

Molekylærgenetisk diagnostikk av Charcot-Marie-Tooths sykdom og hereditær nevropati med trykkpareser

Charcot-Marie-Tooths sykdom (CMT), også kjent som hereditær motorisk og sensorisk nevropati, er den vanligste arvelige tilstanden i det perifere nervesystem, med en estimert prevalens på ca. en av 2 500 i Norge. Sykdommen er delt inn i en demyeliniserende form (CMT1) og en aksonal form (CMT2), basert på kliniske, elektrofysiologiske og nevropatologiske funn. Mellom 70 % og 80 % av alle CMT1-tilfeller skyldes et dominant nedarvet duplisert fragment på 1,5 Mb i region p11.2-12 på kromosom 17 (CMT1A), en region som inneholder genet for perifert myelinprotein 22 (PMP22). Hereditær nevropati med trykkpareser (HNPP) skyldes delesjon av det samme 1,5 Mb-fragmentet. Individuer som er heterozygote for CMT1A-duplikasjon, har tre kopier av genet for PMP22, mens individer som er heterozygote for HNPP-delesjon, bare har én kopi av genet for PMP22. Det finnes flere molekylærgenetiske metoder for å diagnostisere CMT1A-duplikasjon og HNPP-delesjon.

Vi har utviklet en ny metode basert på sann tid (real-time) kvantitativ polymerasekjedereaksjon (PCR) for deteksjon av både PMP22-duplikasjon ved CMT1A og PMP22-delesjon ved hereditær nevropati med trykkpareser. Metoden er sensitiv og tar bare to timer.

I kliniske miljøer og forskningsmiljøer bør denne metoden finne bred anvendelse for identifisering av PMP22-duplikasjon og -delesjon så vel som ved andre sykdommer der antall genkopier eller genekspressjon er involvert.

Charcot-Marie-Tooths sykdom (CMT) er blant de vanligste arvelige nevrologiske tilstander, med en estimert prevalens på en av 2 500 (1). Den ble beskrevet første gang i 1886 av franskmennene Charcot og Marie og engelskmannen Tooth som en arvelig form for peroneal muskelatrofi. Senere ble

Nina K. Aarskog
nina.aarskog@haukeland.no

Institutt for nevrologi og
Senter for medisinsk genetikk og molekylærmedisin

Christian A. Vedeler
Institutt for nevrologi

Haukeland Sykehus
5021 Bergen

Aarskog NK, Vedeler CA.

Molecular genetic testing of Charcot-Marie-Tooth disease (CMT) and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies (HNPP).

Tidsskr Nor Lægeforen 2002; 122: 382-5.

Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease is the most commonly inherited disorder of the peripheral nervous system; in Norway, the estimated prevalence is approximately one in 2,500. CMT has been classified into a demyelinating form (CMT1) and an axonal form (CMT2). Around 70-80% of CMT1 cases are caused by a dominantly inherited 1.5 Mb duplication at 17p11.2-12 (CMT1A), encompassing the peripheral myelin protein 22 (PMP22) gene. In contrast, hereditary neuropathy with liability to pressure palsies (HNPP) is caused by the reciprocal deletion of the same 1.5 Mb region.

We recently developed a method by real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detecting CMT1A duplication and HNPP deletion. Real-time quantitative PCR is very sensitive for identifying PMP22 gene copy number in CMT1A duplication and HNPP deletion.

We discuss molecular genetic testing of CMT1A duplication and HNPP deletion. Real-time quantitative PCR should find broad application in clinical and research settings, not only in CMT1A duplication and HNPP deletion, but also in other diseases involving gene copy number or gene expression.

det imidlertid vist at dette er en sykdom i det perifere nervesystem, og i dag utgjør den en heterogen gruppe av hereditær motorisk og sensorisk nevropati (HMSN). Arvegangen ved Charcot-Marie-Tooths sykdom er oftest autosomt dominant, men kan være autosomt recessiv, X-bundet eller forekomme som sporadiske ikke-familære tilfeller.

Basert på nevrofysiologiske og nevropatologiske studier er Charcot-Marie-Tooths sykdom delt opp i to store hovedgrupper: Charcot-Marie-Tooth type 1 (CMT1) og Charcot-Marie-Tooth type 2 (CMT2) (2-4). Ved CMT1, som er den demyeliniserende formen, finnes redusert nerveledningshastighet, demyelinisering og karakteristiske løkformasjoner (onion bulbs) i nervebiopsi. Ved CMT2, som er den aksonale formen, er nerveledningshastigheten tilnærmet normal, men med redusert amplitude, ellers ingen myelinaffeksjon i nervebiopsi. Ved CMT1 blir det etter hvert sekundær aksonal affeksjon, som medfører langsom forverring på linje med det man ser ved CMT2 (5, 6). CMT1 og CMT2 viser som regel et sammenfallende klinisk bilde med symmetrisk distal affeksjon av både motoriske og sensoriske nervefibrer.

Nyere genetisk kunnskap om Charcot-Marie-Tooths sykdom har resultert i en rekke ulike undergrupper, og dette gjør klassifisering av kliniske fenotyper mindre oversiktlig. Sykdommen er koblet til mer enn 30 ulike genloci og skyldes mutasjoner i ett av til nå ni ulike identifiserte gener (<http://molgen-www.uia.ac.be/CMTmutations/>) (tab 1). Disse genene koder for proteiner med forskjellige funksjoner som er viktig for myelindanning, struktur og integritet av Schwannske celler. CMT2 er koblet til fire forskjellige genloci, men så langt er kun to gener identifisert (7) (tab 1).

Hereditær nevropati med trykkpareser (HNPP) er oftest karakterisert ved forbigående episoder av nummenhet og lammelser som følge av relativt lette kompresjoner eller traumer av perifere nerver. Sykdommen er nylig omtalt i Tidsskriftet (8). Nevrofysiologiske og patologiske studier viser redusert nerveledningshastighet og demyelinisering med fokale fortykninger i myelin, kalt «tomaculi» (4, 9).

Gendose som mekanisme for CMT1A og hereditær nevropati med trykkpareser

Mer enn halvparten av tilfellene av Charcot-Marie-Tooths sykdom forekommer som CMT1, og ca. 80 % av disse utgjøres av CMT1A (10). CMT1A skyldes en molekylær duplikasjon på 1,5 megabaser (Mb) (1,5 mil-

Tabell 1 Gendefekter ved Charcot-Marie-Tooths sykdom (CMT) og arvelig nevropati med tryktpareser (HNPP). AD = autosomt dominant; AR = autosomt recessiv; XLD = X-bundet dominant; PMP22 = perifert myelinprotein 22-gen; MPZ (P0) = myelinprotein 0-gen; ERG2 = tidlig vekst-responsgen 2; KIF1B β = kinesin familiegen; NF-L = nevrofilament lett-gen; MTMR2 = myotubularin-relatert protein 2-gen; NDRG1 = N-myc nedstrømsregulert gen-1; PRX = periaxin-gen; Cx32 = connexin 32-gen

CMT	CMT (%)	CMT-subgruppe	Arv	CMT-subgruppe (%)	Gen	Locus	Mutasjon	Funksjon
CMT1	50	CMT1A	AD	70–80	PMP22	17p11.2-12	Duplikasjon	Myelinstruktur/veksthemmer
			AD ¹	Sjelden	PMP22	17p11.2-12	Mutasjon	Myelinstruktur/veksthemmer
		CMT1B	AD ¹	5–10	MPZ	1q22-q23	Mutasjon	Myelinstruktur/adhesjonsprotein
		CMT1C CMT1D	AD –	10–15 < 5	– ERG2	– 10q21-q22	– Mutasjon	– Myelinstruktur/celledeling
CMT2	20–40	CMT2A	AD	Ukjent	KIF1B β	1p36	Mutasjon	Transportprotein
		CMT2E	AD	Ukjent	NF-L	8p21	Mutasjon	Nevrofilamentorganisering/regulering
CMT4	Sjelden	CMT4B	AR	Ukjent	MTMR2	11q23	Mutasjon	Myelinstruktur/celledeling
		CMT4D	AR	Ukjent	NDRG1	8q24	Mutasjon	Veksthemmer/celledifferensiering
		CMT4E	AR	Ukjent	ERG2	10q21-q22	Mutasjon	Myelinstruktur/celledeling
		CMT4F	AR	Ukjent	PRX	19q13	Mutasjon	Myelinstruktur
CMTX	10–20	CMTX	XLD	90	Cx32	Xq13-q21	Mutasjon	Proteintransport
HNPP		HNPP	AD	70–80	PMP22	17p11.2-12	Delesjon	Myelinstruktur/veksthemmer
		HNPP	–	20–30	PMP22	17p11.2-12	Mutasjon	Myelinstruktur/veksthemmer

¹ Sjeldne recessive former for Charcot-Marie-Tooths sykdom med mutasjon i PMP22- eller P0-genet forekommer også

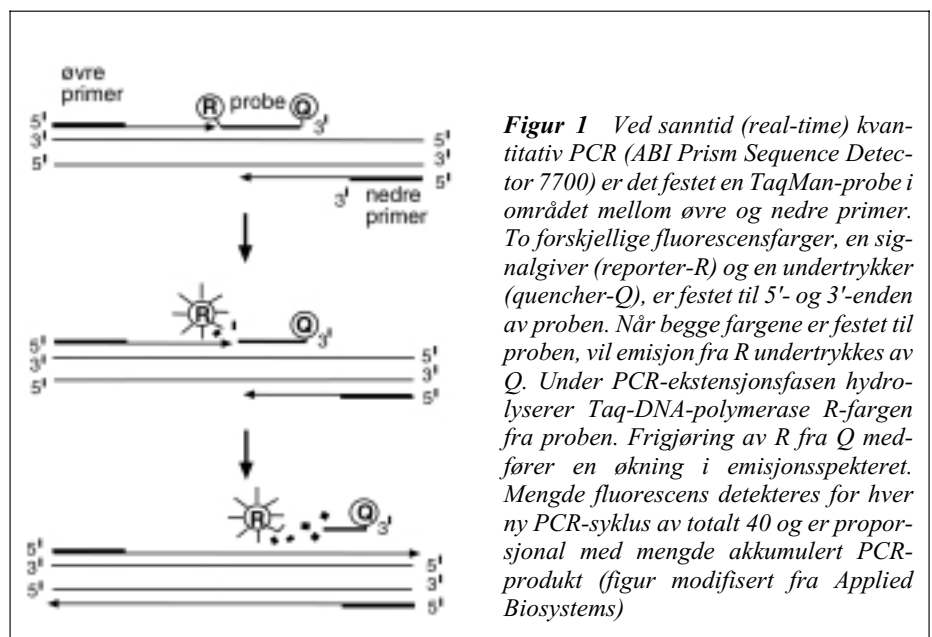
ligner basepar) på kromosom 17 i området p11.2-12. Denne regionen inneholder genet som koder for perifert myelinprotein 22 (PMP22), og en duplikasjon av genet PMP22 er således årsak til de fleste tilfellene av sykdommen (4, 7, 9, 11). Komplementært til duplikasjon på kromosom 17p11.2-12 er en delesjon av det samme 1,5 Mb-området som fører til arvelig nevropati med tryktpareser (4, 9).

PMP22, som ligger i den dupliserte/deleterte 1,5 Mb-regionen, medfører at pasienter med CMT1A har tre kopier av genet PMP22 (ett duplisert kromosom med to genkopier og ett normalt kromosom med én genkopi), mens en delesjon medfører at individer med arvelig nevropati med tryktpareser bare har én kopi av genet for PMP22 (ett deletert kromosom uten genkopi og ett normalt kromosom med én genkopi).

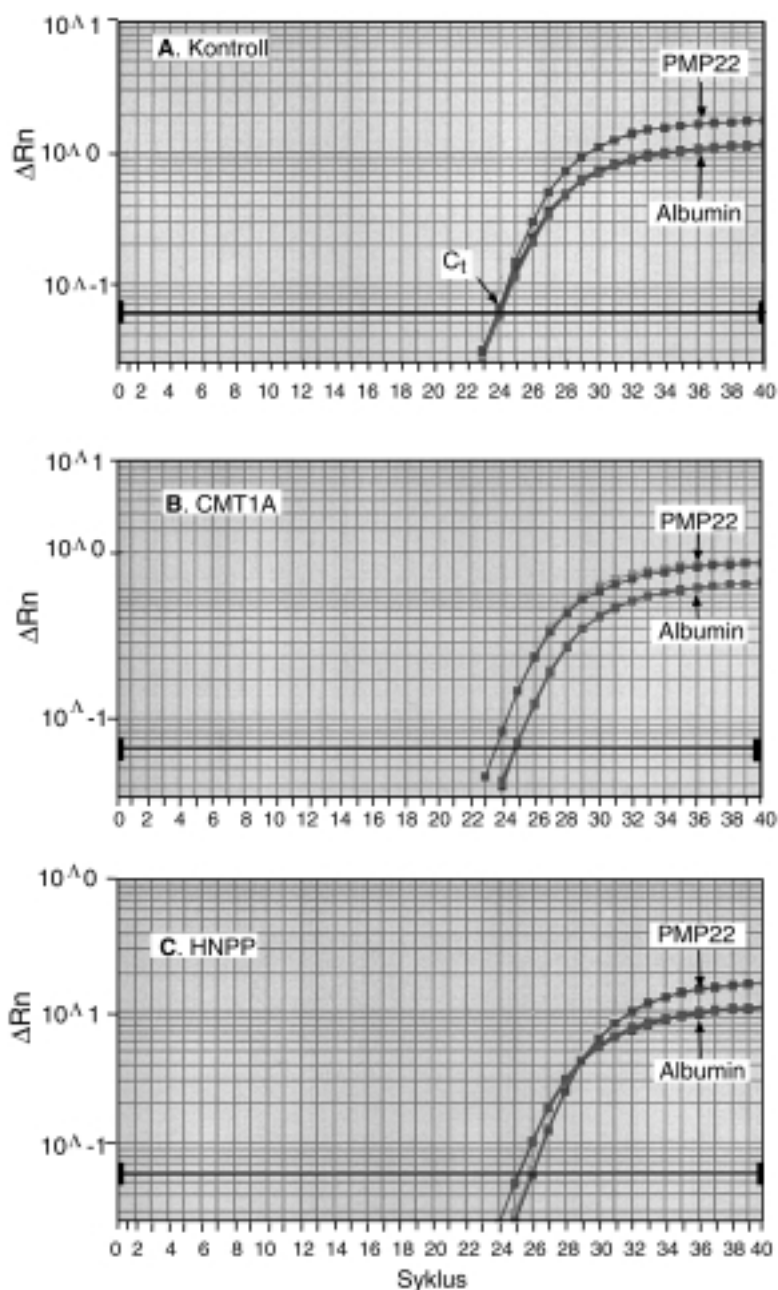
Hvordan duplikasjon og delesjon av genet for PMP22 forårsaker de respektive kliniske fenotyper, CMT1A og arvelig nevropati med tryktpareser, er ikke fullstendig kartlagt. Imidlertid viser studier basert på morfologiske fenotyper av perifere nerver hos naturlige mutanter og transgene gnagere at PMP22-protein er involvert i initieringsfasen av myelinisering og opprettholdelse av myelin- og nevrogliainteraksjoner (5). Det er sannsynlig at PMP22 er et dosesensitivt gen, idet kvantitative målinger av både

PMP22-mRNA og -protein i nervebiopsier fra CMT1A- og HNPP-pasienter viser henholdsvis økt eller redusert nivå (9, 11). Selv små endringer i nivået av PMP22-protein forstyrrer stabiliteten i kompakt myelinstruktur og proteinsammensetning, noe som fører til dysmyelinisering (5).

En minoritet av CMT1-pasienter med dominant arvelig CMT1A uten duplikasjon kan ha mutasjoner i PMP22-genet (tab 1). En mindre vanlig form for CMT1, CMT1B (5–10 %) skyldes mutasjon i myelinproteinnullgenet (MPZ, P0), lokalisert til 1q21-23 (CMT1B). En sjelden årsak til CMT1,



Figur 1 Ved sanntid (real-time) kvantitativ PCR (ABI Prism Sequence Detector 7700) er det festet en TaqMan-probe i området mellom øvre og nedre primer. To forskjellige fluorescensfarger, en signalgiver (reporter-R) og en undertrykker (quencher-Q), er festet til 5'- og 3'-enden av proben. Når begge fargene er festet til proben, vil emisjon fra R undertrykkes av Q. Under PCR-ekstensjonsfasen hydrolyserer Taq-DNA-polymerase R-fargen fra proben. Frigjøring av R fra Q medfører en økning i emisjonsspekteret. Mengde fluorescens detekteres for hver ny PCR-syklus av totalt 40 og er proporsjonal med mengde akkumulert PCR-produkt (figur modifisert fra Applied Biosystems)



Figur 2 Sanntid (real-time) kvantitativ PCR-amplifikasjonsplot av genet PMP22 mot albumin som referanseggen. A) normal kontrollperson, B) pasient med CMT1A-duplikasjon og C) pasient med HNPP-delesjon. A) viser total mengde fluorescensert probe degradert for hver ny PCR-syklus, reflektert ved verdien ΔRn på y-aksen, og utgjør en eksponentiell vekstkurve. Tid representert som antall PCR-sykluser plottes på x-aksen. Når tilfredsstillende mengde hybridisert probe er spaltet av Taq-DNA-polymerase, vil intensitet til signalgiver (reporter-R) fluorescensert emisjon øke. Ved terskelsyklus C_t (threshold cycle) vil kurven krysse en verdi som er beregnet ut fra fluorescensert bakgrunnsnivå for alle PCR-reaksjonene. På denne måten kan total mengde PCR-produkt kvantiteres ved et tidlig tidspunkt av den eksponentielle vekstfasen for en PCR-reaksjon. Jo høyere antall DNA-startkopier, desto raskere vil man observere en signifikant økning i fluorescens ved at man når den eksponentielle vekstfasen for PCR-reaksjonen tidligere og dermed oppnår en lavere terskelsyklusverdi C_t . B) Som vist vil CMT1A-duplikasjon øke antall genkopier for PMP22 fra to til tre og føre til redusert C_t -verdi i forhold til albumin med to genkopier. C) Tilsvarende vil HNPP-delesjon, hvor genkopi antallet for PMP22 er redusert fra to til ett, medføre en høyere C_t -verdi enn for albumin. Ved punktet C_t vil heller ingen av reaksjonskomponentene i PCR-reaksjonen være begrensende, og dette gjør C_t -verdiene svært reproducerbare og forbedrer betraktelig presisjonen for DNA-quantitering. Endringene i C_t -verdi gir grunnlag for å bruke en komparativ C_t -metode for å identifisere antall genkopier (20)

CMT1D (< 5%) er mutasjoner i genet EGR-2 (*krox20*), som koder for en sinkfingertranskripsjonsfaktor som er uttrykt i myeliniserende schwannske celler. Den X-bundne formen for Charcot-Marie-Tooths sykdom, CMTX (10–20%) likner klinisk på CMT1 og skyldes mutasjoner i connexin 32-genet på Xq12-13 (10, 12). Connexin 32 er et kanalprotein som finnes i en rekke celler, deriblant schwannske celler, men det er ikke inkorporert i kompakt myelin (11). De ulike mutasjonene forstyrrer myelinisering og schwannske cellers funksjon på flere komplekse måter, og fører dermed til ulike kliniske fenotyper (5).

Diagnostikk av CMT1A-duplikasjon og HNPP-delesjon

På grunn av relativt høy prevalens av CMT1A-duplikasjon og HNPP-delesjon hos pasienter med arvelig eller sporadisk polyneuropati er molekylærgenetisk diagnostisk test av disse gendefektene av stor diagnostisk verdi. CMT1A/HNPP har til nå vært diagnostisert på basis av ulike molekylærgenetiske metoder, som alle har sine fordeler og ulemper.

- Southern blot-teknikk (13) kan benyttes for påvisning av doseforskjeller til restriksjonsenzym-fragmentlengde-polymorfe (RFLP) alleler (14). Denne metoden kan kombineres med kvantitativ fotostimulert bildebehandling (PSL imaging) for en mer nøyaktig kvantitativ diskriminering av alleldoseforskjeller (15). Metoden er tidkrevende (4–5 dager), men har relativt høy sensitivitet.

- Pulsfelt gelelektroforese (PFGE) (13, 14) kan benyttes for å identifisere et nytt RFLP-allelbånd som et resultat av 1,5 Mb-duplikasjon/-delesjon (15). Metoden er svært tidkrevende (7–8 dager), men har høy sensitivitet.

- Fragmentanalyse er basert på mikrosatellittmarkører (short tandem repeat – STR) i dupliserte/deleterte 1,5Mb-regioner (14, 15). Metoden er relativt rask (to dager), men har begrenset sensitivitet.

- Fluorescens in situ-hybridisering (FISH) (13) detekterer den dupliserte/deleterte regionen på kromosomer i interfase ved hjelp av fluorescensmerkede prober (14). Metoden er tidkrevende (fire dager), men regnes for å ha høy sensitivitet.

- REP (repeat)-PCR kan identifisere områder for duplikasjon/delesjon (16–18). Dette er en relativt rask metode (en dag), men den har begrenset sensitivitet.

- Sluttid (end-point) kvantitativ PCR har også vært benyttet for PMP22. Ved denne metoden beregnes den totale mengde PCR-produkt produsert av normal kontrollperson i en reaksjon i forhold til pasient med duplikasjon/delesjon (19). Metoden er rask, men sensitiviteten er usikker.

- Sanntid (real-time) kvantitativ PCR (fig 1)-basert deteksjon av CMT1A-duplikasjon og HNPP-delesjon er en ny metode som vi har utviklet (20) (fig 2). Sanntid-PCR benytter seg av standard PCR-metodikk sammen

med en fluorescent TaqMan-metodikk (21, 22) og en «ABI Prism 7700» sekvensdetektor. Ved denne metoden kvantiteres alle nyproduserte PCR-produkter for hver nye PCR-syklus i totalt 40 PCR-sykluser. Dette gjør det mulig å måle progresjon av PCR-reaksjoner underveis (real-time), og metoden har revolusjonert PCR-basert kvantitering av DNA og RNA. For å beregne tre genkopier PMP22 ved CMT1A-duplikasjon og en genkopi PMP22 ved HNPP-delesjon benyttes vi oss av en komparativ Ct beregningsmetode ($\Delta\Delta Ct$) (23). Basert på studier av norske CMT1A- og HNPP-pasienter har vi kunnet definere verdier som gir et uttrykk for antall PMP22-genkopier ved CMT1A-duplikasjon ($\Delta\Delta Ct > 1,50$) og HNPP-delesjon ($\Delta\Delta Ct < 0,60$) i tillegg til normale ($0,82 < \Delta\Delta Ct < 1,30$) (20).

Metoden er rask (to timers analyse, 13 pasienter), krever et minimum av DNA, er enkel og involverer ikke bruk av radioaktivt arbeid eller etterbehandling av PCR-produkt. Vi har funnet at denne metoden har høy sensitivitet og er mer sensitiv enn både PSL-imaging (15) og REP-PCR (18).

Diskusjon

Det er klinisk mistanke om Charcot-Marie-Tooths sykdom hvis det foreligger en langsomt progredierende symmetrisk polynevropati som opptrer i løpet av de tre første decennier, sammen med en positiv familiehistorie. Oftest er det de motoriske symptomer som dominerer, men den neurologiske undersøkelsen er forenlig med både sensorisk og motorisk polynevropati. De typiske funn er distal atrofi, mest uttalt i beina, med hulfot og hammertær, distale pareser, arefleksi og distal sensibilitetsreduksjon av overflatiske og dype sansekvaliteter. Ved klinisk undersøkelse kan det være vanskelig å skille CMT1, CMT2 og CMTX, men nerveledningshastigheten er sterkt redusert ved CMT1 (ofte < 30 m/s for motoriske nerver i beina). Ved CMTX kan det forekomme forlenget sentral konduksjonstid ved auditivt fremkalt hjernestammerespons, som uttrykk for at connexin 32 også finnes i sentralnervesystemet (24). Déjerine-Sottas sykdom (tidligere CMT3) betraktes nå som en alvorlig variant av CMT1A, CMT1B eller CMT4. CMT3 er derfor foreslått å være forbeholdt autosomt recessive aksonale nevropatier (7). Hereditær nevropati med tryktpareser opptrer som regel med residiverende kompresjonsnevropatier i samme familie, og de kliniske funn er forenlig med motorisk og sensorisk mononevropati (8). Imidlertid kan det være overlappende symptomer og funn med Charcot-Marie-Tooths sykdom, og det er ved hereditær nevropati med tryktpareser også en stor grad av fenotypisk variasjon.

Familiehistorie med affiserte individer over tre generasjoner med klare neurologiske funn som angitt ovenfor tyder på Charcot-Marie-Tooths sykdom/hereditær nevropati med tryktpareser. Slike pasienter kan

imidlertid ha negativ familiehistorie fordi mildt uttrykte former i familier ikke er diagnostisert, på grunn av recessiv arvegang, usikkert farskap eller pasienten kan ha en ny mutasjon.

Når det gjelder den genetiske diagnostikk, vil det i familier med tilsynelatende dominant arv og redusert nervelednings-hastighet være naturlig først å teste på CMT1A (duplikasjon av genet for PMP22). Dersom denne testen er negativ, bør den etterfølges av en CMT1B-test (mutasjonsanalyse av genet for P0). I familier med tilsynelatende X-bundet arv bør mutasjonsanalyse av connexin 32-genet utføres. Negative resultater basert på slik testing kan imidlertid ikke utelukke diagnosen, siden Charcot-Marie-Tooths sykdom kan skyldes mutasjoner i PMP22-genet, andre relaterte gener, hittil ukjente gener eller eventuelt en annen form for hereditær nevropati med kliniske likhetstrekk. Ved hereditær nevropati med tryktpareser vil de fleste pasientene ha delesjon av genet for PMP22. De genetiske testene som er nevnt ovenfor, vil påvise enten duplikasjon eller delesjon i samme prøve. Mutasjonsanalyser gjøres ikke rutinemessig for CMT2 eller CMT4.

Vi har funnet at sanntid (real-time) kvantitativ PCR er meget rask og sensitiv for påvisning av CMT1A-duplikasjon og HNPP-delesjon, og denne metoden er derfor vårt førstevalg ved supplerende utredning av disse typer av arvelig polynevropati. Vi tar sikte på at analysen etter hvert skal inngå i det generelle laboratoriediagnostiske tilbudet ved Senter for medisinsk genetikk og molekylærmedisin, Haukeland Sykehus. I vår egen forskningsgruppe vil vi nå starte med mutasjonsanalyser for CMT1A, CMT1B og CMTX for de pasienter hvor CMT1A-duplikasjon ikke kan påvises.

Studiene er støttet av Gerda Meyer Nyquist Gulbranson og Gert Meyer Nyquists forskningsfond.

Litteratur

1. Skre H. Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *Clin Genet* 1974; 6: 98–118.
2. Lupski JR, Garcia CA. Charcot-Marie-Tooth peripheral neuropathies and related disorders. I: Schriver CR, red. *Metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, 2001: 5241–6338.
3. Lupski JR. Charcot-Marie-Tooth disease: lessons in genetic mechanisms. *Mol Med* 1998; 4: 3–11.
4. Chance PF. Molecular basis of hereditary neuropathies. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 2001; 12: 277–91.
5. Kamholz J, Menichella D, Jani A, Garbern J, Lewis RA, Krajewski KM et al. Charcot-Marie-Tooth disease type 1: molecular pathogenesis to gene therapy. *Brain* 2000; 123: 222–33.
6. Krajewski KM, Lewis RA, Fuerst DR, Turansky C, Hinderer SR, Garbern J et al. Neurological dysfunction and axonal degeneration in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Brain* 2000; 123: 1516–27.
7. Vance JM. The many faces of Charcot-Marie-Tooth disease. *Arch Neurol* 2000; 57: 638–40.

8. Gjerde IO, Aarskog N, Vedeler C. Hereditær nevropati med tryktpareser. *Tidsskr Nor Lægeforen* 2001; 121: 426–8.
9. Lupski JR. Charcot-Marie-Tooth polyneuropathy: duplication, gene dosage, and genetic heterogeneity. *Pediatr Res* 1999; 45: 159–65.
10. Nelis E, Van Broeckhoven C, De Jonghe P, Lofgren A, Vandenberghe A, Latour P et al. 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* 1996; 4: 25–33.
11. Nelis E, Timmerman V, De Jonghe P, Van Broeckhoven C, Rautenstrauss B. Molecular genetics and biology of inherited peripheral neuropathies: a fast-moving field. *Neurogenetics* 1999; 2: 137–48.
12. Nelis E, Haites N, Van Broeckhoven C. Mutations in the peripheral myelin genes and associated genes in inherited peripheral neuropathies. *Hum Mutat* 1999; 13: 11–28.
13. Eiken HG, Børresen-Dale A-L. Molekylær genetisk diagnostikk: teknologi for påvisning av mutasjoner DNA. *Tidsskr Nor Lægeforen* 1998; 118: 1730–6.
14. Lupski JR. DNA diagnostics for Charcot-Marie-Tooth disease and related inherited neuropathies. *Clin Chem* 1996; 42: 995–8.
15. Aarskog NK, Aadland S, Gjerde IO, Vedeler CA. Molecular genetic analysis of Charcot-Marie-Tooth 1A duplication in Norwegian patients by quantitative photostimulated luminescence imaging. *J Neurol Sci* 2001; 188: 21–6.
16. Haupt A, Schols L, Przuntek H, Epplen JT. Polymorphisms in the PMP-22 gene region (17p11.2-12) are crucial for simplified diagnosis of duplications/deletions. *Hum Genet* 1997; 99: 688–91.
17. Yamamoto M, Keller MP, Yasuda T, Haya-saka K, Ohnishi A, Yoshikawa H et al. Clustering of CMT1A duplication breakpoints in a 700 bp interval of the CMT1A-REP repeat. *Hum Mutat* 1998; 11: 109–13.
18. Aarskog NK, Vedeler CA. Recombination breakpoints in the Charcot-Marie-Tooth 1A repeat sequence in Norwegian families. *Acta Neurol Scand* 2001; 104: 97–100.
19. Poropat RA, Nicholson GA. Determination of gene dosage at the PMP22 and androgen receptor loci by quantitative PCR. *Clin Chem* 1998; 44: 724–30.
20. Aarskog NK, Vedeler CA. Real-time quantitative polymerase chain reaction. A new method that detects both the peripheral myelin protein 22 duplication in Charcot-Marie-Tooth type 1A disease and the peripheral myelin protein 22 deletion in hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Hum Genet* 2000; 107: 494–8.
21. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; 6: 986–94.
22. Orlando C, Pinzani P, Pazzagli M. Developments in quantitative PCR. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36: 255–69.
23. Livak KJ. Comparative Ct method. *ABI Prism 7700 Sequence Detection System. User Bulletin no. 2*. Foster City: PE Applied Biosystems, 1997.
24. Nicholson G, Corbett A. Slowing of central conduction in X-linked Charcot-Marie-Tooth neuropathy shown by brain stem auditory evoked responses. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996; 61: 43–6.

○