

**Utvidelse av diagnostisk tilbud innen de neuromuskulære sykdommene
Charcot-Marie-Tooth (CMT) og Welander distale myopati (WDM).**

&

**Utredning av funn av usikker klinisk betydning
hos en pasient med mistenkt CMT4C.**

MED-3950 5.-årsoppgaven
Profesjonsstudiet i medisin ved Universitetet i Tromsø

**Hilde Yttervik
Medisinerstuent Kull -09**

**Toril Fagerheim
Veileder**

**Valeria Marton
Biveileder**

Medisinsk genetisk avdeling UNN
Mars 2014 - 31. Juni 2014

Innholdsfortegnelse:

Innledning.....	s. 3
Resymé.....	s. 3
Neuromuskulære sykdommer.....	s. 3
Differensialdiagnoser.....	s. 4
Charcot-Marie-Tooth disease (CMT).....	s. 5
Material og metode.....	s. 6
DNA ekstraksjon.....	s. 6
RNA isolering.....	s. 6
«First strand» cDNA syntese.....	s. 6
Måling av DNA-/ cDNA-/ RNA konsentrasjoner.....	s. 7
Kvalitetskontroll av renheten til cDNAet.....	s. 7
PCR reaksjon fra DNA og cDNA.....	s. 8
Gelelektroforese og bilde.....	s. 9
ExoStarbehandling av PCR produktet.....	s. 10
Sekvenseringsreaksjon.....	s. 10
CMT- Dominant Intermediær F (CMT-DIF).....	s. 11
Introduksjon.....	s. 11
Pasientopplysninger.....	s. 11
Material og metode, <i>GNB4</i>	s. 11
Resultater.....	s. 12
Diskusjon/ konklusjon.....	s. 15
Charcot-Marie-Tooth 4C (CMT4C).....	s. 16
Introduksjon.....	s. 16
Pasientopplysninger.....	s. 17
Material og metode, <i>SH3TC2</i>	s. 17
Resultater	s. 17
Diskusjon/ konklusjon.....	s. 21
Welander Distale Myopati.....	s. 22
Introduksjon.....	s. 22
Pasientopplysninger.....	s. 23
Material og metode, <i>TIA1</i>	s. 24
Resultater	s. 24
Diskusjon/ konklusjon.....	s. 26
Referanseliste.....	s. 27

Innledning

Resymé:

UNN driver Neuromuskulært Kompetansesenter som har et nasjonalt ansvar for genetisk utredning av pasienter med ulike arvelige neuromuskulære sykdommer. Den største pasientgruppen har en av formene for den arvelige neuropatien Charcot-Marie-Tooth (CMT) sykdom. For å kunne gi pasienten en nøyaktig diagnose må mutasjonen som gir den aktuelle fenotypen bestemmes. Ca. 70% av pasientene får en spesifikk CMT diagnose etter undersøkelser som omfattes av laboratoriets diagnostiske tilbud idag, men hos 30 % av pasientene finner man ikke noen av de kjente sykdomsassosierte sekvensvariantene. Det er derfor nødvendig å utvide det diagnostiske tilbudet ved å innlemme nye gener i analysene etterhvert som sykdomsassosierte mutasjoner blir beskrevet.

I dette arbeidet med å etablere ny diagnostikk ved laboratoriet i Tromsø, omtales tre ulike former for distale neuromuskulære sykdommer; én type autosomal dominant CMT (CMT-DIF), én type autosomal recessiv CMT (CMT4C) samt autosomal dominant Welander Distale Myopati (WDM). Tre respektive sykdomsassosierte gener screenes for å se etter normalvariasjon i sekvensene og/ eller sykdomsassosierte mutasjoner, for å se om genene skal bli en del av laboratoriets tilbud av analyser som tilbys pasienter med neuromuskulære sykdommer.

27 pasienter med kliniske funn tilsvarende DI-CMT, screenes for mutasjon i *GNB4* genets kodende eksoner (ekson2 til og med -10), for å kartlegge genetiske variasjoner i genet samt sjekke to nylig beskrevne DI-CMT-assosierte mutasjoner i *GNB4*, c.158G>A p.(Gly53Asp) og c.265A>G p.(Lys89Glu). Det blir funnet flere sekvensvarianter som ikke endrer aminosyrerekkefølgen i ferdig protein, men ingen av de beskrevne sykdomsassosierte mutasjonene blir funnet hos disse pasientene. Genet innlemmes i laboratoriets diagnostiske tilbud til pasientene.

Ytterligere 8 pasienter med kliniske funn tilsvarende WDM, screenes for mutasjon i *TIA1* ekson13, c.1150G>A, p.(Arg384Lys), en kjent sekvensvariant som gir WDM. 3 av pasientene er heterozygote for denne sekvensvarianten, og de kan nå få diagnosen WDM. Genet innlemmes i laboratoriets diagnostiske tilbud til pasientene.

Én pasient med kliniske funn tilsvarende CMT4C, utredes videre etter funn av kjent CMT4C assosiert mutasjon i ett allel og mutasjon i intron 4 *SH3TC2* c.386-15G>A og mulig påfølgende feil i RNAspleising. Det blir funnet en spleisemutasjon som fører til en delesjon i ekson5 (del. c.386-c.403) med påfølgende delesjon og innsettelse av feil aminosyre i proteinet p.(gly129_leu135 del ins val). Pasienten kan få diagnosen CMT4C da han med svært stor sannsynlighet er compound heterozygot for mutert *SH3TC2*. Dette genet er allerede del av laboratoriets diagnostiske tilbud.

Neuromuskulære sykdommer:

Neuromuskulære sykdommer er betegnelsen på flere ulike sykdommer som reduserer musklens funksjonsevne. Pasientene har nedsatt muskelkraft som kan ha en direkte årsak dvs. patologi i musklene (myopati) eller årsaken kan være indirekte dvs. patologi i motoriske neuroner (mono-/ polyneuropati) eller i forbindelsen mellom nerve og muskel (neuromuskulær endeplate) (NEL).

I databasene UpToDate og NEL beskrives i detalj hvordan man skal tilnærme seg neuromuskulære sykdommer, et sammendrag refereres her. Primært må det fastslås om pasienten har en sann svekkelse av muskelkraft forårsaket av skade i muskel eller nerver, eller om pasientens nedsatt motorisk evne kan ha en ikke- neuromuskulær årsak, som feks. astheni (alders-/livsstilsrelatert tap av muskelmasse, infeksjoner, kronisk sykdom, depresjon, kakheksi), kroniske smerter, leddsykdom, systemiske sykdommer (KOLS, hjerte-

lunge sykdom) eller liknende, som ikke gir direkte kraftsvekkelse i muskelen men tap av evne til bevegelse like fullt. Bivirkninger av medikamenter, metabolsk- og endokrin sykdom må også utelukkes.

En god anamnese vil avdekke hvilken av disse formene for redusert bevegelighet pasienten har. En pasient med asthenia rapporterer ofte at de har blitt svakere, mens en pasient med en neuromuskulær sykdom typisk rapporterer at de har mistet evnen til å utføre bestemte bevegelser (gå i trapper, kjemme håret), eller de har en følelse av tunghet eller stivhet i armer/ ben. Muskelsmerter er sjelden hos pasienter med neuromuskulær sykdom mens det ofte rapporteres av pasienter med andre årsaker til tap av styrke (polymyalgia reumatika, kramper, fibromyalgi).

Deretter må man ved observasjon bedømme om pasienten har muskelatrofi. Muskelstyrke/kraft må testes ved klinisk undersøkelse. Pasienten kan ha relativt godt bevart muskelstyrke på tross av langt kommet generell muskelatrofi forårsaket av feks. kakeksi, mens ved neuromuskulære sykdommer vil muskelkraften være redusert. Svakhet i respirasjons muskulatur bør også undersøkes, spesielt dersom pasienten har tegn eller symptomer på redusert ventilasjon eller oropharyngeal svakhet (svelg-/ talevansker). Muskelømmhet er vanligvis ikke assosiert med kraftsvekkelse selv om det finnes noen unntak som infektiose-, metabolske-, thyroide- og medikament-induserte myopater.

Når det er fastslått at pasienten har en muskelsvekkelse vil en fysisk undersøkelse kunne lokalisere hvor i det neuromuskulære systemet lesjonen som fører til svakhet sitter. Lesjonen kan sitte et sted i motorisk cortex, corticospinal tractus, anterior horn i ryggmargen, spinal nerverøtter, perifere nerver, neuromuskulær forbindelse/endeplate eller i selve muskelen. En nøye neurologisk undersøkelse, med undersøkelse av hvilke muskler som har tapt muskelkraft (generalisert-/ speifikk svakhet, symmetrisk-/ asymmetrisk affeksjon, distal-/ proximal affeksjon), endret sensibilitet, dype senerefleksi til stede eller nedsatt/utslukket og Babinski tegn, vil gi svar på dette.

For å bestemme årsaken til lesjonen kan man benytte seg av en rekke tester som kan skille genetiske-, inflammatoriske-/ immunologiske-, infektiose-, neoplastiske-, toksiske- eller metabolske årsaker til neuromuskulær sykdom. I disse testene inngår blodprøver, elektromyogram (EMG), nerveledningsstudier (NCS), histologisk undersøkelse av muskelbiopsier, CT, Røntgen/ MRI og genetisk testing av kjente sykdomsassosierte gener.

Differensialdiagnoser:

Minst 20 ulike distale myopater er blitt beskrevet, og i 14 av disse har den underliggende genetiske årsaken blitt identifisert (Klar J, *et al.* 2013). En av disse arvelige myopatiene er Wellander Distale Myopati (WDM) som omtales i dette arbeidet. Andre myopater er dystrofia myotonika (DM), Limb-girdle (LMGD), tibial muskeldystrofi (TMD) mm.

Blandt de arvelige neuropatiene er CMT den hyppigste forekomne og to ulike typer omtales i dette arbeidet; CMT 4C og DI-CMTB. Gruppen inneholder også arvelig brachial plexus neuropati, arvelig neuropati med trykkfølsomhet (HNPP), arvelig motorisk neuropati (HMN), arvelig sensorisk og autonom neuropati (HSAN), metakromatisk leukodystrofi (MLD), Friedreich ataxia (FRDA) mm.

Ikke-genetiske neuropater som bør utelukkes under anamnese og klinisk undersøkelse omfatter alkoholisme, vit.B12 mangel, Thyroidea sykdom, Diabetes Mellitus, HIV infeksjon, vaskulitt, amyloidavleiringer som resultat av kronisk inflammasjon, skjulte tumorer, tungmetall forgiftning og inflammatoriske-/ immunmedierte neuropater.

Charcot-Marie-Tooth disease (CMT):

Charcot-Marie-Tooth (CMT) er den vanligste arvelige neuromuskulære sykdom med en prevalens på 1/2500 i Norge (NEL, Senderek J. *et al.* 2003). CMT er en heterogen gruppe av genetisk forskjellige sykdommer med en liknende klinisk sykdomsmanifestasjon (Kedlaya D. *et al.* 2014). Det er en perifer neuropati som gir symmetrisk distal affeksjon av både motoriske og sensoriske nervefibre (NEL, Aarskog, N K. *et al.* 2002). De første symptomene debuterer ofte i 10-20 års alderen, og de fysiske konsekvensene er for det meste milde med sakte progresjon (Østern, R. *et al.* 2014). Symptomene varierer avhengig av pasientens genetiske årsak til sykdom og penetransmønsteret, men pasienter rapporterer oftest problemer med å gå og snubletendens (Kedlaya D. *et al.* 2014). Dårlig fingerkontroll, finmotorisk klønethet, fall og ankelskader er også vanlig hos CMT pasienter (Kedlaya D. *et al.* 2014).

De mest karakteristiske funnene ved undersøkelse av CMT pasienter, er en progressiv muskelatrofi og svekelse av distal muskulatur i bena, redusert/ utsløkket akilles senerefleks, fotdeformiteter som pes cavus (hulftot) og hammertå, samt mildt/ moderat distalt tap av berørings- og vibrasjons sans (Østern, R. *et al.* 2014). Smerte og temperatur sans er vanligvis ikke affektert, disse modalitetene ledes av en annen type nervefibre (umyliniserte, Type C fibre) (Kedlaya D. *et al.* 2014). Muskelskjelett smerter eller neuropatiske smerter, samt muskelkramper er ganske vanlige plager (Kedlaya D. *et al.* 2014). Hos noen kan CMT manifestere seg som sensorineuralt hørselstap eller hoftedeledsdysplasi (Kedlaya D. *et al.* 2014, Bamford N. *et al.* 2009).

CMT kan nedarves både autosomt dominant, -recessivt og X- bundet (Kedlaya D. *et al.* 2014). I tillegg finner man sporadiske tilfeller av CMT uten en familiehistorie med kjente tilfeller av sykdom i slekten (Kedlaya D. *et al.* 2014). Autosomal dominant CMT er den vanligste av disse, de forklarer 60-70 % av CMT tilfellene, og kan deles inn i demyeliniserende- eller aksonal form ved å se på elektrofysiologiske- og neuropatologiske særtrekk (Kedlaya D. *et al.* 2014, Soong, *et al.* 2013).

Pasienter med demyeliniserende CMT (CMT1), har nedsatt nerveledningshastighet (NCV <38 m/s) i motorisk del av n. Medianus (normalt > 50 m/s) (Østern, R. *et al.* 2014). Histopatologiske undersøkelser viser segmental demyelinisering og remyelinisering samt karakteristiske løkformasjoner i nervebiopsier (Østern, R. *et al.* 2014, Senderek J. *et al.* 2003). Løkformasjonene er produktet av repeterte sykkluser av demyelinisering og remyelinisering som resulterer i et tykt abnormt lag av myelin rundt perifere aksoner (Kedlaya D. *et al.* 2014).

Pasienter med aksonal CMT (CMT2), har tilnærmet normal nerveledningshastighet (NCV >38 m/s) men med redusert amplitude grunnet tap av aksoner (Østern, R. *et al.* 2014). Histopatologiske undersøkelser viser ingen myelinaffeksjon i nervebiopsi, men det er tegn på aksonal degenerasjon (Østern, R. *et al.* 2014, Senderek J. *et al.* 2003).

I noen familier med CMT varierer n. Medianus NCV mellom 25- 45 m/s hos de ulike affekterte familiemedlemmene. Pasientenes varierende NCV overlapper inndelingen i demyeliniserende CMT1 og aksonal CMT2, og tilstanden har fått betegnelsen Dominant Intermediær CMT (DI-CMT) (OMIM, DI-CMT). Biopsi av n. Suralis viser aksonal degenerasjon, tap av myeliniserte nervefibre, med eller uten segmental demyelinisering og remyelinisering med dannelse av onion bulb (OMIM, DI-CMT).

To andre former for CMT identifiseres vha. arvelighetsmønsteret og begge beskrives uavhengig av NCV. Disse er autosomal recessiv CMT (demyeliniserende CMT4 og aksonal ARCMT2) og X-bundet recessiv CMT (demyeliniserende CMTX). Recessive former for CMT er mye mindre vanlige enn de dominante formene, men i lokalsamfunn hvor det har vært mye inngifte, kan autosomal recessiv CMT utgjøre en større andel av CMT tilfellene (30-50%), og kan til og med være den vanligste formen i området (Senderek J. *et al.* 2003). Klinisk presentasjon er lik dominant CMT men har ofte en tidligere start og en mer alvorlig utvikling (Senderek J. *et al.* 2003).

Det finnes også flere subtyper av CMT innenfor disse klassifikasjonen, disse defineres av det muterte genet som er årsak til sykdommen. Det er funnet CMT-assosierte mutasjoner i ca 45 ulike gener, likevel har mer enn 30 % av CMT tilfellene ukjent etiologi (Soong, *et al.* 2013.). De CMT-assosierte genene koder for proteiner med funksjoner som er viktig for dannelse av myelin og for struktur- og integritet av Schwannske celler

(Aarskog, N K. *et al.* 2002). De sykdomsassosierte mutasjonene i de ulike genene er svært ulike og omfatter bla. duplikasjoner, delesjoner, spleisemutasjoner, missens- og nonsens mutasjoner.

En presis CMT diagnose får man dersom man legger sammen informasjon fra klinisk undersøkelse inkludert elektromyografi (EMG) og testing av nerveledningshastighet (NCV), histopatologiske funn fra n. Suralis- biopsi og genetiske testing for kjente mutasjoner som kan gi ulike former for CMT.

Det er svært viktig med en god klinisk undersøkelse med en presis beskrivelse av arvelighets-mønster, symptomer, alder ved symptomdebut samt resultater fra neuro-fysiologisk og -patologisk undersøkelse. Dette gjør at man kan sirkle inn mulige differensialdiagnoser og dermed begrense antall gener til de som er mest sannsynlige, før man starter en spesifikk genetisk testing.

Behandling av CMT begrenser seg til symptomlindring i form av ortopediske hjelpemidler (Spesialsko og/ eller ankel/fot orthoser som kan korrigere for dropfot og hjelpe på gangvansker) og ortopedisk kirurgi for fotdeformiteter (Kedlaya D. *et al.* 2014).

Paracetamol eller NSAIDs kan brukes mot muskelskjelett smerter, eller trisykliske antidepressiva karbamazepine eller Gabapentin for neuropatiske smerter (Bird T D. 1998). Forebyggende behandling for sekundær komplikasjoner omfatter bla. daglig strekking av akilles senen for å hindre akilles seneforkorting (Kedlaya D. *et al.* 2014).

Slektninger av CMT pasienter med sikre- eller sannsynlige patogene CMT-assosiert sekvensvarianter, kan be om genetisk testing. Slektninger med symptomer kan tilbys en diagnostisk test, mens friske slektninger pålegges genetisk rådgivning i forkant av en presymptomatisk test. Foreldre til barn med en CMT diagnose, der man har påvist en kjent sykdomsassosiert sekvensvariant, kan etter genetisk rådgivning gjennomgå en bærertest. De vil da få vite om de er bærere av den aktuelle sykdomsassosierte mutasjonen. Prenatal testing ved graviditet kan tilbys kvinner som er bærere av sikre eller sannsynlige patogene sekvensvarianter.

Material og metode:

DNA ekstraksjon:

Genomisk DNA er blitt ekstrahert, som beskrevet i kit-protokol manualen, fra EDTA- konservert fullblod vha. MagAttract® DNA Blood Midi M48 Kit (Qiagen) på en BioRobot M48 (Qiagen).

RNA isolering:

RNA er blitt isolert, som beskrevet i kit-protokol manualen, fra fullblod på Tempusrør (inneholdende buffer med RNase-inhibitor) vha. Tempus™ Spin RNA Isolation Reagent Kit (Applied Biosystems). Protokollen har blitt fulgt med unntak av DNase behandlingen, prøvene ble heller ikke holdt på is under prosedyren slik det var beskrevet.

«First strand» cDNA syntese:

Single stranded cDNA ble syntetisert vha. det isolerte RNAet, og en revers transkriptase som beskrevet i kit-protokol manualen, vha. SuperScript® VILO™ cDNA synthesis kit (Invitrogen).

Random primere (ikke-spesifikke oligonukleotider (hexamere) av ssDNA, som kan ha alle mulige kombinasjoner av baser) ble brukt som primere i reaksjonen.

cDNA syntese VILO oppsett:

	volum (μ l)
5x VILO Reaksjon Mix	4
10x Superscript Enzyme Mix	2
RNase fritt H ₂ O	9
RNA	5
Totalt volum	20

PCR program; cDNA syntese VILO:

25°C	10 min	(annealing av oligonukleotider)
42°C	60 min	(revers transkriptase aktiveres)
85°C	5 min	(denaturering av enzym)
12°C	∞	(lagring)

Måling av DNA-/ c-DNA-/ RNA konsentrasjoner:

Konsentrasjonen av nukleinsyre i prøvene ble målt, som beskrevet i instrument-protokollen, vha. et Nanodrop 2000 spektrofotometer (Thermo Scientific).

Kvalitetskontroll av renheten til cDNAet:

PCR på houskeeping-genet APRT (adenine phosphoribosyltransferase) ble utført for å kontrollere renheten til cDNAet. PCR produktet fra cDNA vil være 218 bp langt mens PCR produkt fra DNA vil være 721 bp langt. Dersom cDNAet er rent vil cDNA båndet ha den sterkeste intensiteten av de to båndene etter gelelektroforese.

Primerene: hmAPRT1 (forward) 5'-GGGGAAGCTGCCAGGCCCACT-3'
hmAPRT2 (reverse) 3'-GCGAGGTCAGCTCCACCAGGCT-5'

PCR oppsett APRT:

	volum (μ l)
hmAPRT1 (10 pmol/ μ l)	0,5
hmAPRT2 (10 pmol/ μ l)	0,5
Jump start ready mix	12,5
d H ₂ O	10,5
cDNA (ca 50 ng/ μ l)	1,0
Totalt volum	25

JumpStart™ REDTac® ReadyMix™ Reaction Mix (Sigma-Aldrich®)

PCR program APRT:

94°C	3 min	(denaturering)	} 35 sykler
94°C	30 sek	(denaturering)	
63°C	30 sek	(annealing)	
72°C	1 min	(elongering)	
72°C	7 min	(elongering)	
12°C	∞	(lagring)	

PCR reaksjon fra DNA og cDNA:

Amplifisering av DNA og cDNA ble utført vha. PCR ved bruk av SureCycler 8800 thermal cycler (Agilent Technologies).

Reaksjonsmixen tilberedes på pre-PCR rommet i avtrekket, DNA/ cDNA tilsettes på arbeidsbenken.

Alle primere er bestilt fra Sigma-Aldrich®.

PCR oppsett DNA:

	volum (µl)
Primer F (10 pmol/µl)	0,5
Primer R (10 pmol/µl)	0,5
Jump start ready mix	5,5
d H ₂ O	7,5
DNA (ca 50 ng/µl)	1,0
Totalt volum	15,0

PCR program = Touchdown PCR (TD63-57 (20'', 20'', 20'')):

95°C	5 min	(denaturering)	
95°C	20 sek	(denaturering)	}
63°C	20 sek	(annealing)	} 2 sykler
72°C	20 sek	(elongering)	}
95°C	20 sek	(denaturering)	}
61°C	20 sek	(annealing)	} 2 sykler
72°C	20 sek	(elongering)	}
95°C	20 sek	(denaturering)	}
59°C	20 sek	(annealing)	} 2 sykler
72°C	20 sek	(elongering)	}
95°C	20 sek	(denaturering)	}
57°C	20 sek	(annealing)	} 20 sykler
72°C	20 sek	(elongering)	}
12°C	∞	(lagring)	

Gradient PCR:

PCR ble kjørt ved 12 ulike annealing temperaturer (___), temperaturene varierer fra 55,3°C til 70°C med gradvis økende interval (55,3 - 55,7 - 57,0 - 58,8 - 60,3 - 61,7 - 63,3 - 64,3 - 66,1 - 67,8 - 69,5 - 70,0)°C.

95°C	3 min.	(denaturering)	
95°C	20 sek.	(denaturering)	}
___°C	20 sek.	(annealing)	} 28 sykler
72°C	20 sek.	(elongering)	}
72°C	8 min.	(elongering)	
12°C	∞	(lagring)	

PCR program etter gradient PCR:

95°C	3 min.	(denaturering)	} 28 sykler
95°C	20 sek.	(denaturering)	
57°C	20 sek.	(annealing)	
72°C	20 sek.	(elongering)	
72°C	8 min.	(elongering)	
12°C	∞	(lagring)	

PCR oppsett cDNA:

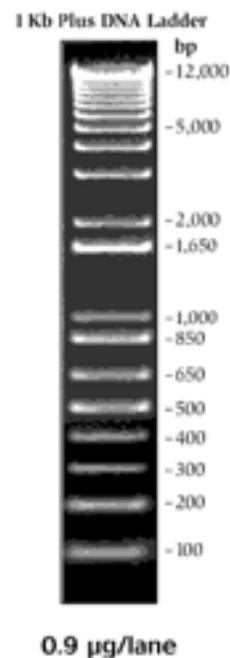
	volum (µl)
Primer F (10 pmol/µl)	0,5
Primer R (10 pmol/µl)	0,5
Jump start ready mix	12,5
d H ₂ O	10,5
DNA (ca 50 ng/µl)	1,0
Totalt volum	25

PCR program APRT (som beskrevet over).

Gelelektroforese og bilde:

For å undersøke lengden (antall basepar) og relativ mengde (intensitet på bånd) av det amplifiserte DNA/ cDNAet, ble det gjort gelelektroforese av en liten mengde av produktet på en 1% agarosegel av UltraPure Agarose (Invitrogen cat.no 15510-027) og 1xTBE buffer ((Tris/Base (Sigma cat.no93350), Borate (Merck cat.no 1.00165.1000), EDTA buffer (Ambion cat.no AM9262).

4 µl PCR produkt ble applisert i hver brønn på en agarosegel som er nedsenket i 1xTBE buffer, prøvene ble kjørt i 40 min. på 90V spenning med gelen nedsenket i en horisontal elektroforese celle av typen: Mini-Sub® Cell GT Cell eller Wide Mini-Sub® Cell GT Cell (BIO RAD). 4 µl 1Kb⁺ ladder (Invitrogen™) kjøres på hver side av prøvene for identifisering av båndstørrelse.



Gelen farges 20 min. i GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium cat.no 41003). Gelen skylles godt med vann før bilde av gelen tas vha. en Benchtop UV transilluminator UVP (BioDoc-It® 220 imaging system).

ExoStarbehandling av PCR produktet:

For å fjerne uønskede primere og nukleotider i forkant av sekvenseringsreaksjonen, tilsettes PCR produktet 1 µl ASAP (Exo1: exonuclease + SAP: shrimp alkaline phosphatase) (ArcticZymes) og en ASAP-PCR utføres:

ASAP-PCR:

37°C	15 min	(degradering av ssDNA + defosforlyring av nukleotider)
80°C	15 min	(inaktivering av enzymene)
12°C	∞	(lagring)

NB: 2 µl ASAP tilsettes PCR produktet etter cDNA-PCR pga. prøvenes økte totalvolum.

Sekvenseringsreaksjon:

Baserekkefølgen i DNA/ cDNAet bestemmes vha. sekvensering som beskrevet i Sanger's dideoxy chain-termination metode, vha. farge-merkede dideoxynukleotider.

Sekvenserings oppsett:

	volum (µl)
Primer F eller R (10 pmol/µl)	0,5
BigDye v 3.1	0,5
5x buffer til BigDye v 3.1	3,0
d H ₂ O	14,0
PCR produkt (ExoSap behandlet)	2,0
Totalt volum	20,0

BigDye® Terminator v3.1 Cycle (Applied Biosystems)

5x Sequencing Buffer til BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems)

Sekvensering PCR:	96°C	10 sek	(denaturering)	} 30 sykler
	50°C	5 sek	(annealing)	
	60°C	4 min	(elongering)	
	12°C	∞	(lagring)	

Prøvene analyseres på en 3130 xL genetic analyser (Applied Biosystems®), sekvensene overføres til og analyseres vha. Sequencher 5 software (Gene Codes Corporation). Sekvensene ble sammenliknet mot en human referansesekvens av aktuelt gen fra Ensemble genome browser (www.ensembl.org).

CMT- Dominant Intermediær F (CMT-DIF)

Introduksjon:

Charcot-Marie-Tooth- Dominant intermediær F (CMT-DIF) er en autosomal dominant form for CMT. Sykdomsdebut er ofte i tenårene med sakte progredierende distal muskelatrofi og svakhet som affekterer hender og ben/ føtter. Pasientene får gang-problemer og snubletendens grunnet dropfot pga. tap av dorsalfleksjon. Pasientene har også svekket distal sensibilitet og reduserte dype senerereflekser. Fotdeformiteter som pes cavus og hammertær kan forekomme. Mannlige pasienter med mutert *GNB4* affekteres alvorligere enn kvinner med samme mutasjon (OMIM, DI-CMT).

Fysiologisk undersøkelse av motorisk NCV (n. Medianus) varierer mellom 25- 45 m/s hos de ulike affekterte pasientene, dette intervallet overlapper inndelingen i demyeliniserende CMT1 og aksonal CMT2. Histopatologiske undersøkelse av biopsi fra distal nerve (n. Suralis), viser aksonal degenerasjon, tap av myeliniserte nervefibrer, med eller uten segmental demyelinisering og remyelinisering med dannelse av onion bulb (OMIM, DI-CMT).

Diagnosen CMT-DIF er basert på kliniske funn, testing av NCV og molekylærgenetisk testing av genet som er mutert; *GNB4* på kromosom 3q28. Det er nylig beskrevet en hetrozygot mutasjon i ekson4 i *GNB4* (c.158G>A p.(Gly53Asp) som er funnet å kosegregere med CMT-DI fenotypen i en kinesisk familie (Soong, *et al.* 2013). Samtidig ble en annen mutasjon i ekson5 i *GNB4* (c.265A>G p.(Lys89Glu) funnet i en enkelt CMT pasient fra en annen kinesisk familie (Soong, *et al.* 2013). *GNB4* består av 10 eksoner hvorav 9 er kodende eksoner (Soong, *et al.* 2013). Residuen Gly53 and Lys89 er konserverte residuer i Gβ4 proteinet, noe som antyder at det er viktige residuer for proteinets funksjon i cellen (Soong, *et al.* 2013).

GNB4 genet koder for beta-4 subenheten (Gβ4) på guanin-nucleotid-bindende protein (G-protein) (Soong, *et al.* 2013). G-proteiner er kjente heterotrimere som integrerer signaler fra celle-overflate-reseptorer til intracellulære effektorproteiner. De består av en alfa-, beta- og gamma subenhet. Beta-subenheten (som Gβ4) er en viktig regulator av alfa-enheten og en rekke signaltransduksjons reseptorer og effektorer. *GNB4* uttrykkes i mange ulike vev (OMIM, DI-CMT) blandt annet finnes Gβ4 i rikelige mengder i både axoner og Schwannceller i perifere nerver (Soong, *et al.* 2013). Hos individer med mutasjon (c.158G>A p.(Gly53Asp) var ekspresjonen av Gβ4 i n. Suralis redusert (Soong, *et al.* 2013). *In vitro* studier av de endrede G-proteinene viste at det muterte proteinet var stabilt men ga en svekket intracellulær signalisering via G protein-koblede reseptorer (GPCR) (Soong, *et al.* 2013). Dette kan bety at mutasjoner i *GNB4* kan redusere uttrykket av genet samt proteinets funksjon i cellen, og at denne funksjonen er viktig for normal funksjon av perifere nerver. *In vivo* studier av *GNB4* uttrykket i rotter, antyder at Gβ4 kan spille en rolle i regenerasjon av perifere nerver (Soong, *et al.* 2013).

Pasientopplysninger:

27 pasienter ble undersøkt for *GNB4* mutasjon. Alle pasientene har en distal form for neuropati, og de er plukket ut på bakgrunn av deres myografifunn som viser både aksonalt- og demyeliniserende mønster. Pasientene har i perioden 2004-2010 blitt sjekket mot flere kjente gener som gir DI-CMT, uten at man har funnet noen mutasjoner som kan forklare deres symptomer.

Material og metode, *GNB4*:

For å undersøke hvilke sekvensvarianter pasientene har i *GNB4* genet, og for å utelukke de kjente mutasjonene (c.158G>A p.(Gly53Asp) og c.265A>G p.(Lys89Glu) i *GNB4* genet, ble det laget et oppsett der ekson2 til og med 10 ble amplifisert hver for seg vha. PCR på pasientenes genomiske DNA. DNAet er isolert

fra leukocytter i EDTA- konserverte fullblod (Material og metode). PCR produktene inneholder hele det aktuelle eksonet samt små sekvenser av intronene i 3'- og 5' retning. Primersekvensene er konstruert med Primer3Input: <http://primer3.ut.ee>. Som utgangspunkt ble lengste transkript av *GNB4*: NM_021629.3 (NCBI), ENST00000232564 (Ensemble) brukt.

Primerene: *GNB4* ex2.F (forward) 5'-TCCATTGAATTTTCAGTAGGTCCA-3'
GNB4 ex2.R (reverse) 3'-TCAGTTCTTACTTCGCCATGTG-5'
Ekson2: PCR produktet (459 bp langt fragment)

GNB4 ex3.F (forward) 5'-TTTTTAAAGATGTGGTACAGTGAGAAG-3'
GNB4 ex3.R (reverse) 3'-GAATCTGAATGTCATTTGCCTCT-5'
Ekson3: PCR produktet (399 bp langt fragment)

GNB4 ex4.F (forward) 5'-TTGATCCCATAACGGCTCTG-3'
GNB4 ex4.R (reverse) 3'-GCATTTTCTGCAAACGCTTC-5'
Ekson4: PCR produktet (507 bp langt fragment)

GNB4 ex5.F (forward) 5'-TTTGGTATCAAGTTTTTAGTTGGAAAA-3'
GNB4 ex5.R (reverse) 3'-CTGGTGAACAGCCAAACAAA-5'
Ekson5: PCR produktet (444 bp langt fragment)

GNB4 ex6.F (forward) 5'-TGGTTCACITTTCTCAAGCCATT-3'
GNB4 ex6.R (reverse) 3'-CCGAGCACAATCTGTCATTTG-5'
Ekson6: PCR produktet (543 bp langt fragment)

GNB4 ex7/8.F (forward) 5'-AACACTTGTTGCCCAAGTATTCTA-3'
GNB4 ex7/8.R (reverse) 3'-TCCTTGAAGGCAATTTGTTGTT-5'
Ekson7/8: PCR produktet (770 bp langt fragment)

GNB4 ex9.F (forward) 5'-AACATCGCTCACCTGGTAGG-3'
GNB4 ex9.R (reverse) 3'-CCATGGAGGCTAGAACACA-5'
Ekson9: PCR produktet (577 bp langt fragment)

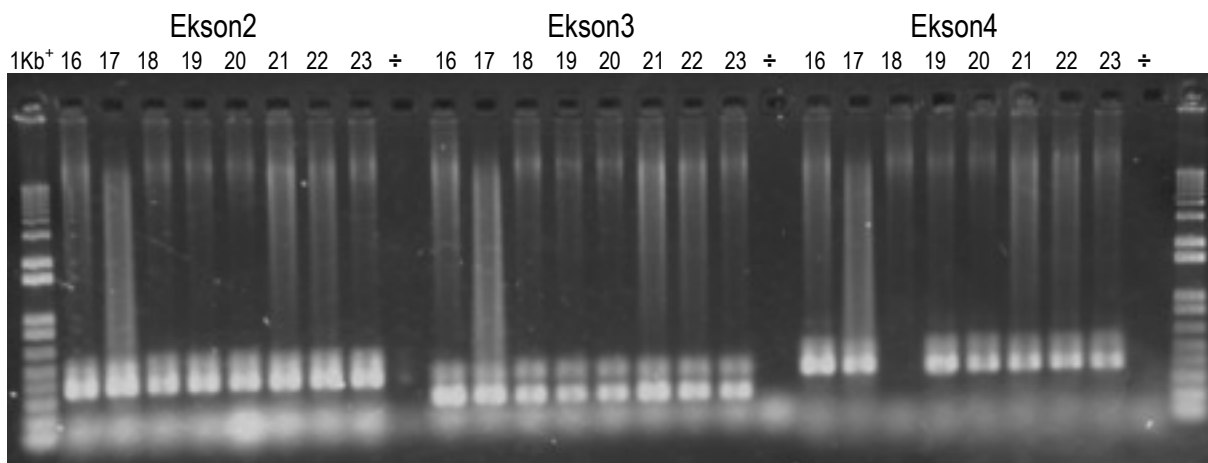
GNB4 ex10.F (forward) 5'-TGATGAACTTTCAAGAAAAGTGG-3'
GNB4 ex10.R (reverse) 3'-TTTTCTCCACCCCACTT-5'
Ekson10: PCR produktet (480 bp langt fragment)

PCR produktene ble bekreftet ved gelelektroforese, deretter ble de sekvensert og analysert som beskrevet i Material og metode.

Resultater:

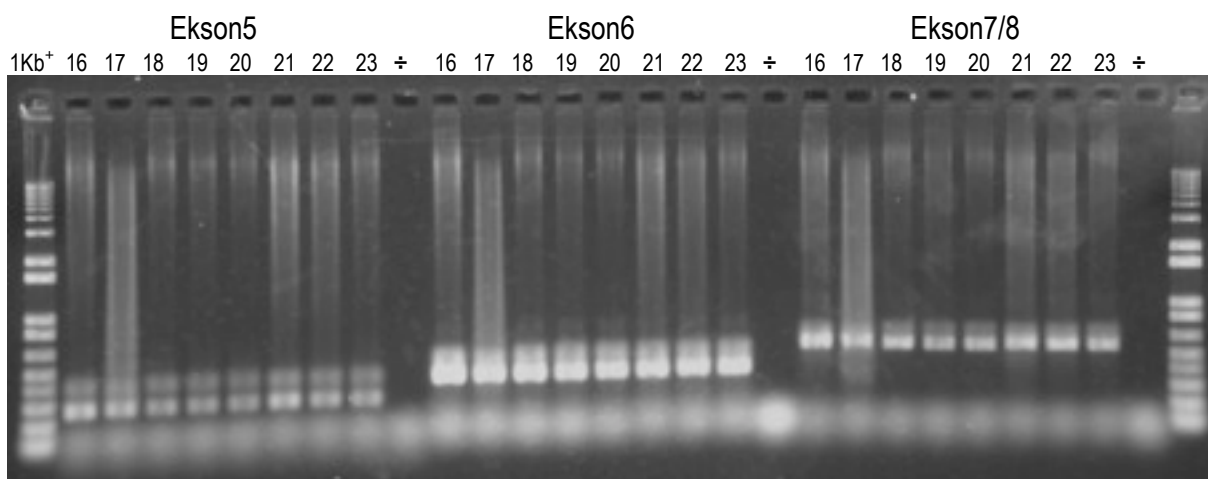
Etter gelelektroforese av PCR produktene ses tydelige bånd som bekrefter at vi har fått de ønskede PCR produktene (med riktig antall bp for hvert ekson, se ovenfor: Material og metode, *GNB4*) fra DNA hos pasient 16-23 (bilde 1- 3).

Bilde 1: Gel elektroforese av PCR produktene fra DNA *GNB4* ekson2, 3 og 4:



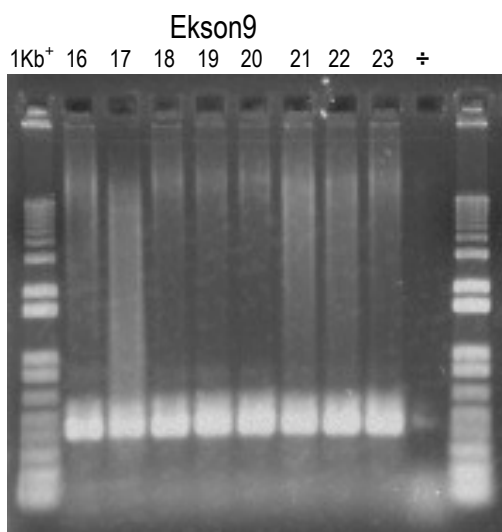
DNA fra pasient 16-23, ÷ negativ kontroll (dH₂O)

Bilde 2: Gel elektroforese av PCR produktene fra *GNB4* ekson5, 6 og 7/8:

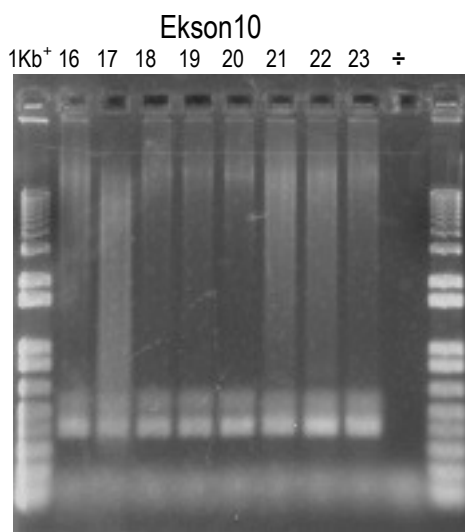


DNA fra pasient 16-23, ÷ negativ kontroll (dH₂O)

Bilde 3: Gel elektroforese av PCR produktene fra *GNB4* ekson9 og 10:



DNA fra pasient 16-23, ÷ negativ kontroll (dH₂O)



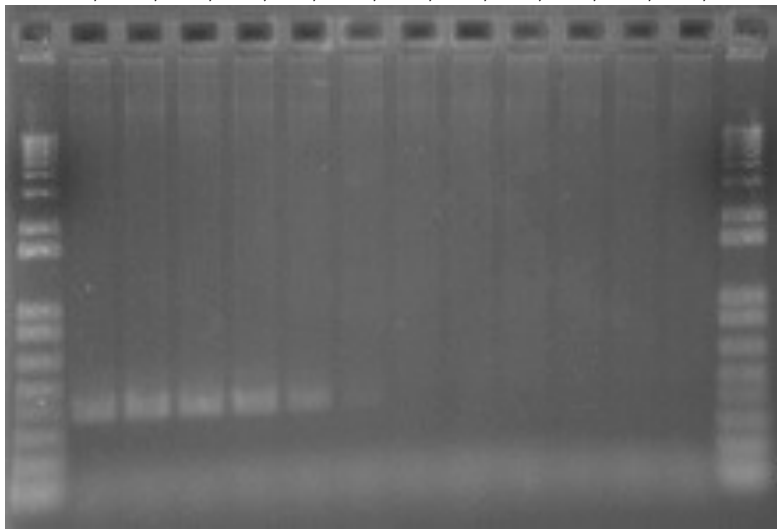
DNA fra pasient 16-23, ÷ negativ kontroll (dH₂O)

PCR produktene ble sekvensert og analysert før sekvensene ble overført til Sequencher hvor de respektive eksonsekvensene ble sammenliknet mot referansesekvensen til *GNB4*, ENST00000232564 (Ensemble). Sekvensene fra *GNB4* ekson10 ble ikke like gode som fra de andre eksonene, men de ble fullt lesbare. Likevel ble det kjørt en gradient PCR (Material og metode) på normal DNA (K28) for å se om transkripsjonen er mer avhengig av en bestemt temperatur slik at Touchdown PCR ikke er optimal.

Etter gelelektroforese av PCR produktene fra gradient PCR ser det ut til at en annealing temperatur på 57 °C gir best PCR utbytte basert på signalstyrke fra båndet (bilde 4).

Bilde 4: Gel elektroforese av PCR produkt fra *GNB4* ekson10 hos normalkontroll (K28):

1Kb⁺ 55,3 55,7 57,0 58,8 60,3 61,7 - 63,3 64,3 66,1 67,8 69,5 70,0 1Kb⁺



DNA fra normal kontroll (K28)

Det ble derfor gjort en ny PCR på *GNB4* ekson10 på DNA fra alle 27 pasientene, med 57 °C på annealing trinnet. Videre sekvensering og analysering som beskrevet (Material og metode).

Sekvensene av *GNB4* ekson10 blir ikke vesentlig mye bedre ved disse PCR betingelsene (resultater ikke vist), så ved senere anledninger kan PCR programmet Touchdown benyttes.

Noen av pasientene hadde synonyme sekvensvarianter, dvs. punktmutasjoner som endrer den kodende tripletten i DNA men ikke aminosyren den koder for. Resultatene er ikke vist, men frekvensen av sekvensvariantene er beregnet og sammenliknet med genotype-frekvensen fra litteraturen (tabell 1). Ingen av pasientene hadde noen av de kjente mutasjonene (c.158G>A p.(Gly53Asp) og c.265A>G p.(Lys89Glu) i *GNB4* genet.

Tabell 1:

Genetiske varianter funnet i materialet vårt. Genotypefrekvens fra litteraturen er fra <http://www.ensembl.org/index.html>, og frekvensen i en europeisk- amerikansk befolkning (4300 personer) er benyttet.

genetisk variant (SNV)	plassering i <i>GNB4</i>	NM navn (DNA) NM_021629.3:	NP navn (protein) NP_067642.1:	frekvens i mitt materiale (27 pasienter)	genotype-frekvens (4300 personer) (Ensemble)
rs1078749	ekson2	c.48T>C	p.= p.(Asn16Asn)	96,3 % A/A 3,7 % A/G 0 % G/G	92,0 % A/A 7,7 % A/G 0,3 % G/G
rs1362650	ekson4	c.117T>C	p.= p.(Ser39Ser)	44,5 % A/A 40,7 % A/G 14,8 % G/G	28,2 % A/A 49,8 % A/G 22,0 % G/G
rs149798652	ekson4	c.186T>C	p.= p.(His62His)	96,3 % A/A 3,7 % A/G	99,5 % A/A 0,5 % A/G

SNV: single nukleotide variation

p.=: synonym variant

Diskusjon/ konklusjon:

Etter screening av *GNB4* ble det påvist tre sekvensvarianter hos de 27 pasientene som ble undersøkt. Alle sekvensvariantene er synonyme punktmutasjoner som ikke er sykdomsassosierte. Genotypefrekvensen av de ulike variantene i vårt materiale viser samme tendens som frekvensene i en normalbefolkning med unntak av frekvensen av den genetiske varianten rs 1362650. Flere av pasientene i vårt materiale uttrykker villtype allelet A i homozygot form, og færre uttrykker allelet G i homozygot form. Denne forskjellen kan skrives seg fra at vårt materiale er sparsomt og at pasientene kommer fra en skandinavisk befolkning og ikke fra en europeisk-amerikansk befolkning som normalbefolkningen gjør.

De kjente sykdomsassosierte mutasjonene (c.158G>A p.(Gly53Asp) og c.265A>G p.(Lys89Glu) i *GNB4* genet ble ikke funnet i vårt materiale. Mutasjonene er beskrevet i en kinesisk befolkning og det er ikke sikkert at disse mutasjonene finnes, eller de kan være svært sjeldne, i en skandinavisk befolkning. De 27 pasientene som ble screenet er svært selekterte pasienter da de alle har tydelige symptomer og tegn på DI-CMT, samtidig som de har vært gjennom en omfattende testing mot de kjente mutasjonene som kan gi denne formen for CMT. Man ville derfor forvente at dersom mutasjonene finnes i den norske befolkningen så ville man finne dem i denne pasientgruppen. Genotypefrekvensene i den kinesiske befolkningen er ikke kjent, og mutasjonene har foreløpig ikke blitt beskrevet i en europeisk befolkning. Genet inkluderes i next generation sequencing (NGS) panelet på avdelingen på UNN der det planlegges screening av ca 300 gener assosiert med både arvelige myopati og neuropati.

Charcot-Marie-Tooth 4C (CMT4C)

Introduksjon:

Charcot-Marie-Tooth 4C (CMT4C) er en demyeliniserende form for arvelig motorisk- og sensorisk neuropati med debut i barne- og ungdomsalder og har en autosomal recessiv arvegang (Senderek *et al.* 2003). Sykdommen er sterkt assosiert med, og presenterer seg ofte med tidlig utvikling av alvorlig progressiv scoliose (i alderen 2-10 år) (OMIM, CMT4C). I tillegg kan pasientene ha milde-/ mer alvorlige symptomer på sakte progredierende perifer neuropati med forsinket alder for å gå, distal muskelatrofi og svakhet, areflexi, fotdeformiteter (pes cavus, - planus eller -valgus) og distal sensorisk svekkelse (Senderek *et al.* 2003, Arnaud E. *et al.* 2009). Andre symptomer som krampe og smerte rapporteres ofte (80%), respirasjonsproblemer forekommer hos mange (20%), mens nedsatt hørsel/ døvhet forekommer hos endel (15%) av CMT4C pasientene (OMIM, CMT4C).

Motorisk- og sensorisk nerveledningshastighet (NCV) er redusert som ved demyeliniserende sykdom (4-37 m/ sek. i motorisk nerve) (Arnaud E. *et al.* 2009). Histopatologisk undersøkelse av biopsi fra distal nerve (n. Suralis), viser demyelinisering og elektronmikroskopianalyser av nerven viser en spesiell type Schwann celle patologi (Arnaud E. *et al.* 2009). Hos enkelte CMT4C pasienter finner man også en nodal fenotype med forlengede nodes of Ranvier, dvs. en økt avstand mellom Schwann cellene i nervefibrene (Arnaud E. *et al.* 2009).

Diagnosen CMT4C er basert på kliniske funn, testing av NCV og molekylærgenetisk testing av genet som er mutert i CMT4C; *SH3TC2* på kromosom 5q32 (Arnaud E. *et al.* 2009). Dette er det eneste kjente genet som er forbundet med CMT4C, og man kjenner heller ikke til noen andre sykdommer som er assosiert med mutasjon i *SH3TC2* genet (OMIM, CMT4C). Over 20 sykdomsassosierte mutasjoner er funnet og inkluderer nonsense-, missense- og indel (insersjon og delesjon) mutasjoner (Lupo V. *et al.* 2009). CMT4C arves autosomt recessivt dvs. begge *SH3TC2*- allelene må ha en mutasjon for at sykdommen skal utvikles. Sykdomsdebut og grad av funksjonsnedsettelse kan variere mye mellom- og innen familier. Enkelte pasienter med CMT4C blir bundet til rullestol pga. affeksjon av proximal muskulatur i underekstremitetene. Personer som er heterozygote for mutasjoner i *SH3TC2* kan ha en mild mononeuropati i n. Medianus (MNMN). Det synes ikke å være en korreasjon mellom hvilke mutasjoner pasienten har i *SH3TC2* genet og fenotypen som uttrykkes (OMIM, CMT4C).

SH3TC2 uttrykkes sterkt i nervevev, inkludert perifert nervevev, og spesifikt i Schwann celler (Arnaud E. *et al.* 2009). Det translaterte proteinet tilhører en proteinfamilie med ukjent funksjon (Arnaud E. *et al.* 2009). De fleste mutasjonene i *SH3TC2* fører til tap av proteinet eller et trunkert protein (Lupo V. *et al.* 2009). Studier med muterte mus, viser at *SH3TC2* proteinet er nødvendig for normal myelinisering i perifere nerver og normal struktur av node of Ranvier, begge deler er påkrevd for normal nerveledningshastighet (Arnaud E. *et al.* 2009). *SH3TC2* består av 18 eksoner og fullengde transkriptet inneholder en åpen leseramme på 17 eksoner (Senderek *et al.* 2003). Det korresponderende proteinet inneholder to SH3 (Src homology-3) domener og ti TPR (tetratricopeptid repeat) domener (OMIM, CMT4C, Lupo V. *et al.* 2009). SH3 - og TPR domener medierer ofte protein-protein binding og dannelse av multiproteinkomplekser (Lupo V. *et al.* 2009). Basert på proteinets struktur er det muligens et scaffold (stilas) protein som interagerer med- og muligens assisterer i samling av proteiner i grupper eller komplekser som kanskje deltar i celle-celle kommunikasjon (Arnaud E. *et al.* 2009). Symptomene hos CMT4C pasienter kan kanskje skyldes en kommunikasjonssvikt mellom Schwann celler og axonet slik at vi får en abnormal myelinisering med hypomyelinisering av axonene samt forstyrret struktur på nodes of Ranvier (Arnaud E. *et al.* 2009, Lupo V. *et al.* 2009). Demyelinisering av nervene kan muligens være sekundært og komme lengre ut i sykdomsforløpet (Arnaud E. *et al.* 2009).

Pasientopplysninger:

Pasient #3 er en ung mann som fikk diagnosen arvelig motorisk og sensorisk neuropati (HMSN/ CMT) i 2011. Han hadde på det tidspunktet distal atrofi i armer og ben, og neurofysiologiske undersøkelser antydte en primær demyeliniserende polyneuropati med sekundær aksonal affeksjon.

Begge hans foreldre er friske, men hans yngre bror har liknende symptomer. Friske foreldre med syke barn antyder en recessiv arvegang der hver av foreldrene er heterozygot for en sykdomsassocieret mutasjon i et gen, det vil si de er begge bærere av et mutert allel og ett funksjonelt allel, hvilket betyr at de har 1/4 sjans for å få et barn som har to muterte alleler og som dermed vil utvikle sykdom.

Pasienten ble genetisk testet for typebestemmelse av CMT, og han ble funnet heterozygot for c.2860C>T p.(Arg954*) i ekson11 i *SH3TC2* genet. Dette er en kjent sykdomsassocieret sekvensvariant, med en frekvens på 0,2% i en europeisk amerikansk befolkning (Senderek *et al.* 2003), Ensemble). c.2860C>T p.(Arg954*) er en nonsense-mutasjon som fører til en prematur stopp i proteinsyntesen, og når mutasjonen foreligger i homozygot form, eller som compound heterozygot, får personen Charcot-Marie-Tooth sykdom type 4C (CMT4C) (Senderek *et al.* 2003). Da pasienten er heterozygot for sekvensvarianten og CMT4C er en recessiv sykdom, kan ikke denne sekvensvarianten alene forklare pasientens sykdom.

Pasienten ble også funnet heterozygot for c.386-15G>A i intron4. Denne sekvensvarianten er ikke tidligere rapportert og kan være en polymorfisme uten klinisk betydning eller, dersom spleisingen av ekson4 og -5 blir påvirket, en sykdomsassocieret mutasjon. Dersom det er en sykdomsassocieret mutasjon og den sitter på pasientens umuterte *SH3TC2* allel, er han compound heterozygot, og han lider av CMT4C. Hvilket allel sekvensvarianten sitter på kan avgjøres ved bærertest. Hans mor er testet og er heterozygot for c.2860C>T p.(Arg954*), men hun har ikke sekvensvarianten c.386-15G>A i intron4. Dette taler for at de to sekvensvariantene sitter på ulike alleler og at pasienten er compound heterozygot. Det ble derfor bestemt at det som en del av hans diagnostiske utredning skulle ses nærmere på c.386-15G>A sekvensvarianten, for å undersøke om den kunne ha klinisk betydning. Hans syke bror skal testes for begge sekvensvariantene og dette vil gi svar på om mutasjonen har oppstått i pasienten eller om de kan ha arvet en sekvensvariant fra mor og en fra far. Far er ikke tilgjengelig for bærertest for øyeblikket.

Material og metode, *SH3TC2*:

For å undersøke om pasientens sekvensvariant c.386-15G>A i intron4 forstyrrer spleisingen av ekson4 og 5 i modningen av mRNA, ble det laget oppsett der det ble amplifisert et 609 basepar (bp) fragment vha. PCR på pasientens cDNA. cDNAet er konvertert fra mRNA som er ekstrahert fra leukocytter i fullblod på tempusrør (Material og metode). cDNAets konsentrasjon og renhet er kontrollert som beskrevet i Material og metode. PCR produktet inneholder deler av ekson2, hele ekson3, 4 og 5 i tillegg til deler av ekson6 (609bp). Primersekvensene er konstruert med Primer3Input: <http://primer3.ut.ee>. Som utgangspunkt ble *SH3TC2* mRNA: NM_024577.3 (NCBI), ENST00000515425 (Ensemble) brukt.

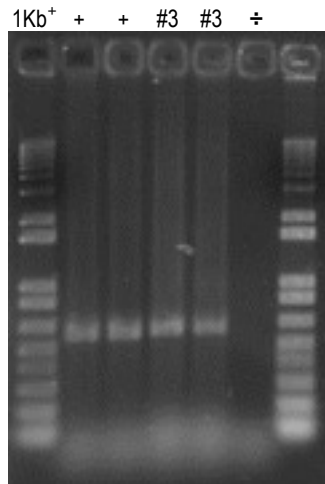
Primerene:	<i>SH3TC2</i> ex2-6.F (forward)	5'-TCCTTCCAAGGATCCAAGT-3'
	<i>SH3TC2</i> ex2-6.R (reverse)	3'-GTCACCAAAGACACGCCTTC-5'

PCR produktet (609 bp langt fragment) ble bekreftet ved gelelektroforese (Bilde 5), deretter ble det sekvensert og analysert som beskrevet i Material og metode.

Resultater:

Etter gelelektroforese av PCR produktene ses ett tydelig bånd mellom 500 bp og 650 bp som bekrefter at vi har fått ønsket PCR produkt (609 bp) fra cDNA både hos +kontroll og pasient #3 (bilde 5).

Bilde 5: Gel elektroforese av PCR produkt fra cDNA *SH3TC2* ekson2-6:



+ positiv kontroll fra cDNA (EJ00)
cDNA fra pasient #3
÷ negativ kontroll (dH₂O)

PCR produktet ble sekvensert og analysert før sekvensen ble overført til Sequencher hvor den ble sammenliknet mot referansesekvensen til *SH3TC2* ekson4-5. Det lot seg ikke gjøre å sammenlikne sekvensene fra forward primer med sekvensen fra reverse primer, sekvensene måtte derfor sammenliknes hver for seg mot referansesekvensen.

Sekvensering av pasient #3's cDNA *SH3TC2* med forward primer viser fin sekvens fra ekson2 til og med ekson4, men etter siste nuklotid i ekson4 og videre i 5' retning, ut ekson5 og -6, er sekvensen dobbel (figur 1 og 2).

Figur 1.

Baserekkefølgen i cDNA *SH3TC2* ekson4 med overgang til ekson5 etter sekvensering med *SH3TC2* ex2-6.F (forward) primer (Sequencher) (siste base i ekson4 markert i sort boks):

```
GAAGTTCGCCACCTACCTTAATTTA GGCTACGTATCCAIGTGTCTAGAACAT
GAAGTTCGCCACCTACCTTAATTTA G
GAAGTTCGCCACCTACCTTAATTTA G
```

310 320 330 340 350

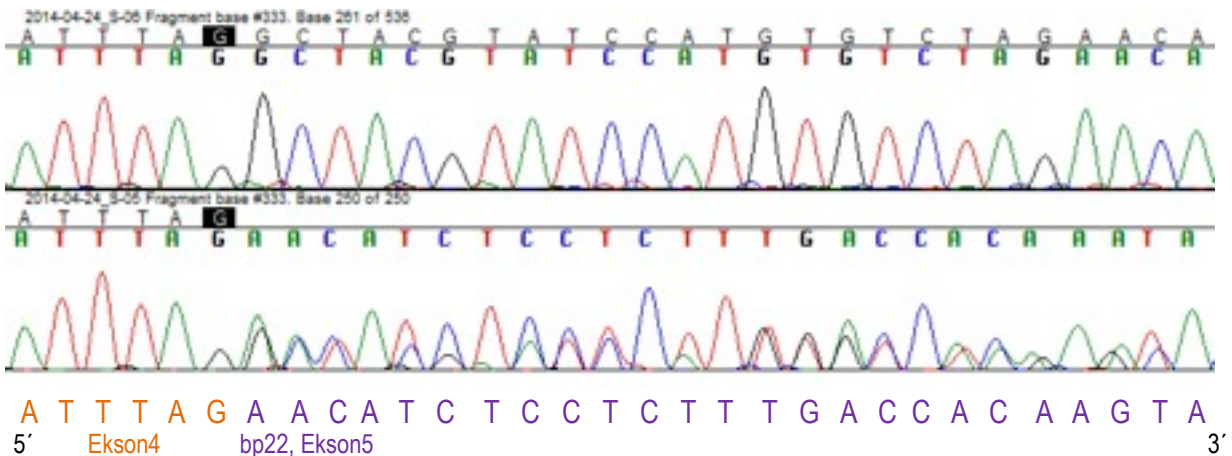
```
GAAGTTCGCCACCTACCTTAATTTA GGCTACGTATCCAIGTGTCTAGAACAT
```

Ekson4 Ekson5

linje 1: normal, kontroll, linje 2: pasient #3, linje 3: referansesekvens *SH3TC2* ekson4-5 (ENST00000515425, Ensemble)

Figur 2.

Kromatogram av cDNA *SH3TC2* ekson4 med overgang til ekson5 etter sekvensering med *SH3TC2* ex2-6.F (forward) primer (Sequencher) (siste base i ekson4 markert i sort boks):

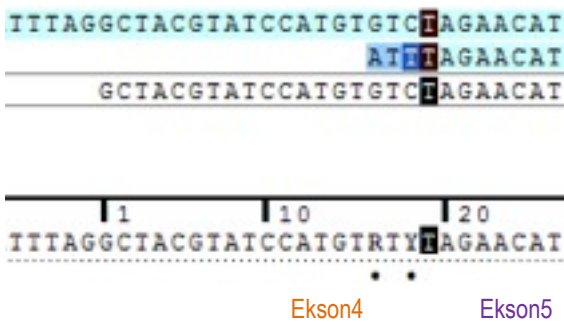


Sanger sequencing chromatogram viser *SH3TC2* ekson4 og -5 fra cDNA hos pasient #3 (nederste linje) med normal DNA til sammenlikning (øverste linje).

Sekvensering med revers primer viser fin sekvens fra ekson6 til og med ekson5 (figur 3), men fra 3'ende av ekson4 og videre i 5' retning, ut ekson3 og -2, er sekvensen dobbel (figur 4).

Figur. 3

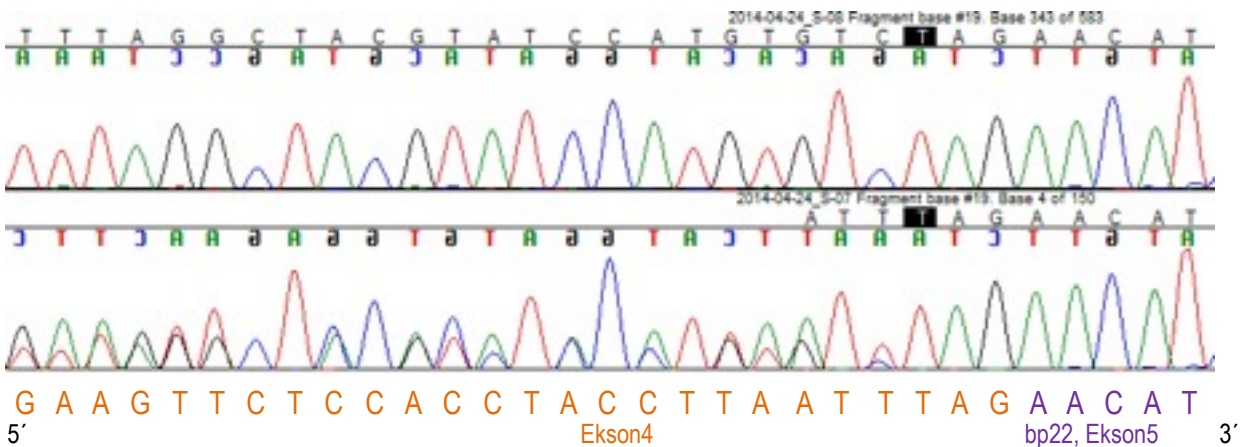
Baserekkefølgen i cDNA *SH3TC2* ekson4 med overgang til ekson5 etter sekvensering med *SH3TC2* ex2-6.R (revers) primer (Sequencher) (første base i siste triplet i ekson4 markert i sort boks):



linje 1: normal, kontroll, linje 2: pasient #3, linje 3: referansesekvens *SH3TC2* ekson5-6 (ENST00000515425, Ensemble).

Figur 4.

Kromatogram av cDNA *SH3TC2* ekson4 med overgang til ekson5 etter sekvensering med *SH3TC2* ex2-6.F (revers) primer (Sequencher) (første base i siste triplet i ekson4 markert i sort boks):



Kromatogram øverst: *SH3TC2* ekson4 og -5, normal kontroll. Kromatogram nederst: *SH3TC2* ekson4 og -5, pasient #3.

Den siste nuklotid-tripletten i 3'ende av intron4 (TAG), er identisk med den siste nuklotid-tripletten i 3'ende av exon4 og de tre siste nuklotidene i 5'ende av den delen av ekson5 som er spleiset vekk (figur 5).

Figur 5.

Sekvens *SH3TC2* ekson4 og -5 samt start og slutt på intron4 (Ensembler):

4	ENSE0000349 9340	148,424, 201	148,424, 096	0	1	106	GACCTCTCAGCAAGGTTGGTCAGTATCCAGTCTCAGAGGCCAGTTTC TCATCACCTTC AAGACCATGGAGGAAATCTGGAAGTTCTCCACCTACCTTAATTAG
	Intron 4-5	148,424, 095	148,422, 401			1,7	glatggtacaaggcaagcaggtgga.....aaacttgttgctgactcttag
5	ENSE0000369 1283	148,422, 400	148,422, 257	1	1	144	GCTACGTATCCATGTGTCTAGAACATCTCTTTGACCACAAGTACTGG CTCAACTGCA TATTGGTGGAGGATACAGAGATCCAAGTGTCTGTAGATGATAAACACCTG GAAACAATAT ACCTGGGACTCCTGATACAGGAAG

g: setet for G>A mutasjonen i intron4 hos pasient #3. Tripletten TAG som man finner både i ekson4, intron4 og ekson5.

For å undersøke hvilken potensiell endring som har skjedd i det muterte mRNAet, analyseres sekvensen fra cDNA i Alamut versjon 2.4. Prediksjonsprogrammene viser at mutasjonen i intron4 kan gi en svekkelse av det normale acceptor cite for spleising og et kryptisk spleisesete i ekson4 etter tripletten TAG som dannes av den aktuelle punktmutasjonen (figur 6). Resultater fra cDNA analysen viser at mutasjonen i intron4 resulterer i en delesjon i begynnelsen av ekson5 (del. c.386-c.403). Mutasjonen er inframe slik at leserammen bevares, men det translaterte proteinet mister noen aminosyrer og setter inn Valin p.(gly129_Leu135 del ins val) (Alamut, 2.4).

Figur 6

Prediksjon av konsekvenser for spleiseseters affinitet etter mutasjon i *SH3TC2*, c.386-15G>A i intron4.



Øverste linje viser normalssekvensen av *SH3TC2* med en affinitet på 6,8 og 0,8 i spleisesetet etter siste triplet i intron4 (TAG)

Nederste linje viser sekvensen i mutert *SH3TC2* med en affinitet på 5,0 og 0,6 i spleisesetet etter siste triplet i intron4 (TAG), i tillegg vises en økning i affinitet på 72,3 i -13 posisjon i intron4 (like etter tripletten TAG).

Diskusjon/ konklusjon:

Spleisesete mutasjoner er endringer i DNA sekvensen som endrer den normale spleisingen som finner sted under modningsprosessen pre-mRNA gjennomgår før det modne mRNA kan translateres videre til protein. Spleisesete mutasjoners biomedisinske påvirkning er beskrevet i Taneri B. *et al.* 2012. Spleisosomet som utfører spleisingen må gjenkjenne ekson-intron grensen slik at riktig spleising skal kunne finne sted. Det er flere regioner på precursor mRNA (pre-mRNA) som kjennes igjen av spleisosomet, blandt annet et område i 3' ende av intronet. Mutasjon i 3' ende av intronet kan føre til skipping av ett eller flere ekson, bevaring av intron, dannelse av pseudo-ekson eller aktivering av kryptiske spleiseseter inni et ekson eller et intron. Transkriptet kan enten beholde leserammen og translateres til et funksjonelt/ delvis funksjonelt produkt, eller leserammen kan endres og det vil oppstå et prematurt terminerings codon og translasjonen vil termineres prematurt. Et slikt mRNA kan være utilgjengelig for translasjon og brytes ned i cellen uten å gi noe genprodukt.

Pasient #3 har fått påvist en punktmutasjon i 3' ende av intron4 og normalt vil ikke en slik punktmutasjon i et intron ha noe å si for rekkefølgen av aminosyrer i det ferdige proteinet. Men dersom mutasjonen affekterer spleisingen, ved feks. å skape et kryptisk spleisesete i intron4 eller i ekson5, slik at man får henholdsvis en insersjon av deler av intron4, eller en delesjon i ekson5 i mRNA, kan man få et mutert protein med tapt- eller redusert funksjon i cellen. Sekvensvarianten kan dermed være sykdomsassosiert og dersom den foreligger i homozygot form, eller som compound heterozygot slik vi mistenker hos vår mulige CMT4 pasient, kan mutasjonen forklare fenotypen.

Sekvenseringen av pasientens genomiske DNA viste ingen insersjon eller delesjon i ekson5 (resultater ikke vist), det er derfor grunn til å tro at det har skjedd en feil i spleisingen av ekson4 og -5 transkribert fra det muterte allelet, slik at cellen inneholder normalt- og mutert mRNA som gir hver sin cDNA sekvens.

For å bestemme om de to beskrevne mutasjonene sitter på samme eller ulike alleler kan man gjøre allelspesifikk PCR. Dette ble ikke gjort da man avventer sekvensering av *SH3TC2* genet hos hans syke bror.

Den siste nuklotid-tripletten i 3'ende av intron4 (**TAG**), er identisk med de tre siste nuklotidene i 5'ende av den delen av ekson5 som er spleiset vekk (figur. 5). Det er mulig at mutasjonen i intron4 har ført til dannelsen av et kryptisk spleisesete i ekson5 nettopp etter denne tripletten. Denne tripletten gjenkjennes jo som de siste tre nukleotidene i intron4 som skal spleises vekk ved normal modning av *SH3TC2* pre-mRNA. En slik spleise feil vil gi en delesjon av ekson5 på 21 basepar. Siden ekson4 også har den samme tripletten; **TAG**, som de siste tre basene i 3'ende, er det ikke umulig at **TAG** i sekvensen (figur. 2 og -4) kommer fra ekson5 og at vi har en liten delesjon på tre nukleotider i 3'ende av ekson4 i tillegg til delesjonen i 5'ende av ekson5. Det er mindre sannsynlig at mutasjonen i intronet skulle ha flere konsekvenser, men i et slikt tilfelle ville delesjonen av ekson5 være på 18 basepar.

Ulike vev kan ha ulike spleisevarianter transkribert fra samme gen (Taneri B. *et al.* 2012.). Det er vist at *SH3TC2* kan bli alternativt spleiset i noen vev (feks. i CNS), men i perifere nerver blir hovedsaklig transkriptet som koder for full lengde protein transkribert (Senderek J. *et al.* 2003).

Vi har vist at i Pasient #3's leukocytter fører mutasjonen i *SH3TC2* (c.386-15G>A i intron4) mest sannsynlig til en delesjon på 21 bp i *SH3TC2* mRNA. Dersom denne delesjonen også uttrykkes i nerveceller og dersom man får uttrykt et protein med redusert/ ingen aktivitet, kan den forklare pasientens CMT4 da han vil være komponent heterozygot for mutert *SH3TC2*, et viktig gen for normal myelinisering av nervevev (Taneri B. *et al.* 2012.). Det gjenstår å undersøke om denne spleisemutasjonen har samme konsekvens for spleising av *SH3TC2* pre-mRNA i perifere nerveceller. Dette kan undersøkes ved å isolere mRNA fra en biopsi av n. Suralis hos pasienten og utføre cDNA analyser som beskrevet i dette arbeidet.

Videre studier av *SH3TC2* proteinet er nødvendig for å bestemme dets normalfunksjon i cellen. Studier av hvilken konsekvens mutasjonen c.386-15G>A i intron4 har på produktet er også påkrevd, slik at man kan finne en plausibel forklaring på fenotypen hos pasienten. Mutasjonen hos pasient #3, kan være en «loss of function»-mutasjon eller en toksisk «gain of function»-mutasjon, eller mRNA fra mutert *SH3TC2* kan bli degradert i cellen uten å gi noe produkt.

Welander Distale Myopati (WDM)

Introduksjon:

Welander Distal Myopati (WDM) er en autosomal dominant distal myopati. Symptomene starter i voksen alder (40-60 år) og er langsomt progredierende med økende distal muskelsvakhet (Hackman P, *et al.* 2013.). Typisk utvikles først svakhet i pekefingerens ekstensormuskulatur og det første symptomet er ofte klønethet ved finmotoriske bevegelser som involverer pekefinger og tommel (Klar J, *et al.* 2013). Etterhvert progredierer denne svakheten til alle fingrene og pasienten kan få problemer med å rette ut fingrene (Klar J, *et al.* 2013). Atrofi av muskulaturen i hånden kommer etter flere års svakhet (Klar J, *et al.* 2013). Senere rammes også ekstensormuskulatur i fot og legg, særlig m. Tibialis anterior og tå-ekstensorene, og pasienten kan få gangvansker og en snublende gange pga. tapt evne til dorsalfleksjon (dropfot) (Hackman P, *et al.* 2013, Klar J, *et al.* 2013). Man kan finne sensorisk dysfunksjon, som hypoestesi og abnormal temperaturterskel på hendene og føttene, ved temperaturstimuli (OMIM, *TIA1*). Sjeldne homozygote

personer har en tidligere sykdomsdebut, en raskere progresjon og påvirkning av mer proximal muskulatur. Disse blir bundet til rullestol i tidlig alder (ca. 50 år) (Hackman P, *et al.* 2013.).

Histopatologiske undersøkelser av distal skjelett muskulatur (m. Tibialis anterior), viser myopatiske endringer som består i variasjon av muskelfiber diameter, fiber degeneration (atrofi), fibrose og "rimmed vacuoles" (dvs. intracellulære inklusjoner inneholdende membranlegemeer, glycogen og amorft materiale.) (Klar J, *et al.* 2013) Elektromyografiske funn inkluderer myopati og uspesifikke endringer med fibrillasjoner og komplekse potensialer (Klar J, *et al.* 2013). Nerveledningen er normal og sCK er normal til lett forhøyet (Klar J, *et al.* 2013).

Alle WDM pasientene er av svensk- eller finsk avstamning og insidensen er høyest i midt-/ østige deler av Sverige (Klar J, *et al.* 2013). I enkelte lokale områder har WDM en insidens på 1/100 (Klar J, *et al.* 2013). Da sykdommen starter i voksen alder vil det ikke være noen naturlig seleksjon mot den.

Alle pasientene deler en sjelden heterozygot founder mutasjon i c.1150 G>A p.(Glu384Lys) i *TIA1* gen (Klar J, *et al.* 2013). Residuen p.Glu384 er konserverv i mange ulike arter, noe som antyder at den er viktig for bevaring av proteinets funksjon i organismen (Klar J, *et al.* 2013). Byttet av nuklotid i *TIA1* ekson13 fører til at kodonet endres fra GAA til AAA og i det ferdige proteinet erstattes aminosyren Glutaminsyre av Lysin. Disse aminosyrene er svært lik hverandre men Glutaminsyre har en negativt ladet sidegruppe mens Lysin har en positivt ladet sidegruppe. Et slikt bytte av aminosyrer med ulik ladning, i en konserverv residue av proteinet, er tydeligvis ikke forenelig med et fullt aktivt *TIA1* protein.

WDM er vist å være forårsaket av denne missense mutasjonen på kromosom 2p13, i *TIA1* gen (Hackman P, *et al.* 2013.). *TIA1* koder for det RNA bindende proteinet T-cell intracellulær antigen-1 (*TIA1*), også bom; cytotoxic granule-assosiert RNA binding protein. *TIA1* uttrykkes flere steder bla. i skjelettmuskulatur, og er involvert i regulering av spleising og translasjon som en del av cellenes håndtering av oxydativ stress eller situasjoner med energimangel (Hackman P, *et al.* 2013.). Mutasjonen i *TIA1* er lokalisert i slutten av ekson13 som koder for den C-terminale enden av proteinet. Denne delen av proteinet er konserverv mellom flere ulike arter, og den er vist å interagere med en av spleisingfaktorene (Klar J, *et al.* 2013). Normalt vil *TIA1* hindre skipping av ekson7 i *SMN2* (Survival of motor neuron 2) gen, men hos individer med *TIA1* mutasjon i ekson13, finner man økte mengder av spleiset *SMN2* (dvs. uten ekson7) i skjelettmuskelceller (Klar J, *et al.* 2013). Samtidig er ikke nivået av mRNA fra *TIA1* redusert i cellen, så mutasjonen er assosiert med redusert *TIA1* aktivitet (Klar J, *et al.* 2013). Pasientenes symptomer kan dermed skyldes en *TIA1*-haploinsuffisiens der den reduserte *TIA1* aktiviteten i cellen kan redusere cellenes respons på cellulært stress med påfølgende apoptose som resultat (Klar J, *et al.* 2013). Fenotypen i WDM kan kanskje forklares av denne apoptosen som resulterer i en aldersrelatert muskelcelleatrofi.

Pasientopplysninger:

Åtte pasienter med symptomer på distal myopati testes for mutasjon i *TIA1* gen for å undersøke om deres myopati skyldes WDM. Pasientene har tidligere blitt testet rutinemessig uten å finne noen mutasjon i kjente gener som kan gi myopati av liknende art som pasientene presenterer. Noen av pasientene har gått i mange år uten å vite grunnen til deres plager, og WDM har vært en aktuell diagnose.

Material og metode (*TIA1*):

TIA1 genet har 13 kodende eksoner og 20 ulike transkripter eller spleisevarianter. For å undersøke om pasientene har mutasjon i *TIA1* ekson13, amplifiseres et 407 bp fragment vha. PCR på pasientens genomiske DNA ekstrahert fra leukocytter i EDTA- konserverv fullblod (Material og metode). PCR produktet inneholder deler av intron 12 (3'ende) samt ekson13 (127bp) og en liten del av 3' nedstrøms sekvens.

Primersekvensene er konstruert med Primer3Input: <http://primer3.ut.ee>. Som utgangspunkt ble lengste transkript av *TIA1*: NM_022037.2 (NCBI), ENST00000433529 (Ensemble) brukt.

Primerene med M13 tags:

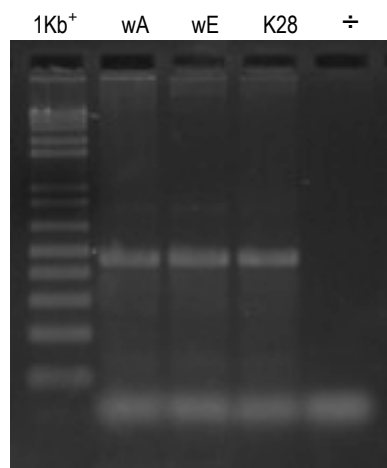
M13F-*TIA1* ex13.F (forward primer) 5'-tgtaaacgacgccagtgTTCTTGTGTTTGTCTTGCCA-3'
M13F-*TIA1* ex13.R (reverse primer) 3'-caggaaacagctatgaccGGCAGACATCCAGCATCTTG-5'

PCR produktet (425 bp langt fragment, inkludert ekson og primerenes M13 tag på 18 bp) ble bekreftet ved gelelektroforese (Bilde 6) sekvensert og analysert (Material og metode).

Resultater:

Etter gelelektroforese av PCR produktene ses ett tydelig bånd mellom 400 bp og 500 bp som bekrefter at vi har fått ønsket PCR produkt (407 bp) fra DNA både hos + kontroll og hos pasientene wA og wE (Bilde6).

Bilde 6: Gel elektroforese av PCR produkt fra *TIA1* ekson13:



K28 positiv kontroll, normal DNA (K28)
wA og wE pasienter
÷ negativ kontroll (d H₂O)

PCR produktet ble sekvensert og analysert før sekvensen ble overført til Sequencher hvor den ble sammenliknet mot referansesekvensen til *TIA1* ekson13. Sekvensering av pasient wE's *TIA1* sekvens viser en missens mutasjonen i nukleotid c.1150. Pasienten wE er heterozygot i aktuelle lokus (figur 7 og 8).

Figur. 7

Baserekkefølgen i *TIA1* ekson13 (Sequencher) (nuklotid c.1150 markert i sort boks):

```
ATCGAGTGGCAGGGTATGAAACCCAGTGAATA
ATCGAGTGGCAGGGTATGAAACCCAGTGAATA
ATCGAGTGGCAGGGTATAAAACCCAGTGAATA
ATCGAGTGGCAGGGTATGAAACCCAGTGAATA
ATCGAGTGGCAGGGTATGAAACCCAGTGA
```

```
30      1140      1150      1160
ATCGAGTGGCAGGGTATGAAACCCAGTGAATA
```

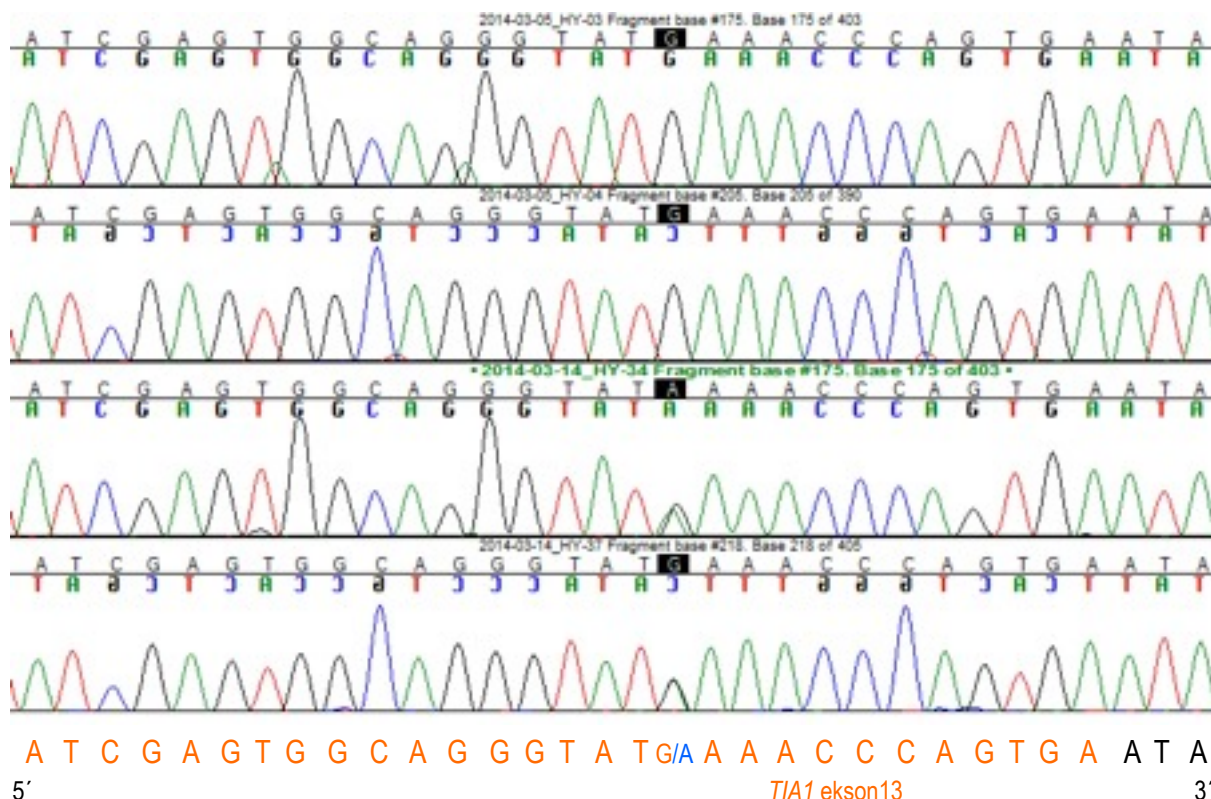
Linje 1 (forward) og -2 (reverse) er sekvens fra *TIA1* ekson13 hos normal kontroll

Linje 3 (forward) og -4 (reverse) er sekvens fra *TIA1* ekson13 hos pasient wE

Linje 5 er referansesekvens av de siste 29bp i *TIA1* ekson13 (Ensemble)

Figur. 8

Kromatogram *TIA1* ekson13 (Sequencher) (nuklotid c.1150 markert i sort boks):



Sanger sequencing chromatogram viser dobbel sekvens ved *TIA1* mutasjon c.1362/1050G>A (pE384K) hos en av pasientene (linje 3 (forward) og -4 (reverse)) med normal DNA til sammenlikning (linje 1 (forward) og -2 (reverse)).

Ytterligere to pasienter, wA og wG, var heterozygote for missens mutasjonen c.1150 G>A p.(Glu384Lys) i *TIA1* (resultater ikke vist her).

Pasientenes symptomer på distal myopati er sammenfattet i tabell 2. Pasient wA merket de første symptomene i 1990 (49 år gammel). Pasient wE merket de første symptomene i 2003 (47 år gammel)

Pasient wE's mor fikk symptomer i 30-års alderen men hun lever ikke lenger og informasjonen om henne stammer fra komparentopplysninger. Jeg har ikke hatt tilgang på journalen til pasient wG, informasjonen om symptomene er hentet fra henvisningen til medisinsk genetisk avdeling med forespørsel om testing for distal myopati. Alder for symptomdebut er derfor ukjent, men pasienten er idag 73 år gammel. Alle pasientene hadde en forelder med liknende symptomer, to av pasientene hadde i tillegg en tante/ onkel og ett søskenbarn med liknende symptomer. I den ene familien hadde dette søskenbarnet også et affektet barn.

Tabell 2
Kliniske opplysninger om WDM-pasientene:

Pasient	distal svakhet	dropfot klohånd	distal muskel-atrofi	proximal svakhet	fot-deformitet	distalt sensorisk tap	reflexer
wA	+	vansker hælging	+		hulfot	+	
wE	+	dropfot bilat.	+ bilat.	+			÷ triceps og acilles
wE's mor	+	dropfot bilat.	+ bilat.				
wG	+						

Det finnes ikke tilgjengelige data fra måling av motorisk-/ sensorisk nervelednings hastighet eller svar på eventuelle muskel-biopsier av pasientene.

Det er ikke gjort standardtesting av alle pasientene og manglende blankt felt i tabellen over betyr at det ikke finnes data tilgjengelig.

Diskusjon/ konklusjon:

Familiehistorien til pasientene indikerte en arvelig form for muskelsykdom med en autosomal dominant arvegang. Alle de tre pasientene som var heterozygot for mutasjon i *TIA1* c.1150 G>A p.(Glu384Lys) hadde symptomer på distal muskelsvakhet. For to av pasientene fantes det informasjon om både bilateral dropfot og distal muskelatrofi som begge er typiske tegn på WDM.

Pasientene vil nå få en bekreftelse fra laboratoriet på at deres myopati skyldes WDM, og eventuelle andre familiemedlemmer som presenterer liknende symptomer kan testes spesifikt mot *TIA1* genet. *TIA1* genet inkluderes i laboratoriets diagnostiske tilbud til myopatipasienter.

Referanseliste

Aarskog, N K. *et al.* 2002. Molekylærgenetisk diagnostikk av Charcot-Marie-Tooths sykdom og hereditær nevropati med trykkpareser. Tidsskr Nor Lægeforen 2002; 122:382 – 5 Nr. 4 – 10. februar 2002

Arnaud E. *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A. Oct 13, 2009; 106(41): 17528–17533. Neuroscience SH3TC2/KIAA1985 protein is required for proper myelination and the integrity of the node of Ranvier in the peripheral nervous system

Bamford N. *et al.* 2009. Neuromuscular hip dysplasia in Charcot–Marie–Tooth disease type 1A. Published online 24th March 2009: <http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/j.1469-8749.2008.03234.x/asset/j.1469-8749.2008.03234.x.pdf?v=1&t=hvwacftg&s=d208389d3d06fd01ca39878a39d956d23a8c0f7c>

Bird T D. September 28, 1998; Last Revision: March 6, 2014 Charcot-Marie-Tooth Hereditary Neuropathy Overview: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1358/>

Ensemble:http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index

Hackman P, *et al.* 2013. Welander Distal Myopathy Is Caused by a Mutation in the RNA-Binding Protein TIA1. Annals of Neurology, 2013, Vol.73(4), pp.500-509

Kedlaya D. *et al.* Updated: Mar 20, 2014. Physical Medicine and Rehabilitation for Charcot-Marie-Tooth Disease: <http://emedicine.medscape.com/article/315260-overview>

Klar J, *et al.* 2013. Welander Distal Myopathy Caused by an Ancient Founder Mutation in TIA1 Associated with Perturbed Splicing. Human Mutation, 2013, Vol.34(4), pp.572-577

Lupo V. *et al.* 2009 © The Author 2009. Published by Oxford University Press. MISSENSE MUTATIONS IN THE SH3TC2 PROTEIN CAUSING CHARCOT-MARIE-TOOTH DISEASE TYPE 4C AFFECT ITS LOCALIZATION IN THE PLASMA MEMBRANE AND ENDOCYTIC PATHWAY : <http://hmg.oxfordjournals.org/content/early/2009/09/10/hmg.ddp427.full.pdf>

NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

NEL: <http://legehandboka.no>

OMIM, CMT4C: <http://www.omim.org/entry/601596?search=CMT4C&highlight=cmt4c>

OMIM, DI-CMT: <http://www.omim.org/entry/606482?search=CMT&highlight=cmt>

OMIM, TIA1: <http://www.omim.org/entry/604454?search=WDM&highlight=wdm>

Senderek J. *et al.* Am J Hum Genet. 2003 Nov;73(5):1106-19. Mutations in a gene encoding a novel SH3/TPR domain protein cause autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth type 4C neuropathy.

Soong, *et al.* 2013. Exome Sequencing Identifies GNB4 Mutations as a Cause of Dominant Intermediate Charcot-Marie-Tooth Disease. American journal of human genetics, 2013, Vol.92(3), pp.422-30

Taneri B. *et al.* Mol Med. 2012; 18(1): 314–319. Biomedical Impact of Splicing Mutations Revealed through Exome Sequencing.

UpToDate: http://www.uptodate.com/contents/search?search=neuromuscular+disorders&sp=0&searchType=0&source=USER_INPUT&searchControl=TOP_PULLDOWN&searchOffset=&autoComplete=true

Østern, R, *et al.* 2014. Segregation analysis in families with Charcot-Marie-Tooth disease allows reclassification of putative disease causing mutations. BMC medical genetics, 2014, Vol.15, pp.12