 6)	1p36.2	#601152	(Zuchner et al. 2004)	<i>MFN2</i>	*608507	(Zuchner et al. 2006)
CMT2B	3q13-q22,	#600882	(Kwon et al. 1995)	<i>RAB7</i>	*602298	(Verhoeven et al. 2003)
CMT2C	12q23-q24	#606071	(Klein et al. 2003)	<i>TRPV4</i>	*605427	(Landouere et al. 2010)
CMT2D	7p15	#601472	(Ionasescu et al. 1996a)	<i>GARS</i>	*600287	(Antonellis et al. 2003)
CMT2E	8p21	#607684	(Mersiyanova et al. 2000)	<i>NEFL</i>	*162280	(Mersiyanova et al. 2000)
CMT2F	7q11-q21	#606595	(Ismailov et al. 2001)	<i>HSPB1</i> (<i>HSP27</i>)	*602195	(Evgrafov et al. 2004)
CMT2G	12q12-13.3	#608591	(Nelis et al. 2004)	<i>unknown</i>		
CMT2H	8q13-21.1	#607731	(Barhoumi et al. 2001; Birouk	<i>GDAP1</i>	*606598	(Cuesta et al. 2002)

			et al. 2003)			
CMT2K	8q13-21.1	#607831	(Barhoumi et al. 2001; Birouk et al. 2003)	<i>GDAP1</i>	*606598	(Cuesta et al. 2002)
CMT 2I	1q22-23	#607677	(Marrosu et al. 1998; Baloh et al. 2004)	<i>MPZ</i>	*159440	(Marrosu et al. 1998; De Jonghe et al. 1999)
CMT 2J	1q22-23	#607736	(Marrosu et al. 1998; Baloh et al. 2004)	<i>MPZ</i>	*159440	(Marrosu et al. 1998; De Jonghe et al. 1999)
CMT2L	12q24.3	#608014	(Tang et al. 2004)	<i>HSPB8 / HSP22</i>	*608014	(Tang et al. 2005)
Επικρατητικός μεικτός τύπος						
DI-CMTA	10q24.1-q25.1	#606483	(Verhoeven et al. 2001)	<i>unknown</i>		
DI-CMTB	19q12-q13.2	#606482	(Kennerson et al. 2001)	<i>DNM2</i>	*602378	(Zuchner et al. 2005)
DI-CMTC	1p34-p35	#608323	(Jordanova et al. 2003a)	<i>YARS</i>	*603623	(Jordanova et al. 2006)
DI-CMTD	1q22	#607791	(Mastaglia et al. 1999)	<i>MPZ</i>	*159440	(Mastaglia et al. 1999)
DI-CMT	8p23	#608236	(Verhoeven et al. 2003)	<i>ARHGEF10</i>	*608136	(Verhoeven et al. 2003)
HMSN-P	3q13.1	%604484	(Takashima et al. 1997)	<i>unknown</i>		
Επικρατητικός φυλοσύνδετος τύπος στο χρωμόσωμα X						
CMTX1	Xq13.1	#302800	(Gal et al. 1985)	<i>GJB1</i>	*304040	(Bergoffen et al. 1993)
Σύνδρομο Dejerine-Sottas (DSS)						
CMT 3A (DSS)	17p11.2-12	#145900	(Roa et al. 1993)	<i>PMP-22</i>	*601097	(Roa et al. 1993)
CMT 3B (DSS)	1q22-23	#145900	(Hayasaka et al. 1993b)	<i>MPZ</i>	*159440	(Hayasaka et al. 1993b)
CMT 3C (DSS)	8q23-q24	#145900	(Ionasescu et al. 1996b)	<i>unknown</i>		
DSS-EGR	10q21-22	#145900		<i>EGR2</i>	*129010	(Chung et al. 2005)
CMT3D	19q13.1- q13.2	#145900	(Delague et al. 2000)	<i>PRX</i>	*605725	(Delague et al. 2000)
Υπολειπόμενος απομυελινωτικός τύπος						
CMT 4A	8q13-21.1	#214400	(Ben Othmane et al. 1993)	<i>GDAP1</i>	*606598	(Baxter et al. 2002)
CMT 4B-1	11q22	#601382	(Bolino et al. 1996)	<i>MTMR2</i>	*603557	(Bolino et al. 2000)

CMT 4B-2	11p15	#604563	(Othmane et al. 1999)	<i>MTMR13/ SBF2</i>	*607697	(Senderek et al. 2003)
CMT 4C	5q23-33	#601596	(LeGuern et al. 1996)	<i>KIAA1985/ SH3TC2</i>	*608206	(Senderek et al. 2003)
CMT 4D (HSMN-L)	8q24.3	#601455	(Kalaydjieva et al. 1996)	<i>NDRG1</i>	*605262	(Kalaydjieva et al. 2000)
CMT 4E	10q 21.1-22 17p	#605253		<i>EGR2</i>	*129010	(Warner et al. 1998)
CMT 4F	19q13.1-q13.3	#145900 #605725	(Delague et al. 2000)	<i>periaxin</i>	*605725	(Boerkoel et al. 2001; Guilbot et al. 2001)
CMT 4G (Russe)	10q23.2	#605285	(Rogers et al. 2000)	<i>unknown</i>		
CMT 4H	12p11.21	#609311	(De Sandre-Giovannoli et al. 2005)	<i>FGD4</i>	*611104	(Delague et al. 2007; Stendel et al. 2007)
CMT 4J	6q21	#611228		<i>FIG4</i>	*609390	(Chow et al. 2007)
CCFDN	18q23-qter	#604168	(Angelicheva et al. 1999)	<i>CTDP1</i>	*604927	(Varon et al. 2003)
Υπολειπόμενος αξονικός τύπος						
CMT4C1 or AR CMT 2B1	1q21.2-q21.3	#605588	(Bouhouche et al. 1999)	<i>lamin A/C</i>	*150330	(De Sandre-Giovannoli et al. 2002)
CMT4C2 or AR-CMT 2C or AR CMT 2H	8q21.3	#607731	(Barhoumi et al. 2001)	<i>unknown</i>		
CMT4C3 or AR CMT2B2	19q13.3	#605589	(Leal et al. 2001)	<i>ARC92/ ACID1 (MED25)</i>	*610197	(Leal et al. 2009)
CMT4C4 or AR CMT2K	8q13-21.1	#607706	(Cuesta et al. 2002)	<i>GDAP1</i>	*606598	(Cuesta et al. 2002)
Υπολειπόμενος φυλοσύνδετος τύπος στο χρωμόσωμα X						
CMTX2	Xp 22.2	#302801	(Ionasescu et al. 1991)	<i>unknown</i>		
CMTX3	Xq26.3-q27.1	#302802	(Ionasescu et al. 1991)	<i>unknown</i>		
CMTX4 Chowchock syndrome	X q24-q26.1	#310490	(Priest et al. 1995)	<i>unknown</i>		
CMTX5	Xq21.32-q24	#311070	(Kim et al. 2005)	<i>PRPS1</i>	*311850	(Kim et al. 2007)



Εικόνα 1.7 Χρωμοσώματα και υπεύθυνα γονίδια με τα οποία συνδέονται γενετικά οι τύποι CMT.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Για τους σκοπούς της διδακτορικής αυτής διατριβής συμπεριλήφθηκαν οικογένειες και σποραδικοί ασθενείς που προήλθαν από τη Νευρολογική Κλινική και το Εργαστήριο Νευρογενετικής του Ινστιτούτου Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου και τη Νευρολογική Κλινική του Τμήματος Ιατρικής Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Για την επιδημιολογική μελέτη συμπεριλήφθηκαν 33 οικογένειες και οκτώ σποραδικοί ασθενείς από την Κύπρο (Πίνακας 2.1). Επιπλέον μελετήθηκαν έξι οικογένειες και δυο νέοι ασθενείς μιας υφιστάμενης οικογένειας από την Κύπρο καθώς και πέντε οικογένειες και τέσσερις σποραδικοί ασθενείς από την Ελλάδα (περιοχή της Λάρισας), οι οποίοι δεν συμπεριλήφθηκαν στην επιδημιολογική μελέτη (περιστατικά που συλλέχθηκαν μετά τις 15 Ιανουαρίου του 2009).

Η αρχική κατάταξη των ασθενών με CMT στους διάφορους τύπους έγινε με βάση τα κλινικά, νευροφυσιολογικά και ιστοπαθολογικά κριτήρια που συλλέχθηκαν από τους συνεργάτες νευρολόγους στο Ινστιτούτου Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου και στη Νευρολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Στη συνέχεια έγινε μία πιο ολοκληρωμένη ταξινόμηση με την περάτωση της γενετικής μοριακής ανάλυσης που διεξάχθηκε.

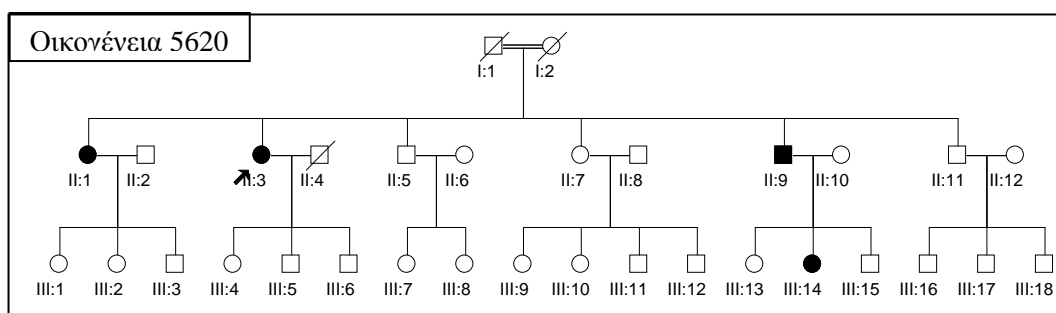
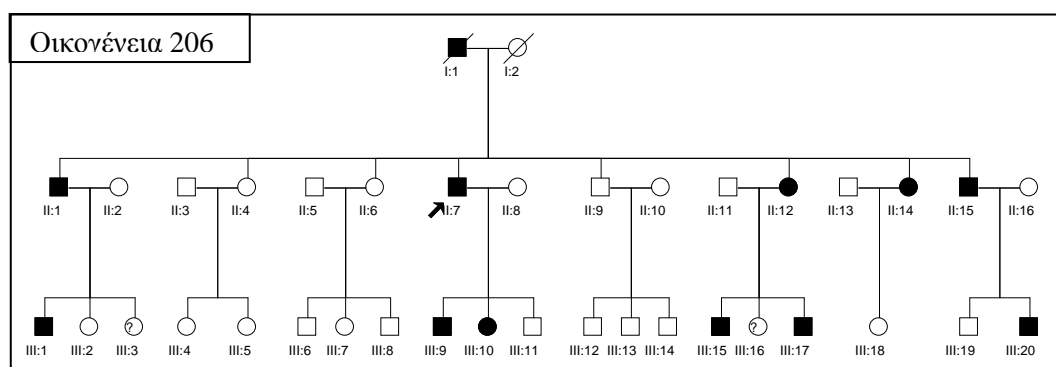
2.1.1 Οικογένειες και γενεαλογικά δέντρα

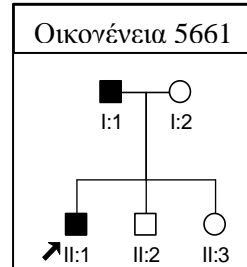
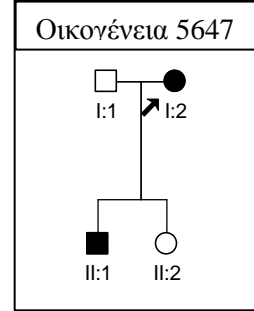
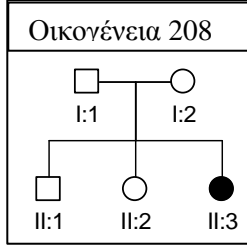
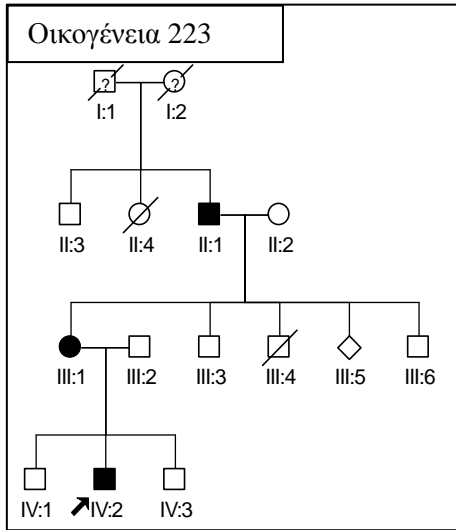
- Οικογένειες που συμπεριλήφθηκαν στην επιδημιολογική μελέτη

Πίνακας 2.1 Οικογένειες και σποραδικοί ασθενείς που χρησιμοποιήθηκαν για την επιδημιολογική μελέτη

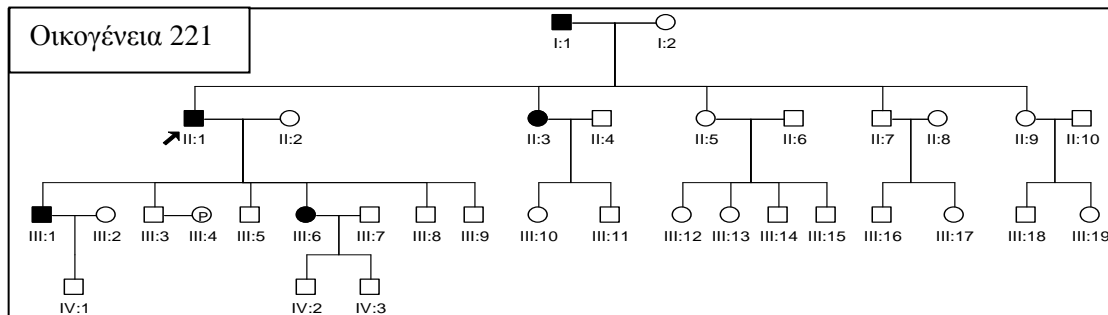
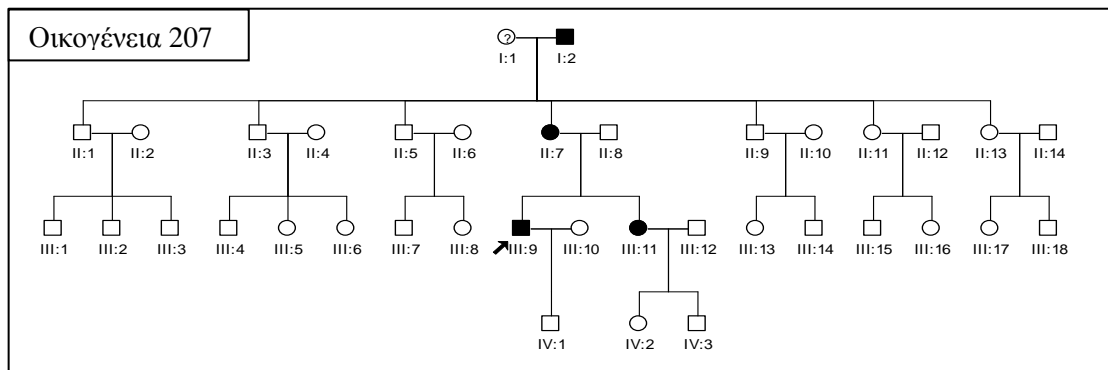
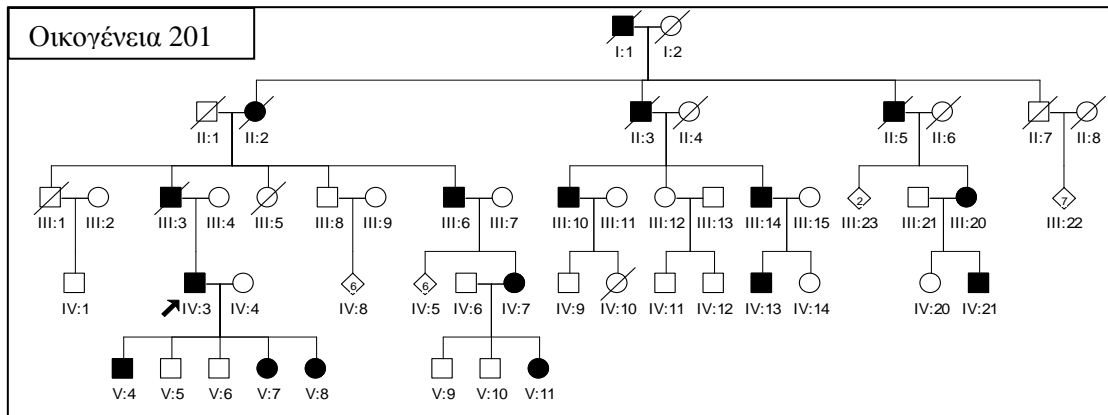
Τύπος	Αριθμός Οικογενειών	Αριθμός Ασθενών
Επικρατητικός αξονικός	6	22
Επικρατητικός απομυελινωτικός	17	59
Υπολειπόμενος αξονικός	5	13
Υπολειπόμενος μεικτός	1	2
Επικρατητικός απομυελινωτικός φυλοσύνδετος	1	6
Επικρατητικός μεικτός φυλοσύνδετος	3	17
Σποραδικός αξονικός	-	7
Σποραδικός απομυελινωτικός	-	1
Σύνολο	33	127

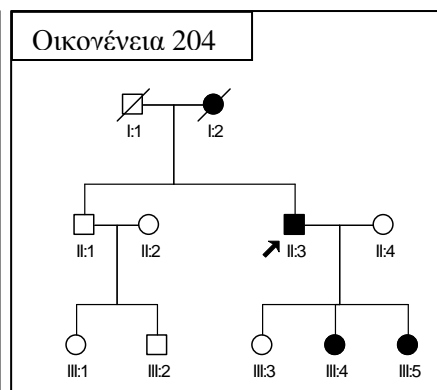
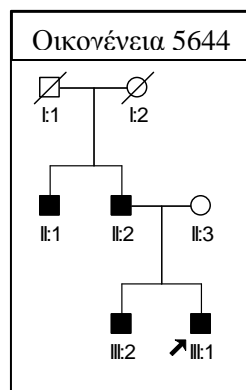
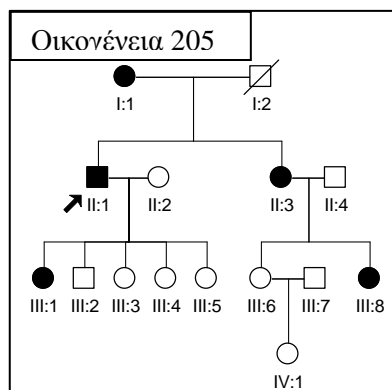
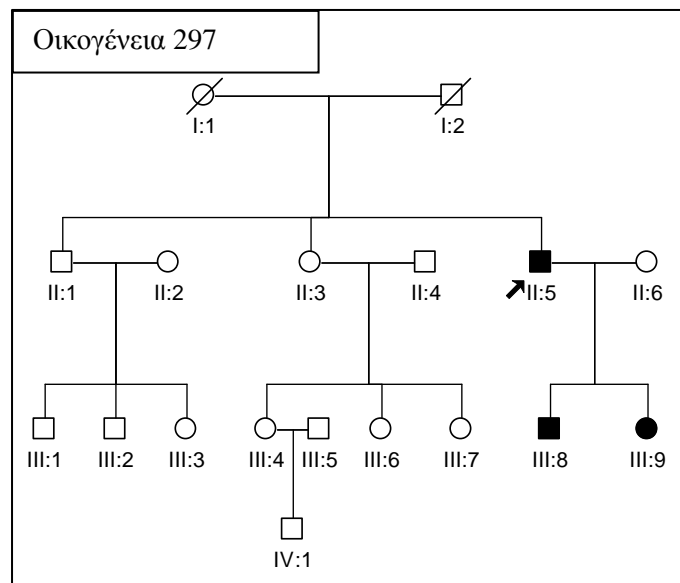
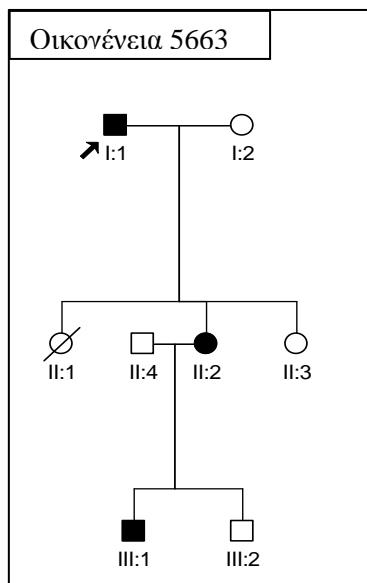
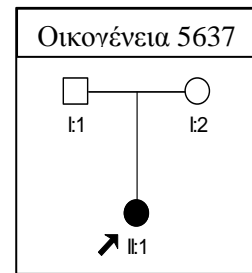
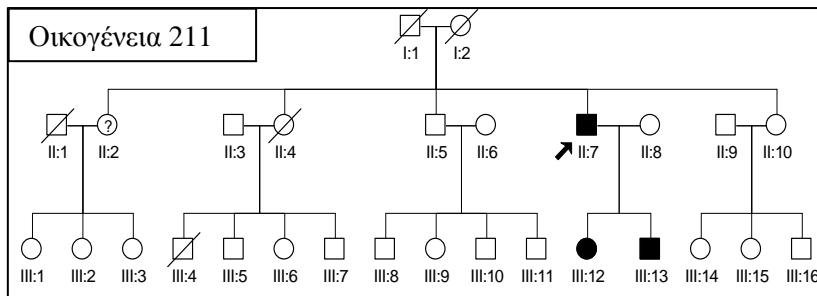
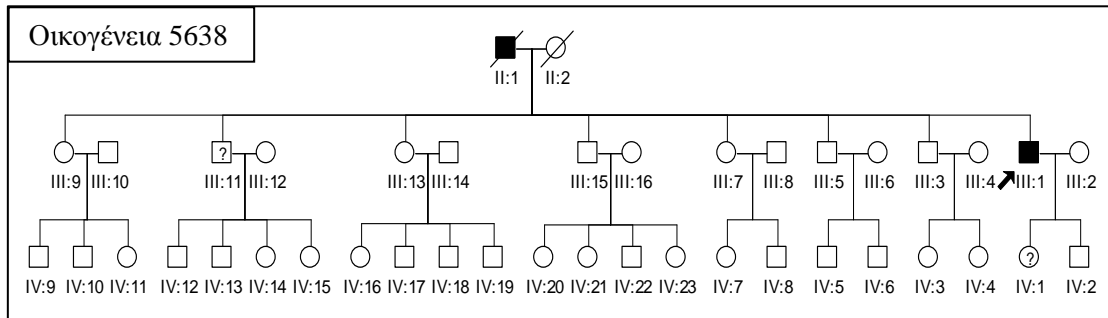
Οικογένειες με επικρατητικό αξονικό τύπο:

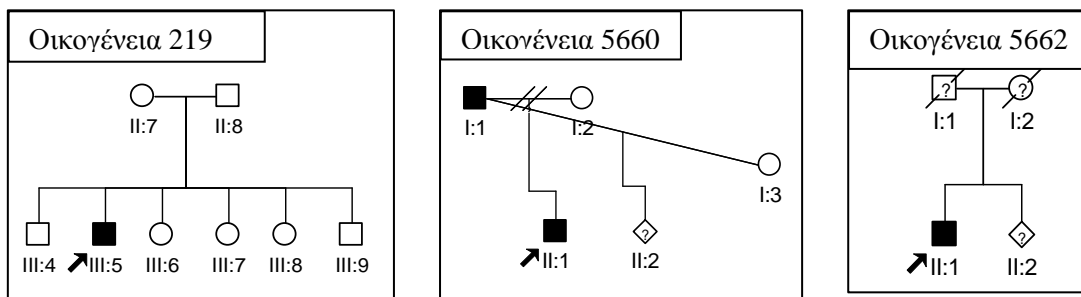
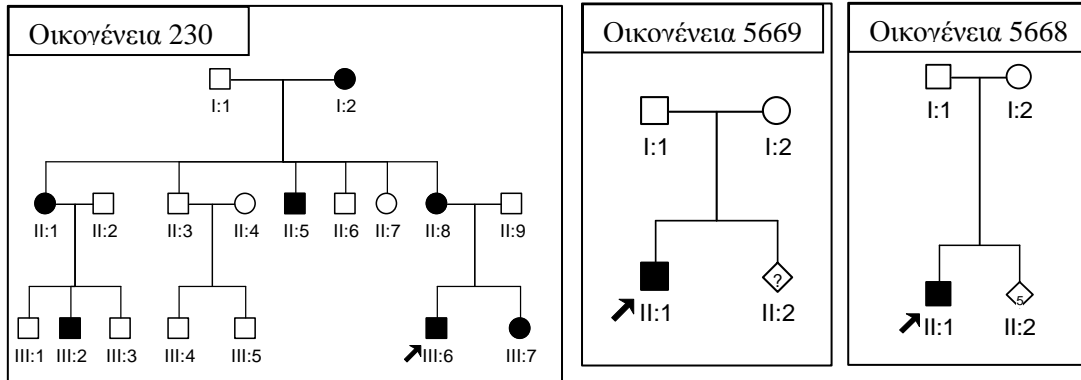




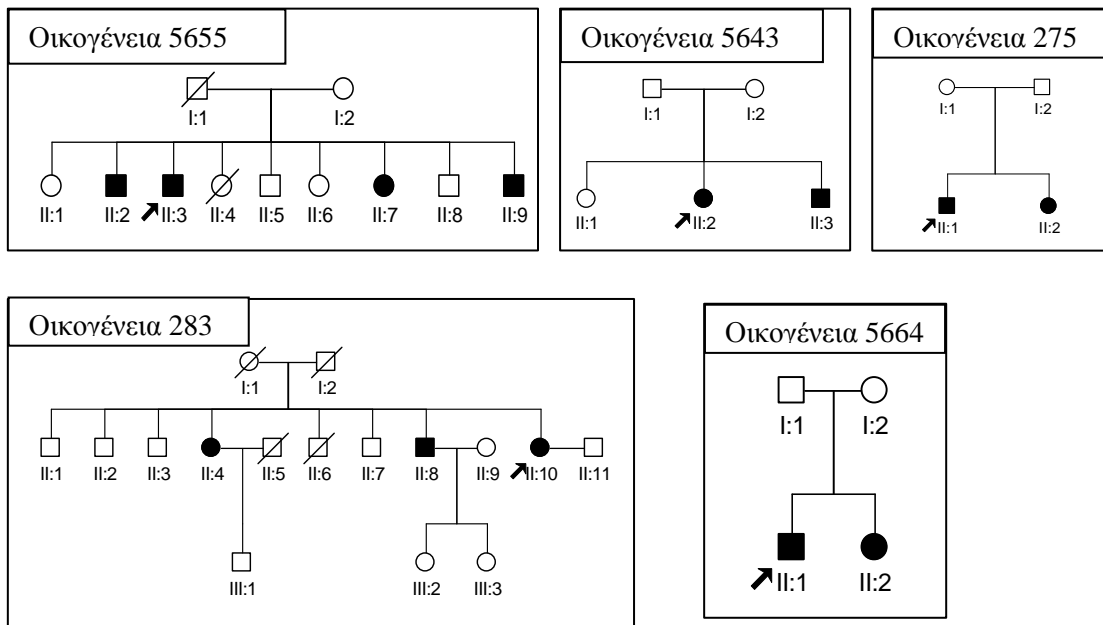
Οικογένειες με επικρατητικό απομεινωτικό τύπο:



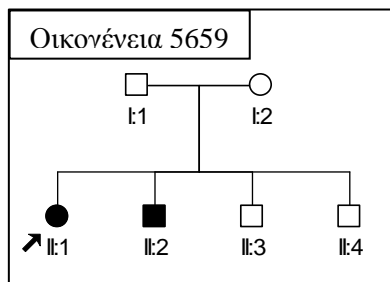




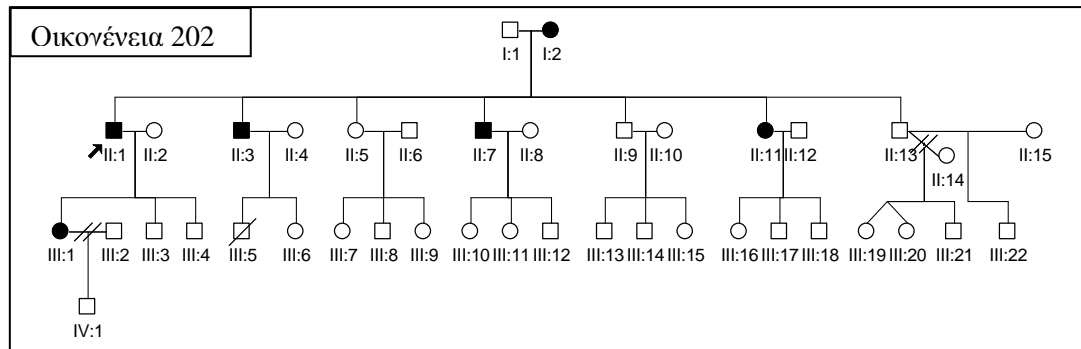
Οικογένειες με υπολειπόμενο αζονικό τύπο:



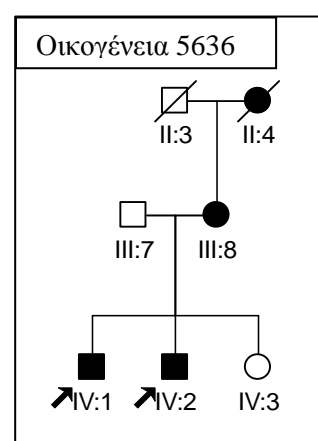
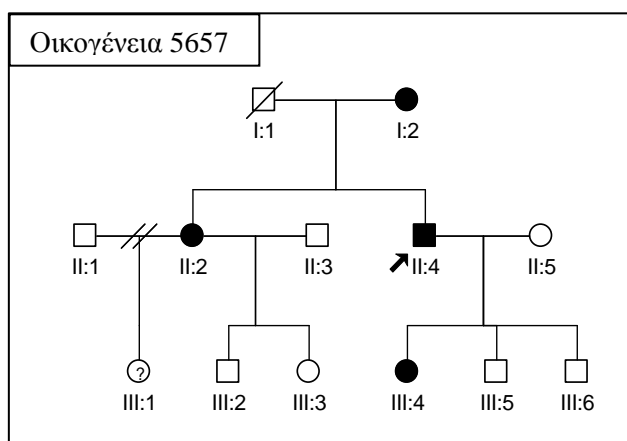
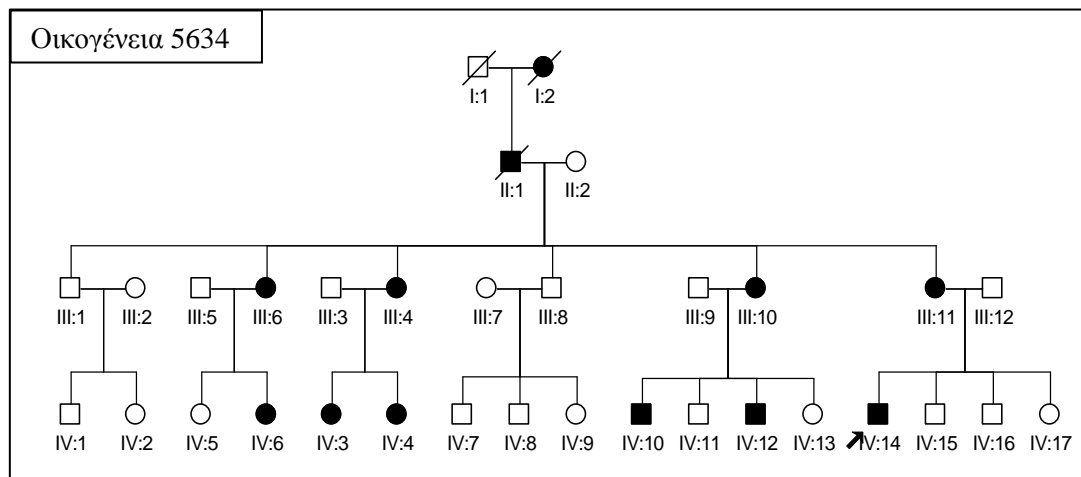
Οικογένειες με υπολειπόμενο μεικτό τύπο



Οικογένειες με επικρατητικό απομυελινωτικό φυλοσύνδετο τύπο



Οικογένειες με επικρατητικό μεικτό φυλοσύνδετο τύπο



Σποραδικοί ασθενείς

Υπάρχουν επίσης ένας σποραδικός ασθενής με απομυελινωτικό τύπο (5671) και επτά σποραδικοί ασθενείς με αξονικό τύπο (299, 5646, 5648, 5650, 5665, 5666, 5667)

• Οικογένειες που δεν συμπεριλήφθηκαν στην επιδημιολογική μελέτη

Οικογένειες απομυελινωτικού τύπου:

Συμπεριλαμβάνονται οι οικογένειες 5670, 5672, 5673, 5674, 5675, 5676, δυο ασθενείς της οικογένειας 5644 από την Κύπρο και τρεις οικογένειες από την Ελλάδα ΝΜ, ΠΠ, ΒΑ.

Οικογένειες αξονικού τύπου:

Δυο οικογένειες από την Ελλάδα ΔΣ, ΖΜ.

Σποραδικοί ασθενείς απομυελινωτικού τύπου:

Δυο ασθενείς από την Ελλάδα ΒΒ, ΡΤ.

Σποραδικοί ασθενείς αξονικού τύπου:

Ένας ασθενή από την Ελλάδα ΒΙ.

Σποραδικοί ασθενείς μεικτού τύπου:

Ένας ασθενή από την Ελλάδα ΜΒ.

2.1.2 Δημογραφικά δεδομένα

Ο επιπολασμός (Prevalence) είναι ο αριθμός των ατόμων που νοσούν μια συγκεκριμένη στιγμή προς τον αριθμό ατόμων πληθυσμού την ίδια χρονική στιγμή.

$$\text{Επιπολασμός} = \frac{\text{Αριθμός ατόμων με τη νόσο}}{\text{Σύνολο πληθυσμού}}$$

(σε μία συγκεκριμένη χρονική στιγμή)

Ο επιπολασμός της CMT υπολογίστηκε με βάση την τελευταία απογραφή του πληθυσμού της Κύπρου στις περιοχές που ελέγχει το Κράτος. Σύμφωνα με την τελευταία απογραφή που έγινε την 1^η Οκτωβρίου του 2001, ο πληθυσμός της Κύπρου στις περιοχές που ελέγχει το Κράτος ήταν 703,529 άτομα. Το Δεκέμβριο του 2008 ο πληθυσμός της Κύπρου στις περιοχές που ελέγχει το Κράτος, υπολογίστηκε από την Στατιστική Υπηρεσία της Κυπριακής Δημοκρατίας και ήταν 794.000 άτομα. Η μεγάλη αύξηση του πληθυσμού από το 2001 μέχρι το 2009 οφείλεται στην αυξημένη μετανάστευση (70% της αύξησης οφείλεται στους μετανάστες) που παρουσιάστηκε κατά τη διάρκεια 2001-2009. Ο μέσος όρος ηλικίας του πληθυσμού ήταν 35 χρονών και ο μέσος όρος του ορίου ζωής 80 χρόνια (78,3 χρόνια για τους άντρες και 81,9 για τις γυναίκες).

2.1.3 Κλινική εξέταση

Όλοι οι ασθενείς και μέλη των οικογενειών (όπου ήταν εφικτό) εξετάστηκαν από τους συνεργάτες νευρολόγους. Το οικογενειακό ιστορικό καταγράφηκε για όλες τις οικογένειες και τους σποραδικούς ασθενείς και πραγματοποιήθηκε μέτρηση των ταχυτήτων αγωγής κινητικών και αισθητικών νεύρων σε όλα τα διαθέσιμα μέλη των οικογενειών καθώς και των σποραδικών ασθενών.

2.1.4 Γενετική ανάλυση

Εφόσον προσδιορίστηκε ο τύπος της CMT στην οποία ανήκουν οι ασθενείς, βάσει της κλινικής, νευροφυσιολογικής και ιστοπαθολογικής τους εξέτασης, αναλύθηκε ένας ασθενής από κάθε οικογένεια (ασθενής δείκτης) σύμφωνα με το γενικό πρωτόκολλο που παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.2. Στην περίπτωση ανεύρεσης πιθανής μετάλλαξης αναλύονταν και τα υπόλοιπα άτομα της οικογένειας (ασθενείς και μη), ούτως ώστε να διαπιστωθεί αν πρόκειται για μετάλλαξη ή πολυμορφισμό. Η γενετική ανάλυση των ασθενών έγινε βάση των μεθόδων που περιγράφονται πιο κάτω (παράγραφος 2.2).

Πίνακας 2.2 Πρωτόκολλο γενετικής ανάλυσης της CMT

Τύπος	Απομυελινωτικός				Μεικτός			Αξονικός			
	AD	AR	X	S	AD	X	S	AD	AR	X	S
Κληρονομικότητα											
	<i>PMP22 dup</i> <i>MPZ</i> <i>PMP22</i>	<i>GDAP1</i>	<i>GJB1</i>	<i>PMP22 dup</i> <i>GJB1</i> <i>MPZ</i> <i>PMP22</i>	<i>MPZ</i>	<i>GJB1</i>	<i>GJB1</i> <i>MPZ</i> <i>PMP22</i>	<i>MFN2</i> <i>MPZ</i> <i>GARS</i> <i>NEFL</i>	<i>GDAP1</i> <i>LMNA</i>	<i>GJB1</i>	<i>MFN2</i> <i>GJB1</i> <i>MPZ</i>

AD: Επικρατητικός αυτοσωματικός (autosomal dominant)

AR: Υπολειπόμενος αυτοσωματικός (autosomal recessive)

X: Φυλοσύνδετος στο χρωμόσωμα X

S: Σποραδικός (sporadic)

dup: διπλασιασμός (duplication)

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 Απομόνωση του DNA

Για την απομόνωση του DNA από περιφερικό αίμα χρησιμοποιείται το PUREGENE DNA Purification Kit της εταιρίας Gentra. Συλλέγονται 2 ml περιφερικό αίμα από κάθε άτομο σε μπουκάλι που περιέχει 0,5 ml EDTA (0,11 M). Προστίθεται 6 ml διάλυμα λύσης ερυθρών κυττάρων (RBC Lysis solution), ανακατεύεται και επωάζεται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Φυγοκεντρείται για 5 λεπτά σε 2000 x g (RCF) και αφαιρείται ποσότητα του υπερκείμενου υγρού αφήνοντας 100-200 ml στο οποίο επαναδιαλύουμε το υφιστάμενο ίζημα. Προστίθεται 2 ml διάλυμα λύσης κυττάρων (Cell Lysis Solution) και αναδεύεται για λύση των κυττάρων (με επώαση στους 37°C αν χρειαστεί). Στη συνέχεια προστίθεται 667 μl διάλυμα καταβύθισης πρωτεϊνών (Protein Precipitation Solution), ανακατεύεται καλά και φυγοκεντρείται για 5 λεπτά σε 2000 x g (RCF) για καταβύθιση των πρωτεϊνών. Συλλέγεται το υπερκείμενο υγρού σε σωλήνα των 15 ml και προστίθεται 2 ml 100% ισοπροπανόλη. Αναδεύεται ελαφρώς και αργά ώστε να δημιουργηθεί το ίζημα του DNA και συλλέγεται σε σωλήνα των 2 ml. Στη συνέχεια ξεπλένεται με 70% κρύας αιθανόλης (-20°C), αφαιρείται το υπερκείμενο (αιθανόλη), στεγνώνεται το DNA και διαλύεται σε υδατικό διάλυμα (Hydration Solution). Η ποσότητα του υδατικού διαλύματος που προστίθεται για τη διάλυση του DNA εξαρτάται από την ποσότητα του, η οποία αξιολογείται εμπειρικά.

Παλαιότερα για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιείτο η κλασσική μέθοδος απομόνωσης χλωριούχου νατρίου (NaCl) (salting out) (Miller et al. 1988). Η μέθοδος

αυτή παρά το χαμηλό της κόστος έδινε DNA μικρότερης καθαρότητας από τη μέθοδο που χρησιμοποιείται σήμερα.

2.2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Κατά την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης παράγονται πολλά αντίγραφα ενός συγκεκριμένου τμήματος του DNA που μας ενδιαφέρει (καθορίζεται από τους εκκινητές) ώστε να μπορέσουμε με διάφορες άλλες μεθόδους να το παρατηρήσουμε.

Αρχικά σχεδιάζονται οι κατάλληλοι εκκινητές για τα εξόνια ή ακόμα και άλλες περιοχές (π.χ. προμότορες) των υπό εξέταση γονιδίων (παράρτημα 2) με τη βοήθεια του προγράμματος σχεδίασης εκκινητών Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>).

Η αντίδραση PCR διεξάγεται ως εξής:

Σε θερμοανθεκτικό σωλήνα PCR (0,2ml) προστίθενται 50-500 ng DNA από τους ασθενείς που είναι υπό εξέταση. Στη συνέχεια φτιάχνουμε μείγμα με τα υπόλοιπα αντιδραστήρια. Στο μείγμα προσθέτουμε για κάθε αντίδραση 10 pmoles από κάθε εκκινητή (Forward και Reverse), 5 μl 10xbuffer (ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση 1xbuffer), 5 μl dNTPs (μείγμα dATP, dCTP, dGTP, dTTP, με αρχική συγκέντρωση 200 μM) 0.2 μl (1Unit) A-Taq Polymerase enzyme ή Gold Taq Polymerase enzyme και συμπληρώνουμε μέχρι τα 50 μl για κάθε αντίδραση με αποσταγμένο νερό (ddH₂O).

Στη συνέχεια ο σωλήνας αυτός τοποθετείται μέσα σε μηχανή θερμοκικού κυκλοποιητή (PCR machine) στο οποίο ρυθμίζεται το κατάλληλο πρόγραμμα. Το πρόγραμμα που ακολουθείται περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

Αρχικά γίνεται αποδιάταξη του αρχικού δίκλωνου DNA σε θερμοκρασία 94⁰ C για 5 λεπτά. Στη συνέχεια έχουμε την κυκλική επανάληψη τριών σταδίων για 30 φορές. Στο πρώτο στάδιο κάθε κύκλου γίνεται αποδιάταξη του αρχικού δίκλωνου DNA σε θερμοκρασία 94⁰ C για 30-60 δευτερόλεπτα. Στο δεύτερο στάδιο γίνεται υβριδισμός των εκκινητών στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA, ο οποίος πραγματοποιείται σε θερμοκρασία μεταξύ 37-70⁰ C (ανάλογα με τους εκκινητές που χρησιμοποιούνται) για 30-60 δευτερόλεπτα. Στο τρίτο στάδιο και αφού η πολυμεράση έχει συνδεθεί στο υβρίδιο του εκκινητή και της μονόκλωνης αλυσίδας, αρχίζει η σύνθεση του DNA με επιμήκυνση των υβριδισμένων εκκινητών με κατεύθυνση 5' προς 3'. Η επιμήκυνση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 72⁰ C για 30-60 δευτερόλεπτα. Στο τέλος του πρώτου κύκλου το προϊόν της επιμήκυνσης αποτελεί επίσης υπόστρωμα για τον επόμενο κύκλο. Τέλος έχουμε το στάδιο τελικής επιμήκυνσης το οποίο λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία 72⁰C για 5-10 λεπτά. Με το τέλος της αντίδρασης ποσότητα από το προϊόν που παράγεται ηλεκτροφορείται σε αποδιατακτική πήκτη αγαρόζης για να αξιολογηθεί.

2.2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση πηκτωμάτων είναι μία μέθοδος που διαχωρίζει (βασιζόμενη στο μέγεθος) τα μακρομόρια όπως τα νουκλεϊνικά οξέα ή τις πρωτεΐνες.

Για την παρασκευή 100 ml 0,8% πηκτής αγαρόζης, σε κωνική φιάλη που περιέχει 100 ml 1xTBE (παρασκευή 1L 10xTBE: 108g Trisbase, 55g Boric acid, 40ml 0,5 M EDTA (pH=8,0) και συμπληρώνεται με ddH₂O μέχρι το 1 L) προσθέτουμε 0,8 gr αγαρόζης (SIGMA) και τα διαλύουμε σε ψηλή θερμοκρασία (φούρνο μικροκυμάτων) μέχρι το μείγμα να γίνει διαυγές. Στη συνέχεια προστίθενται 2 ml βρωμιούχο εθίδιο

(EtBr), αναδεύεται προσεκτικά, χύνεται μέσα στο δισκάκι ηλεκτροφόρησης, τοποθετείται η χτένα και αφήνεται να στερεοποιηθεί. Αφού στερεοποιηθεί το πήκτωμα αγαρόζης, τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία γεμίζεται με 1xTBE μέχρι να καλυφθεί το πήκτωμα και αφαιρείται η χτένα. Στη συνέχεια τα δείγματα φορτώνονται στα πηγαδάκια του πηκτώματος και ηλεκτροφορούνται για 30- 60 λεπτά (αναλόγως του μεγέθους) στα 100-120 V. Με την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα φωτογραφίζεται σε ψηφιακή φωτογραφική μηχανή με τη χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας (Digital UV Transilluminator).

2.2.4 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR για περαιτέρω ανάλυση

Ο καθαρισμός των δειγμάτων που προκύπτουν από την PCR γίνεται με ενζυμική αντίδραση εξονουκλεάσης - αλκαλικής φωσφατάσης γαρίδας (ExoSAP - exonuclease I, shrimp alkaline phosphatase). Το δείγμα καθαρίζεται από περίσσεια εκκινητών και ελεύθερων δεοξυνουκλεοτιδίων ακολουθώντας την εξής διαδικασία:

Σε θερμοανθεκτικό σωλήνα PCR (0,2ml) προστίθενται 3-5 μl του προϊόντος της PCR και 0,4 μl ExoSAP για κάθε 1 μl προϊόντος (1,2 μl ExoSAP για 3 μl προϊόντος). Στη συνέχεια ο σωλήνας τοποθετείται σε μηχανήμα PCR στο οποίο επωάζεται στους 37°C για 15 λεπτά, όπου γίνεται πέψη των εκκινητών που περίσσεψαν και απομάκρυνση των ελεύθερων δεοξυνουκλεοτιδίων και στη συνέχεια γίνεται απενεργοποίηση του ενζύμου στους 80° C για 15 λεπτά.

Παλαιότερα για τον καθαρισμό των δειγμάτων της PCR χρησιμοποιείτο το PCR Purification Kit της εταιρίας Qiagen.

2.2.5 Προσδιορισμός της αλληλουχίας προϊόντος της PCR σε αυτόματο αναλυτή

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των προϊόντων PCR συνδυάζει την κλασική μέθοδο προσδιορισμού της πρωτοταγούς δομής του DNA του Sanger και τον εκλεκτικό πολλαπλασιασμό των αλληλουχιών του μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Για την αντίδραση αυτή χρησιμοποιούνται εκτός των δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs) και τριφωσφορικά 2,3- διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs - dye-labeled terminators (WellRED label)), από τα οποία απουσιάζει η υδροξυλική ομάδα στην 3η θέση της δεσοξυριβόζης που είναι απαραίτητη για το σχηματισμό φωσφοδιεστερικού δεσμού με το επόμενο δεοξυνουκλεοτίδιο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον τερματισμό της σύνθεσης. Η διαδικασία προσδιορισμού αλληλουχίας, εφόσον το προϊόν της PCR έχει ήδη καθαριστεί, ξεκινά με την κυκλική αντίδραση προσδιορισμού αλληλουχίας. Στη συνέχεια ακολουθεί ο καθαρισμός των δειγμάτων με τη χρήση αιθανόλης και τέλος η ανάλυση της αλληλουχίας με αυτόματο αναλυτή.

Κυκλική αντίδραση προσδιορισμού αλληλουχίας (Cycle Sequencing – CEQ):

Σε θερμοανθεκτικό σωλήνα PCR (0,2ml) προστίθενται 3-5 μl από το καθαρισμένο προϊόν της PCR (εάν ο καθαρισμός του προϊόντος γίνει με ExoSAP τότε η αντίδραση συνεχίζεται στον ίδιο σωλήνα PCR) και 5 pmoles από τον ένα εκκινητή (Forward ή Reverse). Στη συνέχεια φτιάχνουμε μείγμα με 4 μl Quick Start Mix (CEQ DTCS QUICK START KIT της εταιρίας Beckman Coulter) και συμπληρώνουμε με ddH₂O μέχρι συνολικό όγκο 20 μl. Το Quick Start Mix περιέχει δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs), τριφωσφορικά 2,3- διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs - WellRED label), μείγμα Tris-HCl, MgCl₂ buffer - pH 8.9, ένζυμο πολυμεράση σταθερή σε υψηλές θερμοκρασίες

(Thermo Sequence DNA Polymerase I*) και πυροφωσφατάση (Pyrophosphatase). Στη συνέχεια ο σωλήνας τοποθετείται μέσα σε μηχανήμα PCR στο οποίο ρυθμίζεται το κατάλληλο πρόγραμμα. Στο πρόγραμμα έχουμε την κυκλική επανάληψη τριών σταδίων για 30 φορές. Στο πρώτο στάδιο κάθε κύκλου γίνεται αποδιάταξη του αρχικού δίκλωνου προϊόντος της PCR σε θερμοκρασία 94⁰ C για 20 δευτερόλεπτα. Στο δεύτερο στάδιο γίνεται υβριδισμός του εκκινητή στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του προϊόντος της PCR σε θερμοκρασία 50⁰ C για 20 δευτερόλεπτα. Στο τρίτο στάδιο έχουμε την επιμήκυνση με τη βοήθεια της πολυμεράσης 60⁰ C για 4 λεπτά.

Καθαρισμός των δειγμάτων με τη χρήση αιθανόλης (Ethanol Precipitation):

Σε σωλήνα 1,5 ml προσθέτουμε 4 μl διαλύματος διακοπής της αντίδρασης (stop solution: 1.5M NaOAc + 50mM EDTA) και 1 μl γλυκογόνο (20 mg/ml glycogen το οποίο περιλαμβάνεται στο CEQ DTCS QUICK START KIT). Μεταφέρουμε το προϊόν της αντίδρασης προσδιορισμού αλληλουχίας στο σωλήνα, προσθέτουμε 60 μl κρύας 95% (v/v) αιθανόλης (αποθηκευμένη στους -20°C), ανακατεύουμε καλά και φυγοκεντρούμε στις 14,000 rpm στους 4°C για 15 λεπτά. Στη συνέχεια αφαιρούμε προσεκτικά το υπερκείμενο υγρό (χωρίς να αφαιρέσουμε το ίζημα - pellet) και ξεπλένουμε το ίζημα δυο φορές με 180 μl κρύας (-20°C) 70% (v/v) αιθανόλης. Το ίζημα στεγνώνεται και διαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα SLS (sample loading solution) που περιλαμβάνεται στο CEQ DTCS QUICK START KIT.

Ανάλυση της αλληλουχίας με αυτόματο αναλυτή:

Προσθέτουμε τα δείγματα που διαλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα SLS σε πηγαδάκια φέρουσας πλάκας 96 υποδοχών (96-well plate) και μεταφέρονται στον

αναλυτή. Τα προϊόντα διαχωρίζονται με τριχοειδής ηλεκτροφόρηση και οι ζώνες ανιχνεύονται με τη βοήθεια ανιχνευτή φθορισμού. Τα αποτελέσματα αναλύονται με το λογισμικό πρόγραμμα Sequence Analysis της Beckman Coulter και η σύγκριση με τη φυσιολογική ακολουθία, την οποία βρίσκουμε καταχωρημένη στη βάση δεδομένων GenBank, γίνεται με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Sequence Investigator της Beckman Coulter.

2.2.6 Πέψη προϊόντος της PCR με ενδονουκλεάσες περιορισμού.

Η πέψη του προϊόντος της PCR με ενδονουκλεάσες περιορισμού γίνεται με σκοπό την ανίχνευση παρουσίας ή απουσίας συγκεκριμένης μετάλλαξη. Η διαδικασία περιλαμβάνει τη πέψη του DNA με ένζυμα περιορισμού, τα οποία αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες του δίκλωνου DNA, μήκους 4-8 νουκλεοτιδίων και διασπών το μόριο στα σημεία αυτά. Για τις ανάγκες της μελέτης αυτής τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

Afl το οποίο αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'...AG[▼]CT...3'

*Mbo*II το οποίο αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'...GAAGA(N)₈[▼]...3'

*Bru*101 το οποίο αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'...CC[▼]TNAGC...3'

*Sac*I το οποίο αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'...GAGCT[▼]C...3'

Τα πιο πάνω ένζυμα περιορισμού, επιλέχθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος RestrictionMapper (<http://www.restrictionmapper.org>)

Οι ποσότητες και οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε ένζυμο περιορισμού δίνονται πιο κάτω (Πίνακας 2.3):

Πίνακας 2.3 Ένζυμα περιορισμού				
	<i>A</i> l <i>u</i> I	<i>M</i> boII	<i>B</i> ru10I	<i>S</i> acI
Προϊόν της PCR	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer)	2 μl NEB4	2 μl 1X NEB 4	2 μl 1X NEB 3	2 μl 1X NEB 4
Ένζυμο περιορισμού	1 μl (10 Units)	2 μl (10 Units)	2 μl (10 Units)	0.5 μl (10 Units)
ddH ₂ O	7 μl	6 μl	6 μl	7,5 μl
Συνολικός όγκος	20 μl	20 μl	20 μl	20 μl
Θερμοκρασία επώασης	37°C	37°C	37°C	37°C
Χρόνος επώασης	16 ώρες	16 ώρες	16 ώρες	16 ώρες

Μετά το τέλος της αντίδρασης το προϊόν που προκύπτει ηλεκτροφορεύεται σε πήκτωμα αγαρόζης και αξιολογείται το αποτέλεσμα.

2.2.7 Διπλασιασμός του γονιδίου *PMP22* (CMT duplication)

Η CMT1A οφείλεται στο διπλασιασμό μιας περιοχής μεγέθους 1,5 Mb στο χρωμόσωμα 17p11.2 που περιέχεται και το γονίδιο *PMP22*.

Η ανίχνευση του διπλασιασμού του γονιδίου *PMP22* καθώς και της γύρω περιοχής γίνεται με τη μέθοδο MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην υβριδοποίηση δυο ειδικών ανιχνευτών για κάθε περιοχή στόχο στο DNA οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους με την αντίδραση της λιγάσης. Οι ανιχνευτές περιέχουν ακολουθίες που αναγνωρίζονται από τους εκκινητές (ο ένας ανιχνευτής από το F και ο άλλος από το R εκκινητή). Ακολουθείται πολλαπλή αντίδραση PCR με κοινό ζευγάρι εκκινητών, οι οποίοι είναι σεσημασμένοι με φθορίζον χρωστική και αναγνωρίζονται από τους ανιχνευτές λόγω κοινής ακολουθίας. Στη συνέχεια διαχωρίζονται τα προϊόντα βάσει μεγέθους και μπορεί να

γίνει σύγκριση της έντασης φθορισμού του υπό εξέταση δείγματος με φυσιολογικό πρότυπο.

Η αντίδραση γίνεται με τη χρήση του CMT - MLPA kit της εταιρίας MRC-Holland σε μηχανήμα PCR, στη συνέχεια αναλύεται σε αυτόματο αναλυτή (BECKMAN COULTER) και τα αποτελέσματα επεξεργάζονται με τη χρήση του προγράμματος Coffalyser της MRC-Holland ακολουθώντας την εξής διαδικασία:

Αποδιάταξη και υβριδισμός του DNA με τους ανιχνευτές SALSA (DNA-Denaturation and Hybridisation of the SALSA-probes):

Σε θερμοανθεκτικό σωλήνα PCR (0,2ml) προστίθενται 50-500 ng DNA από τους ασθενείς που είναι υπό εξέταση και συμπληρώνεται με ddH₂O μέχρι τα 5 μl. Το μείγμα τοποθετείται σε μηχανήμα θερμικού κυκλοποιητή (PCR machine), θερμαίνεται για 5 λεπτά στους 98 °C και στη συνέχεια στους 25 °C, όπου ανοίγονται οι σωλήνες PCR για να προστεθούν 3 μl μείγματος ανιχνευτή (probe mix) και ανακατεύεται καλά. Για την παρασκευή του μείγματος ανιχνευτή προστίθενται 1.5 μl SALSA Probe-mix και 1.5 μl MLPA buffer. Στη συνέχεια και αφού οι σωλήνες ξανακλείσουν, το μείγμα θερμαίνεται για 1 λεπτό στους 95 °C και ακολουθεί επώαση του για 16 ώρες στους 60 °C.

Αντίδραση της λιγάσης (Ligation reaction):

Μετά την επώαση στους 60 °C η θερμοκρασία κατεβαίνει στους 54 °C, προστίθεται το μείγμα της λιγάσης-65 (Ligase-65 mix) και ανακατεύεται καλά, επωάζεται στους 54°C για 15 λεπτά και στη συνέχεια στους 98 °C για 5 λεπτά. Για την παρασκευή του μείγματος προστίθενται 3 μl Ligase-65 buffer A, 3 μl Ligase-65 buffer B, 25 μl ddH₂O και 1 μl Ligase-65.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR reaction):

Σε νέους σωλήνες PCR (0,2ml) προστίθενται 30 μl μείγμα που αποτελείται από 4μl 10 X SALSA PCR buffer και 26 μl ddH₂O. Σε αυτό προστίθενται 10 μl από την αντίδραση MLPA λιγάσης (MLPA ligation reaction), επωάζεται στους 60 °C και προστίθενται 10 μl μείγματος πολυμεράσης (Polymerase mix). Για την παρασκευή του μείγματος πολυμεράσης προστίθενται 2 μl SALSA PCR-primers (cy5), 2μl SALSA Enzyme Dilⁿ buffer, 5,5 μl ddH₂O και 1 μl SALSA Polymerase. Στη συνέχεια ακολουθεί αντίδραση PCR με 35 κυκλικές επαναλήψεις των εξής σταδίων: 30 δευτερόλεπτα στους 95°C, 30 δευτερόλεπτα στους 60°C και 1 λεπτό στους 72°C. Τέλος έχουμε 72°C για 20 λεπτά.

Διαχωρισμός του προϊόντος με τη βοήθεια αυτόματου αναλυτή (Beckman CEQ-2000)

και επεξεργασία των αποτελεσμάτων:

Προσθέτουμε μείγμα (32 μl SLS και 0,3 μl 600 ladder της Beckman Coulter) σε πηγαδάκια φέρουσας πλάκας 96 υποδοχών (96-well plate) και προσθέτουμε 0.7 μl της παραπάνω αντίδρασης PCR. Στη συνέχεια τα δείγματα μεταφέρονται στον αναλυτή και τα προϊόντα διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση και οι ζώνες ανιχνεύονται με τη βοήθεια ανιχνευτή φθορισμού. Τα αποτελέσματα αναλύονται με το λογισμικό πρόγραμμα Fragment Analysis της Beckman Coulter και στη συνέχεια αξιολογούνται με τη χρήση του προγράμματος Coffalyser της MRC-Holland.

Παλαιότερα χρησιμοποιείτο η μέθοδος της PCR (long PCR με τη χρήση της πολυμεράσης *rtTh*) για τον πολλαπλασιασμό της περιοχής που περιείχε το γονίδιο *PMP22*. Στη συνέχεια ακολουθούσε πέψη του προϊόντος της PCR με το περιοριστικό ένζυμο *EcoRI* και αξιολόγηση του προϊόντος με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Η ανίχνευση ύπαρξης διπλασιασμού του γονιδίου γινόταν αντιληπτή μετά την αξιολόγηση των ζωνών που προέκυπταν μετά την ηλεκτροφόρηση. Η μέθοδος αυτή είχε δυνατότητα ανίχνευσης περίπου 60-70% των διπλασιασμών της ευρύτερης περιοχής, ενώ η μέθοδος MLPA ανιχνεύει το 100% των διπλασιασμών των εξονίων του γονιδίου *PMP22*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΣ ΤΗΣ CMT

Ο αριθμός των Κύπριων ασθενών εν ζωή με τη νόσο CMT τον Ιανουάριο του 2009 ήταν 127 (33 οικογένειες και 8 σποραδικοί). Ο πληθυσμός της Κύπρου στις περιοχές που ελέγχει το Κράτος υπολογίστηκε από την Στατιστική υπηρεσία της Κυπριακής Δημοκρατίας σε 794.000 το Δεκέμβριο του 2008. Με βάση τα δεδομένα αυτά ο επιπολασμός της CMT στις 15 Ιανουαρίου του 2009 υπολογίστηκε στους 16 ασθενείς ανά 100,000 πληθυσμού.

127

Επιπολασμός της CMT = ----- = 0.00016

794.000

3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΝΕΥΡΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

Μετά από τη νευροφυσιολογική μελέτη των Κύπριων ασθενών με CMT που έγινε στα πλαίσια της επιδημιολογικής μελέτης προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα (πίνακας 3.1):

- Ο απομυελινωτικός τύπος παρουσιάστηκε με ποσοστό 52% των ασθενών.

- Ο αξονικός τύπος παρουσιάστηκε με ποσοστό 33% των ασθενών.
- Ο μεικτός τύπος παρουσιάστηκε με ποσοστό 15% των ασθενών.

Επιπλέον μετά το πέρας της επιδημιολογικής μελέτης διαγνώστηκαν έξι νέες κυπριακές οικογένειες με CMT οι οποίες μετά από τη νευροφυσιολογική μελέτη ταξινομήθηκαν στον απομυελινωτικό τύπο. Επίσης πέντε οικογένειες και τέσσερις σποραδικοί ασθενείς από την Ελλάδα μετά από νευροφυσιολογική μελέτη έδειξαν ότι τρεις οικογένειες και δύο σποραδικοί ασθενείς είναι απομυελινωτικού τύπου, δυο οικογένειες και ένας σποραδικός ασθενής είναι αξονικού τύπου και ένας σποραδικός ασθενής είναι μεικτού τύπου.



Διάγραμμα 3.1 Ποσοστιαία αποτελέσματα νευροφυσιολογίας του κυπριακού πληθυσμού.

3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ

3.3.1 Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με απομυελινωτικό τύπο CMT

Οι ασθενείς απομυελινωτικού τύπου χαρακτηρίζονται από μεγάλη ετερογένεια τόσο στον κλινικό φαινότυπο όσο και στην ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων. Τα κύρια κλινικά χαρακτηριστικά που παρουσίασαν είναι προοδευτική αδυναμία και ατροφία των περιφερικών μυών, δυσκολία βάρδισης, και παραμόρφωση του άκρου ποδός- κοιλοποδία. Τα πρώτα συμπτώματα για τους περισσότερους ασθενείς εμφανίστηκαν στις πρώτες δυο δεκαετίες της ζωής τους. Υπήρχαν και ασθενείς με εμφάνιση των συμπτωμάτων σε ηλικία 60 ετών. Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων στους ασθενείς του τύπου αυτού ήταν μειωμένες ($MNCV < 38$ m/s)

3.3.2 Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με αξονικό τύπο CMT

Τα κύρια κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών αξονικού τύπου είναι επίσης αδυναμία και ατροφία των περιφερικών μυών, δυσκολία βάρδισης και η παραμόρφωση του άκρου ποδός. Οι περισσότεροι ασθενείς εμφάνισαν τα πρώτα συμπτώματα στις πρώτες τρεις δεκαετίες της ζωής τους και οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων ήταν κανονικές ή ελαφρά μειωμένες ($MNCV > 38$ m/s)

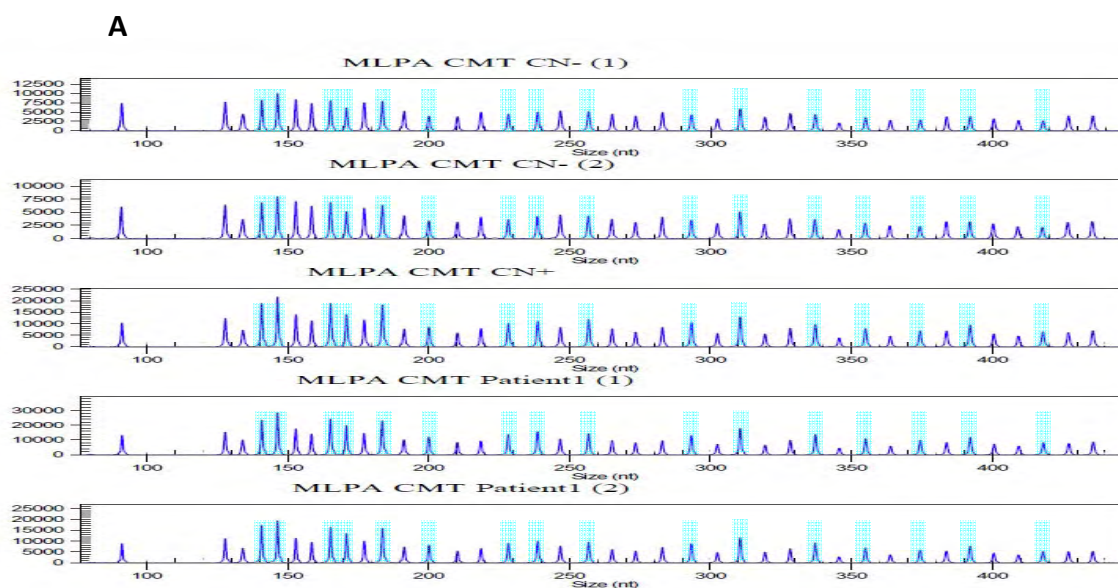
3.3.3 Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με μεικτό τύπο CMT

Οι περισσότεροι ασθενείς μεικτού τύπου παρουσίασαν τα πρώτα συμπτώματα κατά τη δεύτερη δεκαετία της ζωής τους. Τα κύρια κλινικά χαρακτηριστικά στους ασθενείς με τον τύπο αυτό ήταν ατροφία ή αδυναμία των μυών των χεριών και των ποδιών. Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων παρουσίασαν τιμές ~ 35 m/s.

3.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Μετά τη γενετική ανάλυση των οικογενειών και των σποραδικών ασθενών που διεκπεραιώθηκε μέχρι τις 15 Ιανουαρίου του 2009, οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν στον κυπριακό πληθυσμό ήταν στα γονίδια *PMP22*, *MPZ*, *GJB1/Cx32* και *MFN2*. Η παθογόνα μετάλλαξη της νόσου βρέθηκε σε 65 ασθενείς με απομυελινωτικό τύπο (αποτελεί το 98,5% των ασθενών με απομυελινωτικό τύπο), σε 15 ασθενείς με αξονικό τύπο (αποτελεί το 36% των ασθενών με αξονικό τύπο) και σε 17 ασθενείς με μεικτό τύπο (αποτελεί το 89,5 των ασθενών με μεικτό τύπο). Συγκεκριμένα οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν στον κυπριακό πληθυσμό ήταν (Πίνακας 3.1):

- Δεκατρείς οικογένειες (201, 204, 207, 221, 230, 5638, 5637, 219, 5660, 5662, 5663, 5668, 5669) φέρουν το διπλασιασμό του γονιδίου *PMP22* που είναι και η πιο συχνή μετάλλαξη (67% των ασθενών με απομυελινωτικό τύπο και το 35% όλων των ασθενών με CMT). Επίσης ο διπλασιασμός του γονιδίου *PMP22* εμφανίστηκε ως de novo μετάλλαξη (κανένας από τους γονείς δεν έφερε την μετάλλαξη) σε τρεις ασθενείς (4.5% των ασθενών με απομυελινωτικό τύπο και το 6.8% των ασθενών με CMT1A).



B

RESULTS P033B MLPA probemix lot 0207, 0606, 0406.txt

P033B MLPA probemix lot
0207, 0606, 0406.txt

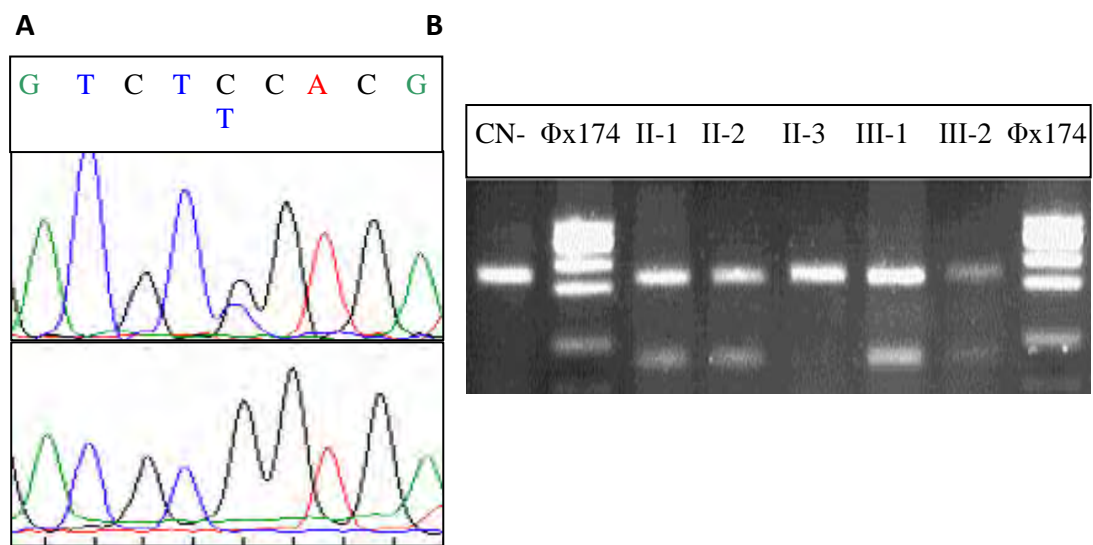
Operator Cofa
Kit number

sample name	CMT MLPA CN- (1)	CMT MLPA CN- (2)	CMT MLPA CN+	CMT MLPA Patient1 (1)	CMT MLPA Patient1 (2)
Analysis Date	23/11/2009 11:42				
normalisation method	MRC RECOMMENDED				
Average / Median	Median on Normalisation Factor				
Nr Probe Signals	38	38	38	38	38
Nr Control Probe Signals	21	21	21	21	21
Ligation Probe Found?	YES	YES	YES	YES	YES
Male / Female?	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
PFMC (pearson) ; nr pr	0.98 ; 38	0.94 ; 38	0.94 ; 21	0.9 ; 20	0.94 ; 17
MAD all ; nr probes	0.05 ; 21	0.04 ; 21	0.06 ; 21	0.08 ; 21	0.07 ; 21
DNA concentration ok?	OK	OK	OK	OK	OK
DD OK? (88)	Incomplete	Incomplete	Incomplete	Incomplete	Incomplete
DD OK? (98)	OK	OK	OK	OK	OK

Gene	Chr pos	Length (bp)	MV36	Recommended Order	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio
ELAC2 probe 1488-L0917	17p11.2?	348	17-012.8 ELAC2	1	1	0.8	1.1	1.05	0.95
COX10 probe 1489-L0924	17p12-17p11.2?	418	17-014.0 COX10 Exon 07A	2	0.95	0.95	1.79	1.67	1.44
COX10 probe 1488-L0925	17p12-17p11.2?	391	17-014.0 COX10 Exon 07B	3	1.02	0.92	1.55	1.49	1.39
FLJ25830 probe 2729-L2156	17p12	373	17-015.1 FLJ25830 Exon 01	4	0.96	0.95	1.63	1.42	1.36
PMP22 probe 4856-L4038	17p12-p11.2	142	17-015.1 PMP22 Exon 01A	5	1.1	1.04	1.39	1.38	1.55
PMP22 probe 1461-L0926	17p12-p11.2	229	17-015.1 PMP22 Exon 01B	6	0.88	0.92	1.34	1.36	1.32
FLJ25830 probe 2730-L2157	17p12	355	17-015.1 FLJ25830 Exon 02	7	0.9	0.96	1.54	1.46	1.36
PMP22 probe 1462-L0927	17p12-p11.2	256	17-015.1 PMP22 Exon 02	8	1	1.06	1.44	1.47	1.44
PMP22 probe 4857-L4461	17p12-p11.2	148	17-015.1 PMP22 Exon 03A	9	1.02	1.05	1.36	1.32	1.56
PMP22 probe 4858-L4041	17p12-p11.2	168	17-015.1 PMP22 Exon 03B	10	1.02	0.92	1.4	1.31	1.47
PMP22 probe 4855-L4463	17p12-p11.2	172	17-015.1 PMP22 Exon 04A	11	0.97	0.96	1.47	1.37	1.42
PMP22 probe 2145-L1841	17p12-p11.2	310	17-015.1 PMP22 Exon 04B	12	1.03	1.02	1.47	1.43	1.38
PMP22 probe 1465-L0930	17p12-p11.2	337	17-015.1 PMP22 Exon 05A	13	1.05	1	1.39	1.51	1.34
PMP22 probe 4859-L4464	17p12-p11.2	238	17-015.1 PMP22 Exon 05B	14	0.88	0.85	1.57	1.31	1.35
BX089850 probe 2878-L2158	17p12	184	17-015.2 BX089850	15	1.01	0.94	1.43	1.38	1.45
TEKT3 probe 4680-L2155	17p12	292	17-015.2 TEKT3 Exon 03	16	0.96	0.99	1.62	1.49	1.46
TEKT3 probe 1480-L0821	17p12	202	17-015.2 TEKT3 Exon 08	17	1.04	0.97	1.48	1.36	1.59
Control probe 0860-L0547	02p12	265	c	18	0.94	1.01	1.01	1.05	1.04
Control probe 0822-L0130	02p21	180	c	19	1.04	1.1	0.84	0.91	1
Control probe 1337-L0880	07q11.23	382	c	20	1.04	1.02	1.06	1.07	1.07
Control probe 1042-L0791	08q24	319	c	21	1.06	1.05	0.99	1.09	1.03
Control probe 3010-L2450	09q34	283	c	22	0.94	0.97	1.03	1	1.04
Control probe 1548-L0992	05q21	364	c	23	1.05	0.97	1.03	1.13	1.02
Control probe 0797-L0463	05q31	130	c	24	0.98	0.96	0.88	0.88	0.96
Control probe 2858-L2390	07q31	178	c	25	1.05	0.98	0.96	0.89	0.92
Control probe 0978-L0563	11p13	193	c	26	1.04	1.05	0.97	0.94	1.01
Control probe 3537-L2903	11p15	436	c	27	0.98	0.97	1.03	1.07	0.96
Control probe 0472-L0088	12q14	211	c	28	0.97	0.98	1	0.94	1
Control probe 1452-L0936	17p11.2	274	c	29	0.98	1	1.06	0.99	0.95
Control probe 1327-L0872	17p13.3	301	c	30	1.04	1.03	0.96	1.01	0.9
Control probe 0778-L0347	17q21	328	c	31	0.96	1.07	1	1.03	1.08
Control probe 0448-L0390	17q21.1	409	c	32	0.92	1.16	1.16	1.18	1.07
Control probe 1088-L0647	17q25.2	400	c	33	1	0.99	1.06	1.12	0.95
Control probe 0816-L0334	21q11	247	c	34	1.07	1.04	0.9	0.99	0.96
Control probe 1108-L0679	? 08q24	427	c	35	1.1	0.97	0.97	1.06	0.84
Control probe 4681-L4462	01p36	154	c	36	1	1.07	1.06	0.98	1.1
Control probe 4682-L4080	01p36	219	c	37	0.83	0.99	0.96	0.98	1.09
Control probe 3797-L4594	21q22	138	c	38	0.97	0.94	0.97	0.83	0.93

Εικόνα 3.1 Αποτέλεσμα ασθενή απομεινωτικού τύπου που φέρει τη μετάλλαξη του διπλασιασμού του γονιδίου *PMP22* με MLPA ανάλυση. **(Α)** Αποτέλεσμα του προγράμματος Fragment analysis της Beckman Coulter. **(Β)** Αποτέλεσμα μετά από επεξεργασία με το πρόγραμμα Coffalyser.

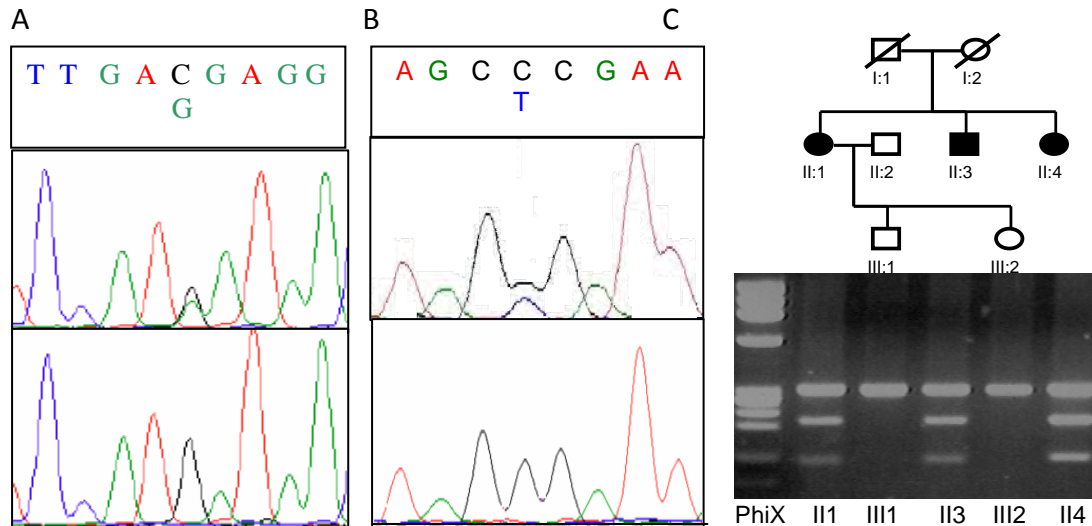
- Τρεις οικογένειες (205, 211, 5644) φέρουν τη μετάλλαξη S22F στο γονίδιο *PMP22* (18% των ασθενών με απομυελινωτικό τύπο και το 9,5% όλων των ασθενών με CMT) (Kleopa et al. 2004). Η μετάλλαξη αυτή δημοσιεύτηκε πρόσφατα για δεύτερη φορά (η πρώτη δημοσίευση αφορούσε μια Κυπριακή οικογένεια) και αφορούσε μόνο ένα ασθενή με HNPP (Kleopa et al. 2004; Russo et al. 2010).



Εικόνα 3.2 (A) Αποτέλεσμα ανάλυσης ακολουθίας ασθενούς που φέρει τη μετάλλαξη S22F (c.65C>T) στο εξόνιο 1 του γονιδίου *PMP22* και υγιούς μάρτυρα. **(B)** Αποτέλεσμα ανίχνευσης της μετάλλαξης 65C>T στην οικογένεια 5644 μετά από πέψη με το ένζυμο περιορισμού *MboII*. Από την πέψη του μεταλλαγμένου αλληλίου προκύπτουν δυο κομμάτια 103 και 99 bp που φαίνονται ως μια ζώνη στην πηκτική αγαρόζη, ενώ στο φυσιολογικό αλληλίο δεν έχουμε πέψη και φαίνεται ως μια ζώνη 202 bp.

- Δύο οικογένειες φέρουν μετάλλαξη στο γονίδιο *MPZ* (5% όλων των ασθενών με CMT). Η πρώτη από τις οικογένειες (297) που φέρει τη μετάλλαξη D90E ανήκει στον απομυελινωτικό τύπο (4,5% των ασθενών με απομυελινωτικό τύπο) (Hayasaka et al. 1993a; Nicolaou et al. 2010) και η δεύτερη οικογένεια (5620) που φέρει τη μετάλλαξη P70L ανήκει στον αξονικό τύπο (7% των ασθενών με αξονικό τύπο) (Hayasaka et al. 1993a; Nicolaou et al. 2010). Η μετάλλαξη P70L αποτελεί καινούργια μετάλλαξη που μέχρι σήμερα, με βάση τις βιβλιογραφικές αναφορές,

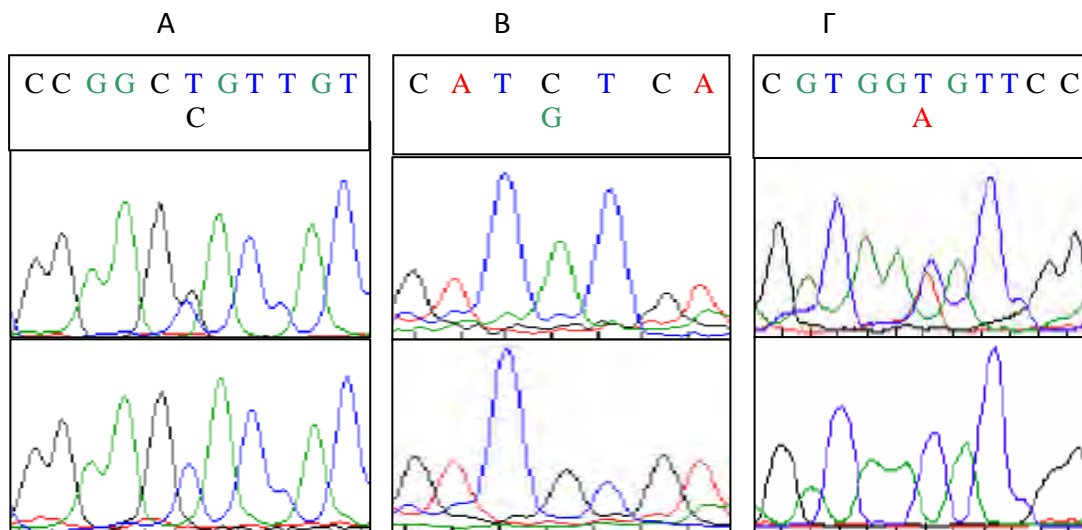
έχει βρεθεί μόνο στον Κυπριακό πληθυσμό. Αποτελέσματα της οικογένειας 5620 που φέρει τη σημειακή μετάλλαξη P70L στο γονίδιο *MPZ* παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.3.



Εικόνα 3.3 (Α) Αποτέλεσμα ανάλυσης ακολουθίας ασθενούς της οικογένειας 297 που φέρει τη μετάλλαξη D90E (c.270C>G) στο εξόνιο 3 του γονιδίου *MPZ* και υγιούς μάρτυρα. **(Β)** Αποτελέσματα ανάλυσης ακολουθίας του ασθενούς της οικογένειας 5620 που φέρει τη μετάλλαξη c.209C>T (P70L) στο εξόνιο 2 του γονιδίου *MPZ* και υγιούς μάρτυρα. **(Γ)** Γενεαλογικό δέντρο της οικογένειας 5620 και ανίχνευση της μετάλλαξης c.209C>T μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *AfuI* σε όλα τα διαθέσιμα μέλη της οικογένειας. Από την πέψη του μεταλλαγμένου αλληλίου προκύπτουν δύο κομμάτια 202 και 107 br, ενώ στο φυσιολογικό αλληλίο δεν έχουμε πέψη και φαίνεται ως μια ζώνη 309 br.

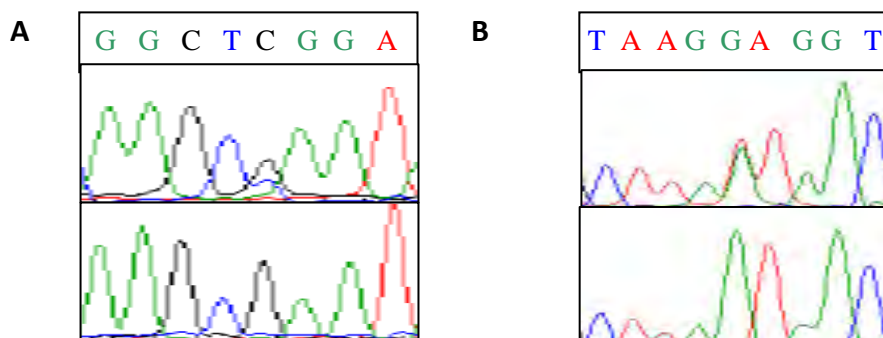
- Τέσσερις οικογένειες φέρουν μετάλλαξη στο γονίδιο *GJB1* (*Cx32*) (18% όλων των ασθενών με CMT). Η μία από τις οικογένειες (202) που φέρει τη μετάλλαξη L143P (Kleopa et al. 2006b; Nicolaou et al. 2010) ανήκει στον απομυελινωτικό τύπο (9% των ασθενών με απομυελινωτικό τύπο). Οι υπόλοιπες τρεις οικογένειες, δυο (5634, 5657) που φέρουν τη μετάλλαξη V140E (Kleopa et al. 2006b; Nicolaou et al. 2010) και μια που φέρει τη μετάλλαξη I127M (5636) (Nicholson et al. 1998; Nicolaou et al. 2010), ανήκουν στο μεικτό τύπο (90% των ασθενών με μεικτό τύπο). Εδώ είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι οι δυο από τις μεταλλάξεις

(V140E και L143P) δεν έχουν μέχρι σήμερα βρεθεί σε άλλο πληθυσμό σύμφωνα με τις βιβλιογραφικές αναφορές που έχουν δημοσιευτεί μέχρι τώρα.



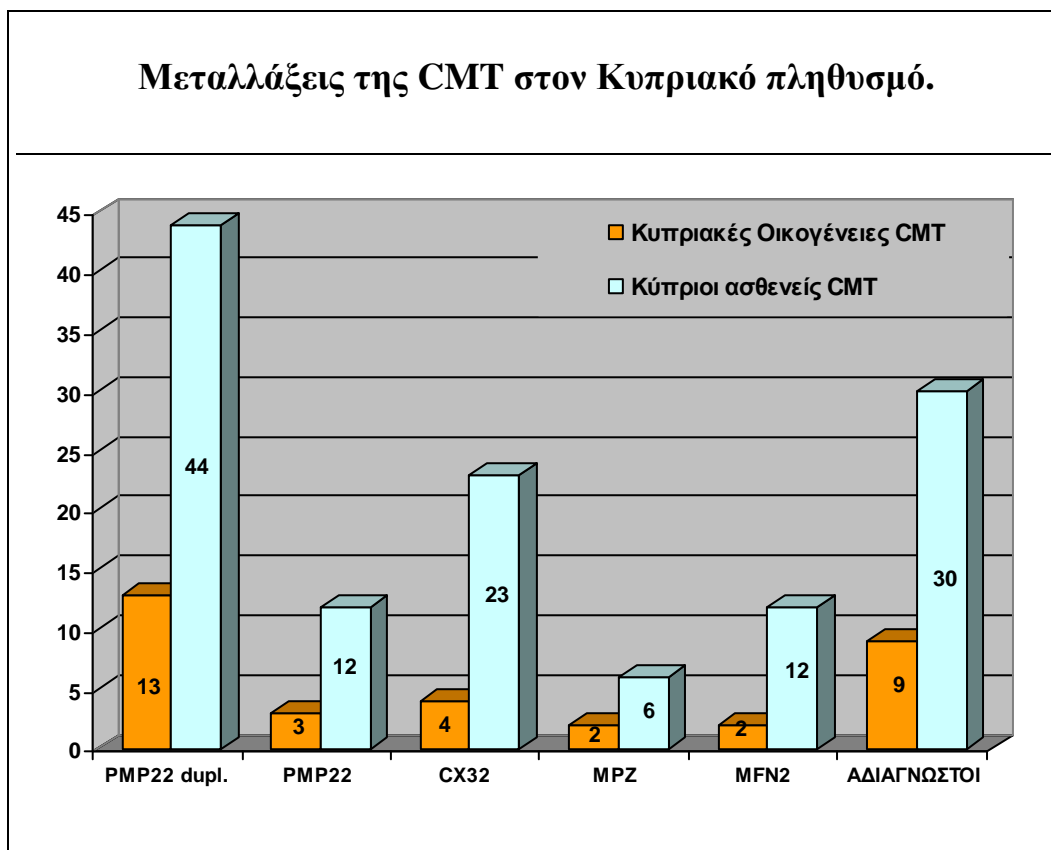
Εικόνα 3.4 Αποτελέσματα ανάλυσης ακολουθίας: **(Α)** γυναίκας που φέρει τη μετάλλαξη L143P (c.428T>C), **(Β)** άντρα που φέρει τη μετάλλαξη I127M (c.381C>G) και **(Γ)** γυναίκας που φέρει τη μετάλλαξη V140E (c.419T>A) στο εξόνιο 2 του γονιδίου *GJB1* και υγιών μαρτύρων.

- Δυο οικογένειες φέρουν μετάλλαξη στο γονίδιο *MFN2* (29% των ασθενών με αξονικό τύπο και το 9.5% όλων των ασθενών με CMT). Στη μία από τις οικογένειες (208) η ασθενής φέρει τη μετάλλαξη R94W και εμφανίστηκε ως de novo (Zuchner et al. 2004) και στην άλλη οικογένεια (206) ανιχνεύτηκε η νέα μετάλλαξη E308K.



Εικόνα 3.5 Αποτελέσματα ανάλυσης ακολουθίας ασθενών που φέρουν τις μεταλλάξεις **(Α)** R94W (c.280C>T) στο εξόνιο 4 και **(Β)** E308K (c.922G>A) στο εξόνιο 9 του γονιδίου *MFN2*.

- Εννέα οικογένειες (30 ασθενείς) από τις οποίες οκτώ είναι αξονικού τύπου (223, 5661, 5647, 5655, 5643, 275, 283, 5664) και μια μεικτού τύπου (5659) και οκτώ σποραδικοί ασθενείς από τους οποίους επτά είναι αξονικού τύπου (299, 5646, 5648, 5650, 5665, 5666, 5667) και ένας απομυελινωτικού τύπου (5671) αποκλείστηκαν από τα περισσότερα κοινά γονίδια της CMT και εξακολουθεί να εκκρεμεί η μοριακή γενετική διάγνωση τους.



Διάγραμμα 3.2 Απεικόνιση των αποτελεσμάτων των κυπριακών οικογενειών και Κύπριων ασθενών με αναφορά στο γονίδιο στο οποίο φέρουν μετάλλαξη.

Πίνακας 3.1 Αποτελέσματα νευροφυσιολογικής και γενετικής μελέτης ασθενών με CMT στον κυπριακό πληθυσμό				
Τύπος	Γενετική ανάλυση (συνολικά CMT/ CMT κατά τύπο)	Μετάλλαξη (Αριθμός Ασθενών)	Ηλικία έναρξης	Ταχύτητες αγωγής νεύρων
Απομυελινωτικός (52%) MNCV < 38 m/s	PMP22 dup. (35%/67%)	PMP22 dup. (44)	12-15 ετών	MNCV < 25 m/s
	PMP22 (9.5%/18%)	S22F (12)	5-60 ετών	MNCV < 38 m/s
	MPZ (5%/4.5%)	D90E (3)	1 ^η δεκαετία	MNCV < 20 m/s
	GJB1/Cx32 (18%/9%)	L143P (6)	2 ^η δεκαετία	MNCV < 30 m/s
Μικτός (15%) MNCV 32-38 m/s	GJB1/Cx32 (18%/90%)	V140E (14)	2 ^η δεκαετία	MNCV ~ 35 m/s
		I127M (3)	2 ^η δεκαετία	MNCV ~ 35 m/s
Αξονικός (33%) MNCV > 38 m/s	MFN2 (9.5%/29%)	R94W (1)	παιδική ηλικία	MNCV > 40 m/s
		E308K (11)	12-30 ετών	MNCV > 40 m/s
	MPZ (5%/7%)	P70L (3)	~50 ετών	MNCV > 42 m/s

Μετά τη γενετική ανάλυση των έξι οικογενειών από την Κύπρο και των πέντε οικογενειών και τεσσάρων σποραδικών ασθενών από την Ελλάδα που προέκυψαν μετά την επιδημιολογική μελέτη είχαμε τα εξής αποτελέσματα:

- Δυο οικογένειες από την Κύπρο (5670, 5675) φέρουν τη μετάλλαξη S22F στο γονίδιο *PMP22*.
- Τέσσερις οικογένειες από την Κύπρο αποκλείστηκαν από τα κοινά γονίδια της CMT και εξακολουθεί να εκκρεμεί η μοριακή γενετική διάγνωση τους (5672, 5673, 5674, 5676)
- Δυο οικογένειες από την Ελλάδα φέρουν το διπλασιασμό του γονιδίου *PMP22* (ΠΠ, ΒΑ).
- Τρεις οικογένειες και τέσσερις σποραδικοί ασθενείς από την Ελλάδα βρέθηκαν αρνητικοί στο διπλασιασμό του γονιδίου *PMP22* και χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης (ΜΒ, ΒΒ, ΝΜ, ΖΜ, ΡΤ, ΒΙ, ΔΣ).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη διδακτορική αυτή διατριβή συμπεριλαμβάνονται τα αποτελέσματα 44 οικογενειών και 12 σποραδικών ασθενών από Κύπρο και Ελλάδα. Οι 39 από τις οικογένειες και οι οκτώ από τους σποραδικούς ασθενείς είναι από την Κύπρο ενώ οι υπόλοιπες πέντε οικογένειες και τέσσερις σποραδικοί ασθενείς είναι από την Ελλάδα. Τον Ιανουάριο του 2009 συμπεριλήφθηκαν τα αποτελέσματα από 33 οικογένειες και οκτώ σποραδικούς ασθενείς από την Κύπρο (αποτελέσματα ασθενών που ήταν μέχρι τότε στη διάθεση μας) για τη διεξαγωγή επιδημιολογικής μελέτης για τη νόσο CMT στον Κυπριακό πληθυσμό. Οι υπόλοιπες έξι οικογένειες και δύο άτομα της οικογένειας 5644 από την Κύπρο δεν συμπεριλήφθηκαν στην επιδημιολογική μελέτη εφόσον είναι ασθενείς που μελετήθηκαν μετά τον Ιανουάριο του 2009.

4.1 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

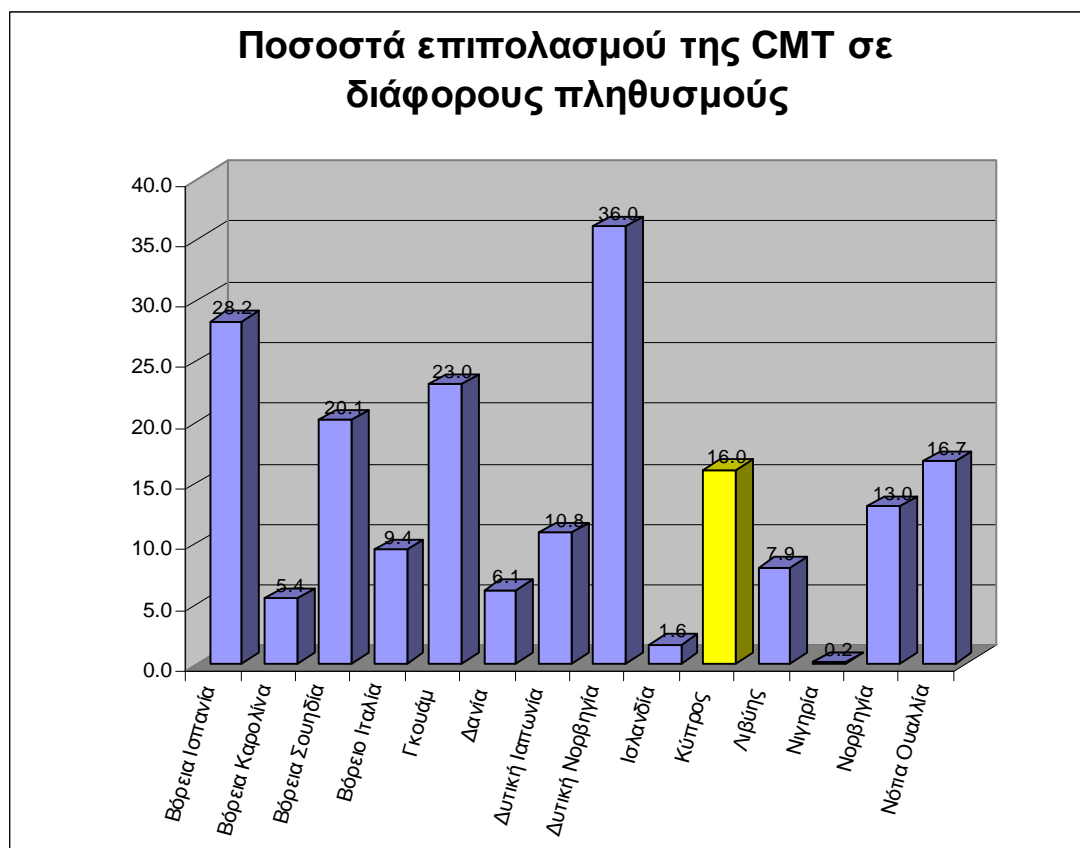
Τα αποτελέσματα της επιδημιολογικής μελέτης που παρουσιάζονται στη διδακτορική αυτή διατριβή είναι αντιπροσωπευτικά για τον Κυπριακό πληθυσμό, δεδομένου ότι η Κύπρος είναι ένα μικρό νησί και το Ινστιτούτο Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου, από το οποίο συλλέχθηκαν και τα δείγματα, είναι το μόνο κέντρο παραπομπής για τη νόσο της CMT στο νησί. Για την επιδημιολογική αυτή μελέτη που διεξάχθηκε στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής, όπως ήδη έχουμε αναφέρει συμπεριλήφθηκαν τα αποτελέσματα από 33 οικογένειες και 8

σποραδικοί ασθενείς από την Κύπρο (συνολικά 127 ασθενείς) με τη νόσο CMT.

4.1.1 Επιπολασμός της CMT

Ο επιπολασμός της CMT στον κυπριακό πληθυσμό όπως ήδη έχουμε αναφέρει είναι 16/100.000. Το αποτέλεσμα αυτό είναι πολύ κοντά στα πλαίσια των ποσοστών που παρουσιάζονται σε παγκόσμιο επίπεδο όπως αυτά αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία και τα οποία κυμαίνονται σε 17-40/100,000 (Barisic et al. 2008). Ο επιπολασμός της CMT ποικίλλει στους διάφορους πληθυσμούς καθώς ακόμα και σε διαφορετικές περιοχές εντός των ίδιων των χωρών όπως αναφέρεται σε διάφορες βιβλιογραφικές αναφορές. Πιο κάτω παρουσιάζονται ορισμένα παραδείγματα πληθυσμών διαφόρων χωρών όπου φαίνεται η διαφορετική κατανομή των ποσοστών των ασθενών με CMT σε αυτούς τους πληθυσμούς. Ο επιπολασμός της CMT στους περισσότερους πληθυσμούς είναι εντός του πλαισίου των ποσοστών που παρουσιάζονται σε παγκόσμιο επίπεδο όπως στην Νότια Ουαλία 16,7/100,000 (MacMillan and Harper 1994), στη Βόρεια Σουηδία 20,1/100,000 (Holmberg 1993), στη Βόρεια Ισπανία 28.2/100,000 (Combarros et al. 1987 624), στο Γκουάμ 23/100,000 (Kurtzke et al. 1971) και στη Δυτική Νορβηγία 36/100,000 (Skre 1974). Στη υπόλοιπη Νορβηγία ο επιπολασμός της CMT κυμαίνεται από 9 έως 17 ανά 100,000 ανάλογα με την περιοχή (Skre 1974; Braathen et al. 2010). Σε ορισμένους πληθυσμούς ο επιπολασμός της CMT είναι χαμηλότερος από τα πλαίσια των ποσοστών που παρουσιάζονται σε παγκόσμιο επίπεδο, όπως στη Βόρειο Ιταλία 9.4/100,000 (Mostacciolo et al. 1991; Mostacciolo et al. 1995), στη Δανία 6.06/100,000 (Werdelin and Keiding 1990), στη Λιβύη 7.9/100,000 (Radhakrishnan

et al. 1987), στη Νιγηρία 0.15/100,000 (Aiyesimoju et al. 1984), στην Ισλανδία 1,6/100,000 (Combarros et al. 1987), στη Βόρεια Καρολίνα 5.4/100,000 (Kurtzke et al. 1971) και στη Δυτική Ιαπωνία 10.8/100,000 (Kurihara et al. 2002)



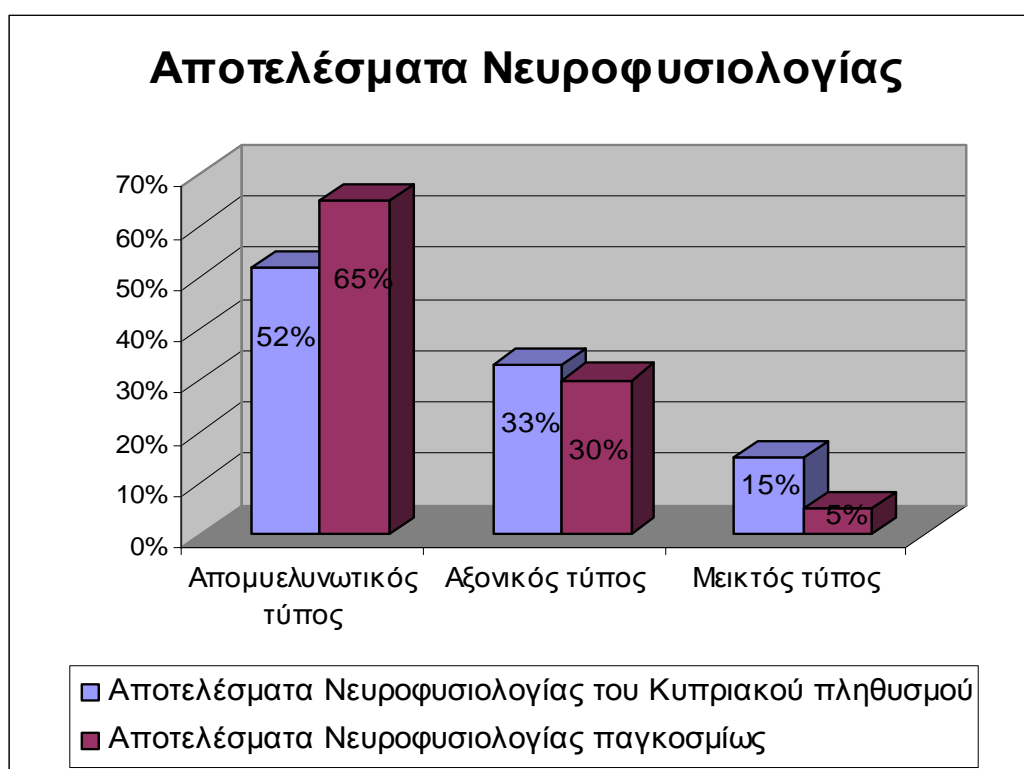
Διάγραμμα 4.1 Ποσοστιαίες αναφορές διαφόρων πληθυσμών ανά το παγκόσμιο για τον επιπολασμό της CMT ανά 100,000 άτομα.

4.2 ΝΕΥΡΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Ο απομυελινωτικός τύπος της CMT με βάση την επιδημιολογική μελέτη, αντιπροσωπεύει το 52% του συνολικού αριθμού των ασθενών με CMT στον κυπριακό πληθυσμό. Το ποσοστό αυτό αυξάνεται (~2%) με την εισαγωγή των νέων οικογενειών που δεν συμπεριλήφθηκαν στην επιδημιολογική μελέτη. Το ποσοστό που αφορά τον κυπριακό πληθυσμό είναι σημαντικά μειωμένο έναντι του μέσου όρου των ποσοστών που παρουσιάζονται σε παγκόσμια κλίμακα και είναι περίπου 65% (Verhoeven et al. 2006; Barisic et al. 2008). Ο αξονικός τύπος της CMT με βάση την επιδημιολογική μελέτη αντιπροσωπεύει το 33% του συνολικού αριθμού των ατόμων που πάσχουν από τη νόσο CMT στον κυπριακό πληθυσμό, ποσοστό που μειώνεται (~1.5%) όταν συμπεριλάβουμε όλους τους ασθενείς (επιπλέον αυτούς που δεν συμπεριλήφθηκαν στην επιδημιολογική μελέτη). Το ποσοστό αυτό είναι παρόμοιο με το μέσο όρο των ποσοστών που παρουσιάζονται σε παγκόσμιο επίπεδο και είναι (~ 30%) (Verhoeven et al. 2006; Barisic et al. 2008). Ο μεικτός τύπος της CMT παρουσιάζεται με ποσοστό 15% των ατόμων που πάσχουν από τη νόσο CMT στον κυπριακό πληθυσμό, που επίσης μειώνεται (~0.5%) όταν συμπεριλάβουμε όλους τους ασθενείς. Το ποσοστό που παρουσιάζεται είναι σημαντικά αυξημένο και δεν έχει παρουσιαστεί παρόμοιο ποσοστό σε κάποιο άλλο πληθυσμό. Ο μέσος όρος των ποσοστών που παρουσιάζονται παγκοσμίως είναι περίπου 5% και είναι κατά πολύ μικρότερο από το αντίστοιχο ποσοστό που εμφανίζεται στον κυπριακό πληθυσμό (Verhoeven et al. 2006). Σε επιδημιολογική μελέτη που παρουσίασαν για μια περιοχή της Νορβηγίας κοντά στο Όσλο, έδωσαν αποτελέσματα 48,2% απομυελινωτικού τύπου, 49,4% αξονικού τύπου και 2,4%

μεικτού τύπου (Braathen et al. 2010). Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι τα ποσοστά που παρουσιάζονται στον Κυπριακό πληθυσμό όσον αφορά τον απομυελινωτικό τύπο είναι παρόμοια με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης.

Τα αποτελέσματα νευροφυσιολογίας των ασθενών από την Ελλάδα και συγκεκριμένα από την περιοχή της Λάρισας, έδειξαν μια ανάλογη κατανομή στους διάφορους τύπους με το μέσο όρο των ποσοστών που παρουσιάζονται παγκοσμίως (λόγω του μικρού αριθμού ασθενών δεν μπορεί να δοθεί ασφαλές και πιο ακριβές συμπέρασμα για κατανομή των ποσοστών).



Διάγραμμα 4.2 Συγκριτικά αποτελέσματα του Κυπριακού πληθυσμού και του μέσου όρου των πληθυσμών παγκοσμίως για τους διάφορους τύπους της CMT.

4.3 ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Ασθενείς που φέρουν το διπλασιασμό του γονιδίου PMP22

Οι Κύπριοι ασθενείς που φέρουν το διπλασιασμό του γονιδίου *PMP22* παρουσίασαν τα πρώτα συμπτώματα στην ηλικία των 12-15 ετών. Χαρακτηρίζονταν από μεγάλη ετερογένεια στον κλινικό φαινότυπο ακόμα και σε άτομα της ίδιας οικογένειας. Το 70% περίπου των ασθενών παρουσίασαν μία όχι και τόσο σοβαρή μορφή CMT. Τα κλινικά συμπτώματα που παρουσίασαν οι ασθενείς αυτοί ήταν προοδευτική αδυναμία και ατροφία των περιφερικών μυών κυρίως στα κάτω άκρα, περνιαία μυϊκή ατροφία, δυσκολία βάδισης, κοιλοποδία (πολύ υψηλή ποδική καμάρα), παραμόρφωση του άκρου ποδός και απουσία αντανακλαστικών, με τους περισσότερους από τους ασθενείς να χρειάζονται υποβοηθήματα βάδισης. Το ~30% των ασθενών παρουσίασε ένα πιο σοβαρό κλινικό φαινότυπο με επιπλέον έντονες παραμορφώσεις, πτώση άκρου ποδός (καλπαστικό βάδισμα) και χρειάστηκε να γίνουν διορθωτικές ορθοπεδικές επεμβάσεις (αρθρωδέσεις). Η κλινική εικόνα που παρουσιάζουν οι ασθενείς αυτοί είναι παρόμοια με την κλινική εικόνα που περιγράφεται στις βιβλιογραφικές αναφορές με εξαίρεση την ύπαρξη υπερτροφίας νεύρων και απώλειας ακοής που παρουσιάζεται σε ορισμένους Κύπριους ασθενείς. Η ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων είναι επίσης η ίδια με τις αντίστοιχες που παρουσιάζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές (πρώτες δυο δεκαετίες). Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων είναι αρκετά μειωμένες (MNCV <25) αλλά στα πλαίσια των ταχυτήτων που δίνονται στις βιβλιογραφικές αναφορές (MNCV <38m/s και συνήθως ~20m/s) (Barisic et al. 2008; Reilly 2009).

Οι ασθενείς από την Ελλάδα που έφεραν το διπλασιασμό του γονιδίου *PMP22* παρουσίασαν τα πρώτα συμπτώματα στην ηλικία των 50-60 ετών. Χαρακτηρίζονταν από ετερογένεια του κλινικού φαινότυπου και διαφορετικό βαθμό βαρύτητας της νόσου. Τα κλινικά συμπτώματα που παρουσίασαν οι ασθενείς ήταν προοδευτική αδυναμία και ατροφία των περιφερικών μυών, κυρίως στα κάτω άκρα, περνιαία μυϊκή ατροφία, δυσκολία βάρδισης, κατάργηση τενοντίων αντανάκλασεων και μειωμένη αισθητικότητα κυρίως των κάτω άκρων. Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό που παρουσιάζουν οι ασθενείς αυτοί είναι η μεγάλη ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων (50-60 ετών). Βιβλιογραφικά αναφέρεται έναρξη συμπτωμάτων στις πρώτες δυο δεκαετίες της ζωής όπως ισχύει και για τους Κύπριους ασθενείς CMT1A (Barisic et al. 2008; Reilly 2009).

Ασθενείς που φέρουν τη μετάλλαξη S22F στο γονίδιο PMP22

Η ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων στους ασθενείς με τη σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο *PMP22 S22F* ποικίλει μεταξύ 16 και 60 ετών και παρουσιάζεται επίσης μεγάλη ετερογένεια στον κλινικό φαινότυπο. Κλινικά οι ασθενείς αυτοί παρουσίασαν προοδευτική αδυναμία και ατροφία των περιφερικών μυών, κοιλοποδία, παραμόρφωση του άκρου ποδός, μερική αδυναμία των χεριών και επίσης απουσία αντανάκλαστικών. Οι ασθενείς με κλινικό φαινότυπο HNPP παρουσίασαν παρέσεις νεύρων. Η κλινική εικόνα που παρουσιάζεται δεν είναι ίδια σε όλους τους ασθενείς και σε μερικές περιπτώσεις διαφέρει ακόμα και σε άτομα της ίδιας οικογένειας. Κάποιοι ασθενείς παρουσιάζουν CMT1 κλινικό φαινότυπο με διάφορες διακυμάνσεις, που μπορεί να είναι από ελαφριά μέχρι βαριά μορφή και μεγάλη ετερογένεια στην ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων. Άλλοι

ασθενείς παρουσιάζουν τυπικό HNPP κλινικό φαινότυπο με κάποιους από αυτούς να καταλήγουν αργότερα με σοβαρής μορφής CMT1 κλινικό φαινότυπο. Υπάρχουν επίσης φορείς της μετάλλαξης χωρίς συμπτώματα ή που παρουσιάζουν συμπτώματα πολύ ελαφριάς μορφής που δεν γίνονται αντιληπτά π.χ. ελαφριά ποδική καμάρα. Συγκεκριμένα οκτώ ασθενείς παρουσιάζονται με CMT1 κλινικό φαινότυπο, τέσσερις ασθενείς με HNPP κλινικό φαινότυπο και πέντε ασθενείς παρουσιάζονται και με τους δύο κλινικούς φαινότυπους. Τα κλινικά χαρακτηριστικά που παρουσιάζουν οι ασθενείς είναι συνήθως σοβαρότερα από ότι σε ασθενείς που φέρουν το διπλασιασμό (CMT1A) ή την έλλειψη του ενός αλληλίου (HNPP) του γονιδίου *PMP22*, γεγονός που περιγράφεται και στις περισσότερες βιβλιογραφικές αναφορές για σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *PMP22* (Meretoja et al. 1997; Barisic et al. 2008; Reilly 2009). Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει η ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων που λόγω συμμετοχής των δυο τύπων σε διαφορετικό ποσοστό παρουσιάζεται τόσο σε μικρές όσο και σε μεγάλες ηλικίες (στον τύπο CMT1E η ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων είναι κυρίως η πρώτη δεκαετία της ζωής ενώ στον τύπο HNPP συμπτώματα μπορεί να παρουσιαστούν σε οποιαδήποτε ηλικία) καθώς και η μεγάλη ετερογένεια που παρουσιάζουν οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων των Κύπριων ασθενών (23–33m/s). Εδώ αξίζει επίσης να αναφερθεί η κοινή καταγωγή των οικογενειών που φέρουν τη μετάλλαξη αυτή (το χωριό Αραδίππου της επαρχίας Λάρνακας). Το γεγονός αυτό συνηγορεί στην ύπαρξη κοινού προγόνου των οικογενειών και ίσως να αποτελεί και τον κύριο λόγο του αυξημένου ποσοστού που παρουσιάζει η μετάλλαξη αυτή στον κυπριακό πληθυσμό.

Ασθενείς που φέρουν τη μετάλλαξη D90E στο γονίδιο MPZ

Οι Κύπριοι ασθενείς με τη σημειακή μετάλλαξη D90E στο γονίδιο *MPZ* παρουσίασαν τα πρώτα τους συμπτώματα στην πρώτη δεκαετία της ζωής τους. Οι ασθενείς που φέρουν τη μετάλλαξη αυτή, παρουσίασαν διαφορετικού βαθμού προοδευτική αδυναμία των περιφερικών μυών, κοιλοποδία και παραμόρφωση του άκρου ποδός. Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων έχουν πολύ μειωμένες τιμές (MNCV<20 m/s). Παρόμοια κλινική εικόνα περιγράφεται και σε διάφορες βιβλιογραφικές αναφορές (Barisic et al. 2008; Reilly 2009).

Ασθενείς που φέρουν τη μετάλλαξη L143P στο γονίδιο GJB1

Οι ασθενείς που φέρουν τη σημειακή μετάλλαξη L143P στο γονίδιο *GJB1* απομυελινωτικού τύπου είχαν ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων στη δεύτερη δεκαετία της ζωής τους. Οι άντρες ασθενείς παρουσίαζαν σοβαρότερη εικόνα από τις γυναίκες λόγω του ότι η μετάλλαξη αυτή παρουσιάζεται στο χρωμόσωμα X. Τα κλινικά συμπτώματα που παρουσίασαν οι ασθενείς ήταν ατροφία ή αδυναμία των μυών των χεριών, κοιλοποδία και παραμόρφωση του άκρου ποδός που συνδέεται με την ατροφία και αδυναμία των μυών των ποδιών. Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων παρουσιάστηκαν μειωμένες (MNCV<30 m/s). Οι Κύπριοι ασθενείς παρουσιάζουν παρόμοια συμπτώματα με τα αντίστοιχα των βιβλιογραφικών αναφορών, με κάπως μεγαλύτερη ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων (δεύτερη δεκαετία, ενώ στη βιβλιογραφία αναφέρεται έναρξη της νόσου στην πρώτη δεκαετία) και μειωμένες τιμές κινητικών ταχυτήτων αγωγής νεύρων (MNCV<30 m/s ενώ στη βιβλιογραφία αναφέρεται 30-50 m/s) (Kleopa and Scherer 2006; Barisic et al. 2008; Reilly 2009).

Ασθενείς που φέρουν τις μεταλλάξεις V140E και I127M στο γονίδιο GJB1

Οι ασθενείς που φέρουν τις σημειακές μεταλλάξεις V140E στο γονίδιο *GJB1* παρουσίασαν τα πρώτα συμπτώματα κατά τη δεύτερη δεκαετία της ζωής τους. Όπως και στην προηγούμενη μετάλλαξη του γονιδίου *GJB1* οι άντρες ασθενείς παρουσίαζαν σοβαρότερη εικόνα από τις γυναίκες. Επίσης υπήρχαν περιπτώσεις όπου άντρες ασθενείς παρουσίασαν συμπτώματα σε μικρότερη ηλικία. Οι ασθενείς με τον τύπο αυτό παρουσίαζαν ατροφία ή αδυναμία των μυών των άνω και κάτω άκρων. Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων είχαν τιμές ~35 m/s. Παρόμοια κλινική εικόνα αναφέρεται και στη βιβλιογραφία εκτός της ηλικίας έναρξης της νόσου στους Κύπριους ασθενείς και τις οριακά χαμηλές τιμές ταχυτήτων αγωγής νεύρων (~35m/s) (Nicholson et al. 1998; Kleopa and Scherer 2006; Barisic et al. 2008; Reilly 2009).

Ασθενής που φέρει τη μετάλλαξη R94W στο γονίδιο MFN2

Η Κύπρια ασθενής με τη σημειακή μετάλλαξη στο R94W γονίδιο *MFN2* (de novo) παρουσίασε έναρξη των συμπτωμάτων κατά την παιδική ηλικία. Παρουσίασε ένα κλασσικό αλλά σοβαρής μορφής κλινικό φαινότυπο CMT με παραμόρφωση του άκρου ποδός. Στη δεύτερη δεκαετία της ζωής της παρουσίασε ατροφία των άνω άκρων. Οι τιμές των κινητικών ταχυτήτων αγωγής νεύρων ήταν κανονικές (MNCV>40 m/s). Η ασθενής αυτή παρουσίασε παρόμοια εικόνα με αυτή που αναφέρεται και στη βιβλιογραφία (Zuchner et al. 2004; Chung et al. 2006; Verhoeven et al. 2006; Zuchner et al. 2006; Cho et al. 2007).

Ασθενείς που φέρουν τη μετάλλαξη E308K στο γονίδιο MFN2

Η ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων στους ασθενείς με τη νέα σημειακή μετάλλαξη E308K στο γονίδιο *MFN2* ποικίλει μεταξύ 12 και 30 ετών. Οι ασθενείς αυτοί

παρουσίασαν ένα κλασσικό αλλά σοβαρής μορφής κλινικό φαινότυπο CMT. Σε κάποιους από τους ασθενείς παρατηρήθηκε οπτική ατροφία, σε κάποιους απώλεια ακοής και σε ορισμένους παρουσιάστηκε σακχαρώδης διαβήτης. Οι τιμές των κινητικών ταχυτήτων αγωγής νεύρων ήταν κανονικές (MNCV>40 m/s). Η κλινική εικόνα είναι παρόμοια με τις αντίστοιχες που παρουσιάζονται βιβλιογραφικά. Η οπτική ατροφία και απώλεια ακοής, είναι εικόνα που επίσης αναφέρεται στη βιβλιογραφία για κάποιες περιπτώσεις, γεγονός που δεν ισχύει για το σακχαρώδη διαβήτη που παρουσιάζεται σε ορισμένους ασθενείς και δεν έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα σε βιβλιογραφικές αναφορές. Εδώ είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι μελέτες έκφρασης του γονιδίου *MFN2* σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 έδειξαν να υπάρχει μείωση της έκφρασης του στους σκελετικούς μύες (Bach et al. 2005). Στην οικογένεια αυτή παρουσιάζονται κάποιοι ασθενείς με μεγαλύτερη ηλικία έναρξης από την αναφερόμενη στη βιβλιογραφία, ενώ οι ταχύτητες αγωγής νεύρων είναι παρόμοιες με αυτές που αναφέρονται στις βιβλιογραφικές αναφορές (Zhu et al. 2005; Zuchner and Vance 2006; Barisic et al. 2008; Reilly 2009).

Ασθενείς που φέρουν τη μετάλλαξη P70L στο γονίδιο MPZ

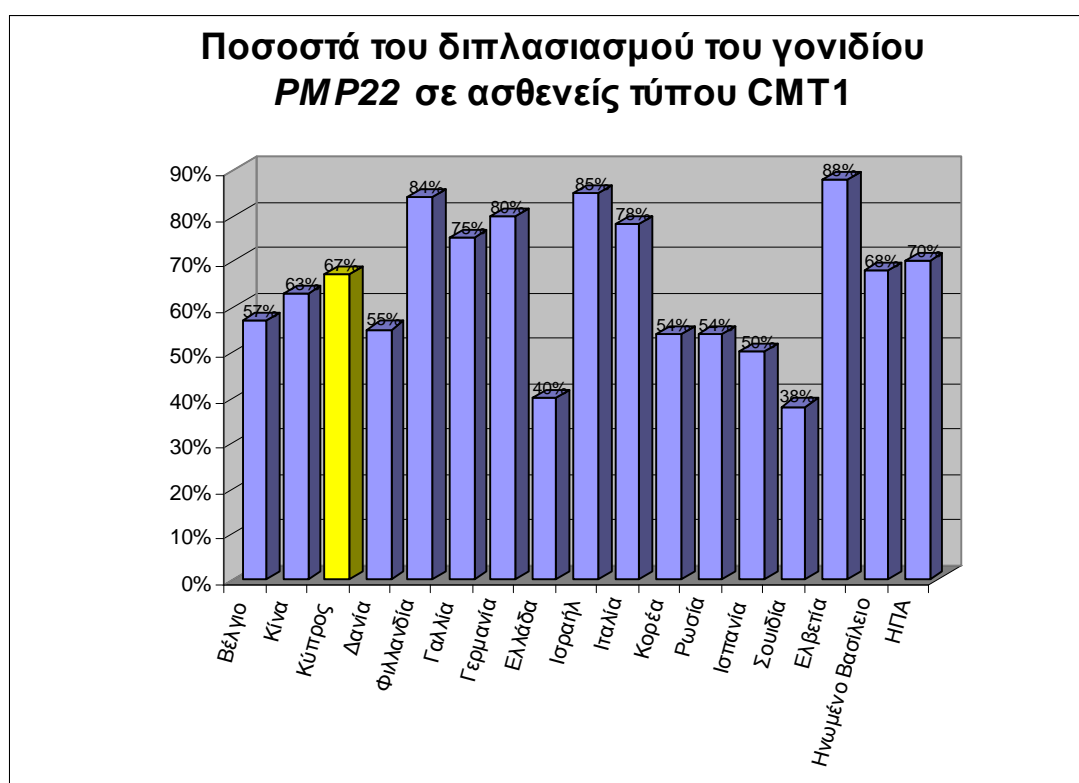
Οι Κύπριοι ασθενείς με τη μετάλλαξη P70L στο γονίδιο *MPZ* αξονικού τύπου παρουσιάζουν έναρξη των συμπτωμάτων σε μεγάλη ηλικία (~50 ετών) και κλινικά παρουσιάζουν ραγδαία εξέλιξη με πτώση ποδός, αδυναμία και ατροφία των περιφερικών μυών, κλινική εικόνα παρόμοια με αυτή που αναφέρεται στις βιβλιογραφικές αναφορές για ασθενείς αξονικού τύπου που φέρουν μετάλλαξη στο γονίδιο *MPZ*. Οι κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων είναι μεγαλύτερες από 38 m/s, ταχύτητες που διαχωρίζουν τον αξονικό από τον απομυελινωτικό τύπο. Οι

ταχύτητες αυτές επιβεβαιώνουν την κατάταξη των ασθενών που φέρουν τη μετάλλαξη αυτή στον αξονικό τύπο, εφόσον μεταλλάξεις του γονιδίου αυτού μπορεί να οδηγήσου στην εμφάνιση και των δυο κλινικών φαινοτύπων (Laura et al. 2007; Reilly 2009).

4.4 ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Ο διπλασιασμός του γονιδίου *PMP22* αποτελεί την πιο συχνή μετάλλαξη τόσο του κυπριακού πληθυσμού όσο και παγκοσμίως. Η μετάλλαξη αυτή παρουσιάζεται στον κυπριακό πληθυσμό με ποσοστό 67% των ασθενών με απομυελινωτικό τύπο CMT και 35% όλων των ασθενών με CMT. Το ποσοστό αυτό είναι παρόμοιο με το μέσο όρο των ποσοστών που παρουσιάζονται παγκοσμίως (60-70% των ασθενών με απομυελινωτικό τύπο CMT και 43% όλων των περιπτώσεων CMT) (England et al. 2009; Szigeti and Lupski 2009). Το ποσοστό του διπλασιασμού του γονιδίου *PMP22* που παρουσιάζεται σε επιδημιολογικές μελέτες για διάφορες χώρες ανά το παγκόσμιο κυμαίνεται από 35% μέχρι 100% ως προς τους ασθενείς απομυελινωτικού τύπου. Σε κάποιες χώρες το ποσοστό είναι παρόμοιο με το ποσοστό που παρουσιάζεται στον κυπριακό πληθυσμό, όπως είναι στην Ιταλία (62-95%), στο Ηνωμένο Βασίλειο (62-75%), στο Βέλγιο (44-70%), στη Γαλλία (73-76%), στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (70%) και στην Κίνα (62.5%). Σε ορισμένες χώρες το ποσοστό που παρουσιάζεται είναι υψηλότερο όπως στη Φινλανδία (84%), την Ελβετία (76-100%), στο Ισραήλ (85%) και τη Γερμανία (61-100%) ενώ σε κάποιες άλλες είναι χαμηλότερο όπως στη Δανία (54,5%), τη Ρωσία (53,7%) και την Κορέα (53,6%) που είναι ελαφρώς μειωμένο, στη Σουηδία (37,5%), στην Ισπανία (35-65%) και στην Ελλάδα (40%) (Wise et al. 1993; Nelis et al. 1996; Mersiyanova et al. 2000;

Choi et al. 2004; Song et al. 2006). Οι de novo περιπτώσεις του διπλασιασμού του γονιδίου *PMP22* παρουσιάζονται σε ποσοστό 6,8% του συνολικού αριθμού των Κύπριων ασθενών με CMT1A, ποσοστό που είναι παρόμοιο με το μέσο όρο των ποσοστών του ευρωπαϊκού πληθυσμού (6,7% των ασθενών με CMT1A) (Nelis et al. 1996). Το ποσοστό αυτό είναι μειωμένο σε σχέση με το αντίστοιχο ποσοστό που αφορά τον παγκόσμιο πληθυσμό και είναι το 1/5 των ασθενών με CMT1A (Barisic et al. 2008).



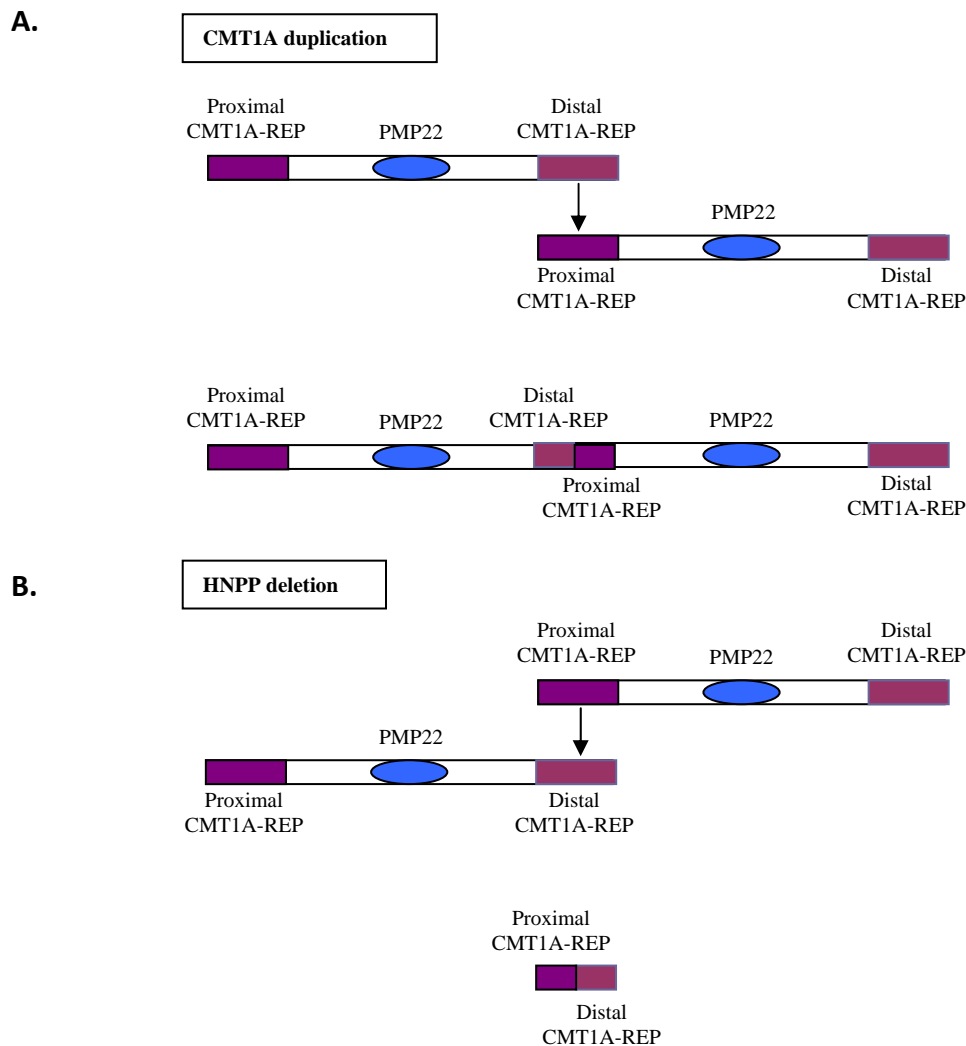
Διάγραμμα 4.3 Ποσοστιαία αποτελέσματα διαφόρων πληθυσμών για τη μετάλλαξη του διπλασιασμού του γονιδίου *PMP22* στο σύνολο των ασθενών απομυελινωτικού τύπου (CMT1).

Η γενετική ανάλυση των οικογενειών και σποραδικών ασθενών από την Ελλάδα (περιοχή Λάρισας) κατέδειξε δυο οικογένειες με το διπλασιασμό του γονιδίου *PMP22*. Αναλογικά θα περίμενε κανείς μεγαλύτερο αριθμό ατόμων με διπλασιασμό

του γονιδίου *PMP22* εφόσον το ποσοστό που παρουσιάστηκε σε επιδημιολογική μελέτη και αφορά την Ελλάδα ήταν 40% των ατόμων απομυελινωτικού τύπου (Nelis et al. 1996). Λόγο όμως του μικρού αριθμού ασθενών τα συμπεράσματα που εξάγονται δεν μπορεί να θεωρηθούν ότι είναι αντιπροσωπευτικά ούτε για τον πληθυσμό της Ελλάδας, αλλά ούτε και για τον πληθυσμό της περιοχής από την οποία προέρχονται οι ασθενείς (περιοχή Λάρισας).

Η *CMT1A* οφείλεται στο διπλασιασμό ενός τμήματος (~1.5Kb) του χρωμοσώματος 17 (17p11.2-p12) που εμπεριέχει το γονίδιο *PMP22* (Εικόνα 4.1). Η κλινική εικόνα που παρουσιάζεται οφείλεται στην υπέρ δοσολογία του γονιδίου *PMP22* σε επίπεδο RNA και κατ' επέκταση πρωτεΐνης. Ο διπλασιασμός αυτός παρατηρείται κατά τη διαδικασία της μείωσης ή μίτωσης των κυττάρων και οφείλεται σε ένα σταθερό ανασυνδυασμό του DNA (για το λόγο αυτό έχουμε σταθερό μέγεθος του διπλασιασμού). Στα χρωμοσώματα υπάρχουν κάποιες περιοχές επαναλήψεων μεγάλου μεγέθους και μικρού αριθμού που παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία μεταξύ τους. Οι περιοχές αυτές όταν βρίσκονται στο ίδιο χρωμόσωμα και σε σχετικά μικρή απόσταση μεταξύ τους, υπάρχει αυξημένη πιθανότητα λόγω ανασυνδυασμού του DNA να προκαλέσουν διπλασιασμό ή έλλειψη της περιοχής που ορίζεται από τις θέσεις των επαναλήψεων που προαναφέραμε. Συγκεκριμένα, στην περιοχή *CMT1A* υπάρχουν ομόλογες περιοχές μεγάλου μεγέθους και λίγων επαναλήψεων, που ονομάζονται *CMT1A-REPs* (low copy *CMT1A* repeats) (Boerkoel et al. 1999; Stankiewicz et al. 2004; Kuhlenbaumer 2005; Nelis et al. 2005). Οι περιοχές αυτές (hotspot) βρίσκονται στα άκρα της περιοχής του διπλασιασμού και ονομάζονται proximal *CMT1A-REPs* και distal *CMT1A-REPs*. Μεταξύ των δυο αυτών περιοχών υπάρχει 98,15% ομολογία ακολουθίας. Σε έρευνες που διεξάχθηκαν παρατηρήθηκε

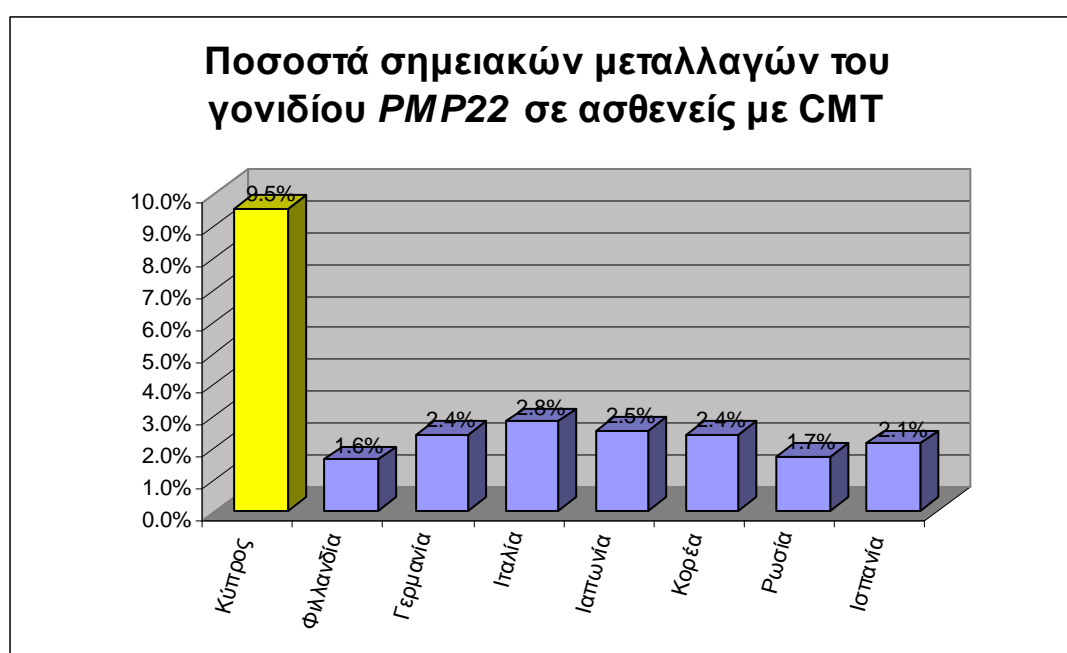
ομολογία ακολουθίας της περιοχής 17p12 του χρωμοσώματος 17 στον άνθρωπο με την περιοχή 19p του χρωμοσώματος 19 του γορίλλα (Boerkoel et al. 1999; Stankiewicz et al. 2004). Παρόμοια χαρακτηριστικά παρουσιάζονται και σε άλλες περιοχές των χρωμοσωμάτων στις οποίες παρατηρούνται διπλασιασμοί. Επίσης υπάρχουν περιοχές (mariner transposon-like element - MITE) που βρίσκονται κοντά στις περιοχές αυτές (hotspot) που αν και δεν κωδικοποιούν τη λειτουργία της τρανσποζάσης (ένζυμο απαραίτητο για την ενεργοποίηση της μεταγραφής) είναι απαραίτητες για τη διαδικασία της μεταγραφής. Έτσι κατά τη διαδικασία της μεταγραφής λόγω της κοινής αυτής ακολουθίας παρατηρείται προϊόν άνισου διασκελισμού και ανασυνδυασμού του DNA με αποτέλεσμα να έχουμε το διπλασιασμό της περιοχής (CMT1A). Αυτός είναι και ο λόγος που παρατηρείται αυξημένο ποσοστό de novo μεταλλάξεων. Ο ίδιος μηχανισμός παρατηρείται και κατά τον υποδιπλασιασμό της περιοχής (HNPP). Σήμερα με την ανάπτυξη της τεχνολογίας, όπως είναι η χρήση μικροσυστοιχιών (microarrays), γίνονται προσπάθειες για την λεπτομερή ανάλυση του μηχανισμού και τον ανασυνδυασμό του DNA στις περιπτώσεις διπλασιασμού και υποδιπλασιασμού μιας περιοχής (Zhang et al. 2010).



Εικόνα 4.1 Μηχανισμός άνισου διασκελισμού που οδηγεί σε **(A)** διπλασιασμό του γονιδίου *PMP22* (CMT1A) και **(B)** υποδιπλασιασμό του γονιδίου *PMP22* (HNPP).

Το ποσοστό των ασθενών που προέκυψε από την επιδημιολογική μελέτη με σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο *PMP22* είναι 9,5% όλων των Κύπριων ασθενών με CMT και αυξάνεται ακόμα περισσότερο με την προσθήκη των ασθενών που μελετήθηκαν μετά την επιδημιολογική μελέτη (από 9,5% σε 11%). Το ποσοστό αυτό είναι κατά πολύ υψηλότερο από το αντίστοιχο ποσοστό που προκύπτει από το μέσο όρο των ποσοστών που παρουσιάζονται παγκοσμίως (2,5% του συνολικού αριθμού των ασθενών με CMT) (England et al. 2009; Szigeti and Lupski 2009). Τα αντίστοιχα

ποσοστά από διάφορες επιδημιολογικές μελέτες που έγιναν είναι παρόμοια με το μέσο όρο των ποσοστών που παρουσιάζονται παγκοσμίως, όπως στην Κορέα 2,4%, στην Ιαπωνία 2,5%, στη Ρωσία 1,7%, στη Γερμανία 2,4%, στην Ισπανία 2,1%, στη Φινλανδία 1,6%, και στην Ιταλία 2,8% (Bort et al. 1997; Silander et al. 1998; Mersiyanova et al. 2000; Mostacciolo et al. 2001; Numakura et al. 2002; Huehne et al. 2003; Choi et al. 2004).



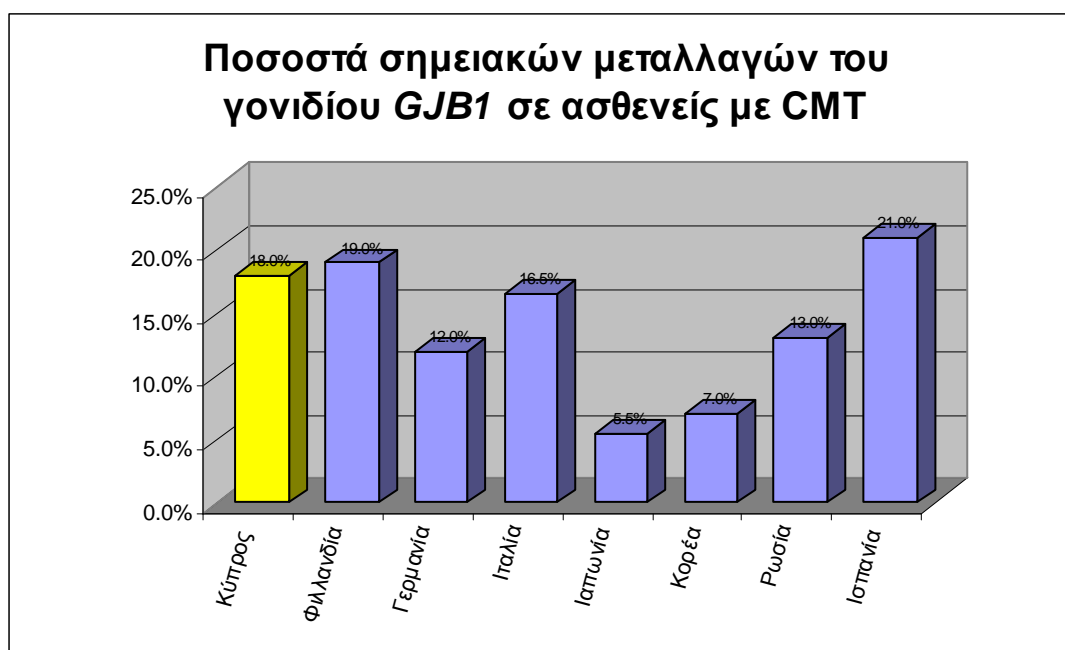
Διάγραμμα 4.4 Ποσοστιαία αποτελέσματα διαφόρων πληθυσμών για σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *PMP22* στο σύνολο των ασθενών με CMT.

Σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *PMP22* μπορεί να προκαλέσουν τόσο CMT1 όσο και HNPP κλινικό φαινότυπο. Η αντικατάσταση της σερίνης από φαινυλαλανίνη στη θέση 22, που βρίσκεται στο πρώτο διαμεμβρανικό τμήμα (first transmembrane domain) της πρωτεΐνης *PMP22* μπορεί να επηρεάσει την έκφραση η ακόμα και την απόθεση της. Η πλειοψηφία των μεταλλάξεων που προκαλούν τους διάφορους κλινικούς φαινότυπους, συμπεριλαμβανομένων των CMT1 και HNPP, βρίσκονται στα τμήματα της πρωτεΐνης που σχετίζονται με τη μεμβράνη. Ο κλινικός φαινότυπος HNPP οφείλεται κυρίως σε υποδιπλασιασμό του γονιδίου *PMP22*, αλλά έχουν

βρεθεί και σημειακές μεταλλάξεις (~15) που προκαλούν το συγκεκριμένο κλινικό φαινότυπο. Οι περισσότερες από τις μεταλλάξεις αυτές σε αντίθεση με αυτές που προκαλούν CMT1 κλινικό φαινότυπο είναι διαγραφές ή μεταλλάξεις που οδηγούν σε κωδικόνιο τερματισμού (stop codon). Ωστόσο παρουσιάστηκαν και κάποιες σημειακές μεταλλάξεις παρόμοιες με αυτή που έχουμε περιγράψει που οδηγούν σε HNPP κλινικό φαινότυπο, χωρίς να είναι γνωστός ο ακριβής μηχανισμός. Σε πρόσφατη βιβλιογραφική αναφορά παρουσιάζονται διάφορες σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *PMP22* με ετερογένεια στον κλινικό φαινότυπο που κυμαίνεται μεταξύ CMT1 και HNPP. Στις μεταλλάξεις αυτές παρουσιάζεται και η μετάλλαξη S22F η οποία παρουσιάστηκε αρχικά στον κυπριακό πληθυσμό. Στη βιβλιογραφική αυτή αναφορά παρουσιάζεται ένας ασθενής που φέρει τη μετάλλαξη S22F με HNPP κλινικό φαινότυπο και με ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων στην πρώτη δεκαετία της ζωής του (Russo et al. 2010).

Το ποσοστό των ασθενών με σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο *GJB1/Cx32* είναι επίσης υψηλότερο στον Κυπριακό πληθυσμό (18% όλων των Κύπριων ασθενών με CMT) έναντι του αντίστοιχου μέσου όρου των ποσοστών που παρουσιάζονται παγκοσμίως (12% του συνολικού αριθμού των ασθενών με CMT) (England et al. 2009). Σε κάποιους πληθυσμούς παρατηρήθηκαν παρόμοια ποσοστά με το μέσο όρο των ποσοστών που παρουσιάζονται παγκοσμίως, όπως στη Ρωσία 13%, και στη Γερμανία 11,9, σε κάποιους πληθυσμούς είχαμε αυξημένα ποσοστά όπως στην Ισπανία 21,1%, στη Φινλανδία 19%, και στην Ιταλία 16,6% και σε κάποιους άλλους μειωμένα ποσοστά όπως στην Κορέα 7,1%, και στην Ιαπωνία 5,6-5,7% (Bort et al. 1997; Silander et al. 1998; Mersiyanova et al. 2000; Yoshihara et al. 2000; Mostacciuolo et al. 2001; Numakura et al. 2002; Huehne et al. 2003; Choi et al.

2004).

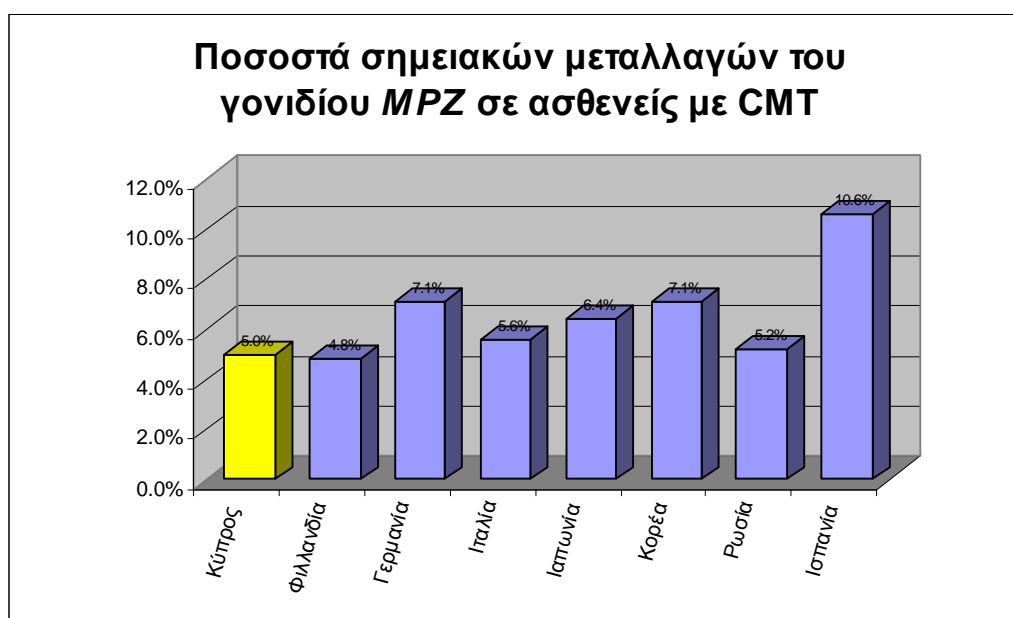


Διάγραμμα 4.5 Ποσοστιαία αποτελέσματα διαφόρων πληθυσμών για σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *GJB1/Cx32* στο σύνολο των ασθενών με CMT.

Οι μεταλλάξεις P143L, V140E και I127M του γονιδίου *GJB1* βρίσκονται στο τρίτο διαμεμβρανικό τμήμα της πρωτεΐνης, το οποίο δημιουργεί εξαμερή με κεντρικούς διαύλους που ονομάζονται κονεξόνια (connexons). Τα κονεξόνια δημιουργούν κανάλια που χρησιμοποιούνται για γρήγορη μεταφορά ουσιών μικρού μοριακού βάρους από το κυτταρόπλασμα των κυττάρων του Schwann, που γειτνιάζουν με τον άξονα (axonal), προς το εξωτερικό τμήμα της μυελίνης. Οι μεταλλάξεις αυτές πιθανώς να επηρεάζουν στη διατήρηση της τριτοταγής δομής της πρωτεΐνης. Επίσης επηρεάζουν τον ολιγομερισμό της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα να διαταράσσεται η μετακίνηση διαμέσου της μεμβράνης.

Το ποσοστό των ασθενών με σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο *MPZ* (5% του συνολικού αριθμού των Κύπριων ασθενών με CMT) είναι παρόμοιο με το μέσο όρο των ποσοστών που παρουσιάζονται παγκοσμίως (5% του συνολικού αριθμού των

ασθενών με CMT) (England et al. 2009; Szigeti and Lupski 2009). Σε διάφορους πληθυσμούς παρατηρήθηκαν παρόμοια ποσοστά όπως στη Ρωσία 5,2%, στη Φινλανδία 4,8%, και στην Ιταλία 5,6% και σε άλλους πληθυσμούς παρατηρήθηκαν αυξημένα ποσοστά όπως στην Κορέα 7,1%, στην Ιαπωνία 5,6-7,1%, στη Γερμανία 7,1% και στην Ισπανία 10,6% σε σύγκριση με το μέσο όρο των ποσοστών που παρουσιάζονται παγκοσμίως (Bort et al. 1997; Silander et al. 1998; Mersiyanova et al. 2000; Yoshihara et al. 2000; Mostacciolo et al. 2001; Numakura et al. 2002; Huehne et al. 2003; Choi et al. 2004)



Διάγραμμα 4.6 Ποσοστιαία αποτελέσματα διαφόρων πληθυσμών για σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *MPZ* στο σύνολο των ασθενών με CMT.

Το γονίδιο *MPZ* ανάλογα με τη μετάλλαξη που φέρει μπορεί να προκαλέσει διαφορετικό κλινικό φαινότυπο όπως CMT1B (επικρατητικού απομυελινωτικού τύπου), DI-CMTD (επικρατητικού μεικτού τύπου) ή CMT2I, CMT2J (επικρατητικού αξονικού τύπου).

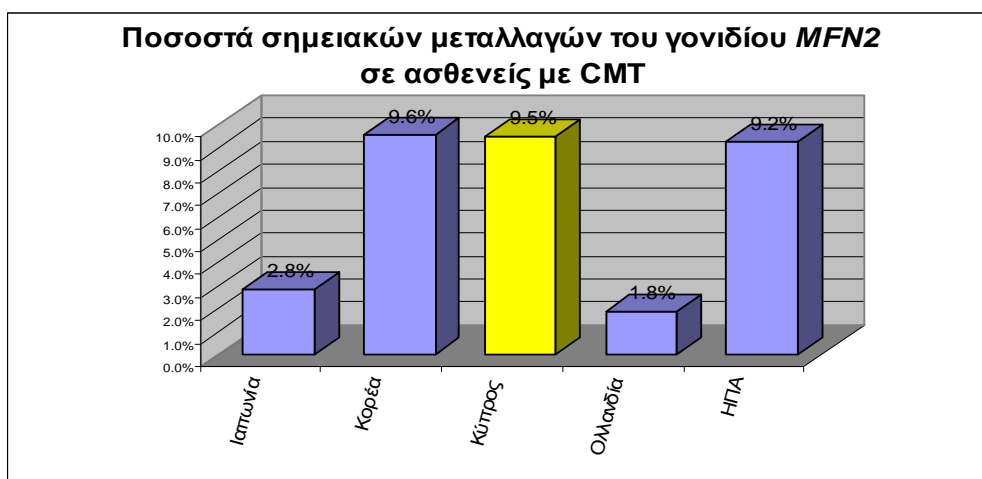
Η μετάλλαξη c.209C>T (P70L) στο γονίδιο *MPZ* αποτελεί μία καινούργια μετάλλαξη. Η αντικατάσταση της βάσης κυτοσίνης με θυμίνη (βάση 209) του γονιδίου *MPZ* προκαλεί την αλλαγή του αμινοξέος προλίνη σε λευκίνη (αμινοξύ 70) και κατά συνέπεια τη νόσο CMT αξονικού τύπου (CMT2). Μετάλλαξη στη βάση 208 (c.208C>T) με αλλαγή του ίδιου αμινοξέος (αμινοξύ 70) από προλίνη σε σερίνη (P70S) έχει δημοσιευτεί για μια Ιταλική οικογένεια αξονικού τύπου (CMT2) (Laura et al. 2007). Οι Κύπριοι και Ιταλοί ασθενείς με τις δυο αυτές μεταλλάξεις (P70L και P70S) παρουσιάζουν παρόμοιο κλινικό φαινότυπο, παρόμοια ηλικία έναρξης της νόσου (~ 50 ετών) και παρόμοιες κινητικές ταχύτητες αγωγής νεύρων (>42m/s).

Η μετάλλαξη c.270C>G (D90E) στο γονίδιο *MPZ* αποτελεί επίσης καινούργια μετάλλαξη, παρόλο που η αλλαγή του αμινοξέος από ασπαραγινικό οξύ σε γλουταμινικό οξύ έχει αναφερθεί ξανά στη βιβλιογραφία λόγω μετάλλαξης στην ίδια θέση c.270C>A που κωδικοποιεί το ίδιο αμινοξύ (Hayasaka et al. 1993a). Η αντικατάσταση της βάσης κυτοσίνης με γουανιδίνη και κατά συνέπεια η αλλαγή του αμινοξέος ασπαραγινικό σε γλουταμινικό προκαλεί τον κλινικό φαινότυπο CMT1B.

Παρά τις πολλές μεταλλάξεις που έχουν αναφερθεί για το γονίδιο *MPZ* και τους διάφορους κλινικούς φαινότυπους που προκαλούν, εντούτοις εξακολουθούν να παραμένουν αδιευκρίνιστοι οι μηχανισμοί με τους οποίους οι μεταλλάξεις αυτές προκαλούν την προκύπτουσα παθολογική κατάσταση (Shy et al. 2004).

Το ποσοστό των ασθενών με σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο *MFN2* (9,5% του συνολικού αριθμού των Κύπριων ασθενών με CMT) είναι επίσης παρόμοιο με το μέσο όρο των ποσοστών που παρουσιάζονται παγκοσμίως (11% του συνολικού αριθμού των ασθενών με CMT) (Verhoeven et al. 2006; England et al. 2009). Σε

κάποιους πληθυσμούς παρατηρήθηκαν παρόμοια ποσοστά με το μέσο όρο των ποσοστών που παρουσιάζονται παγκοσμίως, όπως στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής 9.2% του συνολικού αριθμού των ασθενών με CMT (28% των ασθενών με CMT2) και στην Κορέα 9,6% του συνολικού αριθμού των ασθενών με CMT (24.2% των ασθενών με CMT2) και σε άλλους πληθυσμούς παρατηρήθηκαν μειωμένα ποσοστά όπως στην Ολλανδία 1,8% του συνολικού αριθμού των ασθενών με CMT (5,6% των ασθενών με CMT2) και στην Ιαπωνία 2,8% του συνολικού αριθμού των ασθενών με CMT (8,6% των ασθενών με CMT2) (Kijima et al. 2005; Lawson et al. 2005; Chung et al. 2006; Bienfait et al. 2007; Cho et al. 2007). Επίσης το ποσοστό των de novo περιπτώσεων των μεταλλάξεων του γονιδίου *MFN2* για τον κυπριακό πληθυσμό είναι 7% του συνολικού αριθμού των ασθενών με CMT2, ποσοστό αρκετά χαμηλότερο από το αναφερόμενο στη βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα αναφέρεται 14% στην Ιαπωνία και 33% στην Κορέα (Kijima et al. 2005; Lawson et al. 2005; Chung et al. 2006; Bienfait et al. 2007; Cho et al. 2007)



Διάγραμμα 4.7 Ποσοστιαία αποτελέσματα διαφόρων πληθυσμών για σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *MFN2* στο σύνολο των ασθενών με CMT.

Η γνωστή μετάλλαξη R94W του γονιδίου *MFN2* βρίσκεται εντός της περιοχής του άμινο-τελικού άκρου στην αρχή του GTPase τμήματος της πρωτεΐνης στα κυτταροπλασματικά τμήματα του mitofusin 2. Το τμήμα GTPase είναι ουσιαστικής σημασίας για τη λειτουργία του mitofusin 2 (Zuchner et al. 2004).

Η νέα μετάλλαξη του γονιδίου *MFN2* E308K βρίσκεται επίσης στο GTPase τμήμα της πρωτεΐνης χωρίς να έχει μελετηθεί ακόμα ο πιθανός μηχανισμός ο οποίος προκαλεί τη νόσο.

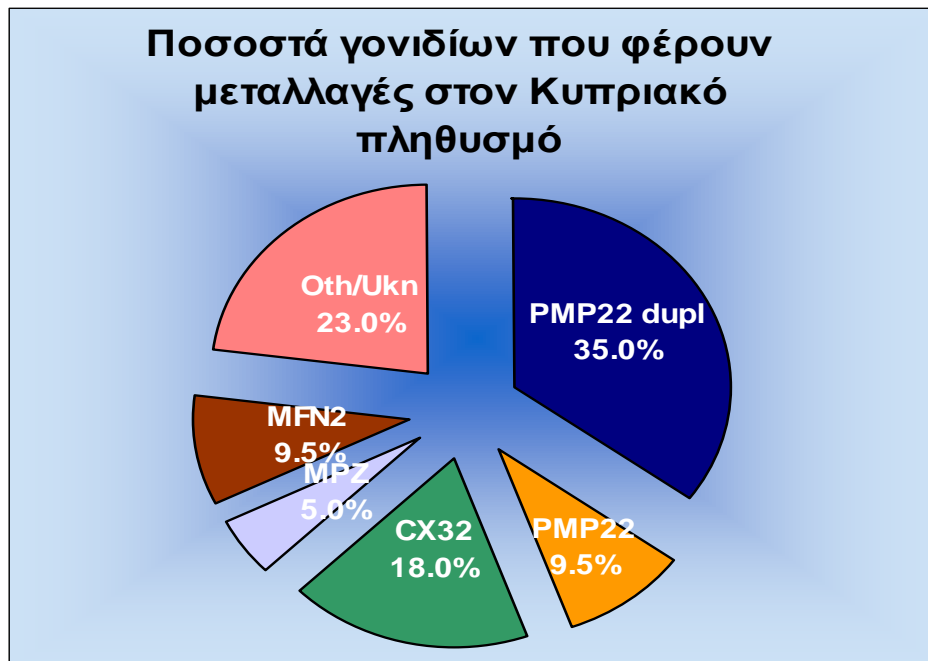
Υπάρχουν επίσης εννέα οικογένειες (22 ασθενείς) και οκτώ σποραδικοί ασθενείς από την Κύπρο που παραμένουν αδιάγνωστοι και αποτελούν το 23% του συνολικού αριθμού των ασθενών με CMT. Το ποσοστό αυτό είναι στα πλαίσια των ποσοστών που παρουσιάζονται παγκοσμίως (20-40%) για αδιάγνωστους ή ασθενείς με μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια εκτός αυτών που έχουμε αναφέρει. Ο ένας από τους σποραδικούς ασθενείς ταξινομείται στον απομυελινωτικό τύπο, δύο από τους ασθενείς ταξινομούνται στο μεικτό τύπο και οι υπόλοιποι 27 ασθενείς στον αξονικό τύπο. Επίσης αναφέρουμε ότι οι αδιάγνωστοι ασθενείς αξονικού τύπου αποτελούν το ~70% των ασθενών αξονικού τύπου, ποσοστό που είναι ίδιο με αυτό που αναφέρεται και στις βιβλιογραφικές αναφορές (Szigeti et al. 2006). Στο σποραδικό ασθενή με απομυελινωτικό τύπο έχει αποκλειστεί η ύπαρξη διπλασιασμού του γονιδίου *PMP22* καθώς και η ύπαρξη σημειακής μετάλλαξης στο γονίδιο *PMP22*. Σε τρεις από τις οικογένειες με αξονικό τύπο έχει αποκλειστεί η ύπαρξη σημειακής μετάλλαξης στο γονίδιο *MFN2*, σε δύο από αυτές στο γονίδιο *MPZ* και σε μία από αυτές στα γονίδια *GARS* και *NEFL*. Οι οικογένειες αυτές θα πρέπει να μελετηθούν περαιτέρω για την ύπαρξη σημειακής μετάλλαξης στα γονίδια *MPZ* (μία οικογένεια),

GARS (δύο οικογένειες), *NEFL* (δύο οικογένειες), *RAB7*, *HSPB27* και *HSPB22*. Στην οικογένεια με αυτοσωμικό υπολειπόμενο μεικτό τύπο αποκλείστηκε η ύπαρξη σημειακής μετάλλαξης στα γονίδια *GDAP1*, *GJB1*, *MPZ* και *PMP22*. Αυτή η οικογένεια θα εξεταστεί περαιτέρω για τα γονίδια *SH3TC2*, *PRX* και *EGR2*. Τρεις από τις υπόλοιπες πέντε οικογένειες αξονικού τύπου αποκλείστηκαν για την ύπαρξη σημειακής μετάλλαξης στα γονίδια *GDAP1* και *LMNA*. Οι υπόλοιπες δύο οικογένειες θα μελετηθούν περαιτέρω για την ύπαρξη μεταλλάξεων στα γονίδια *GDAP1* και *LMNA*. Έξι από τους επτά σποραδικούς ασθενείς αξονικού τύπου αποκλείστηκαν για ύπαρξη σημειακής μετάλλαξης στο γονίδιο *GJB1*, τέσσερις στο γονίδιο *MPZ* και τρεις στο γονίδιο *MFN2*.

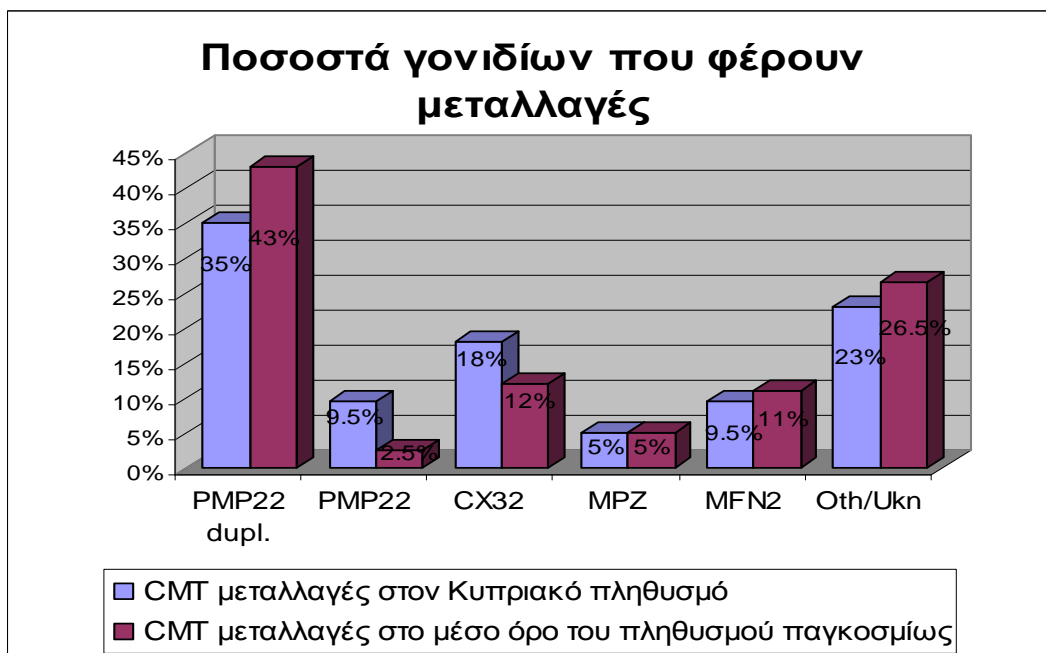
Υπάρχουν επίσης τρεις οικογένειες και τέσσερις σποραδικοί ασθενείς από την Ελλάδα στους οποίους αποκλείστηκε η ύπαρξη διπλασιασμού του γονιδίου *PMP22*.

Οι αδιάγνωστοί ασθενείς τόσο από την Κύπρο όσο και από την Ελλάδα θα πρέπει να εξεταστούν περαιτέρω αρχικά στα γνωστά γονίδια, ανάλογα με τον τύπο στον οποίο ανήκουν (αξονικό, μεικτό ή απομυελινωτικό), για τα οποία δεν έχουν ελεγχθεί. Στη συνέχεια για τους ασθενείς που θα παραμείνουν αδιάγνωστοι, θα μπορούσε να μελετηθούν για να ανευρεθεί νέο υπεύθυνο γονίδιο και η παθογόνα μετάλλαξη. Η ύπαρξη νέων γονιδίων είναι πολύ πιθανή και ιδιαίτερα στον αξονικό τύπο, εφόσον το 70% των ασθενών αξονικού τύπου παραμένουν γενικά αδιάγνωστοι (Kochanski 2005; England et al. 2009).

A.



B.



Διάγραμμα 4.8 (A) Ποσοστιαία αποτελέσματα του Κυπριακού πληθυσμού για τις μεταλλάξεις στα διάφορα γονίδια της CMT. **(B)** Συγκριτικά αποτελέσματα του Κυπριακού πληθυσμού και του μέσου όρου των πληθυσμών παγκοσμίως, για τις μεταλλάξεις στα διάφορα γονίδια της CMT.

4.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Το ποσοστό των Κύπριων ασθενών με απομυελινωτικό, αξονικό και μεικτό τύπο CMT είναι μειωμένο, παρόμοιο και αυξημένο αντίστοιχα, σε σύγκριση με το μέσο όρο του πληθυσμού παγκοσμίως.
2. Το ποσοστό των Κύπριων ασθενών με διπλασιασμό του γονιδίου *PMP22* και με σημειακές μεταλλάξεις στα γονίδια *MPZ* και *MFN2* είναι παρόμοιο με το μέσο όρο του πληθυσμού παγκοσμίως, ενώ με σημειακές μεταλλάξεις στα γονίδια *PMP22* και *GJB1/Cx32* είναι αυξημένο. Το ποσοστό των αδιάγνωστων περιπτώσεων είναι επίσης παρόμοιο.
3. Παρατηρούμε ότι πέντε από τις οκτώ μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στον κυπριακό πληθυσμό δεν έχουν παρατηρηθεί σε άλλους πληθυσμούς. Εδώ να αναφέρουμε ότι σε πρόσφατη δημοσίευση αναφέρεται η ύπαρξη της μίας από τις μεταλλάξεις αυτές σε ένα ασθενή, χωρίς να αναφέρεται η χώρα προέλευσης του (Russo et al. 2010).
4. Η σημειακή μετάλλαξη S22F στο γονίδιο *PMP22* η οποία εμφανίζεται σε πολύ μεγάλο ποσοστό στον κυπριακό πληθυσμό, εμφανίζει κλινικό φαινότυπο τόσο HNPP, CMT1 και ανάμεικτο HNPP με CMT1 χωρίς να είναι γνωστός ο μηχανισμός με τον οποίο η ίδια μετάλλαξη προκαλεί διαφορετικούς κλινικούς φαινότυπους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νόσος Charcot-Marie-Tooth (CMT) είναι η συχνότερη κληρονομική νευρολογική πάθηση με συχνότητα 17-40/100,000. Ταξινομείται στον απομυελινωτικό, αξονικό και μεικτό τύπο και κληρονομείται με επικρατητικό, υπολειπόμενο και φυλοσύνδετο τύπο. Τα κύρια χαρακτηριστικά της πάθησης είναι η αδυναμία των περιφερικών μυών των κάτω άκρων με τη χαρακτηριστική παραμόρφωση του άκρου ποδός (*pes cavus*), περιφερική αδυναμία των μυών των άνω άκρων και σε μικρότερο βαθμό αισθητικές διαταραχές. Έχουν αναγνωρισθεί μέχρι σήμερα περίπου 25 γονίδια με μεγάλο αριθμό μεταλλάξεων, τα οποία ενέχονται στην αιτιοπαθογένεια της νόσου με έκφραση, είτε στα κύτταρα του Schwann, είτε στους άξονες ή και στα δύο.

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής διεξάχθηκε επιδημιολογική μελέτη της CMT στον Κυπριακό πληθυσμό. Διαγνώστηκαν 13 οικογένειες με το διπλασιασμό του γονιδίου *PMP22*, τρεις οικογένειες με σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο *PMP22*, τέσσερις οικογένειες με σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο *GJB1* (*Cx32*), δύο με σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο *MPZ* και δύο με σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο *MFN2*. Εννέα οικογένειες και οκτώ σποραδικοί ασθενείς αποκλείστηκαν από τα γνωστά γονίδια της CMT και χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης. Επίσης μελετήθηκαν επιπρόσθετα έξι νέες οικογένειες και δύο νέοι ασθενείς υφιστάμενης οικογένειας από την Κύπρο καθώς και πέντε οικογένειες και τέσσερις σποραδικοί ασθενείς από τη Θεσσαλία. Από αυτές βρέθηκαν δύο νέες οικογένειες με τη μετάλλαξη S22F στο γονίδιο *PMP22* και δυο οικογένειες από την

Ελλάδα με διπλασιασμό του γονιδίου *PMP22*. Οι υπόλοιποι ασθενείς χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.

Συμπερασματικά, η συχνότερη μετάλλαξη, όπως και παγκοσμίως, είναι ο διπλασιασμός του γονιδίου *PMP22*, καθώς επίσης και η παρουσία πέντε νέων μεταλλάξεων στον Κυπριακό πληθυσμό.

ABSTRACT

Charcot-Marie-Tooth disease (CMT) is the most common inherited neuropathy with a prevalence of 17-40 per 100,000. CMT is classified into demyelinating, axonal and intermediate types. Inheritance can be autosomal dominant, recessive or X-linked. The typical phenotype includes high steppage gait, foot deformities, distal sensory loss, and decreased or absent tendon reflexes. A large number of mutations in 25 causative genes that are expressed either by myelinating Schwann cells, axons, or both have thus far been described.

We studied epidemiological, clinical and genetic characteristics of CMT in the Cypriot population. The prevalence of CMT on 15th January 2009 is estimated at 16/100,000. Thirty-three families and eight sporadic patients were ascertained. CMT was demyelinating in 52%, axonal in 33% and intermediate in 15% of patients. Thirteen families had the *PMP22* duplication, three families had the *PMP22* S22F mutation, four families had *GJB1/Cx32* mutations, two families had different *MPZ* mutations, one of them novel, and two families had different *MFN2* mutations. Nine families and eight sporadic patients were excluded from the common CMT genes. We further studied six new Cypriot families, five families and four sporadic patients from Thessaly. Two Cypriot families had the *PMP22* S22F mutation and 2 Greek families had the *PMP22* duplication. The remaining patients should be further analyzed based on their clinical findings.

In conclusion, the most frequent CMT mutation worldwide, the *PMP22* duplication, is also the most frequent CMT mutation in the Cypriot population. Five out of the eight other mutations are novel, not reported in other populations.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams, C. D. (1939). "The Genuine Works of Hippocrates (translated by Adams F)." Baltimore: Williams & Wilkins.
- Adlkofer, K., R. Frei, et al. (1997). "Heterozygous peripheral myelin protein 22-deficient mice are affected by a progressive demyelinating tomaculous neuropathy." J Neurosci **17**(12): 4662-71.
- Aiyesimoju, A. B., B. O. Osuntokun, et al. (1984). "Hereditary neurodegenerative disorders in Nigerian Africans." Neurology **34**(3): 361-2.
- Ammar, N., E. Nelis, et al. (2003). "Identification of novel GDAP1 mutations causing autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease." Neuromuscul Disord **13**(9): 720-8.
- Angelicheva, D., I. Turnev, et al. (1999). "Congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy (CCFDN) syndrome: a novel developmental disorder in Gypsies maps to 18qter." Eur J Hum Genet **7**(5): 560-6.
- Antonellis, A., R. E. Ellsworth, et al. (2003). "Glycyl tRNA synthetase mutations in Charcot-Marie-Tooth disease type 2D and distal spinal muscular atrophy type V." Am J Hum Genet **72**(5): 1293-9.
- Arnaud, E., J. Zenker, et al. (2009). "SH3TC2/KIAA1985 protein is required for proper myelination and the integrity of the node of Ranvier in the peripheral nervous system." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(41): 17528-33.
- Auer-Grumbach, M., P. De Jonghe, et al. (2000). "Phenotype-genotype correlations in a CMT2B family with refined 3q13-q22 locus." Neurology **55**(10): 1552-7.
- Auer-Grumbach, M., S. Strasser-Fuchs, et al. (2003). "Late onset Charcot-Marie-Tooth 2 syndrome caused by two novel mutations in the MPZ gene." Neurology **61**(10): 1435-7.
- Azzedine, H., A. Bolino, et al. (2003). "Mutations in MTMR13, a new pseudophosphatase homologue of MTMR2 and Sbf1, in two families with an autosomal recessive demyelinating form of Charcot-Marie-Tooth disease associated with early-onset glaucoma." Am J Hum Genet **72**(5): 1141-53.
- Azzedine, H., M. Ruberg, et al. (2003). "Variability of disease progression in a family with autosomal recessive CMT associated with a S194X and new R310Q mutation in the GDAP1 gene." Neuromuscul Disord **13**(4): 341-6.
- Bach, D., D. Naon, et al. (2005). "Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A gene, in human skeletal muscle: effects of type 2 diabetes, obesity, weight loss, and the regulatory role of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6." Diabetes **54**(9): 2685-93.
- Baloh, R. H., J. C. Jen, et al. (2004). "Chronic cough due to Thr124Met mutation in the peripheral myelin protein zero (MPZ gene)." Neurology **62**(10): 1905-6.
- Barhoumi, C., R. Amouri, et al. (2001). "Linkage of a new locus for autosomal recessive axonal form of Charcot-Marie-Tooth disease to chromosome 8q21.3." Neuromuscul Disord **11**(1): 27-34.
- Barisic, N., K. G. Claeys, et al. (2008). "Charcot-Marie-Tooth disease: a clinico-genetic confrontation." Ann Hum Genet **72**(Pt 3): 416-41.

- Baxter, R. V., K. Ben Othmane, et al. (2002). "Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21." Nat Genet **30**(1): 21-2.
- Ben Othmane, K. (1990). "Formes pures de la maladie de CMT en Tunisie. Etude clinique, genealogique, electrophysiologique et histologique de 82 familles." Theses faculte de Medecine et de Pharmacie de Tunis, Tunis, Tunisia.
- Ben Othmane, K., F. Hentati, et al. (1993). "Linkage of a locus (CMT4A) for autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease to chromosome 8q." Hum Mol Genet **2**(10): 1625-8.
- Ben Othmane, K., L. T. Middleton, et al. (1993). "Localization of a gene (CMT2A) for autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2 to chromosome 1p and evidence of genetic heterogeneity." Genomics **17**(2): 370-5.
- Bennett, C. L., A. J. Shirk, et al. (2004). "SIMPLE mutation in demyelinating neuropathy and distribution in sciatic nerve." Ann Neurol **55**(5): 713-20.
- Berger, P., P. Young, et al. (2002). "Molecular cell biology of Charcot-Marie-Tooth disease." Neurogenetics **4**(1): 1-15.
- Berghoff, C., M. Berghoff, et al. (2004). "Clinical and electrophysiological characteristics of autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease (ARCMT2B) that maps to chromosome 19q13.3." Neuromuscul Disord **14**(5): 301-6.
- Bergoffen, J., S. S. Scherer, et al. (1993). "Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease." Science **262**(5142): 2039-42.
- Bernard, R., A. De Sandre-Giovannoli, et al. (2006). "Molecular genetics of autosomal-recessive axonal Charcot-Marie-Tooth neuropathies." Neuromolecular Med **8**(1-2): 87-106.
- Bienfait, H. M., F. Baas, et al. (2007). "Phenotype of Charcot-Marie-Tooth disease Type 2." Neurology **68**(20): 1658-67.
- Bird, T. D. (1989). "Hereditary motor-sensory neuropathies. Charcot-Marie-Tooth syndrome." Neurol Clin **7**(1): 9-23.
- Bird, T. D., J. Ott, et al. (1982). "Evidence for linkage of Charcot-Marie-Tooth neuropathy to the Duffy locus on chromosome 1." Am J Hum Genet **34**(3): 388-94.
- Bird, T. D., J. Ott, et al. (1983). "Genetic linkage evidence for heterogeneity in Charcot-Marie-Tooth neuropathy (HMSN type I)." Ann Neurol **14**(6): 679-84.
- Birouk, N., H. Azzedine, et al. (2003). "Phenotypical features of a Moroccan family with autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease associated with the S194X mutation in the GDAP1 gene." Arch Neurol **60**(4): 598-604.
- Boerkoel, C. F., K. Inoue, et al. (1999). "Molecular mechanisms for CMT1A duplication and HNPP deletion." Ann N Y Acad Sci **883**: 22-35.
- Boerkoel, C. F., H. Takashima, et al. (2001). "EGR2 mutation R359W causes a spectrum of Dejerine-Sottas neuropathy." Neurogenetics **3**(3): 153-7.

- Boerkoel, C. F., H. Takashima, et al. (2002). "Charcot-Marie-Tooth disease and related neuropathies: mutation distribution and genotype-phenotype correlation." *Ann Neurol* **51**(2): 190-201.
- Boerkoel, C. F., H. Takashima, et al. (2003). "CMT4A: identification of a Hispanic GDAP1 founder mutation." *Ann Neurol* **53**(3): 400-5.
- Boerkoel, C. F., H. Takashima, et al. (2001). "Periaxin mutations cause recessive Dejerine-Sottas neuropathy." *Am J Hum Genet* **68**(2): 325-33.
- Bolino, A., V. Brancolini, et al. (1996). "Localization of a gene responsible for autosomal recessive demyelinating neuropathy with focally folded myelin sheaths to chromosome 11q23 by homozygosity mapping and haplotype sharing." *Hum Mol Genet* **5**(7): 1051-4.
- Bolino, A., M. Muglia, et al. (2000). "Charcot-Marie-Tooth type 4B is caused by mutations in the gene encoding myotubularin-related protein-2." *Nat Genet* **25**(1): 17-9.
- Bort, S., E. Nelis, et al. (1997). "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* **99**(6): 746-54.
- Bouhouche, A., A. Benomar, et al. (1999). "A locus for an axonal form of autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease maps to chromosome 1q21.2-q21.3." *Am J Hum Genet* **65**(3): 722-7.
- Braathen, G. J., J. C. Sand, et al. (2010). "Genetic epidemiology of Charcot-Marie-Tooth in the general population." *Eur J Neurol*.
- Charcot, J. M. M., P. (1886). "Sur une forme particuliere d' atrophie musculaire progressive souvent familial debutant par les pieds at les jambes et atteignant plus tard les mains." *Revue de Mddecine (Paris)* **6**(97).
- Cho, H. J., D. H. Sung, et al. (2007). "Mitochondrial GTPase mitofusin 2 mutations in Korean patients with Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2." *Clin Genet* **71**(3): 267-72.
- Choi, B. O., M. S. Lee, et al. (2004). "Mutational analysis of PMP22, MPZ, GJB1, EGR2 and NEFL in Korean Charcot-Marie-Tooth neuropathy patients." *Hum Mutat* **24**(2): 185-6.
- Chow, C. Y., Y. Zhang, et al. (2007). "Mutation of FIG4 causes neurodegeneration in the pale tremor mouse and patients with CMT4J." *Nature* **448**(7149): 68-72.
- Chung, K. W., S. B. Kim, et al. (2006). "Early onset severe and late-onset mild Charcot-Marie-Tooth disease with mitofusin 2 (MFN2) mutations." *Brain* **129**(Pt 8): 2103-18.
- Chung, K. W., I. N. Sunwoo, et al. (2005). "Two missense mutations of EGR2 R359W and GJB1 V136A in a Charcot-Marie-Tooth disease family." *Neurogenetics* **6**(3): 159-63.
- Claramunt, R., L. Pedrola, et al. (2005). "Genetics of Charcot-Marie-Tooth disease type 4A: mutations, inheritance, phenotypic variability, and founder effect." *J Med Genet* **42**(4): 358-65.
- Combarros, O., J. Calleja, et al. (1987). "Prevalence of hereditary motor and sensory neuropathy in Cantabria." *Acta Neurol Scand* **75**(1): 9-12.

- Cowchock, F. S., S. W. Duckett, et al. (1985). "X-linked motor-sensory neuropathy type-II with deafness and mental retardation: a new disorder." Am J Med Genet **20**(2): 307-15.
- Cuesta, A., L. Pedrola, et al. (2002). "The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease." Nat Genet **30**(1): 22-5.
- De Jonghe, P., V. Timmerman, et al. (1999). "The Thr124Met mutation in the peripheral myelin protein zero (MPZ) gene is associated with a clinically distinct Charcot-Marie-Tooth phenotype." Brain **122 (Pt 2)**: 281-90.
- De Sandre-Giovannoli, A., M. Chaouch, et al. (2002). "Homozygous defects in LMNA, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse." Am J Hum Genet **70**(3): 726-36.
- De Sandre-Giovannoli, A., V. Delague, et al. (2005). "Homozygosity mapping of autosomal recessive demyelinating Charcot-Marie-Tooth neuropathy (CMT4H) to a novel locus on chromosome 12p11.21-q13.11." J Med Genet **42**(3): 260-5.
- Dejerine, J. and J. Sottas (1893). "Sur la nevríte interstitielle, hypertrophique et progressive de l'enfance." Comptes Rendus de la Societe de Biologie Paris **45**: 63-96.
- Delague, V., C. Bareil, et al. (2000). "Mapping of a new locus for autosomal recessive demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease to 19q13.1-13.3 in a large consanguineous Lebanese family: exclusion of MAG as a candidate gene." Am J Hum Genet **67**(1): 236-43.
- Delague, V., A. Jacquier, et al. (2007). "Mutations in FGD4 encoding the Rho GDP/GTP exchange factor FRABIN cause autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth type 4H." Am J Hum Genet **81**(1): 1-16.
- Dyck, P. J. and E. H. Lambert (1968). "Lower motor and primary sensory neuron diseases with peroneal muscular atrophy. I. Neurologic, genetic, and electrophysiologic findings in hereditary polyneuropathies." Arch Neurol **18**(6): 603-18.
- Dyck, P. J. and E. H. Lambert (1968). "Lower motor and primary sensory neuron diseases with peroneal muscular atrophy. II. Neurologic, genetic, and electrophysiologic findings in various neuronal degenerations." Arch Neurol **18**(6): 619-25.
- Dyck, P. J., Lamberteh, et al. (1961). "Conduction velocity of nerves in a family with Charcot-Marie-Tooth disease: detection of latent involvement." Trans Am Neurol Assoc **86**: 207-8.
- Dyck, P. J., W. J. Litchy, et al. (1994). "Hereditary motor and sensory neuropathy with diaphragm and vocal cord paresis." Ann Neurol **35**(5): 608-15.
- Dytrych, L., D. L. Sherman, et al. (1998). "Two PDZ domain proteins encoded by the murine periaxin gene are the result of alternative intron retention and are differentially targeted in Schwann cells." J Biol Chem **273**(10): 5794-800.
- England, J. D., G. S. Gronseth, et al. (2009). "Practice Parameter: evaluation of distal symmetric polyneuropathy: role of autonomic testing, nerve biopsy, and skin biopsy (an evidence-based review). Report of the American Academy of Neurology, American Association of Neuromuscular

- and Electrodiagnostic Medicine, and American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation." Neurology **72**(2): 177-84.
- Evgrafov, O. V., I. Mersiyanova, et al. (2004). "Mutant small heat-shock protein 27 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease and distal hereditary motor neuropathy." Nat Genet **36**(6): 602-6.
- Feng, Y., B. Press, et al. (1995). "Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic." J Cell Biol **131**(6 Pt 1): 1435-52.
- Finger, S. and H. W. Buckingham (1994). "Alexander Crichton (1763-1856). Disorders of fluent speech and associationist theory." Arch Neurol **51**(5): 498-503.
- Fischbeck, K. H., N. ar-Rushdi, et al. (1986). "X-linked neuropathy: gene localization with DNA probes." Ann Neurol **20**(4): 527-32.
- Gabreels-Festen, A., S. van Beersum, et al. (1999). "Study on the gene and phenotypic characterisation of autosomal recessive demyelinating motor and sensory neuropathy (Charcot-Marie-Tooth disease) with a gene locus on chromosome 5q23-q33." J Neurol Neurosurg Psychiatry **66**(5): 569-74.
- Gal, A., J. Mucke, et al. (1985). "X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease: suggestion of linkage with a cloned DNA sequence from the proximal Xq." Hum Genet **70**(1): 38-42.
- Gombault, A. (1889). "Un cas de tabes ayant debute dans l'enfance- autopsie." Archives de Medicine Experimentale et D'Anatomie Pathologique **1**: 385-415.
- Greenfield, S., S. Brostoff, et al. (1973). "Protein composition of myelin of the peripheral nervous system." J Neurochem **20**(4): 1207-16.
- Guilbot, A., A. Williams, et al. (2001). "A mutation in periaxin is responsible for CMT4F, an autosomal recessive form of Charcot-Marie-Tooth disease." Hum Mol Genet **10**(4): 415-21.
- Hantke, J., T. Rogers, et al. (2003). "Refined mapping of the HMSNR critical gene region--construction of a high-density integrated genetic and physical map." Neuromuscul Disord **13**(9): 729-36.
- Harding, A. E. and P. K. Thomas (1980a). "Genetic aspects of hereditary motor and sensory neuropathy (types I and II)." J Med Genet **17**(5): 329-36.
- Harding, A. E. and P. K. Thomas (1980b). "Autosomal recessive forms of hereditary motor and sensory neuropathy." J Neurol Neurosurg Psychiatry **43**(8): 669-78.
- Hayasaka, K., M. Himoro, et al. (1993a). "Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1B is associated with mutations of the myelin P0 gene." Nat Genet **5**(1): 31-4.
- Hayasaka, K., M. Himoro, et al. (1993b). "De novo mutation of the myelin P0 gene in Dejerine-Sottas disease (hereditary motor and sensory neuropathy type III)." Nat Genet **5**(3): 266-8.
- Holmberg, B. H. (1993). "Charcot-Marie-Tooth disease in northern Sweden: an epidemiological and clinical study." Acta Neurol Scand **87**(5): 416-22.
- Huehne, K., V. Benes, et al. (2003). "Novel mutations in the Charcot-Marie-Tooth disease genes PMP22, MPZ, and GJB1." Hum Mutat **21**(1): 100.

- Huttner, I. G., M. L. Kennerson, et al. (2006). "Proof of genetic heterogeneity in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease." *Neurology* **67**(11): 2016-21.
- Ionasescu, V., C. Searby, et al. (1995). "New point mutations and deletions of the connexin 32 gene in X-linked Charcot-Marie-Tooth neuropathy." *Neuromuscul Disord* **5**(4): 297-9.
- Ionasescu, V., C. Searby, et al. (1996a). "Autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth axonal neuropathy mapped on chromosome 7p (CMT2D)." *Hum Mol Genet* **5**(9): 1373-5.
- Ionasescu, V. V., J. Kimura, et al. (1996b). "A Dejerine-Sottas neuropathy family with a gene mapped on chromosome 8." *Muscle Nerve* **19**(3): 319-23.
- Ionasescu, V. V., J. Trofatter, et al. (1991). "Heterogeneity in X-linked recessive Charcot-Marie-Tooth neuropathy." *Am J Hum Genet* **48**(6): 1075-83.
- Ionasescu, V. V., J. Trofatter, et al. (1992). "X-linked recessive Charcot-Marie-Tooth neuropathy: clinical and genetic study." *Muscle Nerve* **15**(3): 368-73.
- Ismailov, S. M., V. P. Fedotov, et al. (2001). "A new locus for autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2 (CMT2F) maps to chromosome 7q11-q21." *Eur J Hum Genet* **9**(8): 646-50.
- Jordanova, A., P. De Jonghe, et al. (2003a). "Mutations in the neurofilament light chain gene (NEFL) cause early onset severe Charcot-Marie-Tooth disease." *Brain* **126**(Pt 3): 590-7.
- Jordanova, A., J. Irobi, et al. (2006). "Disrupted function and axonal distribution of mutant tyrosyl-tRNA synthetase in dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth neuropathy." *Nat Genet* **38**(2): 197-202.
- Jordanova, A., F. P. Thomas, et al. (2003b). "Dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth type C maps to chromosome 1p34-p35." *Am J Hum Genet* **73**(6): 1423-30.
- Kalaydjieva, L., D. Gresham, et al. (2000). "N-myc downstream-regulated gene 1 is mutated in hereditary motor and sensory neuropathy-Lom." *Am J Hum Genet* **67**(1): 47-58.
- Kalaydjieva, L., J. Hallmayer, et al. (1996). "Gene mapping in Gypsies identifies a novel demyelinating neuropathy on chromosome 8q24." *Nat Genet* **14**(2): 214-7.
- Kennerson, M. L., D. Zhu, et al. (2001). "Dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth neuropathy maps to chromosome 19p12-p13.2." *Am J Hum Genet* **69**(4): 883-8.
- Kijima, K., C. Numakura, et al. (2005). "Mitochondrial GTPase mitofusin 2 mutation in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A." *Hum Genet* **116**(1-2): 23-7.
- Kim, H. J., S. H. Hong, et al. (2005). "A novel locus for X-linked recessive CMT with deafness and optic neuropathy maps to Xq21.32-q24." *Neurology* **64**(11): 1964-7.
- Kim, H. J., K. M. Sohn, et al. (2007). "Mutations in PRPS1, which encodes the phosphoribosyl pyrophosphate synthetase enzyme critical for nucleotide biosynthesis, cause hereditary peripheral neuropathy with hearing loss and optic neuropathy (cmtx5)." *Am J Hum Genet* **81**(3): 552-8.
- Klein, C. J., J. M. Cunningham, et al. (2003). "The gene for HMSN2C maps to 12q23-24: a region of neuromuscular disorders." *Neurology* **60**(7): 1151-6.

- Kleopa, K. A., D. M. Georgiou, et al. (2004). "A novel PMP22 mutation Ser22Phe in a family with hereditary neuropathy with liability to pressure palsies and CMT1A phenotypes." Neurogenetics **5**(3): 171-5.
- Kleopa, K. A. and S. S. Scherer (2006). "Molecular genetics of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease." Neuromolecular Med **8**(1-2): 107-22.
- Kleopa, K. A. and S. S. Scherer (2006a). "Molecular genetics of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease." Neuromolecular Med **8**(1-2): 107-22.
- Kleopa, K. A., E. Zamba-Papanicolaou, et al. (2006b). "Phenotypic and cellular expression of two novel connexin32 mutations causing CMT1X." Neurology **66**(3): 396-402.
- Kochanski, A. (2005). "Molecular genetics studies in Polish Charcot-Marie-Tooth families." Folia Neuropathol **43**(2): 65-73.
- Kuhlenbaumer, G. (2005). Hereditary Peripheral Neuropathies. Munster, Steinkopff-verlag Darmstadt.
- Kuhlenbaumer, G., P. Young, et al. (2002). "Clinical features and molecular genetics of hereditary peripheral neuropathies." J Neurol **249**(12): 1629-50.
- Kurihara, S., Y. Adachi, et al. (2002). "An epidemiological genetic study of Charcot-Marie-Tooth disease in Western Japan." Neuroepidemiology **21**(5): 246-50.
- Kurtzke, J. F., L. T. Kurland, et al. (1971). "The numerical impact of the major neurologic and sense organ disorders." Trans Am Neurol Assoc **96**: 265-7.
- Kwon, J. M., J. L. Elliott, et al. (1995). "Assignment of a second Charcot-Marie-Tooth type II locus to chromosome 3q." Am J Hum Genet **57**(4): 853-8.
- Lammerding, J., P. C. Schulze, et al. (2004). "Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction." J Clin Invest **113**(3): 370-8.
- Landouere, G., A. A. Zdebik, et al. (2010). "Mutations in TRPV4 cause Charcot-Marie-Tooth disease type 2C." Nat Genet **42**(2): 170-4.
- Laura, M., M. Milani, et al. (2007). "Rapid progression of late onset axonal Charcot-Marie-Tooth disease associated with a novel MPZ mutation in the extracellular domain." J Neurol Neurosurg Psychiatry **78**(11): 1263-6.
- Lawson, V. H., B. V. Graham, et al. (2005). "Clinical and electrophysiologic features of CMT2A with mutations in the mitofusin 2 gene." Neurology **65**(2): 197-204.
- Leal, A., K. Huehne, et al. (2009). "Identification of the variant Ala335Val of MED25 as responsible for CMT2B2: molecular data, functional studies of the SH3 recognition motif and correlation between wild-type MED25 and PMP22 RNA levels in CMT1A animal models." Neurogenetics **10**(4): 275-87.
- Leal, A., B. Morera, et al. (2001). "A second locus for an axonal form of autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease maps to chromosome 19q13.3." Am J Hum Genet **68**(1): 269-74.

- LeGuern, E., A. Guilbot, et al. (1996). "Homozygosity mapping of an autosomal recessive form of demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease to chromosome 5q23-q33." Hum Mol Genet **5**(10): 1685-8.
- Lupski, J. R., R. M. de Oca-Luna, et al. (1991). "DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A." Cell **66**(2): 219-32.
- MacMillan, J. C. and P. S. Harper (1994). "The Charcot-Marie-Tooth syndrome: clinical aspects from a population study in South Wales, UK." Clin Genet **45**(3): 128-34.
- Marrosu, M. G., S. Vaccargiu, et al. (1998). "Charcot-Marie-Tooth disease type 2 associated with mutation of the myelin protein zero gene." Neurology **50**(5): 1397-401.
- Martini, R. and M. Schachner (1997). "Molecular bases of myelin formation as revealed by investigations on mice deficient in glial cell surface molecules." Glia **19**(4): 298-310.
- Mastaglia, F. L., K. J. Nowak, et al. (1999). "Novel mutation in the myelin protein zero gene in a family with intermediate hereditary motor and sensory neuropathy." J Neurol Neurosurg Psychiatry **67**(2): 174-9.
- Meretoja, P., K. Silander, et al. (1997). "Epidemiology of hereditary neuropathy with liability to pressure palsies (HNPP) in south western Finland." Neuromuscul Disord **7**(8): 529-32.
- Mersiyanova, I. V., S. M. Ismailov, et al. (2000). "Screening for mutations in the peripheral myelin genes PMP22, MPZ and Cx32 (GJB1) in Russian Charcot-Marie-Tooth neuropathy patients." Hum Mutat **15**(4): 340-7.
- Mersiyanova, I. V., A. V. Perepelov, et al. (2000). "A new variant of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 is probably the result of a mutation in the neurofilament-light gene." Am J Hum Genet **67**(1): 37-46.
- Miller, S. A., D. D. Dykes, et al. (1988). "A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells." Nucleic Acids Res **16**(3): 1215.
- Mostacciolo, M. L., G. Micaglio, et al. (1991). "Genetic epidemiology of hereditary motor sensory neuropathies (type I)." Am J Med Genet **39**(4): 479-81.
- Mostacciolo, M. L., E. Righetti, et al. (2001). "Charcot-Marie-Tooth disease type I and related demyelinating neuropathies: Mutation analysis in a large cohort of Italian families." Hum Mutat **18**(1): 32-41.
- Mostacciolo, M. L., F. Schiavon, et al. (1995). "Frequency of duplication at 17p11.2 in families of northeast Italy with Charcot-Marie-Tooth disease type 1." Neuroepidemiology **14**(2): 49-53.
- Nagarajan, R., J. Svaren, et al. (2001). "EGR2 mutations in inherited neuropathies dominant-negatively inhibit myelin gene expression." Neuron **30**(2): 355-68.
- Nelis, E., J. Berciano, et al. (2004). "Autosomal dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease type 2 (CMT2G) maps to chromosome 12q12-q13.3." J Med Genet **41**(3): 193-7.
- Nelis, E., N. Haites, et al. (1999). "Mutations in the peripheral myelin genes and associated genes in inherited peripheral neuropathies." Hum Mutat **13**(1): 11-28.

- Nelis, E., P. D. Jonghe, et al. (2005). Charcot-Marie-Tooth disease type 1 (CMT1) and hereditary neuropathy with liability to pressure palsy (HNPP). Hereditary Peripheral Neuropathies. G. Kuhlenbaumer, F. Stogbauer, B. Ringelstein and H. F. Young. Munster, Steinkopff Darmstadt: 92-120.
- Nelis, E., C. Van Broeckhoven, et al. (1996). "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 **4**(1): 25-33.
- Nicholson, G. A., L. Yeung, et al. (1998). "Efficient neurophysiologic selection of X-linked Charcot-Marie-Tooth families: ten novel mutations." Neurology **51**(5): 1412-6.
- Nicolaou, P., E. Zamba-Papanicolaou, et al. (2010). "Charcot-Marie-Tooth Disease in Cyprus: Epidemiological, Clinical and Genetic Characteristics." Neuroepidemiology **35**(3): 171-177.
- Numakura, C., C. Lin, et al. (2002). "Molecular analysis in Japanese patients with Charcot-Marie-Tooth disease: DGGE analysis for PMP22, MPZ, and Cx32/GJB1 mutations." Hum Mutat **20**(5): 392-8.
- Othmane, K. B., E. Johnson, et al. (1999). "Identification of a new locus for autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease with focally folded myelin on chromosome 11p15." Genomics **62**(3): 344-9.
- Pareyson, D., F. Taroni, et al. (2000). "Cranial nerve involvement in CMT disease type 1 due to early growth response 2 gene mutation." Neurology **54**(8): 1696-8.
- Pauli, R. M. (1984). "Sensorineural deafness and peripheral neuropathy." Clin Genet **26**(4): 383-4.
- Pedrola, L., A. Espert, et al. (2005). "GDAP1, the protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4A, is expressed in neurons and is associated with mitochondria." Hum Mol Genet **14**(8): 1087-94.
- Priest, J. M., K. H. Fischbeck, et al. (1995). "A locus for axonal motor-sensory neuropathy with deafness and mental retardation maps to Xq24-q26." Genomics **29**(2): 409-12.
- Radhakrishnan, K., J. C. Maloo, et al. (1987). "Central nervous system infections in Benghazi, Libya: experience from a community-based adult medical neurology set-up." J Trop Med Hyg **90**(3): 123-6.
- Raeymaekers, P., V. Timmerman, et al. (1991). "Duplication in chromosome 17p11.2 in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a (CMT 1a). The HMSN Collaborative Research Group." Neuromuscul Disord **1**(2): 93-7.
- Reilly, M. M. (2007). "Sorting out the inherited neuropathies." Pract Neurol **7**(2): 93-105.
- Reilly, M. M. (2009). "Classification and diagnosis of the inherited neuropathies." Ann Indian Acad Neurol **12**(2): 80-8.
- Roa, B. B., P. J. Dyck, et al. (1993). "Dejerine-Sottas syndrome associated with point mutation in the peripheral myelin protein 22 (PMP22) gene." Nat Genet **5**(3): 269-73.
- Rogers, T., D. Chandler, et al. (2000). "A novel locus for autosomal recessive peripheral neuropathy in the EGR2 region on 10q23." Am J Hum Genet **67**(3): 664-71.

- Rosenberg, R. N. and A. Chutorian (1967). "Familial opticoacoustic nerve degeneration and polyneuropathy." Neurology **17**(9): 827-32.
- Rozear, M. P., M. A. Pericak-Vance, et al. (1987). "Hereditary motor and sensory neuropathy, X-linked: a half century follow-up." Neurology **37**(9): 1460-5.
- Russo, M., M. Laura, et al. (2010). "Variable phenotypes are associated with PMP22 missense mutations." Neuromuscul Disord.
- Saifi, G. M., K. Szigeti, et al. (2005). "SIMPLE mutations in Charcot-Marie-Tooth disease and the potential role of its protein product in protein degradation." Hum Mutat **25**(4): 372-83.
- Senderek, J., C. Bergmann, et al. (2003). "Mutations in a gene encoding a novel SH3/TPR domain protein cause autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth type 4C neuropathy." Am J Hum Genet **73**(5): 1106-19.
- Senderek, J., C. Bergmann, et al. (2003). "Mutation of the SBF2 gene, encoding a novel member of the myotubularin family, in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 4B2/11p15." Hum Mol Genet **12**(3): 349-56.
- Sevilla, T., A. Cuesta, et al. (2003). "Clinical, electrophysiological and morphological findings of Charcot-Marie-Tooth neuropathy with vocal cord palsy and mutations in the GDAP1 gene." Brain **126**(Pt 9): 2023-33.
- Shy, M. E., A. Jani, et al. (2004). "Phenotypic clustering in MPZ mutations." Brain **127**(Pt 2): 371-84.
- Silander, K., P. Meretoja, et al. (1998). "Spectrum of mutations in Finnish patients with Charcot-Marie-Tooth disease and related neuropathies." Hum Mutat **12**(1): 59-68.
- Skre, H. (1974). "Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease." Clin Genet **6**(2): 98-118.
- Song, S., Y. Zhang, et al. (2006). "Mutation frequency for Charcot-Marie-Tooth disease type 1 in the Chinese population is similar to that in the global ethnic patients." Genet Med **8**(8): 532-5.
- Stankiewicz, P., C. J. Shaw, et al. (2004). "Serial segmental duplications during primate evolution result in complex human genome architecture." Genome Res **14**(11): 2209-20.
- Steinberg, D. A. (2002). "Scientific neurology and the history of the clinical examination of selected motor cranial nerves." Semin Neurol **22**(4): 349-56.
- Stendel, C., A. Roos, et al. (2007). "Peripheral nerve demyelination caused by a mutant Rho GTPase guanine nucleotide exchange factor, frabin/FGD4." Am J Hum Genet **81**(1): 158-64.
- Street, V. A., C. L. Bennett, et al. (2003). "New gene for CMT." J Peripher Nerv Syst **8**(4): 206.
- Street, V. A., C. L. Bennett, et al. (2003). "Mutation of a putative protein degradation gene LITAF/SIMPLE in Charcot-Marie-Tooth disease 1C." Neurology **60**(1): 22-6.
- Street, V. A., J. D. Goldy, et al. (2002). "Mapping of Charcot-Marie-Tooth disease type 1C to chromosome 16p identifies a novel locus for demyelinating neuropathies." Am J Hum Genet **70**(1): 244-50.

- Szigeti, K. and J. R. Lupski (2009). "Charcot-Marie-Tooth disease." Eur J Hum Genet **17**(6): 703-10.
- Szigeti, K., E. Nelis, et al. (2006). "Molecular diagnostics of Charcot-Marie-Tooth disease and related peripheral neuropathies." Neuromolecular Med **8**(1-2): 243-54.
- Takashima, H., C. F. Boerkoel, et al. (2002). "Periaxin mutations cause a broad spectrum of demyelinating neuropathies." Ann Neurol **51**(6): 709-15.
- Takashima, H., M. Nakagawa, et al. (1997). "A new type of hereditary motor and sensory neuropathy linked to chromosome 3." Ann Neurol **41**(6): 771-80.
- Tang, B. S., W. Luo, et al. (2004). "A new locus for autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2 (CMT2L) maps to chromosome 12q24." Hum Genet **114**(6): 527-33.
- Tang, B. S., G. H. Zhao, et al. (2005). "Small heat-shock protein 22 mutated in autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2L." Hum Genet **116**(3): 222-4.
- Thomas, P. K., L. Kalaydjieva, et al. (2001). "Hereditary motor and sensory neuropathy-russe: new autosomal recessive neuropathy in Balkan Gypsies." Ann Neurol **50**(4): 452-7.
- Timmerman, V., P. De Jonghe, et al. (1999). "Novel missense mutation in the early growth response 2 gene associated with Dejerine-Sottas syndrome phenotype." Neurology **52**(9): 1827-32.
- Tooth, H. (1886). "The Peroneal type of progressive Muscular Atrophy." H. K. Lewis & Co.Ltd, London.
- Topilko, P., S. Schneider-Maunoury, et al. (1994). "Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system." Nature **371**(6500): 796-9.
- Valentijn, L. J., P. A. Bolhuis, et al. (1992). "The peripheral myelin gene PMP-22/GAS-3 is duplicated in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A." Nat Genet **1**(3): 166-70.
- Vance, J. M., G. A. Nicholson, et al. (1989). "Linkage of Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a to chromosome 17." Exp Neurol **104**(2): 186-9.
- Varon, R., R. Gooding, et al. (2003). "Partial deficiency of the C-terminal-domain phosphatase of RNA polymerase II is associated with congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy syndrome." Nat Genet **35**(2): 185-9.
- Verhoeven, K., K. G. Claeys, et al. (2006). "MFN2 mutation distribution and genotype/phenotype correlation in Charcot-Marie-Tooth type 2." Brain **129**(Pt 8): 2093-102.
- Verhoeven, K., P. De Jonghe, et al. (2003). "Mutations in the small GTP-ase late endosomal protein RAB7 cause Charcot-Marie-Tooth type 2B neuropathy." Am J Hum Genet **72**(3): 722-7.
- Verhoeven, K., P. De Jonghe, et al. (2003). "Slowed conduction and thin myelination of peripheral nerves associated with mutant rho Guanine-nucleotide exchange factor 10." Am J Hum Genet **73**(4): 926-32.
- Verhoeven, K., M. Villanova, et al. (2001). "Localization of the gene for the intermediate form of Charcot-Marie-Tooth to chromosome 10q24.1-q25.1." Am J Hum Genet **69**(4): 889-94.

- Warner, L. E., P. Mancias, et al. (1998). "Mutations in the early growth response 2 (EGR2) gene are associated with hereditary myelinopathies." Nat Genet **18**(4): 382-4.
- Werdelin, L. and N. Keiding (1990). "Hereditary ataxias: epidemiological aspects." Neuroepidemiology **9**(6): 321-31.
- Wise, C. A., C. A. Garcia, et al. (1993). "Molecular analyses of unrelated Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease patients suggest a high frequency of the CMT1A duplication." Am J Hum Genet **53**(4): 853-63.
- Yoshihara, T., M. Yamamoto, et al. (2000). "Mutations in the peripheral myelin protein zero and connexin32 genes detected by non-isotopic RNase cleavage assay and their phenotypes in Japanese patients with Charcot-Marie-Tooth disease." Hum Mutat **16**(2): 177-8.
- Zhang, F., P. Seeman, et al. (2010). "Mechanisms for nonrecurrent genomic rearrangements associated with CMT1A or HNPP: rare CNVs as a cause for missing heritability." Am J Hum Genet **86**(6): 892-903.
- Zhao, C., J. Takita, et al. (2001). "Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta." Cell **105**(5): 587-97.
- Zhu, D., M. L. Kennerson, et al. (2005). "Charcot-Marie-Tooth with pyramidal signs is genetically heterogeneous: families with and without MFN2 mutations." Neurology **65**(3): 496-7.
- Zuchner, S., P. De Jonghe, et al. (2006). "Axonal neuropathy with optic atrophy is caused by mutations in mitofusin 2." Ann Neurol **59**(2): 276-81.
- Zuchner, S., I. V. Mersiyanova, et al. (2004). "Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A." Nat Genet **36**(5): 449-51.
- Zuchner, S., M. Noureddine, et al. (2005). "Mutations in the pleckstrin homology domain of dynamin 2 cause dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth disease." Nat Genet **37**(3): 289-94.
- Zuchner, S. and J. M. Vance (2006). "Molecular genetics of autosomal-dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease." Neuromolecular Med **8**(1-2): 63-74.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των γονιδίων

Γονίδιο	Εκκινητές	Μέγεθος PCR	T _{PCR}
CMT1A	CMT1A-F: 5'-AGGTTGTTTACTCCTTCTTC-3'	3,6 Kb	54°C
	CMT1A-R: 5'-AGATGGAATAGTAGAGCTCAC-3'		
PMP22	PMP22-2F: 5'-CTCCTCGCAGGCAGAAAC TC-3'	202 bp	58°C
	PMP22-2R: 5'-CTGAACCAGCAGGAGCACGGG-3'		
	PMP22-3F: 5'-CCCCTTTTCCTTCACTCCTC-3'	177 bp	55°C
	PMP22-3R: 5'-GTCTTCCAATAAGCGTTTCCAG-3'		
	PMP22-4F: 5'-CTTCTGCTTCTGCTGCCTGT-3'	357 bp	55°C
	PMP22-4R: 5'-ATTCTGAGGCCACATCCTT-3'		
	PMP22-5F: 5'-CTAGGTGGCCAAGATTGGAA-3'	249 bp	58°C
	PMP22-5R: 5'-GGGATTTTGGGCTAGCTCTT-3'		
MPZ	MPZ-1F: 5'-CCCGTTCAGTTCCTGGT-3'	173 bp	58°C
	MPZ-1R: 5'-GTCCCAAGACTCCCAGAGTA -3'		
	MPZ-2F: 5'-CTTCCTCTGTATCCCTTACTG-3'	309 bp	58°C
	MPZ-2R: 5'-CTCCTTAGCCCAAGTTATCT-3'		
	MPZ-3F: 5'-TCATTAGGGTCTCTCACATGC-3'	368 bp	58°C
	MPZ-3R: 5'-GCCTGAATAAAGGTCCTTAGGC-3'		
	MPZ-4F: 5'-GGAGTCCTACATCCTCAATGCAG-3'	310 bp	58°C
	MPZ-4R: 5'-CCCACCCACTGGAGTAGTCTCCG-3'		
	MPZ-5F: 5'-GAAGAGGAAGCTGTGTCCGC-3'	247 bp	58°C

	MPZ-5R: 5'- GAGATCAGTCACCGAGCGACT-3'		
	MPZ-6F: 5'- AGTCGCTCGGTGACTGAT-3'	223 bp	58°C
	MPZ-6R: 5'- TAGCTCCATCTCGATGACCA-3'		
GJB1	GJB1-1F: 5'-TAAAGGGCGTTGTTTCAGAGC-3'	250 bp	60°C
	GJB1-1R: 5'-CCCTGTCCCCTAGCTCCTTA-3'		
	GJB1-2AF: 5'-ACTTTCCACCCCAGCTTCT-3'	453 bp	60°C
	GJB1-2AR: 5'-CCCTGAGATGTGGACCTTGT-3'		
	GJB1-2BF: 5'-TCCCTGCAGCTCATCCTAGT-3'	415 bp	60°C
	GJB1-2BR: 5'-CCCGGATGATGAGGTACAC-3'		
	GJB1-2CF: 5'-CTGGTCAAGTGCAGCTCTA-3'	489 bp	60°C
	GJB1-2CR: 5'-TAGCCAGGGAAGGAAGGTTT-3'		
MFN2	MFN2-1F: 5'-GCAGCAGAGGCGTAAGGA-3'	209 bp	56°C
	MFN2-1R: 5'-GCTTGCTCGCCCTCTCAC-3'		
	MFN2-2F: 5'-CGGATCCATCTCCCTTTTCT-3'	249 bp	58°C
	MFN2-2R: 5'-AGAGGTCCAGGAGAGCACAC-3'		
	MFN2-3F: 5'-GGTTCGCTCACGTTAGCTTC-3'	274 bp	58°C
	MFN2-3R: 5'-CGCAAATCCCACTAGCTAAA-3'		
	MFN2-4F: 5'-TGGGACTGTGGAACCTCCTCT-3'	250 bp	58°C
	MFN2-4R: 5'-GTGCCTCCCTCCCTCCTA-3'		
	MFN2-5F: 5'-TACTGGTGGCTTTGCTGACA-3'	239 bp	58°C
	MFN2-5R: 5'-AGCAGGCACAGGGCTGAC-3'		
	MFN2-6F: 5'-GGTTCCTCCTCAGCCTCTTT-3'	248 bp	58°C
	MFN2-6R: 5'-AGGGACCCTGGCCTAGATTA-3'		
	MFN2-7F: 5'-GTCCCAGGTCTGTTCTCAGC-3'	214 bp	58°C

MFN2-7R: 5'-GGAGAAGGCAGAGGAGGAGT-3'		
MFN2-8F: 5'-ACTCCTCCTCTGCCTTCTCC-3'	239 bp	58°C
MFN2-8R: 5'-CAAACGCAAACAGAAGCA-3'		
MFN2-9F: 5'-CATGCCCAGCCTTATGAC-3'	295 bp	58°C
MFN2-9R: 5'-TCAAACATCAGAGAAAAGGAGGA-3'		
MFN2-10F: 5'-TTTTCTCTGCTGCCAAGTT-3'	239 bp	58°C
MFN2-10R: 5'-TACAACCAAGGGCCAGACTC-3'		
MFN2-11F: 5'-GAGTCTGGCCCTTGGTTGTA-3'	235 bp	58°C
MFN2-11R: 5'-CTTGTCTCGGCAGCTCTCTC-3'		
MFN2-12F: 5'-CCCTCTTGCTCCTCTGCTTA-3'	228 bp	58°C
MFN2-12R: 5'-TCCAAATCTTCCAGAATGC-3'		
MFN2-13F: 5'-TGCTGCAGGAGTGAACCTTG-3'	234 bp	58°C
MFN2-13R: 5'-CAGACCAACAGGGGTGAAT-3'		
MFN2-14F: 5'-GGGAA TTTTGATGGACATGC-3'	236 bp	58°C
MFN2-14R: 5'-GCCTCCGCATCTGATCTTT-3'		
MFN2-15F: 5'-ATCCCTGGCAGTAGCTGGTA-3'	382 bp	58°C
MFN2-15R: 5'-TCTGGAGGCAGGGTACAGAC-3'		
MFN2-16F: 5'-CGTGAATGAGAGACTCAATACGTC-3'	235 bp	56°C
MFN2-16R: 5'-AGCAGGAACCTAGCCCTCAG-3'		
MFN2-17F: 5'-ACAGAGAGGCTGCACTCCA-3'	249 bp	58°C
MFN2-17R: 5'-GCTGACCCTGCCTAAAGGA-3'		
MFN2-18F: 5'-GCATCTTGCTCCACACACC-3'	227 bp	57°C
MFN2-18R: 5'-GCACCCTGGAGCCCTAAC-3'		
MFN2-19F: 5'-CCTGGCGGGTAGTCCTAATA-3'	215 bp	57°C

	MFN2-19R: 5'-GAGCCCACATGGCACTTAG-3'		
GDAP1	GDAP1-1F: 5'-AGAAGTCCAGGGCGGACA-3'	234 bp	56°C
	GDAP1-1R: 5'-TCAGAAGGAGCTGTCCCAGT-3'		
	GDAP1-2F: 5'-AAAGGCTGCTTAGCGGTGT-3'	346 bp	56°C
	GDAP1-2R: 5'-AGAAAAAGAGAAAGGGAACACA-3'		
	GDAP1-3F: 5'-TGTTTTTGTTTTGCTTTTGAGTG-3'	332 bp	56°C
	GDAP1-3R: 5'-AGTGACCATGAGACATGCTAGG-3'		
	GDAP1-4F: 5'-TCATTGAGTTTCTCTGCTTCTCC-3	299 bp	58°C
	GDAP1-4R: 5'-CATGTGTACTGGTGAAGTCA A-3'		
	GDAP1-5F: 5'-TCTGTAAGAGTTTGTATGTGCTTTACC-3'	289 bp	58°C
	GDAP1-5R: 5'-CAGAACGTTTTTGGTGAGACC-3'		
	GDAP1-6F: 5'-TCTGAGTGTGGCTGTCAAGAA-3'	595 bp	58°C
	GDAP1-6R: 5'-GGGCAATCACAGGGTCTAGC-3'		
NEFL	NEFL-1F1: 5'-GCACACAGCCATCCATCCTCCC-3'	276 bp	68°C
	NEFL-1F1: 5'-GATCCAGAGCTGGAGGAGTAGC-3'		
	NEFL-1F2: 5'-CTTCCTCGCTGTCCGTGCGCC-3'	279 bp	65°C
	NEFL-1R2: 5'-GCTCGTACAGCGCCCGGAAGC-3'		
	NEFL-1F3: 5'-CAGAAGCACTCCGAGCCATCC-3'	196 bp	63°C
	NEFL-1R3: 5'-CCTCGGCGTCCTCGCGGCTC-3'		
	NEFL-1F4: 5'-GGAGGAGACCCTGCGCAACC-3'	241 bp	60°C
	NEFL-1R4: 5'-CATCTCCACGGAGATCTGCGC-3'		
	NEFL-1F5: 5'-CCGAACTGCAGGCGCAGATCC-3'	241 bp	60°C
	NEFL-1R5: 5'-CTCCGACACCTCGTCCTTGGC-3'		
	NEFL-1F6: 5'-GAGAGCGCCGCAAGAACACC-3'	205 bp	63°C

	NEFL-1R6: 5'-CCCTGTGTTTCTGGCCGTGCC-3'		
	NEFL-2F: 5'-TAATAGAAGGGATTTATGCTCGG-3'	225 bp	60°C
	NEFL-2R: 5'-TCCTAAGGTTTAATGGCTGCTG-3'		
	NEFL-3F1: 5'-CCTCACCTTGACCTGCATCC-3'	215 bp	65°C
	NEFL-3R1: 5'-TTCGGTCTGCTCCTCTTGGAC-3'		
	NEFL-3F2: 5'-CAGCTCCTATCTGATGTCCACC-3'	248 bp	62°C
	NEFL-3R2: 5'-CACCCAGTTTACACTTGAAGTTGC-3'		
	NEFL-4F: 5'-ACTGGACTTACCCTGGATTTGC-3'	241 bp	62°C
	NEFL-4R: 5'-CCTGATTCGGGAGAATTATTCC-3'		
LMNA	LMNA-1F: 5'-CCGAGCAGTCTCTGTCCTTC-3'	532 bp	55°C
	LMNA-1R: 5'-CCCTCTCACTCCCTTCCTG-3'		
	LMNA-2F: 5'-GCACTGTCTAGGCACACAGACT-3'	289 bp	57°C
	LMNA-2R: 5'-GGGAGGGCCTAGGTAGAAGA-3'		
	LMNA-3F: 5'-TGTGACCCCTTTTCCTCATC-3'	281 bp	57°C
	LMNA-3R: 5'-CACTAGGGCAAGGGACTCAG-3'		
	LMNA-4F: 5'-AGCACTCAGCTCCCAGGTTA-3'	497 bp	55°C
	LMNA-4R: 5'-CTGATCCCCAGAAGGCATAG-3'		
	LMNA-5F: 5'-TAGCAGTGATGCCCAACTCA - 3'	257bp	57°C
	LMNA-5R: 5'-CATCCGGCCAGACTCTA-3'		
	LMNA 6F: 5'-TCCTGGAGAGAGTAGCCAGGT-3'	400 bp	57°C
	LMNA 6R: 5'-CCAAGTGGGGGTCTAGTCAA-3'		
	LMNA 7F: 5 -AGGTGCTGGCAGTGTCTCT-3'	355bp	57°C
	LMNA 7R: 5'-ATGCCATCCTTCTGTCTTGC-3'		
	LMNA8/9F: 5'-GCAAGATACACCCAAGAGCC-3'	695 bp	57°C

	LMNA8/9R: 5'-GCTCCGA TGTTGGCCATCAG-3'		
	LMNA10F: 5'-GTAGACATGCTGTACAACCC-3'	688 bp	57°C
	LMNA10R: 5'-GGCCAGCGAGTAAAGTTCCA -3'		
	LMNA11F: 5'-TTGGGCCTGAGTGGTCAGTC-3'	373 bp	55°C
	LMNA11R: 5'-GACCCGCCTGCAGGATTTGG-3'		
	LMNAex12F: 5' -GGGAGATGCTACCTCCCTTC-3'	236 bp	57°C
	LMNAex12R: 5' -GGGTTATTTTTCTTTGGCTTCA- 3'		