

## مطالعه ژن FRDA در بیماران مشکوک به فردریش آتاکسیا

مریم ناصرالاسلامی<sup>۱</sup>، کاظم پریور<sup>۲</sup>، سارا سنجریان<sup>۱</sup>، امیدآریانی<sup>۲</sup>، مسعود هوشمند<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی گرایش علوم سلولی مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران  
<sup>۲</sup> استاد زیست شناسی علوم جانوری سلولی- تکوینی، گروه زیست شناسی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران  
<sup>۳</sup> پژوهشگر، آزمایشگاه ژنتیک مرکز پزشکی خاص  
<sup>۴</sup> استادیار ژنتیک پزشکی، سرپرست آزمایشگاه مرکز بیماری های خاص و هیات علمی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی

## چکیده

**سابقه و هدف:** فردریش آتاکسیا (FA) نوعی بیماری اتوزوم مغلوب است. تقریباً ۲ تا ۴ درصد موارد این بیماری به علت گسترش تکرارهای سه نوکلئوتیدی GAA در یکی از آلل های ژن FXN و موتاسیون نقطه‌ای در آلل دیگر این ژن ایجاد می‌گردد. در این تحقیق، برای اولین بار در ایران اگزون‌های ژن FXN به منظور یافتن موتاسیون نقطه‌ای بررسی گردید.

**روش بررسی:** در این مطالعه توصیفی، ۵۰ فرد مشکوک به فردریش آتاکسیا که برای انجام تست ژنتیکی به مرکز بیماری‌های خاص مراجعه کرده بودند انتخاب شدند. در ابتدا، DNA ژنومیک استخراج گردید، سپس به منظور تشخیص بیماران از روش‌های مختلف PCR (PCR معمولی برای اینترون، LongPCR و PCR برای اگزون‌های ژن FXN) استفاده گردید و پس از آن توالی‌یابی برای محصول PCR اگزون‌ها انجام شد. در نهایت آنالیز توالی های تکثیر شده صورت گرفت.

**یافته‌ها:** در اگزون ۲ تغییر نوکلئوتید CAG<sub>۸۲۵۹۵</sub>، در اگزون ۳ تغییر نوکلئوتید C<sub>۸۳۲۷۲</sub>G<sub>۹۰</sub> و در اگزون ۵a اضافه شدن نوکلئوتید گوانین به شماره نوکلئوتید ۸۲۲۲۲۵ در تمام بیماران مشاهده گردید.

**نتیجه‌گیری:** این مطالعه نشان داد که تشخیص بالینی FA چون با سایر آتاکسی‌های دیگر هم پوشانی دارد ساده نیست و برخی از موتاسیون‌ها که در اینترون ایجاد می‌شود ممکن است در بیماری تاثیر داشته باشد که نیاز به بررسی بیشتر می‌باشد. به علاوه، به دلیل ازدواج‌های فامیلی ممکن است در بیماران جهش‌های هموزیگوت باعث بیماری شوند.

**واژگان کلیدی:** فردریش آتاکسیا، ژن FXN، PCR.

## مقدمه

فردریش آتاکسیا نوعی بیماری تخریب کننده عصبی است که به صورت اتوزومی مغلوب به ارث می‌رسد و علت آن نقص در مقدار پروتیین فراتاکسین است (۲۰۱). بروز بیماری در ۹۸-۹۶ درصد بیماران به علت گسترش تکرارهای سه نوکلئوتیدی GAA در هر دو آلل ژن FXN است (FRDA هموزیگوت) و تقریباً در ۴-۲ درصد موارد به علت گسترش تکرارهای سه نوکلئوتیدی GAA

در یکی از آلل‌های ژن FXN و موتاسیون نقطه‌ای در آلل دیگر این ژن است (هتروزیگوت مرکب) (۳). تکرارهای گسترده (گوانین، آدنین، آدنین) GAA در ژن FXN سبب ایجاد ساختار ثانویه در DNA شده که باعث مهار RNA پلی‌مراز و خاموشی ژن می‌گردد. در نتیجه از روی ژن FXN رونویسی نشده و به موجب آن مقدار پروتیین فراتاکسین کاهش می‌یابد (۴). سلول‌های عصبی و ماهیچه‌ای به کمبود فراتاکسین حساس هستند که منجر به بروز علائم FA می‌گردد. خصوصیات بالینی اصلی در بیماران شامل ناهماهنگی حرکتی دست‌ها و پاها، فقدان رفلکس اندام‌های تحتانی، کاهش حس تعادل، اختلال در تکلم،

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، مریم ناصرالاسلامی

(email: naseroleslami@gmail.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۸۹/۱۰/۲۸

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۰/۴/۲۷

اسکولیز و گودی کف پا است. آتروفی چشمی و کری نیز در برخی از بیماران مشاهده می‌شود. سن شروع معمولا در بلوغ است و چون این بیماری پیش‌رونده است و اندام‌ها را درگیر می‌کند تا سن ۲۰ سالگی نیاز به استفاده از ویلچراست (۵). تقریبا دوسوم افراد FRDA کاردیومیوپاتی دارند و بیشتر از ۳۰ درصد هم دیابت شیرین دارند (۶). ژن بیماری فردریش آتاکسیا FRDA (X25,FXN) به طور مستقیم در پاتوژنز بیماری دخالت دارد. این ژن حاوی ۷ اگزون است (۱، ۲، ۳، ۴، ۵a و ۵b) که ۴۰ kb طول دارد و در ناحیه ۱۲-۹q۱۳ قرار دارد. شایع‌ترین رونوشت آن از اگزون‌های ۵a-۱ به دست می‌آید که پروتئینی به نام فراتاکسین کد می‌کند (فراتاکسین انسانی پروتئین ۲۱۰ آمینواسیدی است) و اگزون ۶ غیر کدکننده است. محصول ژن FRDA بنام فراتاکسین در سلول‌های غنی از میتوکندری مانند کاربوسیت‌ها و نورون‌ها به مقدار زیاد بیان می‌شود (۷، ۸). قبل از آنکه تشخیص مولکولی وجود داشته باشد، شیوع آن ۱ در ۵۰۰۰۰ افراد سالم و شیوع ناقلین در حدود ۱:۱۱۰ تخمین زده می‌شد (۹). بسیاری از مطالعات اخیر براساس اطلاعات مولکولی شیوع بیشتری را پیشنهاد می‌کنند (۱۲-۱۰). بر اساس آزمایش ژن FRDA، میزان ناقلین در آلمان ۱:۶۰ تا ۱:۹۰ برآورد شد. شیوع بیماری در آسیا و آفریقا پایین‌تر است (۱۳). تا به حال ۱۷ جهش نقطه‌ای مرتبط با FRDA یافت شده است (۱۴، ۱۵). تاکنون هیچ بیمار هموزیگوتی که دارای جهش‌های نقطه‌ای باشد مشاهده نشده است (۱۳). از آنجایی که علائم بالینی بیماری‌های نورودژنراتیو از جمله آتاکسیا‌ها به هم شبیه است، پس تنها راه تشخیص صحیح بیماری‌ها انجام تست‌های مولکولی می‌باشد و از طرفی به دلیل الگوی متفاوت موارد نادر FRDA (۲ درصد) با موارد معمول (۹۸ درصد) در تست مولکولی این افراد FRDA تشخیص داده نمی‌شوند و تست‌های تشخیصی سایر بیماری‌هایی که از لحاظ فنوتیپی با این بیماری هم‌پوشانی دارند برای این بیماران پیشنهاد می‌گردد که به موجب آن هزینه و وقت بیشتری صرف می‌گردد. بدین منظور بر آن شدیم تا اگزون‌های ژن FXN را در افرادی که بر مبنای تست ژنتیکی انجام شده FRDA نبودند و تظاهرات بالینی شبیه افراد FRDA داشتند را به منظور یافتن موتاسیون نقطه‌ای بررسی کنیم.

## مواد و روشها

در این مطالعه توصیفی، ۵۰ فرد مشکوک به بیماری فردریش آتاکسیا که به مرکز بیماری‌های خاص مراجعه کرده بودند و شاخص‌های بالینی این بیماری را نشان می‌دادند انتخاب

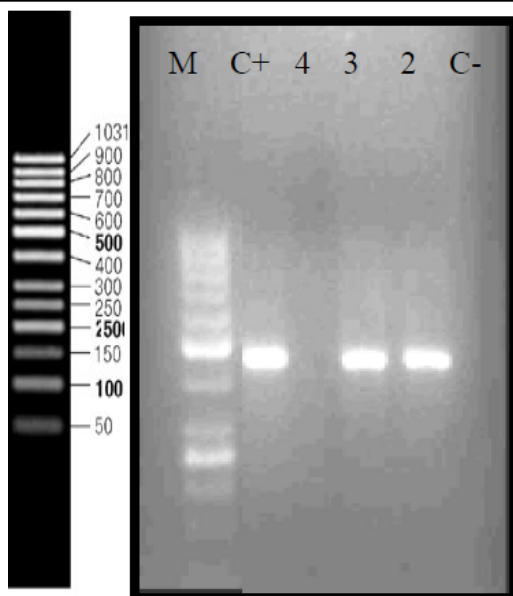
گردیدند. در مرحله بعد از خون این افراد با استفاده از کیت نمک اشباع و کیت کیا ژن DNA استخراج شد. سپس با استفاده از پرایمرهای —GAA-F۳-GGGATGGTCCAGTCTTAAAAGTTAG- و GAA-R ۳GATCAAGACCATCATGGCCACACTGCC- (مرحله دناتوراسیون اولیه ۹۵ به مدت ۵ دقیقه، مرحله دناتوراسیون ۹۴ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله اتصال ۶۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله طویل شدن ۷۲ درجه به مدت ۲ دقیقه، مرحله طویل شدن نهایی ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه) PCR گذاشته شد. برای انجام واکنش از ۲/۵ μl بافر ۱۰ x μl، ۰/۵ MgCl<sub>۲</sub> میلی‌مولار ۰/۵ μl، ۰/۵ dNTP، پرایمر ۰/۵ μl F و پرایمر ۰/۵ μl R، ۲ μl DNA، ۰/۱ μl Taq polymerase و ۱۷/۵ μl آب مقطر استفاده گردید.

به منظور کنترل و صحت انجام هر تست PCR از نمونه‌های کنترل منفی و مثبت استفاده گردید.

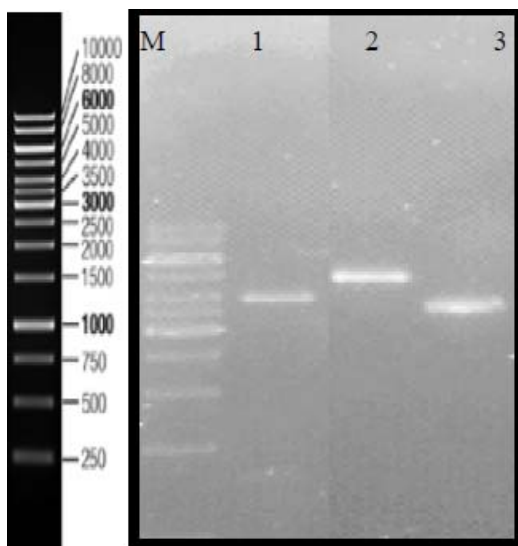
در مرحله بعد ۵ μl از محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد قرار داده شد و الکتروفورز با ولتاژ ۱۱۰ ولت به مدت ۳۰ دقیقه انجام گرفت. سپس برای بررسی افرادی که از محصول PCR بانندی مشاهده نشده بود، با استفاده از پرایمرهای Bam-R۳GGAGGGATCCGCTGGGCAAAGG- ۳CAATCCAGGACAGTCAGGGGCTTT- F -2500 و طبق برنامه حرارتی Long PCR گذاشته شد.

۲۰ سیکل بدین شرح انجام شد: مرحله دناتوراسیون اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله دناتوراسیون ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، مرحله اتصال و طویل شدن ۶۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲/۵ دقیقه. در ادامه ۱۷ سیکل بدین صورت انجام شد که مرحله دناتوراسیون ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، مرحله اتصال و طویل شدن ۶۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲/۵ دقیقه و در هر سیکل ۱۵ ثانیه به آن اضافه می‌شد. برای انجام واکنش از دو مخلوط استفاده شد. مخلوط اول شامل ۲/۵ μl بافر، ۱/۶ μl MgCl<sub>۲</sub>، ۰/۴ μl آنزیم، ۸ μl آب مقطر و مخلوط دوم شامل ۷/۹ μl آب مقطر، ۰/۵ μl dNTP، ۰/۸ μl پرایمر F، ۰/۸ μl پرایمر R و ۲/۵ μl DNA بود. سپس برای یافتن افراد FRDA هتروزیگوت (۲ درصد)، برای اگزون‌های ژن FXN با استفاده از پرایمرهای جدول ۱ PCR گذاشته شد.

برنامه حرارتی برای این PCR شامل مرحله دناتوراسیون اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله دناتوراسیون ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه، مرحله اتصال (برای اگزون ۲: ۵۶/۸، اگزون ۳: ۵۴، اگزون ۴ و ۵a: ۵۸ و اگزون ۵b: ۵۷) به مدت ۵۰ ثانیه، مرحله طویل شدن ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه و مرحله طویل شدن نهایی ۷۲



شکل ۱- تشخیص افراد بیمار از سالم: C- کنترل منفی، 2 و 3 افراد سالم، 4: فرد بیمار، C+: کنترل مثبت، M: مارکر مولکولی 50bp Fermentas



شکل ۲- M: مارکر مولکولی 1Kb Fermentas، 1 و 2 و 3 بیمار فردریش آتاکسیای هموزیگوت.

جدول ۲- نتایج بررسی اگزون‌های ژن FXN

تغییر	شماره اگزون	هموزیگوت هتروزیگوت	پلی مورفیسم	مکان
C۸۲۵۹۵۴G	۲	۷		اینترون
T۸۳۲۷۲۹C	۳	۳	۴	اینترون
-----	۴			اینترون
InsG۸۲۲۲۵	۵a			اینترون
-----	۵b			اینترون

درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه بود. مواد استفاده شده در این PCR شامل ۵  $\mu$ l بافر، ۰/۵  $\mu$ l  $MgCl_2$ ، ۰/۳  $\mu$ l Tag پلیمرز، ۰/۵  $\mu$ l dNTP و ۲  $\mu$ l DNA بود.

جدول ۱- پرایمرهای استفاده شده برای PCR اگزون‌های ژن FXN

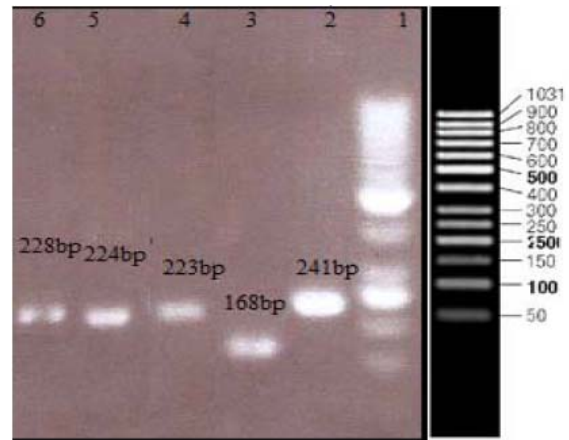
توالی	شماره اگزون
F: agtaacctacttcttaactttggc	۲
R: agaggaagatacctatcacctg	
F: aaaatggaagcatttgtaatca	۳
R: agtgaactaaaattcttagaggg	
F: aagcaatgatgacaaagtgtaac	۴
R: tggccacaatgtcacatttcgg	
F: ctgaagggtgtgctgtgga	۵a
R: tgtccttacaacggggct	
F: cccatgctcaagacatactcc	۵b
R: acagtaaggaaaaacaaacagcc	

## یافته‌ها

بیماران مشکوک به FRDA توسط PCR مورد بررسی قرار گرفتند که برای ۱۵ فرد باند نرمال گرفته نشد و برای ۳۵ فرد باند نرمال (حدود ۵۰۰ bp) گرفته شد. برای افرادی که باند نرمال داشتند ۲ حالت وجود داشت؛ یا این افراد از لحاظ بیماری فردریش آتاکسیا سالم بودند و یا از موارد نادر بیماری FRDA بودند که نیاز به بررسی بیشتری بود (شکل ۱). برای اطمینان از افرادی که باند نرمال نداشتند، Long PCR گذاشته شد که باندهای گسترش یافته برای این افراد مشاهده شد. پس این افراد FRDA هموزیگوت بودند که ۹۸ درصد موارد فردریش آتاکسیا را شامل می‌شود (شکل ۲). سپس برای بررسی بیشتر برای افرادی که باند نرمال داشتند، بر طبق نظر پزشک معالج (بر حسب علائم فنوتیپی) از میان ۳۵ نفر ۷ فرد انتخاب شدند و اگزون‌های ژن FXN در این افراد توسط PCR بررسی گردید (شکل ۳). در اگزون ۲ در تمام بیماران نوکلئوتید سیتوزین به گوانین به صورت هموزیگوت تغییر کرده بود (C۸۲۵۹۵۴G) و در اگزون ۳ در تمام بیماران در برخی به صورت هتروزیگوت و در برخی به صورت هموزیگوت نوکلئوتید تیمین به سیتوزین تغییر کرده بود (T۸۳۲۷۲۹C) و در اگزون ۵a اضافه شدن نوکلئوتید گوانین به شماره نوکلئوتید ۸۲۲۲۲۵ در تمام بیماران دیده شد. در بررسی اگزون ۴ و ۵b تغییری مشاهده نشد (جدول ۲، شکل ۴).

اکثر موارد مرگ در اثر نارسایی قلبی (کاردیومیوپاتی) می‌باشد (۴). FRDA بیشتر در جمعیت سفید پوستان دیده شده است. این طور پنداشته می‌شود که اکثر بیماران و ناقلین FRDA همگی دارای یک نسل مشترک از یک جمعیت اروپایی می‌باشند که حدود ۱۵۰۰ سال پیش می‌زیسته‌اند. به همین دلیل گستردگی و طولیل شدن ژن حامل پروتیین FRDA در بین جمعیت‌های آسیایی و آفریقایی زیاد گزارش نشده است (۹). البته تحقیقاتی در مورد FRDA در ایران و یا به عبارتی در خاورمیانه به جز تحقیقی که دکتر هوشمند و همکارانش در مورد تعیین تکرارهای ۳ تایی و بررسی تنوع D-Loop و dlision و جهش‌های میتوکندریایی در بیماران ایرانی انجام گرفته است، تا به حال صورت نپذیرفته است. در این مطالعه تغییراتی مشاهده گردید که همگی در ناحیه اینترونی بود و چون در این نواحی اسید آمینه کد نمی‌شود و از طرفی به نظر نمی‌رسد که این نواحی مربوط به ناحیه اسپیلیسینگ باشد و از طرفی چون این تغییرات در افراد غیربیمار هم دیده شده است. پس این تغییرات در کاهش پروتیین فراتاکسین و ایجاد بیماری نقش نداشتند.

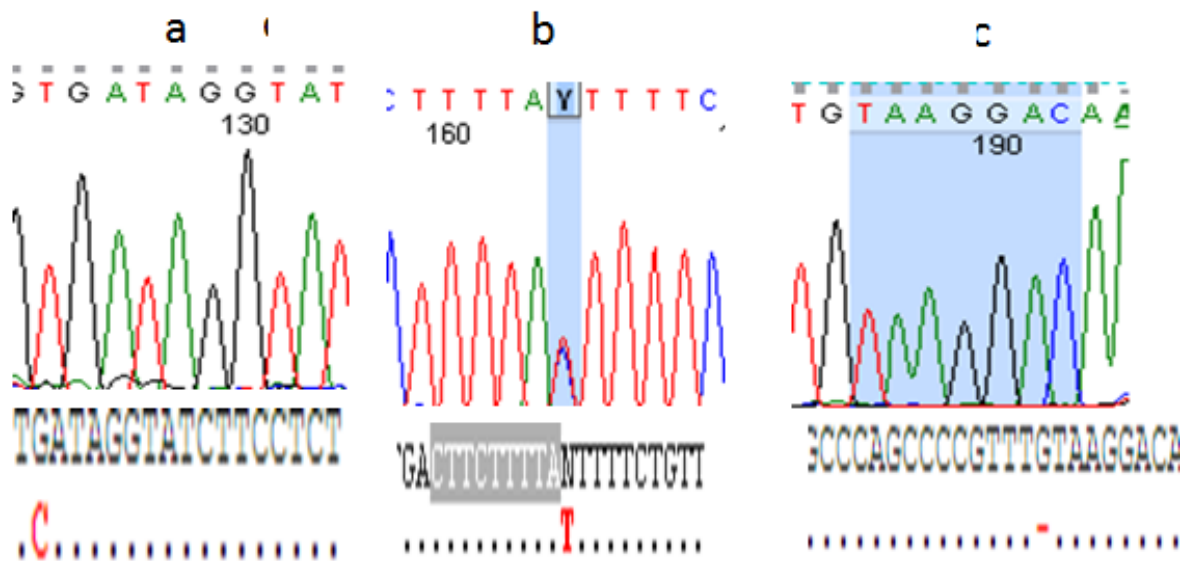
Cossee و همکاران در سال ۱۹۹۷ تغییر نوکلئوتید گوانین به تیمین را در اگزون ۱ مشاهده نمودند (MII) که سبب نقص در شروع ترجمه می‌گردد (۱۶). Gellera و همکاران در سال ۱۹۹۷ حذف نوکلئوتید گوانین را در اگزون ۱ مشاهده کردند که این تغییر در پایان ترجمه پروتیین فراتاکسین نقص ایجاد می‌کند (100delG) و در همان سال Gellera و همکاران حذف



شکل ۳- اگزون‌های ژن FXN. ۱: مارکر مولکولی 50bp، ۲: اگزون ۲، ۳: اگزون ۳، ۴: اگزون ۵a، ۵: اگزون 5b و ۶: اگزون ۳.

### بحث

FRDA شایع‌ترین نوع آتاکسیای ارثی است که به طور عمومی بررسی می‌شود و تقریباً ۵۰ درصد تمام آتاکسی‌های ارثی را تشکیل می‌دهد (۱). اکثر مطالعات روی این بیماری در اروپا و آمریکای شمالی صورت گرفته است. به طور متوسط از هر ۵۰۰۰۰ نفر حدود ۱ تا ۲ نفر دچار FRDA می‌شوند. آماری از افراد حامل و یا بیمار فردریش آتاکسیا در ایران موجود نیست. FRDA نوعی بیماری کند و پیش‌رونده است، به طوری که پس از ۱۵ سال از مشاهده اولین علائم، بیمار صندلی نشین شده و علائم روز به روز بدتر می‌شود و بیمار در سن متوسط ۳۷/۳ سالگی (انحراف معیار ۱۴/۴ سال) از بین می‌روند. در



شکل ۴- a: ترادف اگزون ۲ و تبدیل نوکلئوتید سیتوزین به گوانین، b: ترادف اگزون ۳ و تبدیل نوکلئوتید تیمین به سیتوزین، c: ترادف اگزون ۵a و اضافه شدن نوکلئوتید گوانین.

این تغییر نیز در پایان ترجمه پروتیین فراتاکسین نقص ایجاد می‌کرد (118delC) (۲۲).

McCormack و همکاران در سال ۲۰۰۰ تغییر نوکلئوتید گوانین به سیتوزین را در اینترون ۱ بررسی نمودند که باعث نقص در اسپلایسینگ می‌شد (Splice donor) (۲۳). Pook و همکاران در سال ۲۰۰۰، GTCA>TTG را در اگزون ۲ گزارش کردند که این تغییر نیز در پایان ترجمه پروتیین فراتاکسین نقص ایجاد می‌کرد (202GTCA→TTG) (۲۴). De Castro و همکاران در سال ۲۰۰۰ اضافه شدن نوکلئوتید تیمین را در اگزون ۳ گزارش کردند که این تغییر سبب پایان ترجمه پروتیین فراتاکسین می‌شد (297insT) (۲۵). Zühlke و همکاران در سال ۲۰۰۴ حذف اگزون 5a را گزارش کردند (g.120032\_1222808del) (۲۶).

بنابراین مطالعات نشان می‌دهند که بیشترین درصد موتاسیون در اگزون ۱ می‌باشد. لذا پیشنهاد می‌شود که در مطالعات، ابتدا اگزون ۱ در بیماران برای یافتن موتاسیون نقطه ای بررسی گردد.

### تشکر و قدردانی

از کارکنان و دانشجویان مرکز بیماری‌های خاص و شرکت ژن پژوهان پویا تقدیر و تشکر می‌شود.

نوکلئوتید سیتوزین را در اگزون ۱ مشاهده نمودند که این تغییر هم باعث اختلال در ترجمه پروتیین فراتاکسین می‌شود (104delC) (۱۷). Doudney و همکاران در سال ۱۹۹۷ تغییر نوکلئوتید آدنین به گوانین را در اینترون ۱ که در اسپلایسینگ نقص ایجاد می‌کرد را بررسی کردند (Splice donor) (۱۸). Forrest و همکاران در سال ۱۹۹۸ تغییر نوکلئوتید تیمین به گوانین را در اینترون ۴ مشاهده نمودند که باعث نقص در اسپلایسینگ شده بود (Splice donor) (۱۹).

Cossee و همکاران در سال ۱۹۹۹ تغییر نوکلئوتید آدنین به سیتوزین را در اگزون ۱ گزارش کردند (MIL) و در همان سال تغییر نوکلئوتید تیمین به سیتوزین را در اگزون ۱ مشاهده نمودند (MIT) که هر دوی این موتاسیون‌ها باعث نقص در شروع ترجمه می‌شد و همچنین در همان سال حذف نوکلئوتید سیتوزین را در اگزون ۱ مشاهده نمودند که این تغییر در پایان ترجمه پروتیین فراتاکسین نقص ایجاد می‌کرد (158delC) (۲۰). Potter و همکاران در سال ۲۰۰۰ تغییر نوکلئوتید گوانین به آدنین را در اگزون ۱ مشاهده نمودند که این تغییر در پایان ترجمه پروتیین فراتاکسین نقص ایجاد می‌کرد (MII) (۲۱). De Castro و همکاران در سال ۲۰۰۰ حذف نوکلئوتید سیتوزین را در اگزون ۱ مشاهده نمودند که

### REFERENCES

- Durr A, Cossee M, Agid Y. Clinical and genetic abnormalities in patients with Friedreich's ataxia. *N Engl J Med* 1996; 335: 1169.
- Harding AE. Friedreich's ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features. *Brain* 1981; 104: 589.
- Cossee M, Schmitt M, Campuzano V. Evolution of The Friedreich's ataxia trinucleotide repeat expansion: founder effect and permutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 7452-57.
- Castaldo I, Pinelli M, Monticelli A. DNA methylation in intron 1 of the frataxin gene is related to GAA repeat length and age of onset in Friedreich ataxia patients. *J Med Genet* 2008; 45: 808-12.
- Wood NW. Diagnosing Friedreich's ataxia. *Arch Dis Child* 1998; 78: 204-207.
- Al-Mahdawi S, Pinto RM, Ismail O. The Friedreich ataxia GAA repeat expansion mutation induces comparable epigenetic changes in human and transgenic mouse brain and heart tissues. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 735-46.
- Finocchiaro G, Baio G, Micossi P, Pozza G, di Donato S. Glucose metabolism alterations in Friedreich's ataxia. *Neurology* 1988; 38: 1292-96.
- Koutnikova IT, Campuzano V, Foury F, Dolle P, Cazzalini O, Koenig M. Studies of human, mouse and yeast homologues indicate mitochondrial function for frataxin. *Nat Genet* 1997; 16: 345-51.
- Harding AE, Zilkhak J. Pseudo-dominant inheritance in Friedreich's ataxia. *J Med Genet* 1981; 18: 285-87.
- Romeo G, Menozzi P, Ferlini A. Incidence of Friedreich's ataxia in Italy estimated from consanguineous marriages. *Am J Hum Genet* 1983; 35: 523-29.
- Filla A, Demichele G, Marconi R. Prevalence of hereditary ataxias and spastic paraplegias in Molise, a region of Italy. *J Neurol* 1992; 239: 351-53.

12. Epplen C, Epplen J, Frank G. Differential stability of the (GAA)<sub>n</sub> tract in The Friedreich's ataxia (stm7) gene. *Hum Genet* 1997; 99: 834-36.
13. Pandolfo M, Montermini L. Prenatal diagnosis of Friedreich's ataxia. *Prenat Diagn* 1998;18: 831-33.
14. Caron F, Jacq C, Ouviaere YJ. Characterization of histon-like protein extracted from yeast mitochondria. *Proc Sci USA* 1979; 76: 4265-69.
15. Foury F, Cazzalini O. Deletion of the yeast homologues of the human gene associated with Friedreich's ataxia elicits iron accumulation in mitochondria. *FEBS Lett* 1997; 411: 373-77.
16. Cossee M, Campuzano V, Koutnikova H, Fischbeck K, Mandel JL, Koenig M, et al. Frataxin fragas. *Nat Genet* 1997; 15: 337-38.
17. Gellera C, Pareyson D, Castellotti B, Mazzucchelli F, Zappacosta B, Pandolfo M, et al. Very late onset Friedreich's ataxia without cardiomyopathy is associated with limited GAA expansion in the X25 gene. *Neurology* 1997; 49: 1153-55.
18. Doudney K, Pook M, Al-Mahdawi S, Carvajal J, Hillerman R, Chamberlain S. A novel splice site mutation (384+1G-A) in the Friedreich's ataxia gene. *Mutat* 1997; 11: 415.
19. Forrest SM, Knight M, Delatycki MB, Paris D, Williamson R, King J. The correlation of clinical phenotype in Friedreich ataxia with the site of point mutations in the FRDA gene. *Neurogenetics* 1998; 1: 253-57.
20. Cossee M, Durr A, Schmitt M, Dahl N, Trouillas P, Allinson P, et al. Friedreich's ataxia: point mutations and clinical presentation of compound heterozygotes. *Ann Neurol* 1999; 45: 200-206.
21. Potter NT, Miller CA, Anderson IJ. Mutation detection in an equivocal case of Friedreich's ataxia. *Pediatr Neurol* 2000; 22: 413-15.
22. De Castro M, Garcia-Planells J, Monros E, Canizares J, Vazquez-Manrique R, Vilchez JJ, et al. Genotype and phenotype analysis of Friedreich's ataxia compound heterozygous patients. *Hum Genet* 2000; 106: 86-92.
23. McCormack ML, Guttman RP, Schumann M, Farmer JM, Stolle CA, Campuzano V, et al. Frataxin point mutations in two patients with Friedreich's ataxia and unusual clinical features. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000; 68: 661-64.
24. Pook M, Al-Mahdawi SAH, Thomas NH. Identification of three novel frameshift mutations in patients with Friedreich's ataxia. *J Med Genet* 2000; 37:e38.
25. De Castro M, Garcia-Planells J, Monros E, Canizares J. Genotype and phenotype analysis of Friedreich's ataxia compound heterozygous patients. *Hum Genet* 2000; 106: 86-92.
26. Zühlke CH, Dalski A, Habeck M, Straube K, Hedrich K, Hoeltzenbein M, et al. Extension of the mutation spectrum in Friedreich's ataxia: detection of an exon deletion and novel missense mutations. *Eur J Hum Genet* 2004; 12: 979-82.