



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA
DIPARTIMENTO DI NEUROSCIENZE
SETTORE SCIENTIFICO-DISCIPLINARE MED/20

DOTTORATO DI RICERCA IN NEUROSCIENZE

CICLO DEL CORSO DI DOTTORATO XXI

Titolo della tesi
STUDIO CLINICO E GENETICO-MOLECOLARE
IN PARAPARESI SPASTICHE EREDITARIE
AD ESORDIO PRECOCE

Pasqua Montieri

A.A. 2009/2010

Docente Guida/Tutor: Prof. Antonio Orlacchio

Coordinatore: Prof. Giorgio Bernardi

*"La leggerezza...si associa con la precisione e la determinazione,
non con la vaghezza e l'abbandono al caso"*
Italo Calvino
(Lezioni americane)

ABSTRACT

Le paraparesi spastiche ereditarie (HSPs) rappresentano un gruppo eterogeneo di disturbi neurologici con interessamento del motoneurone superiore (UMND) la cui caratteristica clinica prevalente è la spasticità e l'ipostenia piramidale degli arti inferiori.

HSP può essere classificata clinicamente in accordo alla modalità di ereditarietà, età di insorgenza o il fenotipo clinico. Questo disturbo è ereditato più spesso secondo la modalità autosomica dominante, meno frequentemente con ereditarietà autosomica recessiva e raramente secondo modalità di trasmissione X-linked.

Pochi studi epidemiologici sono stati condotti sulle HSPs, ma la prevalenza è stimata tra 3-10:100 000, di cui le forme di HSP ad ereditarietà autosomica dominante costituiscono circa l'80% dei casi nei paesi Occidentali (con le forme più comuni in *SPG4* e *SPG3A*). A dispetto di una eterogeneità genetica con 46 loci genetici (di cui 5 riservati) e 20 geni identificati, è più difficile separare le diverse entità nosografiche sul piano clinico. Questa uniformità fenotipica forse riflette un *pathway* finale comune nei processi della malattia da cui esita una degenerazione retrograda assonale dei tratti cortico-spinali e delle colonne posteriori. Studi recenti hanno permesso di identificare i geni di circa la metà di questi loci, suggerendo un'interruzione a più livelli come possibile causa di danno assonale: nel trasporto assonale e nella regolazione citoscheletrica, nelle funzioni mitocondriali, nel mantenimento e assemblaggio della mielina e nella migrazione neuronale.

Questo studio ha l'obiettivo di effettuare un'indagine genetico-molecolare di famiglie affette da forme ad esordio precoce di ADHSP, ARHSP e casi apparentemente sporadici, sia con fenotipo clinico "non complicato" che "complicato".

Uno studio di *linkage* a 2 punti è stato effettuato in una famiglia ADHSP per 8 loci noti autosomico dominanti (*SPG3A*, *SPG4*, *SPG6*, *SPG8*, *SPG10*, *SPG12*, *SPG13*, *SPG31*). I risultati indicano che il disturbo in questa famiglia era legato al locus noto *SPG3A*.

Attraverso il sequenziamento diretto degli esoni codificanti e delle regioni fiancheggianti gli introni del gene *SPG3A* è stata individuata una nuova mutazione missenso nell'esone 12 al nucleotide c.1246 C>T (p.R416C). La Arginina 416 è altamente conservata tra le specie.

Ho analizzato i 3 geni HSP ad esordio precoce, *SPG3A*, *SPG5A* and *SPG42*, attraverso l'analisi di sequenziamento diretto nel restante campione composto dai probandi di 9 famiglie non imparentate autosomico dominanti, 3 autosomico recessive e 18 pazienti con paraplegia spastica apparentemente sporadica, con forme pure e complesse di malattia.

L'analisi MLPA effettuata nei pazienti candidati per SPG3A (kit P165-HSP-B1, MRC-Holland) non ha individuato nessun cambiamento patogenetico.

Attraverso il sequenziamento diretto ho evidenziato cinque mutazioni, di cui tre nuove, una che segrega in due famiglie non imparentate e le altre in casi apparentemente sporadici. Quattro di queste mutazioni sono missenso: c.1246 C>T (p.R416C) e c.1243 C>T (p.R415W) nel gene *SPG3A*, c.995 T>C (p.F264S) e c.344C>T (p.S115F) nel gene *SPG5A*. Una è un'inserzione che esita in un *frameshift* con l'introduzione di uno stop prematuro al codone C-terminale della proteina: c.1362insT (p.A453CfsX470) nel gene *SPG5A*. Nessun cambio patogenetico è stato individuato nel gene *SPG42*.

È interessante che sia l'esordio precoce sia possibili fenomeni di anticipazione genetica siano stati osservati nelle due famiglie che presentano la mutazione p.R416C in *ATL1*.

Questi risultati confermano i dati osservati in letteratura per cui i geni *SPG3A* e *SPG5A* mostrano un'alta frequenza mutazionale nelle forme ad esordio precoce di ADHSP e ARHSP (rispettivamente il 20 e il 7%) e nei casi apparentemente sporadici.

ABSTRACT

The hereditary spastic paraplegias (HSPs) are an etiologically heterogeneous group of neurological disorders which results from the selective degeneration of upper motor neurons (UMNs), of which key diagnostic clinical findings are spasticity and pyramidal weakness of lower limbs.

HSP can be classified clinically according to mode of inheritance, age of onset or clinical phenotype. The disorder is inherited most often as an autosomal dominant trait, with autosomal recessive and X-linked inheritance occurring rarely and very rarely, respectively.

Few epidemiological studies of HSP have been done, but prevalence is estimated at 3–10 cases per 100 000 population in western countries, in which approximately ADHSPs account for 80% of all HSPs (with SPG4 and SPG3A being the most common forms).

Although genetically diverse with 46 genetic loci for HSP (of which 5 reserved) and 20 genes identified, it is often difficult to separate the disorders on clinical grounds. This phenotypic uniformity perhaps reflects a final common pathway in the disease process which results in degeneration of the corticospinal tracts and posterior columns. Advances in recent years identifying the genes at half of these loci have suggested that disruption in any of the following: axonal transport, cytoskeleton regulation, mitochondrial function, myelin maintenance and assembly and neuronal migration may cause axonal damage in HSP.

This study aims at genetic-molecular investigation of families affected by early onset forms of ADHSP, ARHSP, and apparently sporadic cases, as with “uncomplicated” or “complicated” clinical phenotype.

Two point linkage analyses were performed in a ADHSP family to 8 known autosomal dominant loci (SPG3A, SPG4, SPG6, SPG8, SPG10, SPG12, SPG13, SPG31). The data indicated that the disorder in this kindred was linked to the known HSP locus SPG3A.

Sequencing the *SPG3A* gene coding exons and flanking intronic regions disclosed a novel heterozygous missense mutation in exon 12 at nucleotide c.1246 C>T (p.Arg416Cys). The Arginine 416 is highly conserved among species.

I analysed the coding region and exon–intron boundaries of 3 “early onset” HSP genes, *SPG3A*, *SPG5A* and *SPG42*, by direct sequencing in a total serie of 9 unrelated autosomal dominant and 3 autosomal recessive hereditary spastic paraplegia index patients, and in 18 unrelated index patients with apparently sporadic hereditary spastic paraplegia, manifesting either pure or complex forms of the disease.

Multiplex ligation-dependent probe amplification performed in SPG3A candidate patients

(probe mixtures P165-HSP-B1, MRC-Holland, The Netherlands) did not detect any pathogenic changes.

By direct sequencing I identified five, including three novel, mutations, one segregating in two unrelated families, the others in apparently sporadic cases. Four of these mutations were missense: c.1246 C>T (p.R416C) and c.1243 C>T (p.R415W) in *SPG3A* gene, c. 995 T>C (p.F264S) and c.344C>T (p.S115F) in *SPG5A* gene. One resulted in a frameshift with the introduction of a premature stop codon at the C-terminal of the protein: c.1362insT (p.A453CfsX470) in *SPG5A* gene. Any pathogenic changes was detected in *SPG42* gene.

Interestingly, both early-age onset and possible anticipatory phenomena were observed in the two families showing mutation p.R416C in *ATL1*.

These results confirm data observed in literature according to which the *SPG3A* and *SPG5A* genes show an high mutational frequency in early onset forms of ADHSP and ARHSP (respectively 20% and 7%) and apparently sporadic cases.

INDICE

<i>Abstract</i>	Pag 3
1 – PARAPARESI SPASTICHE EREDITARIE (HSPs)	
1.1 <i>Classificazione</i>	Pag 9
1.2 <i>Epidemiologia</i>	Pag 16
1.3 <i>Aspetti clinici</i>	Pag 19
1.3.1 <i>I principali fenotipi SPG</i>	
1.3.2 <i>Diagnosi differenziale</i>	
1.3.3 <i>Studi in vivo e ex vivo</i>	
1.3.4 <i>Scala di valutazione funzionale (SPRS)</i>	
1.4 <i>Ipotesi sui meccanismi etiopatogenetici</i>	Pag 60
1.4.1 <i>Trasporto assonale e traffico di membrana</i>	
1.4.2 <i>Funzioni mitocondriali</i>	
1.4.3 <i>Mantenimento e assemblaggio della mielina e migrazione neuronale</i>	
1.4.4 <i>Altri meccanismi etiopatogenetici</i>	
1.4.5 <i>Modelli animali</i>	
1.5 <i>Forme ad esordio precoce per i geni analizzati</i>	Pag 82
1.5.1 <i>SPG3A</i>	
1.5.2 <i>SPG5A</i>	
1.5.3 <i>SPG42</i>	
2 - OBIETTIVI	Pag 88
3 - MATERIALI E METODI	
3.1 <i>Pazienti</i>	Pag 91

3.2	<i>Tecniche di laboratorio</i>	Pag 93
3.2.1	<i>Sequenziamento diretto DNA</i>	
3.2.2	<i>Linkage</i>	
3.2.3	<i>MLPA</i>	
3.3	<i>Analisi dei dati</i>	Pag 109
4 -	RISULTATI	
4.1	<i>Analisi del gene SPG3A</i>	Pag 111
4.2	<i>Analisi del gene SPG5A</i>	Pag 116
4.3	<i>Analisi del gene SPG42</i>	Pag 120
5 -	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	Pag 121
6 -	BIBLIOGRAFIA	Pag 124
7 -	APPENDICI	Pag 140
7.1	<i>Protocolli clinici</i>	
7.2	<i>Protocolli di laboratorio</i>	

Capitolo1 – PARAPARESI SPASTICHE EREDITARIE (HSPs)

1.1 *Classificazione*

Le paraparesi spastiche ereditarie (HSPs) sono disturbi mono-genici in cui gli assoni del tratto cortico-spinale o fallisce lo sviluppo normale o va incontro a una progressiva degenerazione.

Sono stati descritti modelli di ereditarietà autosomica dominante (ADHSP), autosomica recessiva (ARHSP), e X-linked recessiva nelle HSPs. ADHSPs sono più spesso “pure” in termini clinici, mentre le ARHSPs sembrano essere più complesse e associate con un’età di esordio più precoce. Ad oggi sono stati identificati circa la metà dei geni causativi, sono state osservate alcune sovrapposizioni nelle presentazioni cliniche, e una nuova classificazione sta ora emergendo dai dati molecolari e clinici.

La principale caratteristica clinica di tutte le HSPs è una paraparesi spastica bilaterale, simmetrica, lentamente progressiva. Clinicamente la maggior parte dei pazienti ha le stesse caratteristiche principali, che includono andatura spastica, ipertonìa dell’arto inferiore, risposta plantare in estensione, e ipostenia muscolare, e qualche volta questi si associano a diminuite pallestesie alle estremità distali, disfunzione vesicale, piede cavo o scoliosi. Quando questi segni sono le uniche caratteristiche cliniche, la malattia è descritta come “pura” o “non complicata”. Le forme “complicate” o “complesse” hanno segni o sintomi neurologici ed extraneurologici aggiuntivi, che comprendono ritardo mentale, atassia cerebellare, epilessia, neuropatia periferica, atrofia muscolare, atrofia ottica, retinite pigmentosa, sordità, ittiosi, cataratta.

A.E. Harding nel 1981 e in un successivo lavoro del 1983 ipotizza una classificazione in base alla presentazione clinica in forme di HSP pura o non, e in base all’età di esordio (con un *cut-off* intorno ai 35 anni di età).

Secondo la classificazione proposta da Harding la paraplegia spastica ereditaria pura (HSP) (*Strümpell disease*) implica la presenza di segni piramidali negli arti inferiori ma non esclude casi con riflessi tendinei aumentati, lieve danno dei movimenti rapidi alternanti, o amiotrofia distale lieve negli arti superiori. I nervi cranici e il linguaggio non sono interessati. Le HSP autosomiche dominanti comprendono sia forme ad esordio precoce che tardivo. Nei casi ad esordio precoce (prima dei 35 anni) è comune un ritardo motorio e la spasticità degli arti inferiori è più marcata dell’ipostenia; la disabilità è lentamente progressiva e molto variabile. Nel caso dell’esordio è tardivo (di solito sopra i 35 anni), l’ipostenia muscolare può esser marcata e i sintomi urinari sono frequenti, con una evoluzione più rapida.

Tutte le forme complicate di HSP sono indicate da Harding come rare.

Negli anni successivi numerosi studi hanno dimostrato che questa classica divisione delle HSPs in forme pure e complesse, ancora in uso nella pratica clinica, è imperfetta e richiede chiarificazioni attraverso migliori correlazioni fenotipo-genotipo. La scoperta di geni che sottendono geneticamente specifici sottotipi di HSP e la progressiva definizione dei fenotipi associati ha portato ad una rinnovata nosologia.

La paraplegia spastica ereditaria può essere classificata in base

- al *locus* HSP quando noto: sono stati assegnati i loci SPG da 1 a 46 seguendo l'ordine della loro scoperta (database HUGO Gene Nomenclature Committee, <http://www.genenames.org>, OMIM Online Mendelian Inheritance in Man, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>),

- secondo la modalità di ereditarietà: autosomica dominante, autosomica recessiva, e X-linked,

- secondo il fenotipo: HSP “non complicata” se la sindrome paraplegia spastica ricorre prevalentemente da sola, “HSP complicata” se presenta anomalie aggiuntive neurologiche o sistemiche.

In questa tesi ho scelto di classificare le HSPs secondo la numerazione progressiva dei diversi loci per le paraplegia spastiche (SPG) e di dividerle in quattro gruppi. Seguendo gli obiettivi di questo lavoro di tesi ho posto particolare attenzione all'età di esordio (AO= age of onset), stabilendo un cut-off intorno ai 20 anni:

- il primo gruppo (Tabella 1.1a) indica le forme di HSPs i cui i geni causativi sono stati identificati, in questo gruppo includo forme con un esordio esclusivamente precoce, e forme con un range di AO anche precoce, specificando per ciascuna forma l'età di esordio;

- il secondo gruppo (Tabella 1.1b) indica le forme di HSPs i cui i geni causativi sono stati identificati con un esordio prevalentemente o esclusivamente tardivo;

- il terzo gruppo (Tabella 1.2a) indica i loci mendeliani HSPs, per i quali le cause genetiche che sottendono non sono ancora note, in questo gruppo includo forme con un esordio esclusivamente precoce, e forme con un range di AO anche precoce;

- il quarto gruppo (Tabella 1.2b) indica i loci mendeliani HSPs, per i quali le cause genetiche che sottendono non sono ancora note, con un esordio prevalentemente o esclusivamente tardivo.

Tabella 1.1a. SPG secondo i geni causativi di HSP con “esordio precoce”*.

Loci genetici/ Cromosoma	Gene/ Proteina	Ereditarietà	Età di esordio (AO)	Caratteristiche cliniche associate	Riferimento
SPG1/Xq28	<i>LICAM/ L1</i> molecola di adesione cellulare	X-linked	Prima infanzia	Sindrome MASA (ritardo mentale, afasia, andatura spastica, pollice addotto), Sindrome CRASH (ipoplasia del corpo calloso, ritardo mentale, pollice addotto, paraplegia spastica e idrocefalo X-linked)	2006 Basel- Vanagaite, 1994 Jouet
SPG2/Xq22	<i>PLP1/</i> Proteolipoproteina 1	X-linked	Prima infanzia	HSP pura e complicata, con ritardo mentale e crisi epilettiche	2009 Hassen, 1994 Saugier- Veber
SPG3A/14q12- q21	<i>ATL1/</i> Atlastina 1	AD	Esordio precoce, prima dei 10 anni	HSP pura (preval.) e complicata (neuropatia assonale motoria e/o sensitiva)	2009 Salameh, 2009 Fusco, 2009 Svenstrup, 2009 Smith, 2009 de Leva, 2008 Haberlova
SPG5A/8q21.3	<i>CYP7B1/</i> Citocromo P450, famiglia 7, sottofamiglia B, polipeptide 1	AR	Esordio variabile (preval. adolescenti e giovani adulti)	HSP pura (preval.) e complicata (segni cerebellari dopo lunga durata di malattia)	2009 Goizet, 2009 Criscuolo, 2009 Biancheri, 2008 Tsaousidou, 2007 Klebe
SPG6/15q11.2- q12	<i>NIPAI/</i> Proteina 1 non imprinted nella regione della sindrome di Prader-Willi	AD	Esordio in adolescenza preval. (8-35 anni)	HSP pura	2009 Grzmil, 2006 Kaneko, 2005 Reed, 2003 Rainier, 1995 Fink
SPG10/12q13	<i>KIF5A/</i> membro 5A della famiglia delle kinesine	AD	Esordio variabile (preval. adolescenti e giovani adulti) (2-51 anni)	HSP pura e complicata, con neuropatia periferica, grave amiotrofia degli arti superiori (tipo Silver syndrome), deterioramento mentale, parkinsonismo, sordità e/o retinite pigmentosa	2009 Goizet, 2002 Reid
SPG11/15q21.1	<i>SPG11/KIAA1840/</i> Spatacsina	AR	Esordio variabile (dall’infanzia alla giovane età adulta) (1-27 anni)	assottigliamento del corpo calloso (HSP-TCC), deterioramento cognitivo e neuropatia	2009 Crimella, 2009 Anheim, 2008 Samaranch, 2008 Erichsen, 2008 Boukris, 2008 Stevanin
SPG15/14q24.1	<i>ZFYVE26/</i> Spastizina	AR	Esordio in adolescenza preval. (13-23 anni)	Sindrome di Kjellin, retinopatia pigmentosa, segni cerebellari, ritardo mentale, assottigliamento del corpo calloso (HSP- TCC)	2009 Goizet, 2009 Denora, 2008 Hanein, 2007 Elleuch
SPG17/11q12-q14	<i>BSCL2/</i> Seipina	AD	Esordio variabile (dall’infanzia alla giovane età adulta)	Sindrome di Silver, amiotrofia distale degli arti superiori>arti inferiori	2009 Brugman, 2009 Ito, 2008 Cafforio, 2007 Silver
SPG20/13q12.3	<i>SPG20/</i> Spartina	AR	Esordio in infanzia	Sindrome di Troyer, alta frequenza nella popolazione Old Order Amish, disartria, amiotrofia distale, ritardo mentale lieve, bassa statura	2009 Milewska, 2007 Bakowska, 2002 Patel
SPG22/Xq13.2	<i>SLC16A2/</i> Solute carrier family16, member 2	X-linked	Prima infanzia	Sindrome di Allan- Herndon-Dudley, ritardo mentale, ipotonia e atrofia muscolare, dimorfismi facciali	2004 Bohan e Azizi

SPG31/2p12	<i>REEP1</i> / Receptor expression-enhancing protein 1	AD	Prima e seconda decade nella maggior parte dei casi (distribuzione bimodale)	HSP pura	2009 Liu, 2008 Beetz, 2008 Schlang, 2006 Zuchner
SPG39/19p13	<i>PNPLA6</i> / Neuropathy target esterase	AR	Esordio in infanzia (2 famiglie note)	Marcata ipotrofia distale degli arti superiori e inferiori	2008 Rainier
SPG42/3q25.31	<i>SLC33A1</i> / Acetyl-CoA transporter	AD	Esordio variabile (prima e seconda decade preval.) (1 famiglia nota)	HSP pura	2008 Lin
SPG44/1q42.13	<i>GJA12/GJC2</i> / Connexina 47	AR	Prima e seconda decade (1 famiglia nota)	Disartria, atassia cerebellare e crisi epilettiche	2009 Orthmann-Murphy

* forme di HSP con un esordio esclusivamente precoce, e forme con un ampio range di AO anche in età pediatrica, specificando per ciascuna l'età di esordio;

Tabella 1.1b. SPG secondo i geni causativi di HSP con “esordio tardivo”.

Loci genetici/ Cromosoma	Gene/ Proteina	Ereditarietà	Età di esordio (AO)	Caratteristiche cliniche associate	Riferimento
SPG4/2p22	<i>SPAST/ Spastina</i>	AD	Esordio variabile	HSP pura (preval.)	2009 Svenstrup, 2009 Shoukier, 2009 Riano
SPG7/16q24.3	<i>SPG7/ Paraplegina</i>	AR	Esordio variabile	HSP pura e complicata, con atrofia ottica, atrofia corticale, segni cerebellari, neuropatia	2009 Martinelli, 2008 Arnoldi, 2008 Brugman
SPG8/8q24	<i>KIAA0196/ Strumpellina</i>	AD	In età adulta (<10 famiglie note)	HSP pura	2007 Valdmanis
SPG13/2q24-q34	<i>HSPD1/ HSP60/ Heat shock protein 60</i>	AD	In età adulta (<10 famiglie note)	HSP pura	2008 Hewamadduma, 2002 Hansen
SPG21/15q21-q22	<i>SPG21/ Maspardina</i>	AR	Esordio variabile (20-40 anni)	Sindrome di Mast, alta frequenza nella popolazione Old Order Amish, demenza, difetti dello sviluppo, assottigliamento del corpo calloso (HSP-TCC), segni cerebellari e extrapiramidali	2009 Hanna, 2003 Simpson

Tabella 1.2a. Loci SPG associati a HSP con “esordio precoce”*.

Loci genetici/ Cromosoma	Gene/ Proteina	Ereditarietà	Età di esordio (AO)	Caratteristiche cliniche associate	Riferimento
SPG9/10q23.3- q24.2	Sconosciuto	AD	Prima e terza decade con anticipazione (2 famiglie)	Cataratte congenite bilaterali, reflusso gastroesofageo, amiotrofia e neuropatia periferica	2008 Panza, 1999 Seri
SPG12/19q13	Sconosciuto	AD	Esordio precoce con anticipazione (<10 famiglie)	HSP pura	2002 Orlacchio, 2000 Reid
SPG16/Xq11.2	Sconosciuto	X-linked	Prima infanzia (1 famiglia)	Ritardo mentale, afasia, nistagmo, disturbi sfinterici	1997 Steinmuller
SPG18/8p12- p11.21 (?) RISERVATO	Sconosciuto	AR (?)	Prima infanzia (1 famiglia)	Ritardo mentale, agenesia e ipoplasia del corpo calloso (HSP-TCC), epilessia	Proposto da Al- Yahyaee, 2006
SPG23/1q24-q32	Sconosciuto	AR	Infanzia (1 famiglia)	Sindrome di Lison, anomalie pigmentarie cutanee, dimorfismi facciali e scheletrici, declino cognitivo, tremore	2003 Blumen
SPG24/13q14	Sconosciuto	AR	Infanzia (1 famiglia)	HSP complicata, disartria e segni pseudobulbari	2002 Hodgkinson
SPG26/12p11.1- q14	Sconosciuto	AR	Infanzia (2 famiglie)	Deficit cognitivo, neuropatia e atrofia distale	2005 Wilkinson
SPG28/14q21.3- q22.3	Sconosciuto	AR	Infanzia (1 famiglia)	HSP pura	2005 Bouslam
SPG29/1p31-p21	Sconosciuto	AD	Seconda-terza decade (1 famiglia)	Ipoacusia neurosensoriale, ernia iatale, piede cavo, iperbilirubinemia	2005 Orlacchio
SPG30/2q37	Sconosciuto	AR	Adolescenza (1 famiglia) (12-21 anni)	HSP complicata, segni cerebellari lievi, neuropatia periferica	2006 Klebe
SPG32/14q12-q21	Sconosciuto	AR	Infanzia (1 famiglia)	Ritardo mentale lieve, assottigliamento del corpo calloso (HSP-TCC), disrafismo a livello pontino	2007 Stevanin
SPG34/Xq24-q25	Sconosciuto	X-linked	Infanzia e tarda adolescenza (1 famiglia)	HSP pura	2008 Macedo- Souza 2002 Starling 1976 Zatz
SPG35/16q21-q23	Sconosciuto	AR	Infanzia (1 famiglia)	Deficit cognitivo, crisi epilettriche	2008 Dick
SPG36/12q23-q24	Sconosciuto	AD	Seconda-terza decade (1 famiglia)	HSP complicata, neuropatia periferica	2009 Schule
SPG38/4p16-p15	Sconosciuto	AD	Adolescenza e giovane età adulta (1 famiglia)	Amiotrofia distale (Sylver syndrome)	2008 Orlacchio
SPG41/11p14.1- p11.2	Sconosciuto	AD	Adolescenza (1 famiglia)	HSP pura	2008 Zhao
SPG45/10q24.3- q25.1	Sconosciuto	AR	Prima infanzia (1 famiglia)	Ritardo mentale, nistagmo, atrofia ottica	2009 Dursun

* forme di HSP con un esordio esclusivamente precoce, o con un ampio range di AO anche in età pediatrica, specificando per ciascuna l'età di esordio;

Tabella 1.2b. Loci SPG associati a HSP con “esordio tardivo”.

Loci genetici/ Cromosoma	Gene/ Proteina	Ereditarietà	Età di esordio (AO)	Caratteristiche cliniche associate	Riferimento
SPG14/3q27-q38	Sconosciuto	AR	Esordio variabile (1 famiglia)	Ritardo mentale, neuropatia motoria distale	2000 Vazza
SPG19/9q33-q34	Sconosciuto	AD	Età adulta (1 famiglia) (36-55 anni)	HSP pura	2002 Valente
SPG25/6q23-q24	Sconosciuto	AR	Età adulta (1 famiglia) (30-46 anni)	Erniazioni del disco spinale, cataratta, neuropatia	2002 Zortea
SPG27/10q22.1- q24.1	Sconosciuto	AR	Età adulta (1 famiglia)	HSP pura	2004 Meijer
SPG33/10q24.2 (?) RITIRATO da HGNC	Sconosciuto (proposto ZFYVE27)	AD	Età adulta (1 famiglia) (42-50 anni)	HSP pura	Proposto da Mannan 2006
SPG37/8p21.1- q13.3	Sconosciuto	AD	Età adulta (1 famiglia) (8-60 anni)	HSP pura	2007 Hanein
SPG40/? RISERVATO	Sconosciuto	AD	Oltre i 35 anni (1 famiglia)	HSP non complicata	Proposto da Subramony 2009
SPG43/19p13.11- q12 RISERVATO	Sconosciuto	AR	Riservato	Riservato	HGNC:35198
SPG46/? RISERVATO	Sconosciuto	AR	Riservato	Riservato	HGNC:37080

1.2 Epidemiologia

Benché le HSPs siano distribuite in tutto il mondo, pochi studi epidemiologici sono stati condotti su questi disturbi. La maggior parte sono stati condotti su popolazioni Europee e pochi su popolazioni Africane e Asiatiche.

Nella Tabella 3 sono riportati i principali studi sulle prevalenze di HSP i cui valori variano tra 1.3 e 10/100 000.

Tabella 1.3. Studi di prevalenza in HSP (adattata da Erichsen et al., 2009)

Riferimento	Paese	Popolazione dello studio	Strategia di ricerca	Diagnosi incluse	Numero dei soggetti affetti	Prevalenza complessiva	Prevalenza per HSP
Skre (1974)	Norvegia	725 000	Strategie di ricerca multiple	AD-HSP, AR-HSP	34	12.1 ^a	
Sridharan (1985)	Libia	519 000	Istituzioni sanitarie regionali	HA, AD-HSP, AR-HSP	25	4.8	2.1
Brignolio (1986)	Italia	2 327 996	Ospedale regionale	HA, AD-HSP, AR-HSP, HSP sporadici	142	6.1	1.3
Polo (1991)	Spagna	510 000	Ospedale regionale	HA, HSP (pure)	103	20.2	9.6
Filla (1992)	Italia	335 211	Indagine telefonica e per posta	HA, AD-HSP, AR-HSP	25	7.5	2.7
Hirayama (1994)	Giappone	123 000 000	Ospedali > 200 posti letto, indagine per posta	HA, HSP, MSA, atassia sporadica	5050 ^a	4.53 ^a	ND
Leone (1995)	Italia	115 270	Istituzioni sanitarie regionali	HA, AD-HSP, AR-HSP, HSP sporadici	17	14.8	4.3
Silva (1997)	Portogallo	250 061	Strategie di ricerca multiple	AD-HA, AR-HA, AD-HSP, AR-HSP	16	6.4	2
Mori (2001)	Giappone	613 349	Strategie di ricerca multiple	HA, HSP, MSA, atassia sporadica	109	17.8	ND
McMonagle (2002)	Irlanda	5 436 000	Strategie di ricerca multiple	AD-HSP	69		1.27
Tsuji (2007)	Giappone	ND	Ospedali > 200 posti letto, indagine per posta	HA, HSP, MSA, atassia sporadica	10487	18.5	ND
Erichsen (2009)	Norvegia	2 633 893	Strategie di ricerca multiple	HA, AD-HSP, AR-HSP, HSP sporadici	365	13.9	7.4
Braschinsky (2009)	Estonia	421.501	Ospedali regionali	HSP, HA, MS, PLS, SCA, PCI mielopatia cervicale	737		4.4
Boukris (2009)	Tunisia	869 700	Istituzioni sanitarie regionali	HSP	50		5.75

^a Estrapolazione.

ND= dato non disponibile

HA= atassia ereditaria; MSA= atrofia multi sistemica; MS=sclerosi multipla; SCA=atassia spinocerebellare; PCI= paralisi cerebrale infantile.

Le forme ADHSP sono le più frequenti nei paesi occidentali, dove rappresentano circa l'80% dei casi, mentre le forme ARHSP sono più comuni nelle popolazioni in cui esistono matrimoni tra consanguinei (Boukhris et al., 2009; Fink et al., 2006; Polo et al., 1991; Coutinho et al., 1999).

Di conseguenza la loro prevalenza varia in accordo alla origine etnica/geografica e al sottotipo considerato:

- da 1.3 a 9.0 casi su 100.000 per le ADHSP in Irlanda, in Portogallo, in Norvegia,
- da 0.6 in Norvegia a 9.0 casi su 100.000 per le ARHSP nel nordest del Portogallo,
- 1.3 casi su 100.000 per i casi sporadici di HSP in Norvegia.

Il tipo e le dimensioni delle popolazioni, i metodi nell'individuazione dei casi, la classificazione dei disturbi e le diagnosi di inclusione variano considerevolmente nei diversi studi epidemiologici, queste e altre differenze metodologiche, come la robustezza del campione, rendono difficile il confronto.

La dimensione della intera popolazione su cui viene condotto lo studio di prevalenza è di importanza fondamentale. Infatti molti dei primi lavori di prevalenza su HSP sono stati condotti su popolazioni troppo piccole rischiando di falsare i risultati. In un recente studio condotto da Erichsen et al., (2009) su una popolazione Norvegese, dall'analisi per la robustezza del campione è emerso che è necessaria una dimensione del campione di almeno 1.394.805, prima di definire l'area di studio per valutare una precisa prevalenza per queste malattie rare. L'importanza di questa condizione è illustrata dalle significative differenze nelle prevalenze trovate tra le varie contee in Norvegia (che variavano da 3.7 a 11.0 /100 000 per HSP) rilevate nell'ambito dello stesso studio. Questo studio è stato condotto durante l'arco di tempo di 6 anni (2002-2008) su una popolazione di origine caucasica.

Uno studio precedente condotto in Irlanda (McMonagle et al., 2002) indica una prevalenza di ADHSP pura marcatamente più bassa (1.17/100 000 vs 4.5/100 000) considerando metodi di determinazione dei soggetti e le condizioni geografiche e culturali compatibili con lo studio condotto in Norvegia. Una ragione per questa discrepanza potrebbe essere, come precisano gli stessi autori, nei metodi per l'individuazione dei casi.

La prevalenza complessiva più alta (18.5/100 000) è stata riportata in Giappone (Tsuji et al., 2008). Comunque questi studi includevano atassia sporadica, paraparesi spastica ereditaria e diagnosi di atrofia multi-sistemica. Questo dimostra quanto sia difficile confrontare prevalenze quando differiscono la classificazione e la diagnosi di inclusione (includere tutti i soggetti sporadici nella stima di prevalenza ne determina l'aumento).

Gli studi basati soprattutto sui pazienti dai centri diagnostici possono perdere dei soggetti e sottostimare la vera prevalenza (Silva et al., 1997). L'uso di strategie di ricerca multiple assicura l'inclusione di più soggetti.

I risultati dello studio condotto da Skre dalla Norvegia occidentale (Skre, 1974a) erano basati soltanto su criteri clinici, erano stati calcolati usando un metodo di estrapolazione ed erano basati su una popolazione limitata. Le differenze nel dato grezzo di prevalenza rispetto alla prevalenza estrapolata potrebbero essere soprattutto relative a differenze diagnostiche, mentre la consanguineità nella popolazione rende conto delle differenze tra i soggetti autosomici recessivi.

In uno studio condotto in Estonia dal 1981 al 2008 (Braschinsky et al., 2009), su un numero totale di 421.501 pazienti ospedalizzati sono stati valutati 737 pazienti sospetti, di cui 88 HSP probabili e 59 HSP inclusi in questo studio. Il tasso grezzo di prevalenza è di 4.4/100 000 per HSP identificate, di cui il 21.6% di tutti i pazienti HSP dell'Estonia hanno presentato mutazioni nel gene *SPG4*.

In uno studio condotto in Tunisia (Boukris et al., 2009), è stata stabilita una prevalenza di 5.75/100 000, di cui il 69% erano forme complicate e la modalità di ereditarietà quasi esclusivamente di tipo autosomico recessivo. Questo dato ha invertito la tendenza descritta per le popolazioni Occidentali. Lo studio è stato condotto in un arco di tempo di 17 anni (1990-2007), nel distretto di Sfax con una popolazione di 869.700 abitanti, di origine Araba, con un alto tasso di consanguineità in accordo con quello osservato nel resto del Nord Africa.

1.3 *Aspetti clinici*

Clinicamente la maggior parte dei pazienti con una **HSP pura** presenta le stesse caratteristiche principali, che includono andatura spastica, ipertonìa dell'arto inferiore, risposte plantari in estensione, ipostenìa muscolare, che possono essere associate a disfunzione vesicale urinaria, diminuite pallestesie e sensibilità cinestetica danneggiate o amiotrofia distale (per durata di malattia oltre i 10 anni), piede cavo o scoliosi. Un coinvolgimento importante degli arti superiori non è comune nelle HSP pure ma quando presente consiste in riflessi tendinei profondi scattanti e più raramente in un incremento del tono in senso spastico. Con il progredire della malattia la maggior parte dei soggetti manifesta una deambulazione marcatamente spastica e richiede un bastone, deambulatore o la sedia a rotelle per muoversi.

La disfunzione neurogena della vescica è frequente nei pazienti con HSP. Braschinsky et al. (2009) hanno proposto uno studio su 49 pazienti con HSP attraverso intervista anamnestica semi-strutturata, misurazione del volume residuo urinario (PVR) e valutazione urodinamica. La disfunzione urinaria si presenta in HSP con incontinenza (69.4%), esitazione (59.2%), incrementata frequenza di minzione (55.1%) e urgenza urinaria (51.0%). L'incompleto svuotamento vescicale è la più rara (36.7%). La più comune combinazione di sintomi è averli tutti (14.3%). Le donne hanno un più alto rischio di aumentare la frequenza di minzione.

Mentre in HSP pura la paraparesi spastica è la caratteristica prevalente, nelle **HSP complicate** la paraparesi spastica ricorre con una o più caratteristiche cliniche aggiunte che contribuiscono ad un fenotipo più ampio, che includono:

- amiotrofia
- disfunzioni cerebellari,
- sordità neurosensoriale,
- demenza,
- disfunzioni endocrine,
- epilessia,
- distonia,
- coreoatetosi,
- ittiosi,
- atrofia ottica,
- degenerazione retinica,
- neuropatia,
- cataratte,
- deformità scheletriche.

1.3.1 I principali fenotipi SPG

La sovrapposizione clinica tra la maggior parte delle HSP rende difficile prevedere il genotipo di un singolo paziente.

Esiste una notevole variabilità dell'età di esordio, della velocità di progressione, e della gravità, *inter e intra* familiare, nelle HSPs, soprattutto nelle ADHSPs. La penetranza di ADHSP pura può essere incompleta, o almeno età-dipendente. Varianti alleliche nei geni HSP possono modulare i fenotipi. Si consideri ad esempio l'andatura spastica associata con deficit cognitivo riportata in diverse famiglie SPG4, che ha suggerito che geni modificatori potrebbero interessare il fenotipo o la sua gravità. Pochi polimorfismi nel gene SPG4 di per sé (S44L, P45Q) sono stati riferiti modulare o attenuare la gravità di malattia, questi polimorfismi sembrano aumentare la stabilità delle isoforme di spastina e potrebbero perciò agire come deboli mutazioni in associazione con altre mutazioni SPG4 (Schickel et al., 2007). Oppure altro esempio è l'apparente incompleta penetranza in pazienti SPG3A e SPG4 che potrebbe essere spiegata da mutazioni de novo o mosaicismi gonadici (Depienne et al., 2007, Blair et al., 2007).

Forme autosomiche dominanti.

Sono note 19 forme HSPs autosomico dominanti (ADHSP). Sono stati identificati i geni causativi in 9 di esse:

19 ADHSP	- 9 ADHSP i cui geni sono noti	- "early onset"	- SPG3A (<i>ATL1</i>) - SPG6 (<i>NIPA</i>) - SPG10 (<i>KIF5A</i>) - SPG17 (<i>BSCL2</i>) - SPG31 (<i>REEP1</i>) - SPG42 (<i>SLC33A1</i>)
		- "late onset"	- SPG4 (<i>SPAST</i>) - SPG8 (<i>KIAA0196</i>) - SPG13 (<i>HSPD1/HSP60</i>)
	- 10 ADHSP di cui solo i loci noti	- "early onset"	- SPG9 - SPG12 - SPG29 - SPG36 - SPG38 - SPG41
		- "late onset"	- SPG19 - SPG33 - SPG37 - SPG40

ADHSPs “early onset” di cui sono noti i geni:

SPG3A (ATL1).

Essendo questa forma oggetto di studio in questa tesi si rimanda al paragrafo 1.5.1 per una descrizione più dettagliata.

SPG6 (NIPA).

Il fenotipo della HSP associata a *SPG6* è riportato come una forma pura di ADHSP che progredisce lentamente, ma può diventare grave. L'età di esordio di *SPG6* tende ad essere nella maggior parte dei casi in adolescenza o in età adulta precoce, estendendosi da 8 a 35 anni di età. La penetranza è età dipendente ed è alta. Kaneko et al. (2006) hanno individuato una famiglia Giapponese con mutazione in *NIPA* con una forma pura e primi sintomi di esordio già in adolescenza, con anticipazione rispetto ai familiari affetti. Rainer et al. (2003) hanno descritto una famiglia positiva per mutazione in *NIPA1*, unica su un campione di 81 famiglie, con esordio in tarda adolescenza, con la stessa mutazione di una famiglia precedentemente associata al locus *SPG6* (Fink et al., 1995) e hanno ipotizzato che *SPG6* non fosse una forma frequente di HSP. Reed et al. (2005) in una ampia famiglia Britannica con epilessia, danno cognitivo e tremore posturale hanno individuato individui affetti con esordio intorno ai 16 anni. Il locus *SPG6* si estende in una regione di 6.1 centiMorgan tra D15S128 e il centromero (Rainier et al., 2000), un intervallo spesso coinvolto in delezioni che esitano nella sindrome di Prader-Willi (PWS) o nella sindrome di Angelman (AS). PWS e AS sono caratterizzate da imprinting genetico, un fenomeno in cui l'espressione del gene e il fenotipo dipendono dal sesso del genitore che trasmette (Nicholls e Knepper, 2001). La proteina NIPA è espressa ubiquitariamente a bassi livelli ma mostra un'espressione significativamente più alta nei tessuti del sistema nervoso centrale (Rainer et al., 2003). *NIPA1* possiede 9 domini trans membrana e probabilmente funziona come un recettore di membrana o trasportatore del magnesio (Reed et al., 2005). Mutazioni missenso sono state descritte negli esoni 1 e 3; tali mutazioni potrebbero interrompere i domini transmembrana (Rainier et al., 2003; Reed et al., 2005). Queste mutazioni sono probabilmente patogenetiche attraverso un meccanismo dominante negativo, con acquisto di funzione. Le delezioni di Classe I (che coinvolgono la regione imprinted più le regioni non imprinted) in *NIPA1* danno luogo a sindrome di Prader-Willi o Angelman. Nessuno di questi disturbi causa una paraparesi spastica progressiva, indicando che l'aploinsufficienza di *NIPA1* non è il meccanismo patogenetico in *SPG6*.

SPG10 (KIF5A).

Casi di HSP associati con *KIF5A* (SPG10) sono stati inizialmente riportati solo in HSP pure ad esordio precoce. Più recentemente sono state riportate mutazioni nel 10% dei casi di HSP complicate in pazienti di origine Europea (Reid et al., 2002; Goizet et al., 2009). Il gene al locus SPG10 è stato identificato come *KIF5A* nel 2002 (Reid et al., 2002). Due famiglie sono state identificate con mutazioni in questo gene hanno mostrato un fenotipo puro HSP con un esordio giovanile in infanzia o negli anni dell'adolescenza (Fichera et al., 2004), una famiglia è stata legata al locus SPG10 in cui nessuna mutazione nel gene *KIF5A* è stata identificata (Reid et al., 2002). Il fenotipo in questa famiglia era differente, avendo un esordio in età adulta molto più avanzata, con una età media di esordio di 30 anni. Inoltre i membri più anziani presentavano amiotrofia in aggiunta alla paraparesi spastica (Ashley-Koch et al., 2001).

Le mutazioni descritte sono missenso ed interessano il dominio di legame dei microtubuli della kinesina.

SPG17 (BSCL2).

Mutazioni in *BSCL2* causano una forma complicata di HSP che è caratterizzata da amiotrofia dei piccoli muscoli delle mani e dei piedi con esordio dai primi 10 anni ai 30 anni di vita (Silver Syndrome). Il gene mutato al locus SPG17 identificato come *BSCL2* era stato identificato in 4 famiglie non consanguinee (Windpassinger et al., 2004). Il fenotipo di SPG17 complicato con amiotrofia distale che co-segrega con la paraparesi spastica era stato inizialmente descritto da Silver (1966) in due famiglie. Questo fenotipo complicato di HSP è riportato come Silver syndrome e diversi casi sono stati descritti negli anni successivi (Patel et al., 2001; Windpassinger et al., 2003, 2004; Warner et al., 2004). In tre famiglie riportate in *linkage* con SPG17, l'età di esordio dei sintomi varia da 8 a 63 anni. Gli individui asintomatici descritti in queste famiglie sono suggestivi di ridotta penetranza. L'amiotrofia ricorre in maniera predominante nelle mani o nei muscolo peronieri, benché il primo caso sia il più comune. Nelle mani i muscoli dell'eminanza thenar e i primi interossei dorsali tendono ad essere interessati preferenzialmente, inoltre deformità del piede, più comunemente piede cavo, sono stati frequentemente descritti. Osservazioni meno frequenti sono stati disturbi vescicali e diminuzione delle pallestesie, osservati più spesso in individui con più lunga durata di malattia. La progressione in queste famiglie è stata lenta nel corso di molte decadi.

La mutazione missenso in eterozigosi N88L in *BSCL2* è anche associate con la neuropatia ereditaria distale motoria di tipo V (dHMNV) in cui, come nella *Silver syndrome*, si osserva ipotrofia e ipostenia predominante della mano. Mutazioni nel gene *BSCL2* sono esemplificative

di fenotipi sovrapposti prodotti da un unico difetto genico: causano la paraplegia spastica ereditaria SPG17, HMN di tipo V, e la lipodistrofia congenita di Berardinelli-Seip, autosomica recessiva. Le mutazioni nulle in BSCL2 portano alla lipodistrofia congenita di tipo 2 di Berardinelli-Seip ed è stato ipotizzato che un meccanismo di guadagno di funzione sottenda la degenerazione del motoneurone in SPG17. Inoltre SPG17, è clinicamente sovrapponibile con la malattia di Charcot-Marie-Tooth sottotipo 4D, una neuropatia motoria periferica. Questo suggerisce che Silver syndrome e dHMNV siano fenotipi estremi dello stesso disturbo.

SPG31(REEP1).

Le mutazioni nel gene codificante la proteina mitocondriale REEP1 portano ad una forma pura di HSP con una età di esordio variabile. La maggior parte dei pazienti SPG31 ha un esordio nella prima e seconda decade, ma circa il 15% dei pazienti presenta un'età di esordio oltre i 30 anni, mostrando una distribuzione bimodale (Beetz et al., 2008). Le mutazioni nel gene *REEP1* sono state identificate nel 3% di un campione di pazienti non consanguinei con HSP, che aumentava all'8,2% nelle HSP pure in cui erano state escluse mutazioni in *SPG3A* e *SPG4*. Nello studio condotto da Zuchner et al. (2006), oltre alle mutazioni convenzionali, sono state identificate mutazioni che interessano i siti di riconoscimento per microRNA nella regione 3'UTR che potrebbero alterare la stabilità degli mRNA.

SPG42 (SLC33A1).

Essendo questa forma oggetto di studio in questa tesi si rimanda al paragrafo 1.5.3 per una descrizione più dettagliata.

ADHSPs "late onset" di cui sono noti i geni:

SPG4 (SPAST).

L'HSP associata a *SPG4* è il tipo più comune di HSP pura autosomica dominante, che comprende circa il 40-45% dei casi di ADHSP ed è la forma che è stata studiata clinicamente più in dettaglio.

Mutazioni puntiformi in *SPG4* sin dai primi studi era stato stimato costituissero circa il 40% delle HSPs pure autosomiche dominanti (Hazan et al., 1999; Fonknechten et al., 2000), una proporzione che era stata rivalutata al 15%-25% in studi successivi che includevano più ampi campioni di pazienti, in cui venivano descritte ampie delezioni non individuabili attraverso metodi standard in *SPG4* (Beetz et al., 2006). La recente introduzione della tecnica MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification), per individuare riarrangiamenti che

coinvolgono uno o più esoni che di solito non vengono viste con le tecniche standard, ha dimostrato che le delezioni di esoni in *SPG4* sono una causa frequente di malattia. Esse costituiscono il 20% dei pazienti che sono negativi per mutazioni puntiformi (Depienne et al., 2007). La frequenza complessiva delle mutazioni in *SPG4* è perciò di nuovo vicina al 40%.

Le mutazioni in *SPG4* sono associate con un fenotipo puro HSP che consiste in un esordio in età adulta di paraparesi spastica progressiva. L'età di esordio varia grandemente non solo tra famiglie, ma anche dentro la stessa famiglia, spaziando tra l'infanzia e l'ottava decade. Penetranza incompleta o età dipendente è stata osservata in diverse famiglie con individui settantenni, portatori obbligati di mutazione, asintomatici (Fonknechten et al., 2000; Qin et al., 2003). La maggior parte degli individui affetti conserva l'abilità di deambulazione autonoma o con minimo supporto, sono stati descritti pazienti ai due estremi, da asintomatici o paucisintomatici fino a molti gravi, su sedia a rotelle o allettati. In alcune famiglie si è tentato di fornire una spiegazione per questa variabilità (Chinnery et al., 2004; Svenson et al., 2004). Sono state riportate famiglie in cui due mutazioni che segregano indipendentemente nel gene della spastina sono presenti. In una famiglia il cambio missense S44L segrega indipendentemente con il cambio missense P361L (Chinnery et al., 2004). Il probando ha un fenotipo grave di HSP pura con esordio in infanzia, la cui madre è clinicamente non affetta ma portatrice del cambio P361L. Il nonno materno del probando è eterozigote per P361L e clinicamente mostra un fenotipo puro HSP con grave spasticità. Il padre del probando che porta la mutazione S44L non manifesta alcuna difficoltà nella deambulazione ma all'esame clinico è chiaramente affetto. Ulteriori famiglie sono state descritte in cui S44L e P45Q segregano indipendentemente con D470V e R526G, rispettivamente (Svenson et al., 2004). Gli individui con entrambe le mutazioni hanno una più giovane età di esordio in confronto ai membri della famiglia con solo una mutazione. Nel caso della famiglia S44L/D470V un fenotipo più grave ad esordio infantile è osservato quando entrambe le mutazioni occorrono in un individuo, con caratteristiche addizionali in qualcuno che includono progressivo deterioramento cognitivo e grave perdita del sensorio. È discusso se i cambi missense S44L e P45Q siano patogenetici di per sé o semplicemente agiscano come modificatori del fenotipo nel contesto di un'altra mutazione della spastina (McDermott et Shaw, 2007). Il raro polimorfismo della spastina Ser44Leu, che è presente approssimativamente nell'1%-2% della popolazione è stato associato con un precoce esordio di malattia (Svenson et al., 2004).

Non c'è alcuna caratteristica specifica tra i sintomi e i segni osservati nel fenotipo puro associato con mutazione in spastina nel confronto con altre cause di HSP pura. Combinando le osservazioni di più lavori clinici pubblicati, caratteristiche addizionali alla HSP pura includono:

riflessi profondi scattanti nelle braccia (39%), tono aumentato nelle braccia (25%), pallestesie diminuite negli arti inferiori (46%), piede cavo (43%), disturbi sfinterici (45%) e amiotrofia (10%) (McDermott e Shaw, 2007).

Benchè il fenotipo comune associato con la spastina mutata sia la HSP pura, esistono molti lavori che descrivono fenotipi clinici complicati. La più comune caratteristica che complica il fenotipo SPG4 è il danno cognitivo e anche la franca demenza (Murphy et al., 2009). In tre famiglie che presentavano SPG4 associata a demenza le caratteristiche cliniche erano piuttosto differenti (Heinzlef et al., 1998; Webb et al., 1998; White et al., 2000). In una famiglia francese riportata da Heinzlef et al (1998), una demenza con caratteristiche corticali era stata vista in un membro della famiglia, sebbene il danno cognitivo fosse stato descritto in altri membri della famiglia. In una famiglia descritta da Webb et al. (1998), un membro era morto di demenza all'età di 62 anni, mentre altri membri della famiglia erano risultati affetti da demenza subcorticale alla valutazione neuropsicometrica. White et al. (2000) hanno riportato un caso indice con una demenza rapidamente progressiva con cambi extrapiramidali in età anziana e caratteristiche neuropatologiche insolite. Due membri della famiglia avevano danni nella memoria e uno aveva difficoltà di apprendimento borderline. In tutte e tre le famiglie la natura dell'associazione di demenza con la paraparesi spastica non è chiara data la variazione intrafamiliare osservata in ciascun *pedigree*. Il ricorrere di demenza in queste famiglie potrebbe risultare direttamente dall'espressione della proteina spastina mutata o semplicemente essere un fenomeno occasionale. A supporto del ruolo della spastina mutata nello sviluppo di demenza, McMonagle et al. (2000) ha supportato evidenza di danno cognitivo subclinico in HSP pura causata da mutazioni in spastina. Il danno cognitivo è frequentemente presente nell'HSP associato a mutazioni nel gene *SPG4*, quando specificamente individuato con test neuropsicometrici, e può anche anticipare l'insorgenza di paraparesi spastica (Byrne et al., 2000). Recentemente lo stesso gruppo ha trovato un declino cognitivo progressivo in un gruppo di pazienti con SPG4 provenienti da tre famiglie, seguito per un periodo di tre anni, con 7 di 11 pazienti che hanno sviluppato demenza di gravità lieve o moderata (McMonagle et al., 2004). Non è stata osservata una chiara correlazione fenotipo-genotipo nelle famiglie in cui il danno cognitivo è riportato, sono state descritti cambi missenso in differenti posizioni nel gene e una mutazione tronca.

Esistono molti lavori clinici che riportano sintomi e segni clinici addizionali in pazienti con HSP correlata a mutazioni nel gene *SPG4*. Questi includono epilessia (Heinzlef et al., 1998; Mead et al., 2001; Meijer et al., 2002; Orlacchio et al., 2004), disfunzioni erettili (De Bantel et al., 2001), amiotrofia (Lindsey et al., 2000; Falco et al., 2004; Tang et al., 2004), disturbo del

sensorio (Svenson et al., 2004), costipazione (Namekawa et al., 2001), sclerosi multipla (Mead et al., 2001), assottigliamento del corpo calloso (Orlacchio et al., 2004b), equinismo di sospensione (piede cadente) (Meijer et al., 2002) e segni cerebellari (Meijer et al., 2002; Proukakis et al., 2002; Nielsen et al., 2004a; Tang et al., 2004). È stata descritta un'interessante famiglia complicata con il cambio missense T614I che manifesta paraparesi spastica con cisti aracnoidi congenite e piede cavo in tutti gli individui affetti (Orlacchio et al., 2004).

Sono stati identificati riarrangiamenti genomici in *SPG4* che, insieme con le mutazioni puntiformi, costituiscono approssimativamente il 40% dei casi (Depienne et al., 2007; Mitne-Neto et al., 2007).

Più spesso c'è una chiara storia familiare autosomica dominante, ma mutazioni in spastina sono anche state descritte in pazienti con una paraparesi spastica apparentemente sporadica (Lindsey et al., 2000; Sauter et al., 2002; Falco et al., 2004). Le mutazioni note in *SPG4* sono localizzate sull'intero gene senza nessun *hotspot* identificato. È stata identificata anche una mutazione nel 5'UTR causativa di HSP in una famiglia (Iwanaga et al., 2005).

Tra le mutazioni in *SPG4*, le mutazioni tronche sono molto comuni e dovrebbero portare a perdita di tutta la proteina o parte della *AAA box*, regione altamente conservata. Anche mutazioni nel sito di *splicing* sono piuttosto comuni e la maggior parte di queste interessano lo *splicing* degli esoni dentro la *AAA box*. E' dimostrato che i trascritti tronchi o *mis-spliced* sono instabili, portando a ridotta o assente traduzione dell'allele mutato. La maggior parte delle mutazioni missenso cade dentro la *AAA cassette* (McDermott e Shaw, 2007).

L'ampiezza delle mutazioni descritte in spastina suggerisce che l'aploinsufficienza è il meccanismo patogenetico più probabile. Inoltre la presenza di trascritti tronchi instabili, proteine mutate tronche e mutazioni con perdita di funzione supportano l'idea di una soglia dinamica per i livelli di spastina che porterebbe allo sviluppo di un fenotipo HSP (Burger et al., 2000; Svenson et al., 2001; Patrono et al., 2002). Al contrario di ciò, la stabilità di trascritti mutati missenso, l'anomala interazione di spastina mutata missenso con i microtubuli e un lavoro su *Drosophila* (Sherwood et al., 2004; Trotta et al., 2004) suggeriscono che anche un effetto negativo dominante o guadagno di funzione potrebbero essere meccanismi patogenetici (Errico et al., 2002; Molon et al., 2003; McDermott e Shaw, 2007).

SPG8 (KIAA0196).

Valdmanis et al., (2007) hanno identificato il gene responsabile per SPG8, una forma pura di ADHSP. Gli autori hanno identificato mutazioni missenso nell'8% dei pazienti appartenenti a 6 famiglie, per due delle varianti patologiche non hanno potuto riprodurre il fenotipo di modelli

knockdown di zebrafish SPG8. Tre famiglie associate a questo locus hanno mostrato un fenotipo HSP puro (Hedera et al., 1999; Reid et al., 1999; Rocco et al., 2000). L'esordio della malattia tende a manifestarsi in età adulta spaziando dai 18-60 anni nelle famiglie pubblicate. Oltre che una spasticità più grave e ridotte pallestesie, non ci sono altre chiare differenze tra un fenotipo puro di HSP a questo locus rispetto ad altri loci puri ADHSP.

SPG13 (HSPD1/HSP60).

Il gene al locus SPG13 è stato identificato come una chaperonina mitocondriale Hsp60 (heat shock protein 60) (Hansen et al., 2002). La HSP associata a mutazioni in questo gene si manifesta con esordio tardivo, senza caratteri aggiuntivi.

La variante missenso Gly563Ala è stata recentemente descritta in pazienti con mutazione patogenetica in *SPG4*, associata ad un'età di esordio molto precoce, benché non sia patogenetica di per sé (Hewamadduma et al., 2008). Un altro cambio aminoacidico Asp29Gly nella proteina HSPD1 è stato riportato in una genia beduina israelitica causativo di malattia tipo Pelizaeus-Merzbacher fatale neurodegenerativa ad esordio molto precoce se presente in stato omozigote (Magen et al., 2008). Una famiglia identificata con una mutazione in *SPG13* con una forma pura di HSP è stata descritta con un'età media di esordio di 39 anni (range 17-68) (Fontaine et al., 2000). Un confronto è stato fatto con un gruppo di pazienti con *SPG4* e si è visto che gli individui affetti da *SPG13* hanno una maggiore frequenza di grave handicap funzionale (McDermott e Shaw, 2007). Hsp60 è coinvolta nel garantire un corretto *folding* proteico nei mitocondri e sembra probabile che un'interruzione nella sua funzione porterebbe ad un danno nella biogenesi mitocondriale. La mutazione V72I in *SPG13* identificata in una famiglia, è stata dimostrato alterare la crescita cellulare di *E.coli* in cui gli omologhi geni sul cromosoma groESgroEL sono stati deleti (Hansen et al., 2002).

ADHSPs "early onset" di cui sono noti solo i loci:

SPG9.

Sono state descritte due famiglie in *linkage* al locus SPG9. Una famiglia italiana è stata riportata in cui il fenotipo è complicato da cataratta, reflusso gastroesofageo con vomito e amiotrofia (Seri et al., 1999, Panza et al., 2008). Una famiglia Britannica è stata descritta con cataratta, difficoltà di apprendimento e anomalie scheletriche (Slavotinek et al., 1996; Lo Nigro et al., 2000). In entrambe le famiglie è stata identificata una neuropatia motoria prevalentemente assonale come causa della amiotrofia. L'età di esordio spazia dal primo anno di vita alla quarta

decade, soprattutto con esordio nella prima e terza decade, con anticipazione genetica nelle generazioni successive.

SPG12.

Due famiglie numerose sono state riportate in *linkage* con il *locus* SPG12 (Reid et al., 2000; Orlacchio et al., 2002), con età di esordio precoce. La progressione di malattia è rapida con il 75% di una delle famiglie che richiedeva il costante uso della sedia a rotelle entro i 4 anni dall'esordio della malattia. È stata descritta anticipazione nelle generazioni successive.

SPG29.

Orlacchio e coll. (2005) hanno descritto due famiglie di discendenza Scozzese in cui 19 membri presentavano una paraplegia spastica autosomica dominante con fenotipo complicato. L'età media all'esordio è di circa 15 anni, la maggior parte dei pazienti mostra spasticità e iperiflessia degli arti inferiori con risposte plantari in estensione. Due pazienti hanno iperiflessia degli arti superiori. Altre caratteristiche che complicano il fenotipo sono ipoacusia neurosensoriale, piede cavo, clono, e iperbilirubinemia neonatale con kernicterus, urgenza urinaria dovuta a iperattività del muscolo detrusore. Tredici pazienti mostrano ernia iatale. È stata descritta più precoce età di esordio e crescente grado di disabilità nelle generazioni successive.

SPG36.

Schule e coll. (2009) hanno descritto una famiglia Tedesca che presenta paraplegia spastica autosomica dominante complicata da neuropatia periferica. L'età media di esordio della malattia è intorno ai 24 anni (14-33 anni). Il fenotipo include andatura spastica, spasticità, ipostenia agli arti inferiori e risposta plantare in estensione, inoltre gli individui affetti mostrano anche alle estremità inferiori deficits sensitivi con diminuite pallestesie, coinvolgimento della sensibilità tattile, cinestetica e della discriminazione termica, suggerendo una demielinizzazione di tipo piramidale, che è confermata da studi neurofisiologici. Due pazienti mostrano piede cavo, e due sono divenuti dipendenti da sedia a rotelle tardi nel corso della malattia. Non ci sono anomalie neuropsicologiche e la MRI cerebrale è nella norma.

SPG38.

Orlacchio e coll. (2008) hanno descritto una famiglia Italiana in cui 19 individui presentano una paraplegia autosomica dominante con fenotipo complicato. L'età media di

esordio della malattia negli arti superiori e inferiori è tra i 16 e i 18 anni. Tutti i pazienti presentano segni piramidali caratterizzati da andatura spastica, iperiflessia, risposta plantare in estensione, e piede cavo. Tutti i pazienti tranne due mostrano atrofia dei piccoli muscoli della mano, che insorge dopo le difficoltà del passo. La sensibilità è illesa, ma due individui presentano ridotte pallestesie alle caviglie. Un paziente è su sedia a rotelle. L'elettrofisiologia mostra anomalie sia nel motoneurone superiore che inferiore. Gli autori sottolineano una sovrapposizione clinica con la Sindrome di Sylver.

SPG41.

Zhao e coll. (2008) riportano uno studio su una famiglia cinese con HSP nella provincia di Shandong e nella regione della Cina autonoma interna alla Mongolia (Inner Mongolia Autonomous Region of China). Dopo aver escluso i loci noti dominanti, è stata effettuata un'analisi di *linkage* sull'intero genoma. HSP è stata diagnosticata in 6 soggetti viventi che hanno sviluppato un progressivo disturbo dell'andatura. Sul probando le indagini di MRI dell'encefalo e ed elettromiografica degli arti superiori e inferiori sono nella norma. La modalità di ereditarietà in questa famiglia è autosomico dominante. L'età di esordio del disturbo è precoce (16.6 ± 3.0 anni). Tutti i pazienti manifestano tipici segni di paraplegia spastica caratterizzati principalmente da ipostenia prossimale degli arti inferiori con riflessi scattanti e anomalie dell'andatura in senso spastico. Gli arti superiori mostrano un tono normale e solo un'ipostenia molto lieve ai muscoli piccoli della mano. Urgenza urinaria è un sintomo comune ed è riportata in quattro individui della famiglia.

ADHSPs "late onset" di cui sono noti solo i loci:

SPG19.

È stata associata a questo *locus* solo una famiglia, in cui l'esordio dei sintomi era relativamente tardivo (range 36-55 anni), con un decorso benigno e un'altra frequenza di disturbi urinari (Valente et al., 2002).

SPG33 (ZFYVE27) (RITIRATO DA HUGO).

Un cambio di base in *ZFYVE27* (SPG33) è stato riportato come causativo di HSP pura in una singola famiglia tedesca (Mannan et al., 2006). La proteina si associa con la spastina e può avere una funzione nel trasporto endosomiale. Comunque questa variazione di base è stata recentemente riportata in cromosomi di controllo (SNP single nucleotide polymorphism

rs35077384) e sembra avere una frequenza allelica minore dell'1-7%, che dipende dalla popolazione studiata, quindi deve essere considerata una rara variante di sequenza neutra e non causativa di HSP. Inoltre è sotto esame l'articolo originale che descrive un effetto funzionale del cambio missenso (la distribuzione intracellulare e la interazione con la spastina) (Martignoni et al., 2008). Gli autori del lavoro originale hanno accettato che i loro risultati venissero interpretati con attenzione (Mannan et al., 2008). *ZFYVE27* perciò non è attualmente elencata nel database HUGO come un gene associato ad HSP.

SPG37.

Hanein e coll. (2007) hanno descritto una famiglia Francese di quattro generazioni in cui almeno 13 membri presentano paraplegia spastica autosomica dominante. L'età di esordio varia tra 8 e 60 anni (media di 31.6 anni). Le caratteristiche cliniche includono l'andatura spastica e risposte plantari in estensione. Inoltre sono presenti caratteristiche aggiuntive che comprendono iperflessia degli arti superiori, ipostenia dell'ileopsoas, diminuite pallestesie e disturbi urinari. Il disturbo sembra lentamente progressivo. Nessun individuo necessita ausili e le neuroimmagini sono normali. Gli autori ipotizzano penetranza incompleta.

SPG40 (PROPOSTO).

Subramony et al. (2009) hanno proposto una nuova forma di paraplegia spastica dominante. Il difetto genetico della famiglia studiata non è in *linkage* con nessuno dei loci autosomico dominanti di HSP conosciuti, suggerendo l'esistenza di una nuova forma clinicamente distinta di paraplegia spastica, per cui gli autori hanno proposto il nome di SPG40. Il fenotipo in questa famiglia è caratterizzato da un esordio di malattia relativamente tardivo, tutti gli individui eccetto uno in questa famiglia presentano esordio dopo i 35 anni, inoltre è descritto un probabile fenomeno di anticipazione genetica. Attualmente questa forma non è riportata nel database OMIM né in HUGO.

Forme autosomiche recessive

Le forme ARHSPs note sono 22. Solo 8 dei geni causativi sono stati identificati ad oggi:

22 ARHSP	- 8 ARHSP i cui geni sono noti	- “early onset”	- SPG5A (<i>CYP7B1</i>) - SPG11 (<i>KIAA1840</i>) - SPG15 (<i>ZFYVE26</i>) - SPG20 (<i>SPG20</i>) - SPG39 (<i>PNPLA6/NTE</i>) - SPG44 (<i>GJA12/GJC2</i>)
		- “late onset”	- SPG7 (<i>SPG7</i>) - SPG21 (<i>SPG21</i>)
	- 14 ARHSP di cui solo i loci noti	- “early onset”	- SPG18 - SPG23 - SPG24 - SPG26 - SPG28 - SPG30 - SPG32 - SPG35 - SPG45
		- “late onset”	- SPG14 - SPG25 - SPG27
		RISERVATI	- SPG43 - SPG46

Al contrario delle ADHSP, le forme pure di ARHSP sono rare. Sono state descritte forme pure in alcune famiglie con mutazioni in *SPG5* e in famiglie associate a *SPG24*, *SPG28*, e *SPG30*. Sfumati segni cerebellari comunque possono essere osservati dopo una lunga durata di malattia in pazienti *SPG5* o *SPG30*.

Deterioramento mentale e assottigliamento del corpo calloso (HSP-TCC) sono associati ad alcune forme ARHSP: *SPG11* dovrebbe essere considerato per primo poiché costituisce il 59% dei casi con questo fenotipo, segue *SPG15* o, quando in associazione con epilessia, un locus sul cromosoma 8 (*SPG18*, proposto da Al Yahyaee et al., 2006). Più raramente, questo fenotipo ARHSP-TCC è stato trovato anche in pazienti associati con *SPG21*, *SPG32*, *SPG7* e *SPG4*.

Tra le forme ARHSP, tredici sono molto rare e ciascuna è stata descritta solo in una o due famiglie.

ARHSPs “early onset” di cui sono noti i geni:

SPG5A (CYP7B1).

Essendo questa forma oggetto di studio in questa tesi si rimanda al paragrafo 1.5.2 per una descrizione più dettagliata.

SPG11 (KIAA1840).

Un numero crescente di famiglie sono state descritte con HSP complicata da assottigliamento del corpo calloso (HSP-TCC) e da progressivo declino cognitivo, suggerendo che questa sia una forma relativamente comune di ARHSP, che costituisce circa il 21% dei casi di ARHSP (Stevanin et al., 2008; Del Bo et al., 2007; Boukhris et al., 2008). In alcuni lavori iniziali era stato ipotizzato che questo fenotipo fosse più comune in famiglie ARHSP con antenati Giapponesi, ma in seguito è stato riportato in un numero crescente di famiglie Europee e Nord Americane. Alterazioni nelle neuroimmagini consistono in un assottigliamento del corpo calloso, soprattutto nella porzione rostrale, spesso con diffuso interessamento del segnale della sostanza bianca e atrofia frontoparietale in uno stadio avanzato. Il fenotipo clinico include individui descritti con disartria, tremore, disfagia, amiotrofia distale e alcuni casi con neuropatia periferica. SPG11 inizialmente era stato creduto costituisse una forma pura di malattia (Martinez et al., 1999), ma famiglie con forma pura erano di fatto associate con una regione esterna al *locus* SPG11 dopo la ridefinizione del suo intervallo in famiglie con HSP complicata (Olmez et al., 2006). Il fenotipo SPG11 è infatti relativamente omogeneo: consiste di una paraparesi spastica ad esordio precoce e danno cognitivo (a volte diagnosticato come ritardo mentale) che progredisce insidiosamente fino ad una grave disabilità funzionale in un periodo che va da 10 a 20 anni. Alcuni pazienti inoltre sviluppano un coinvolgimento delle braccia, disartria pseudo-bulbare, segni oculari cerebellari e atrofia muscolare. Indagini paracliniche hanno mostrato un assottigliamento non progressivo del corpo calloso, con variabile atrofia cerebrale corticale e iperintensità della sostanza bianca alla MRI che peggiora nel tempo, variabile ipometabolismo del glucosio nelle regioni corticali e talamiche e neuropatia prevalentemente assonale motoria o periferica sensori-motoria (Stevanin et al., 2008).

SPG15 (ZFYVE26).

Il gene responsabile per SPG15 (*ZFYVE26*) costituisce dal 10.5 al 15% delle forme ARHSP (Hanein et al., 2008; Boukhris et al., 2009). Le prime famiglie individuate in *linkage* con il *locus* presentavano degenerazione maculare pigmentaria, amiotrofia distale, incontinenza fecale e urinaria in uno stadio avanzato di malattia e disfunzione cerebellare. Le immagini di MRI rivelavano atrofia degli emisferi cerebrali, del corpo calloso (HSP-TCC) e del tronco

encefalo (Hughes et al., 2001). Questo primo fenotipo che si sovrapponeva con la sindrome di Kjellin, con l'identificazione di nuove famiglie è stato esteso ad includere iperintensità della sostanza bianca e neuropatia periferica, laddove i segni cerebellari e la degenerazione maculare non sono stati trovati in maniera consistente (Elleuch et al., 2007; Boukhris et al., 2008). L'età di esordio è prevalentemente in adolescenza, sono stati descritti casi con esordio dai 13 ai 23 anni.

SPG20 (Troyer syndrome).

L'HSP associata a SPG20 è una forma complicata identificata ad oggi solo nei membri della Old Order Amish (Patel et al., 2002) (come SPG21). La sindrome di Troyer è caratterizzata da tetraparesi spastica, amiotrofia distale, disartria spastica, ritardo dello sviluppo e bassa statura. Un riesame completo dei casi pubblicati ha confermato che la sindrome di Troyer è circoscritta alla popolazione Amish e ha aggiunto dettagli al fenotipo osservato (Proukakis et al., 2004). È stata frequentemente osservata labilità emozionale, così come eccessiva scialorrea nei casi più avanzati. Sono stati descritti segni cerebellari inclusa atassia degli arti, ma non nistagmo. Disfagia, distonia e movimenti coreoatetoidi sono inoltre presenti in casi avanzati. Anomalie scheletriche osservate includono cifoscoliosi, piede cavo, dita a martello e lassità legamentosa nelle mani. L'ipostenia piramidale e instabilità del tono negli arti superiori sono state raramente osservate. Alterazioni del segnale della sostanza bianca profonda è stato osservato in immagini MRI in T2 in tutti gli individui. Il gene *SPG20* comprende 9 esoni che coprono una distanza di 43.3 kb sul cromosoma 13q12.3 e codifica una proteina di 666 aminoacidi (72.7 kDa) chiamata spartina (spastica paraplegia autosomica recessiva della sindrome di Troyer) che è ubiquitaneamente espressa nei tessuti adulti. Tutti i pazienti sono stati trovati omozigoti per la stessa mutazione (c.1110delA) che causa un *frameshift* e una proteina tronca (Patel et al., 2002; Proukakis et al., 2004).

SPG39 (PNPLA6/NTE).

Mutazioni nel gene *PNPLA6* (patatin-like phospholipase domain containing 6) codificante per la NTE (neuropathy target esterase) sono causative per il fenotipo SPG39. Sono state descritte due famiglie che presentano una forma autosomica recessiva di HSP complicata con esordio durante l'infanzia e associata ipotrofia, causate da mutazioni nel gene *NTE*. Il fenotipo ha somiglianze con l'avvelenamento con organofosfati, e la NTE è coinvolta nella tossicità dei composti organofosfati (Rainer et al., 2008).

SPG44 (GJA12/GJC2).

Orthmann-Murphy e coll. (2008) hanno proposto un nuovo fenotipo autosomico recessivo complicato osservato in una famiglia in cui hanno individuato mutazioni nel gene *GJA12/GJC2* che codifica per la connessina 47. Tre pazienti della famiglia che presentano la mutazione in omozigosi c.99C>G hanno sviluppato una forma di HSP, caratterizzata da un progressivo disturbo dell'andatura dalla prima alla quarta decade, due pazienti con esordio nella prima decade e uno con esordio nella seconda decade di vita. Il probando presenta una paraplegia spastica quasi pura con lieve atassia e disartria e deambulazione autonoma fino all'età di 39 anni. Suo fratello presenta una paraplegia spastica moderatamente complicata, con lieve atassia e disartria, qualche crisi e deambulazione con supporto laterale fino a 36 anni. Il cugino ha un fenotipo complesso più grave, con esordio più precoce e necessità della sedia a rotelle all'età di 30 anni. Questi pazienti sono distinguibili dal più grave fenotipo PMDL causato da altre mutazioni recessive nello stesso gene *GJA12/GJC2* per l'esordio più tardivo, la capacità di deambulazione autonoma fino all'età adulta e l'assenza di nistagmo. I pazienti descritti nello studio di Orthmann-Murphy et al. (2008) presentano una paraplegia spastica lentamente progressiva, con atassia e disartria da lieve a moderate, e crisi epilettiche, suggerendo che si tratti di un fenotipo complicato di HSP. Come per PLP1, le mutazioni in *GJA12/GJC2* sembrano causare uno spettro di malattia della sostanza bianca del SNC che include HSP e PMD/PMDL.

ARHSPs "late onset" di cui sono noti i geni:

SPG7 (Paraplegina).

Mutazioni nel gene *SPG7* che codifica per la paraplegina, costituiscono circa il 5% delle mutazioni patogenetiche di ARHSP. La forma SPG7 era inizialmente stata descritta come una forma pura di malattia, in seguito è stata osservata sia come fenotipo puro che complicato da atrofia cerebellare e vari gradi di disfunzioni cerebellari (disartria, nistagmo, atassia), pallore della papilla ottica, e neuropatia periferica e deficit mentali (Warnecke et al., 2007; Arnoldi et al., 2008).

Un ampio numero di polimorfismi missenso, che sono spesso stati trovati in stato eterozigote, complicano grandemente l'analisi genetica (Elleuch et al., 2006). Se essi siano polimorfismi neutri, fattori di suscettibilità o varianti causative rimane da determinarsi. La variante p.A510V, comunque sembra alteri la funzione della proteina SPG7 (Di Bella et al.,

2007), in accordo con la sua frequente associazione con mutazioni in eterozigosi (Arnoldi et al., 2008).

Nella maggior parte dei casi le mutazioni interessano importanti domini funzionali. In tutti eccetto un caso, gli individui affetti sono o omozigoti per mutazioni in paraplegina o sono eterozigoti composti con due differenti mutazioni su ciascun allele. Un'eccezione è stata descritta in una famiglia Inglese in cui il probando è un eterozigote composto (ERR484-6del/A510V), mentre il padre del probando presenta solo la delezione ed è clinicamente affetto (Mc Dermott et al., 2001). Gli autori ipotizzano che SPG7 possa essere ereditata anche come un tratto autosomico dominante. In tutte le altre famiglie pubblicate l'editarietà è chiaramente autosomica recessiva o sporadica.

SPG21 (ACP33).

La Mast syndrome è una forma complicata di HSP associata al *locus* SPG21 (Cross e McKusick., 1967) nei membri della Old Order Amish (come SPG20), in cui l'esordio di malattia è di solito durante l'infanzia (Simpson et al., 2003). Una singola mutazione (c.601insA) è stata descritta nel gene della proteina ACP33 (acid-cluster protein) di 33 kDa. L'inserzione nucleotidica determina un *frameshift* e uno stop prematuro, da cui la patogenesi è probabilmente legata ad una perdita di funzione della proteina maspardina (Mast Syndrome, Paraplegia spastica, Autosomica Recessiva con Demenza). La Mast syndrome si associa a demenza, segni cerebellari ed extrapiramidali, e assottigliamento del corpo calloso (HSP-TCC).

Molti pazienti mostrano un funzionamento relativamente normale in età giovanile prima di sviluppare importanti difficoltà motorie e cognitive. In casi avanzati è stata descritta rigidità alle gambe e i pazienti diventavano poi allettati. Sono stati osservati riflessi primitivi e movimenti extrapiramidali. Le neuroimmagini in alcuni pazienti hanno dimostrato un assottigliamento del corpo calloso, atrofia generalizzata e alterazioni di segnale della sostanza bianca in accordo con la demielinizzazione.

La maspardina sembra localizzarsi alle vescicole della rete endosomiale/trans-Golgi, facendo ipotizzare un ruolo nel trasporto della proteina e nello smistamento (Zeitlmann et al., 2001).

ARHSPs "early onset" di cui sono noti solo i loci:

SPG18 (RISERVATO).

Al-Yahyaee e coll. (2006) hanno descritto due famiglie consanguinee non imparentate tra loro dell'Oman con una forma di SPG autosomica recessiva complicata. Nella prima famiglia l'età d'esordio è nei primi 2 anni di vita in 6 soggetti affetti, tutti con spasticità agli arti inferiori e ipostenia, ipereflessia, e risposte plantari in estensione. Tre presentano una spasticità lieve agli arti superiori. Tutti e 6 presentano ritardo mentale, e in 5 si riscontra ipoplasia o agenesia del corpo calloso (HSP-TCC). Nella seconda famiglia i 3 individui affetti hanno presentato difficoltà alla deambulazione tra i 4 e i 6 anni di vita, all'esame neurologico si rileva spasticità agli arti inferiori soprattutto ai muscoli della loggia posteriore e i tibiali posteriori, due dei bambini presentano epilessia. Tutti hanno referti normali alla TC cerebrale e uno sviluppo cognitivo normale. Attraverso analisi di *linkage* dell'intero genoma, gli autori hanno identificato per entrambe le due famiglie un *locus* candidato di malattia, indicato come autosomico recessivo e localizzato sul cromosoma 8p12-p11.21. Nel database OMIM la forma SPG18 è in accordo con il lavoro di Al-Yahyaee e coll. (2006). Nel database HUGO (HGNC:18009), SPG18 è indicato come autosomico dominante e "riservato".

SPG23.

Una famiglia Araba con paraparesi spastica complicata da anomalie della pigmentazione di pelle e capelli e danno cognitivo lieve è stata associata al locus SPG23 (Blumen et al., 2003). Altre famiglie sono state descritte con un fenotipo simile con neuropatia assonale che potrebbe anche essere associata con questo locus (Abdallat et al., 1980; Lison et al., 1981; Bamforth, 2003). Alle anomalie pigmentarie cutanee possono aggiungersi dimorfismi facciali e scheletrici, declino cognitivo, tremore. Le caratteristiche peculiari di SPG23, anche detta Sindrome di Lison, sono le anomalie del pigmento, rappresentate da vitiligine a chiazze, aree di pelle iperpigmentata, efelidi e prematuro ingrigimento dei capelli. Le anomalie della pelle possono essere presenti dalla nascita, mentre la spasticità solitamente insorge durante l'infanzia (Blumen et al., 2003)

SPG24.

Hodgkinson et al. (2002) hanno descritto una famiglia consanguinea dell'Arabia Saudita in cui 5 fratelli presentano paraplegia spastica. Il fenotipo paraplegico si manifesta ad 1 anno di vita quando gli individui affetti iniziano a stare in piedi. In seguito le caratteristiche sono la tendenza a camminare sulle punte, spasticità, andatura a forbice, clono e iperiflessia. Tre degli individui affetti e due soggetti non affetti della famiglia presentano ipoacusia neurosensoriale che segrega come tratto indipendente. Gli autori suggeriscono che il fenotipo di questa famiglia

debba considerarsi “complicato” a causa della disartria spastica e dei segni pseudobulbari osservati nel probando, anche se questi sintomi non sono stati osservati in nessun altro membro della famiglia.

SPG26.

Una singola famiglia del Kuwait è stata descritta in *linkage* con il *locus* SPG26 (Wilkinson et al., 2005). Gli individui affetti tutti manifestano un esordio di paraparesi spastica tra i 7 e 8 anni. Le caratteristiche che complicano in fenotipo sono disartria, amiotrofia distale nelle braccia e nelle gambe, labilità emozionale e ridotto QI in tre dei cinque fratelli affetti.

SPG28.

Bouslam e coll. (2005) hanno studiato una famiglia consanguinea Marocchina in cui 3 membri presentano paraplegia spastica pura con perdita distale di sensibilità negli arti inferiori e lieve interessamento degli arti superiori. L'età di esordio varia tra i 6 e i 15 anni. Il paziente con l'esordio più precoce presenta anche piede cavo e scoliosi. L'analisi di *linkage* dell'intero genoma ha identificato un *locus* candidato di malattia di 6.7 cM (5.5Mb) tra i marcatori D14S58 e D14S1064 sul cromosoma 14q21.3-q22.3. Non sono state identificate mutazioni nei geni *SPG3A* o *GCHI* che mappano entrambi in questo intervallo.

SPG30.

Associata a questo locus è stata descritta una singola famiglia consanguinea di origini Algerine in cui 4 fratelli mostrano paraplegia spastica ereditaria (Klebe et al., 2006). L'età media di esordio è intorno ai 17.5 anni (range 12-21). Il fenotipo è caratterizzato da rigidità alle gambe e andatura spastica, altre caratteristiche cliniche sono iperreflessia agli arti inferiori e risposte plantari in estensione. Due fratelli hanno una perdita distale del sensorio, principalmente della sensibilità dolorifica, e due presentano movimenti oculari saccadici. Tre fratelli hanno sottili segni cerebellari e le neuroimmagini di uno dei due evidenzia diffusa atrofia cerebellare. La progressione della malattia è lenta, tutti i pazienti sono rimasti deambulanti per più di 15 anni dall'esordio di malattia. Gli autori osservano che il disturbo presentato in questa famiglia è una forma di SPG complicata con interessamento cerebellare e neuropatia periferica.

SPG32.

Stevanin e coll. (2007) hanno descritto una famiglia Portoghese consanguinea in cui tre fratelli presentano una paraplegia spastica complicata lentamente progressiva. L'esordio delle

difficoltà nella deambulazione viene riferito dai pazienti intorno a 6-7 anni di età. L'esame clinico ha mostrato iperiflessia agli arti inferiori, ipostenia e spasticità a riposo e durante la deambulazione (con il bastone), così come risposte plantari in estensione e piede cavo. È presente ritardo mentale lieve e difficoltà di apprendimento. La MRI cerebrale di due pazienti mostra assottigliamento del corpo calloso (HSP-TCC), atrofia corticale e cerebellare, e disrafia pontina. Un paziente con una storia di abuso di alcohol ha sviluppato una neuropatia periferica. Analisi di *linkage* dell'intero genoma hanno permesso di identificato il *locus* candidato, SPG32, sul cromosoma 14q12-q21, con un intervallo di 30 cM. La regione si sovrappone parzialmente con l'inizio del *locus* SPG3A, ma l'analisi genetica non ha identificato mutazioni in atlastina.

SPG35.

Dick et al. (2008) hanno identificato un'ampia famiglia consanguinea dell'Oman in cui sette individui presentano paraplegia spastica. Gli individui affetti manifestano tra i 6 e gli 11 anni i primi segni neurologici e una rapida progressione nei successivi 2-4 anni con una conclamata spasticità degli arti inferiori e superiori con iperiflessia e risposte plantari in estensione, che determinano una perdita dell'autonomia a 25 anni. Caratteristiche variabili includono disartria, clono delle caviglie e un aumento del tono muscolare negli arti inferiori. Due individui presentano crisi epilettiche ben controllate, uno ha urgenza urinaria ed enuresi notturna, la maggior parte manifesta progressivo declino cognitivo. Le neuroimmagini del probando non hanno mostrato anomalie. Quattro pazienti sono diventati dipendenti da sedia a rotelle nella giovane età adulta e il disturbo ha reso impossibile una normale scolarizzazione.

SPG45.

Dursun e coll. (2009) hanno associato una nuova forma complicata autosomica recessiva di HSP (SPG45) ad una regione di 4.6 Mbp sul cromosoma 10q24.3-q25. Le manifestazioni cliniche sono costituite da paraplegia spastica ad esordio molto precoce accompagnata da ritardo mentale e segni oculari. Tutti i cinque individui affetti sono nati da genitori con riconosciuta consanguineità originari dallo stesso villaggio in Turchia, e i genitori dei pazienti sono sani. L'esame neurologico non ha incluso una dettagliata indagine neuropsicologica, ma l'osservazione che nessuno dei pazienti avesse raggiunto la capacità di leggere e scrivere è stata considerata dagli autori un segno di ritardo mentale. La MRI cerebrale è normale nell'unico paziente che l'ha effettuata. Tutti pazienti, 9 soggetti non affetti e 2 dei genitori sono stati sottoposti a visita oftalmologica. In alcuni soggetti della famiglia si è riscontrata miopia e in un

paziente atrofia ottica. Nistagmo pendolare bilaterale è comune nella famiglia ed è considerato un nistagmo congenito.

ARHSPs "late onset" di cui sono noti solo i loci:

SPG14.

In una famiglia italiana consanguinea associata al locus SPG14 le caratteristiche addizionali che co-segregano con la paraparesi spastica sono una neuropatia motoria distale e un ritardo mentale lieve (Vazza et al., 2000), con esordio variabile in età adulta.

SPG25.

Il fenotipo SPG25 è stato riportato in una famiglia italiana in cui i genitori sono cugini (Zortea et al., 2002). In questa famiglia, quattro individui affetti hanno sviluppato paraparesi spastica nella quarta e quinta decade. L'esordio della paraparesi spastica è stato preceduto o accompagnato da dolore alla schiena di tipo radicolare che si irradia agli arti inferiori. Le neuroimmagini hanno rivelato erniazioni del disco spesso a più di un livello. Tre dei quattro membri familiari affetti presentano positività alle indagini neurofisiologiche per una neuropatia periferica lieve, benché la caratteristica differisce in ciascun individuo. Il gene che causa la suscettibilità all'ernia del disco e la paraparesi spastica non è ancora stato identificato. I sintomi di esordio sono stati descritti in età adulta, tra i 30 e 46 anni.

SPG27.

Meijer e coll. (2004) descrivono un'ampia famiglia Franco Canadese in cui 7 su 14 figli presentano una forma pura di ARHSP con esordio in età adulta (25 a 45 anni). Tutti gli individui affetti manifestano una paraparesi spastica da moderata a grave, risposte plantari in estensione, vescica spastica e diminuzione da media a grave delle pallestesie ai piedi. Due individui presentano disartria. Solo un paziente è legato a sedia a rotelle. Gli studi sulla conduzione nervosa hanno mostrato potenziali di azione normali sensitivi e muscolari, ma i potenziali evocati somatosensoriali sono alterati in due pazienti.

L'analisi di *linkage* a due-punti effettuata su questa famiglia dagli autori, con modello autosomico recessivo, ha identificato un locus putativo di malattia che è stato designato SPG27 sul cromosoma 10 (10q22.1-q24.1). Il locus critico di malattia abbraccia approssimativamente 26 Mb e parzialmente si sovrappone con il locus per SPG9, che è una forma distinta, autosomica dominante con fenotipo complicato.

SPG43 (RISERVATO).

Questa forma di HSP non è riportata nel database OMIM. In HUGO è indicato come fenotipo autosomico recessivo mappato al locus 19p13.11-q12, con la numerazione HGNC:35198.

SPG46 (RISERVATO).

Questa forma di HSP non è riportata nel database OMIM. In HUGO è indicato come fenotipo autosomico recessivo RISERVATO, con la numerazione HGNC:37080.

Forme X-linked

Rispetto alle HSP autosomiche, le HSP X-linked sono piuttosto rare. Sono forme complesse e sono spesso facilmente riconoscibili nella pratica clinica. Esistono 5 loci HSP X-linked, per i quali sono stati identificati i geni *SPG1* e *SPG2* sono stati identificati, e i loro meccanismi molecolari sono relativamente ben compresi.

5 X-linked HSP	- 3 X-linked HSP i cui geni sono noti	- “early onset”	- SPG1 (<i>LICAM</i>) - SPG2 (<i>PLP1</i>) - SPG22 (<i>SLC16A2</i>)
	- 2 X-linked HSP di cui solo i loci noti	- “early onset”	- SPG16 - SPG34

SPG1 (LICAM).

SPG1 è causata da mutazioni nel gene della L1 molecola di adesione cellulare (*LICAM*) (Jouet et al., 1994). Il fenotipo tende ad essere complicato, con ritardo mentale e anomalie genetiche muscolo-scheletriche, caratteristica l'agenesia dell'estensore lungo dell'alluce (Kenwick et al., 1986) sin dalla prima infanzia. Mutazioni nello stesso gene sono state identificate nell'idrocefalo X-linked, agenesia X-linked del corpo calloso e sindrome di MASA (ritardo mentale, afasia, andatura paraplegica e pollice addotto). C'è una marcata variabilità interfamiliare e intrafamiliare in famiglie con mutazioni nel gene *LICAM*. In un numero di famiglie più di uno dei possibili fenotipi *LICAM* sono stati osservati. Le malattie sono ora considerate parte della sindrome clinica con l'acronimo CRASH, per l'ipoplasia del corpo calloso, il ritardo, il pollice addotto, la paraplegia spastica e l'idrocefalo (Fransen et al., 1995).

LICAM è una glicoproteina trans membrana, espressa principalmente dai neuroni e dalle cellule di Schwann (Joosten e Gribnau, 1998). La proteina ha 6 domini omologhi ai membri della superfamiglia delle immunoglobuline e 5 domini omologhi alla fibronectina di tipo III (Bateman et al., 1996). Le mutazioni identificate in *LICAM* tendono a raggrupparsi in regioni lungo tutto il gene e possono essere divise in quelle mutazioni che agiscono principalmente alterando i domini proteici e quelle che si prevede alterino le proprietà di superficie della proteina. Le mutazioni che interessano i residui chiave nei domini erano probabilmente quelle che producono un più grave fenotipo CRASH con morte entro 1 anno di vita, in confronto a quelle che interessano i residui di superficie. Le mutazioni che interessano i domini della

fibronectina erano più probabilmente quelle che producono un grave idrocefalo che quelle che interessano i domini delle immunoglobuline (Michaelis et al., 1998).

SPG2 (PLP1).

SPG2 è causata da mutazioni nel gene della proteina proteolipidica (PLP) (Saugier-Veber et al., 1994). Sono state descritte associate a questo locus sia famiglie con fenotipo puro che complicato di HSP (Johnson and McKusick, 1962; Bonneau et al., 1993; Cambi et al., 1996). La HSP complicata legata a SPG2 consiste di un fenotipo principale di paraparesi spastica, sindrome cerebellare e ritardo mentale. Una variazione intrafamiliare è stata osservata rispetto alle caratteristiche principali che ricorrono in vari gradi, con o senza caratteristiche aggiuntive quali l'atrofia ottica. I differenti tipi di mutazioni nel gene *SPG2* si è supposto alterino la mielinizzazione, il che potrebbe spiegare le anomalie della sostanza bianca osservate alla MRI nei pazienti, e si correlano a fenotipi che spaziano da paraplegia spastica lieve ad esordio in età adulta alla grave malattia di Pelizaeus-Merzbacher. Mutazioni nel gene della proteolipoproteina all'Xq21-22 sono state individuate in famiglie con HSP principalmente complicata in cui potevano essere associate neuropatia periferica e cambiamenti della sostanza bianca alla MRI. Mutazioni (di solito duplicazioni) di questo gene inoltre danno origine alla malattia di Pelizaeus-Merzbacher (PMD), malattia dismielinizzante, la cui classica forma ha un esordio in infanzia e morte in tarda adolescenza o in giovane età adulta. E' caratterizzata da nistagmo, atassia, spasticità, movimenti anomali, atrofia ottica e microcefalia. Esiste un più grave sottotipo che mostra una rapida progressione e morte nella prima decade (Renier et al., 1981). Le variazioni nel fenotipo tra Pelizaeus-Merzbacher e PLP1-HSP è ricondotta all'effetto differente che le mutazioni possono avere sulle due isoforme del prodotto della proteina, PLP1 e DM20. Il fenotipo della malattia causato da mutazioni nel gene *PLP* può essere considerato come uno spettro di continuità tra la SPG2 più lieve ad una estremità e la più grave PMD all'altra (Inoue, 2005). Le neuroimmagini in PMD e con minore estensione in SPG2 dimostrano una diffusa iperintensità di segnale della sostanza bianca sulle immagini T2, ricordando l'aspetto di un bambino appena nato (Inoue et al., 2001).

PLP è la proteina più importante della mielina del CNS, poiché costituisce approssimativamente il 50% della mielina proteica totale nel cervello adulto. La isoforma DM20 della proteina è dovuta a *splicing* alternativo, manca di un residuo di circa 35 aa. La funzione di PLP/DM20 non è stata ancora chiarita. Sembra probabile che queste proteine giochino un ruolo nello stabilizzare e mantenere la guaina mielinica (Boison and Stoffel, 1994; Klugmann et al., 1997). È stato ipotizzato anche un ruolo per la PLP/DM20 nella

comunicazione glia/assone (Griffith et al., 1998). L'isoforma DM20 ha un ruolo precoce nello sviluppo e può giocare uno specifico ruolo nello sviluppo delle cellule gliali (Ikenaka et al., 1992; Peyron et al., 1997). Un'ampia gamma di mutazioni sono state descritte in PLP/DM20 che includono duplicazioni, mutazioni missenso, *frameshift*, non senso e di *splicing*. Le mutazioni puntiformi nell'esone 3b del gene *PLP*, codificante il segmento di 35 aa specifico di PLP e tagliato in DM20, tendono a produrre un fenotipo lieve di SPG2 (Saugier-Veber et al., 1994). Le mutazioni tronche che sono attese dare luogo ad una proteina non funzionale possono dar luogo a ad un fenotipo lieve di PMD o SPG2 (Bond et al., 1997). Questo è in contrasto con la maggior parte delle mutazioni puntiformi in PLP, che non ricadono nell'esone 3b, e portano allo sviluppo di un più grave fenotipo dismielinizzante PMD (Raskind et al., 1991; Inoue et al., 2002). Le duplicazioni, la forma più comune di mutazione riportata in *PLP*, sono anche associate con un fenotipo PMD. Queste correlazioni genotipo fenotipo suggeriscono che il fenotipo PMD derivi non da una riduzione nella PLP funzionale ma piuttosto da un guadagno tossico di funzione conferito da un cambiamento missenso o, nel caso della duplicazione genica, dal sovradosaggio di *PLP wild type*.

SPG22 (SLC16A2).

Allan-Herndon-Dudley syndrome (AHDS) è stata classificata come una forma complicata di HSP associata al locus SPG22 (Bohan e Azizi, 2004; Fink, 2004) ed è causata da mutazioni nel gene *SLC16A2* che codifica il trasportatore dell'ormone tiroideo MCT8 (monocarboxylate transporter-8). La prima descrizione di AHDS è stata una famiglia multi generazionale in cui i maschi affetti presentavano un grave ritardo mentale e ipotonia alla nascita. Pochi individui non avevano mai camminato e nella vita adulta sviluppavano un'atrofia muscolare generalizzata, contratture articolari e iporeflessia (Allan et al., 1994). Ulteriori descrizioni negli anni hanno allargato il fenotipo ad includere la paraparesi spastica così come la disartria, l'atassia, i movimenti atetoidi, il mancato controllo del collo, ipoplasia muscolare, scoliosi, pectus excavatum, dimorfismi facciali ("long thin face"), padiglioni auricolari ampi e ipoplasia maxillare (Bundey and Griffiths, 1977; Claes et al., 2000). Una famiglia brasiliana con un fenotipo X-linked puro è stata inoltre legata al locus SPG22 (Starling et al., 2002). Uno studio di Maranduba et al., (2006) descrive caratteristiche cliniche che comprendono grave ritardo mentale con assenza di capacità di comunicazione, incapacità di sostenere la testa, tetraplegia spastica con contratture articolari, ridotta massa muscolare, distonia e nistagmo, l'anamnesi familiare mostrava disabilità lentamente progressiva e regressione nelle abilità acquisite.

SPG16.

Associata con SPG16 è stata descritta una forma X-linked rara di HSP è stata descritta. Gli individui affetti presentano tetraplegia, afasia motoria, riduzione del visus, ritardo mentale lieve, e disturbi sfinterici.

È stata identificata una sola famiglia associata al locus SPG16 con un fenotipo puro che presenta una inserzione NOR (nucleolus organizer region) nel Xq11.2 (Tamagaki et al., 2000). In precedenza Steinmuller et al. (1997) hanno descritto una famiglia in cui i geni *SPG1* e *SPG2* erano stati esclusi e le analisi di *linkage* suggerivano un locus nella regione Xq11.2-q23. In questa famiglia il fenotipo era grave e complicato da ritardo mentale, coinvolgimento degli arti superiori, danno visivo e disfunzione vescicale e intestinale.

Il gene per SPG16 rimane sconosciuto. L'esordio è descritto nella prima infanzia.

SPG34.

Macedo-Souza e coll. (2008) hanno effettuato uno studio di follow-up su una ampia famiglia Brasiliana studiata da Zatz et al. (1976), in cui 24 maschi attraverso 5 generazioni ereditavano una paraplegia spastica con interessamento solo degli arti inferiori. La modalità di ereditarietà è X-linked recessiva. L'esordio è durante la tarda infanzia o in adolescenza e la malattia presenta una progressività molto lenta. Tutti gli adulti affetti mostrano andatura spastica e iperiflessia degli arti inferiori, non altre caratteristiche cliniche. Nello studio di Macedo-Souza (2008) per 11 uomini affetti il fenotipo è omogeneo con esordio tra i 12 e 25 anni. La malattia è lentamente progressiva e i pazienti necessitavano di ausili dopo due decadi. Negli arti superiori la forza non è mai compromessa, ma alcuni manifestano iperiflessia. Gli arti inferiori presentano spasticità progressiva e debilitante. Segno di Babinski, clono alle caviglie, e iperiflessia sono frequenti. Le pallestesie agli arti inferiori sono spesso ridotte dopo la sesta decade di vita; dolore spontaneo agli arti inferiori è comune. Non sono state riferite disfunzioni urinarie o sfinteriche.

Casi sporadici

Oltre alla storia familiare esistono altri parametri clinici che distinguono in modo affidabile la paraplegia spastica “ereditaria” da quella “apparentemente sporadica”. Sono frequenti nella pratica clinica soggetti senza storia di familiarità, diagnosticati come paraplegia spastica apparentemente sporadica (ASSP) (Fink, 2008).

Dopo l’esclusione di altre diagnosi (ad es anomalie strutturali nell’encefalo o nel midollo spinale, leucodistorfie, sclerosi multipla, infezione da virus umano T-linfotrofico di tipo 1, distonia dopa-responsiva, sclerosi laterale amiotrofica o sclerosi laterale primaria) mediante MRI o analisi biochimiche, le mutazioni nei geni noti HSP dovrebbero essere sospettate.

Mutazioni missenso in *SPG4* sono state ritrovate in più del 18% dei casi sporadici (Depienne et al., 2006; Crippa et al., 2006) e tendono ad essere associate con fenotipi meno gravi che in pazienti con ADHSP. Casi “apparentemente” sporadici di HSPs dominanti possono risultare da dominanza incompleta o da mutazioni de novo.

Casi sporadici possono anche corrispondere a ARHSP, soprattutto in pazienti consanguinei, siccome la maggior parte dei pazienti con disturbi autosomici recessivi nei paesi Europei e Nord Americani non hanno storie familiari positive.

Brugman et al. (2008) hanno studiato due geni HSP, *SPG4*/spastina e *SPG7*/paraplegina, in 105 adulti Tedeschi con sindromi apparentemente sporadiche del motoneurone superiore (UMN). Questo studio conferma i risultati di precedenti lavori di Arnoldi e coll. (2008), Wilkinson e coll. (2004).

Pazienti sporadici che portano due mutazioni nei geni *SPG5*, *SPG7*, o *SPG11* sono stati riportati in numerosi studi (Fink, 2008).

1.3.2 *Diagnosi differenziale*

Indicazioni importanti per un corretto processo diagnostico di paraplegia spastica ereditaria sono l'età e la natura dell'esordio, la progressione dei sintomi, la presenza di una storia familiare, e poi altre caratteristiche cliniche. La diagnosi differenziale varia in accordo all'età di esordio.

Diagnosi differenziali in paraplegia spastica (Warner TT., 2007):

ESORDIO INFANTILE:

- Paralisi cerebrale diplegica
- Anomalie strutturali (malformazione di Chiari, sublussazione atlanto-assiale)
- Paraplegia spastica ereditaria (HSP)
- Leucodistrofie (es. di Krabbe)
- Dismetabolismi (abetalipoproteinemia, deficit di arginasi)
- Distonia levodopa-reattiva
- Infezioni (mieliti)
- Sclerosi multipla

ESORDIO IN ETA' ADULTA:

- Patologia spinale degenerativa cervicale
- Sclerosi multipla
- Malattia del motoneurone (MND)
- Neoplasma (tumore spinale primario/secondario, meningioma parasagittale)
- Infezione (mieliti)
- Malformazione arterovenosa durale
- Malformazione di Chiari
- Adrenoleucodistrofia
- Paraplegia spastica ereditaria (HSP)
- Atassie spinocerebellari
- Deficit di vitamina B12, deficit di vitamina E
- Latirismo
- Distonia reattiva levodopa
- Infezioni (sifilide, HTLV-1, HIV)
- Deficit di Rame

La diagnosi di HSP pura in una famiglia in cui diversi membri hanno caratteristiche cliniche simili presenta poche difficoltà. L'età di esordio e la presentazione clinica possono aiutare i clinici a determinare quali test dovrebbero essere proposti, soprattutto per i casi complicati in età pediatrica in cui devono essere esclusi i dismetabolismi. Per un paziente per il quale non si osservi una storia familiare attendibile e verificabile, sono richiesti ulteriori accertamenti.

Gli accertamenti diagnostici comprendono:

- gli acidi grassi a catena molto lunga,
- enzimi cellulari,
- gli aminoacidi plasmatici,
- l'analisi delle lipoproteine sieriche,
- vitamina B12,
- vitamina E,
- rame e ceruloplasmina,
- serologia sierica per la sifilide,
- HTLV-1,
- HIV,
- una valutazione neuroftalmologica.

L'esordio nei primi anni di vita con un ritardo nelle acquisizioni motorie è più suggestivo di paralisi cerebrale infantile (PCI), soprattutto se c'è un quadro clinico statico. Soprattutto in pazienti ad esordio precoce, confrontato con altre cause di paraplegia spastica, come la sclerosi multipla e il danno spinale, c'è una relativa preservazione della forza a dispetto di un drammatico incremento del tono nelle gambe.

Per le forme pure di HSP sono state descritte diverse caratteristiche e queste includono anomalie lievi del sensorio agli arti inferiori (ad es riduzione delle pallestesie), sintomi urinari (riportati in oltre il 50% dei casi ad esordio tardivo), pes cavus e ritardo cognitivo lieve. Gli arti superiori possono presentare ipereflessia, ma i nervi cranici sono raramente coinvolti nelle HSP.

HSPs complicate comprendono un largo numero di condizioni in cui la paraplegia spastica si accompagna ad altri sintomi, quali l'atassia, l'amiotrofia grave, l'atrofia ottica, la retinopatia pigmentaria, il ritardo mentale, segni extrapiramidali, la demenza, la sordità, l'ittiosi, la neuropatia periferica e l'epilessia. Queste forme sono spesso autosomiche recessive e sono rare, così la scoperta di sintomi neurologici addizionali con paraplegia spastica potrebbe indicare altre possibili diagnosi.

Un caso sporadico di paraplegia spastica che si sviluppa oltre i 20 anni è un problema clinico abbastanza frequente in neurologia clinica. In questo caso l'assenza di storia familiare significa che la HSP è una diagnosi di esclusione. La paraplegia spastica apparentemente sporadica (ASSP) (Fink, 2008) può essere diagnosticata per un certo numero di anni finché

- 1) una mutazione patogenetica in un gene HSP venga identificata o emerga una storia familiare, e la diagnosi viene cambiata in HSP;
- 2) il disturbo progredisce a coinvolgere gli arti superiori, il linguaggio, e la deglutizione, e la diagnosi viene cambiata in PLS (sclerosi laterale primaria);
- 3) un'altra etiologia viene identificata (ad es. ALS, sclerosi laterale amiotrofica).

Le malattie del motoneurone (MNDs) sono un gruppo di disturbi eterogeneo etiologicamente che è caratterizzato dalla ipostenia muscolare e/o dalla paralisi spastica, che derivano da una degenerazione selettiva dei motoneuroni inferiori (LMNs) e/o dei motoneuroni superiori (UMNs), rispettivamente. Queste sindromi includono oltre alla HSP in cui la caratteristica principale è la degenerazione del motoneurone superiore, dei tratti corticospinali e delle colonne dorsali, la PLS (Sclerosi Laterale Primaria) in cui vi è degenerazione dei motoneuroni corticali e dei tratti corticobulbari e corticospinali, la SMA (atrofia muscolo spinale) in cui vi è relativamente isolata degenerazione delle cellule delle corna anteriori, la SLA (sclerosi laterale amiotrofica) con degenerazione mista dei tratti corticospinali e delle cellule delle corna anteriori. Nella Atassia di Friedreich la degenerazione è mista dei tratti corticospinali e delle fibre delle colonne dorsali.

Esiste una sovrapposizione clinica, patologica e genetica rispetto anche ad altre malattie del motoneurone, quali la neuropatia ereditaria motoria distale (dHMN) e la neuropatia ereditaria motoria e sensitiva di tipo 2 (HMSN/CMT2).

Altri esempi di malattie neurodegenerative che si manifestano anche con paraplegia spastica sono la sclerosi laterale primaria giovanile (JPLS) e la paralisi spastica ereditaria infantile ascendente (IAHSP). Insieme a JPLS (Juvanile PLS) e IAHSP (Infantile Ascending HSP), PLS è parte di un range di malattie che possono risultare da mutazioni ALS2.

Secondo la localizzazione primaria del deterioramento, queste patologie neurodegenerative sono neurologicamente caratterizzate da paralisi, spasticità e ipereflessia (HSP); da paralisi atonica, atrofia muscolare e iporeflessia (dHMN, SMA, CMT2); o da una combinazione di entrambe (ALS).

Esiste qualche sovrapposizione tra PLS e HSP, siccome entrambe i disturbi sono caratterizzati da segni e sintomi puri di UMN. La sclerosi laterale primaria in età adulta

(PLSA1) è un disturbo autosomico che interessa soltanto i UMNs nei tratti corticospinali e corticobulbari. La differenza tra PLSA1 e ALS adulta è basata sull'assenza di coinvolgimento del LMN in PLS. I due disturbi sono a volte considerati come disturbi neurodegenerativi progressivi clinicamente distinti, ma sebbene questo è probabile sia vero per molti casi di PLS, esistono pazienti che presentano segni puri UMN per anni ma più tardi progrediscono verso la ALS tipica.

La ALS è la più comune MND ad esordio in età adulta, è di solito fatale entro 5 anni dall'esordio ed è caratterizzata dalla degenerazione di UMNs e LMNs. Circa il 5%-10% dei pazienti con ALS ha una storia di familiarità, e questi pazienti più frequentemente ereditano la malattia in maniera autosomica dominante. Gli studi di *linkage* hanno permesso di identificare 12 loci e 8 geni per sclerosi laterale amiotrofica familiare (FALS), e 3 loci per ALS con demenza frontotemporale (FTD). Sebbene questi risultati abbiano fornito preziose idee, queste spiegano solo una piccola frazione di tutti i casi ALS. La maggior parte dei casi ALS non hanno una chiara storia familiare e sono riferiti a casi sporadici di ALS (SALS). Ipotesi iniziali circa le cause di SALS principalmente erano considerate fattori ambientali; più recentemente, sono state proposte ipotesi sul coinvolgimento di fattori epigenetici. Comunque ci sono sempre più evidenze che lasciano ipotizzare che fattori genetici anche contribuiscano a SALS.

La SMA è una MND autosomica recessiva ed è una delle più comuni malattie genetiche che causa mortalità infantile. Si presenta con atrofia e ipostenia muscolare ed è causata da coinvolgimento del motoneurone inferiore. L'atrofia muscolare spino bulbare (SBMA) è stata la prima malattia da ripetizione di triplette identificata, dovuta all'espansione del trinucleotide ripetuto CAG che codifica il tratto poliglutamina (polyQ) nel primo esone del gene per il recettore androgeno (AR). SBMA è una malattia X-linked recessiva dovuta ad espansione della poliglutamina, come altre malattie da espansione della poliglutamina, è caratterizzata dalla formazione di aggregati. Si caratterizza per un'ipostenia lentamente progressiva degli arti e bulbare, con insorgenza tra i 30-50 anni, e interessa il motoneurone inferiore.

Nella Charcot-Marie-Tooth di tipo 2A (CMT2A) è una "proteina motore" che causa di degenerazione degli assoni distali. Mutazioni nella kinesina a catena leggera (KIF1B) causa degenerazione degli assoni periferici.

Le HSPs complicate con atassia cerebellare includono la ARSACS (Autosomica Recessiva Spastica Atassia di Charlevoix Saguenay), un disturbo in cui i fenotipi di HSPs e atassia cerebellare si sovrappongono. Nel 2000 (Engert et al., 2000) il gene *SACS* è stato identificato in pazienti provenienti dal Quebec. Inizialmente si è pensato che fosse costituito da un singolo esone lungo 12794 bp, codificante la proteina chaperone saccina. In seguito è stato

dimostrato che *SACS* è costituito da altri esoni codificanti in cui sono state identificate mutazioni (Grieco et al., 2004; Criscuolo et al., 2005; Ouyang et al., 2006). Ad oggi oltre 20 mutazioni nell'esone gigante sono state trovate in tutto il mondo, incluso Giappone, Italia, Tunisia, Turchia e Spagna. Il fenotipo è un'atassia spastica con esordio precoce, sempre prima dei 20 anni (per lo più prima dei 5 anni). Il fenotipo è tipicamente associato con anomalie del fundus, con atrofia o delle fibre retiniche mielinizzate o del nervo ottico. Sono state descritte famiglie senza anomalie ottiche ma con altri segni, quali ritardo mentale, distonia, sordità, o con atassia cerebellare pura senza spasticità (Harak et al., 2007; Shimazaki et al., 2007). Atrofia cerebellare è sempre visibile alla MRI, soprattutto nel verme superiore. Altri loci per atassie spastiche (la recessiva *SAX2*, *ARSAL* e la dominante *SAX1*) sono stati identificati ma i geni sono ancora sconosciuti (Meijer et al., 2002; Thiffault et al., 2006; Bouslam et al., 2007).

1.3.3 *Studi in vivo e ex vivo.*

Esame neurologico:

L'esame neurologico (Fink, 2006) dei soggetti affetti da HSP prevede l'analisi dell'andatura poiché il disturbo del passo è il primo sintomo di HSP. Andatura di tipo spastico è osservata in tutti i soggetti con HSP, il modo in cui il passo è anomalo è spesso variabile tra individui. I soggetti HSP generalmente esibiscono ridotta lunghezza del passo dovuta a difficoltà nel sollevare le gambe e nella dorsiflessione del piede, variabili gradi di spostare anteriormente la base d'appoggio del piede (che va da attaccarsi al pavimento con la superficie medio-laterale plantare, il cuscinetto plantare, o camminare sulle punte), e una tendenza a strusciare le loro dita (dovuta a diminuita flessione dell'anca e della dorsiflessione del piede). La circonduzione, "l'andatura a forbice" (dovuta a spasticità dei muscoli adduttori), l'iperlordosi, e l'iperestensione delle ginocchia possono anche essere osservate. La capacità di camminare sui talloni è generalmente compromessa. Un'attenta analisi dell'andatura di ciascun paziente è utile per fornire specifiche indicazioni riabilitative e per determinare quali soggetti potrebbero beneficiare più di un trattamento di riduzione della spasticità e quali soggetti potrebbero beneficiare di ortesi anca-piede.

L'esame neurologico degli individui con HSP non complicata rivelano ipereflessia degli arti inferiori, spasticità (soprattutto nei muscoli della loggia posteriore della gamba, adduttori, gastrocnemio-soleo), ipostenia (soprattutto nei muscoli della loggia posteriore della gamba, ileo psoas, e tibiali anteriori) e le risposte plantari in estensione (raramente, le risposte plantari rimangono in flessione malgrado l'ovvia spasticità dell'arto inferiore e l'ipereflessia patologica).

Il coinvolgimento degli arti inferiori è tipicamente simmetrico (o quasi simmetrico).

Piede cavo (equinismo) è comune nella HSP, sebbene possa essere assente in soggetti definitivamente affetti.

La spasticità e l'ipostenia ricorrono in proporzioni variabili nelle HSPs. Sebbene alcuni pazienti presentino significativa ipostenia, altri pazienti manifestano solo marcata spasticità con nessuna ipostenia dimostrabile. Valutando i relativi contributi di ipostenia contro la spasticità aiuta determinare l'andatura di quali pazienti dovrebbe beneficiare di un trattamento medico di riduzione della spasticità.

E' comune per soggetti con HSP non complicata avere riflessi lievemente aumentati agli arti superiori. Ciononostante ipereflessia lieve agli arti superiori nelle HSP non complicate non è accompagnata da spasticità degli arti superiori, ipostenia, lentezza dei movimenti, o ridotta destrezza e non produce disturbo funzionale. La paraplegia spastica che si associa con spasticità

e ipostenia agli arti superiori lentamente progressiva e funzionalmente limitante dovrebbe far ipotizzare una diagnosi di PLS (sclerosi laterale primaria) piuttosto che una paraplegia spastica ereditaria non complicata.

Nell'HSP non complicata pallestesie lievemente diminuite nelle dita sono un altro reperto frequente. La propriocezione e altre modalità sensoriali sono normali. La riduzione della sensibilità vibratoria, quando presente e non attribuibile ad altre cause (come una neuropatia periferica o una spondilosi cervicale), è un utile segno per distinguere L'HSP dalle fasi precoci di ALS (sclerosi laterale amiotrofica) e di PLS, nessuna delle quali coinvolge un deterioramento della colonna dorsale. La diminuzione delle pallestesie a livello distale nella HSP non complicata è lieve. Un grave disturbo della colonna dorsale non è tipico di HSP non complicate e potrebbe suggerire diagnosi alternative (quali l'atassia di Friedreich, la degenerazione combinata subacuta, e una sifilide terziaria) o disturbi coesistenti.

Indagini di laboratorio e strumentali (MRI, neurofisiologia):

Il ruolo primario di studi di laboratorio, neuroimmagini e neurofisiologici è escludere disturbi alternativi. Inoltre le neuroimmagini e gli studi neurofisiologici sono utili per valutare l'estensione del coinvolgimento neurologico, e per classificare con maggiore precisione il tipo di HSP. Questa informazione è utile per stimare la prognosi. Esami di laboratorio di routine come lattato sierico, piruvato, acidi grassi a catena lunga, ed esame del liquor sono normali in soggetti con HSP.

Le immagini di risonanza magnetica dell'encefalo e del midollo spinale sono un'importante procedura per escludere altre frequenti condizioni neurologiche quali la sclerosi multipla, leucodistrofie ma anche per individuare anomalie associate come atrofie cerebellari o del corpo calloso così come anomalie della sostanza bianca (Depienne et al., 2007). MRI encefalo convenzionale è normale nelle HSP non complicate. MRI encefalo in diverse forme di HSP complicate rivela anomalie specifiche della sindrome come assottigliamento del corpo calloso in SPG11, anomalie cerebrali o cerebellari in SPG7, e idrocefalo in SPG1. La MRI del midollo spinale in HSP non complicate potrebbe essere completamente normale o mostrare atrofia, soprattutto del midollo spinale normale (Fink, 2006).

Sebbene i reperti di immagini in risonanza magnetica di cervello e midollo spinale possano apparire normali in alcuni pazienti, c'è uno spettro di immagini in RM nei pazienti con HSP, che include atrofia lieve dell'encefalo e del midollo spinale, alta intensità di segnale in T2 nelle braccia posteriori della capsula interna, lesioni della sostanza bianca non specifiche,

assottigliamento del corpo calloso, e atrofia dell'encefalo e cerebellare soprattutto nelle aree motorie e nel giro pericentrale (Lesca et al., 2003; Hourani et al., 2009).

Uno studio quantitativo di imaging in RM in 3D del volume cerebrale ha dimostrato una marcata atrofia cerebrale associata con HSP in confronto a controlli di varie età, ed era più grave e coinvolgeva entrambe sostanza grigia e bianca nelle forme complicate di HSP (Kassubek et al., 2006).

Un altro importante reperto è l'anomala intensità di segnale alta in T2 nelle braccia posteriori della capsula interna a livello delle fibre discendenti dei tratti corticospinali e corticobulbari, che si estende dalla corona radiata attraverso il braccio posteriore della capsula interna fino al tronco encefalo (Hourani et al., 2009).

In letteratura sono state anche descritte lesioni iperintense non specifiche della sostanza bianca periventricolare e nel centro semiovale soprattutto nelle aree temporoparietali. Sono rilevanti nei pazienti più anziani, suggerendo una progressiva degenerazione assonale e un avanzato stato di malattia. Nello studio proposto da Hourani et al. (2009) queste lesioni della sostanza bianca erano lievi, osservate nel 67% dei pazienti, ed erano leggermente più evidenti nei pazienti più anziani che in quelli più giovani all'interno della stessa famiglia. Questa osservazione può riflettere sia la penetranza genica sia un accumulo di lesioni correlato all'età. Queste lesioni non specifiche della sostanza bianca dovrebbero essere attentamente interpretate poiché alcuni studi dimostrano che non c'è una significativa differenza tra pazienti con HSP e una popolazione sana della stessa età (Cambi et al., 1995).

Un reperto radiologico importante in HSP è un corpo calloso ridotto. Era stato descritto nelle forme complicate autosomico recessive legate al cromosoma 15q13-q15, soprattutto in pazienti Giapponesi (Krabbe et al., 1997; Nakamura et al., 1995; Kuru et al., 2005).

Corpo calloso assottigliato è stato descritto in pazienti con HSP autosomico dominante correlato a mutazione nel gene della spastina (Orlacchio et al., 2005).

L'etiologia di un assottigliamento del corpo calloso è ancora oggetto di dibattito riguardante se secondario a ipoplasia congenita o ad atrofia progressiva. Alcuni autori la considerano un'ipoplasia che ricorre precocemente nel corso della malattia, e lo spessore del corpo calloso rimane stabile nel tempo e nel corso dei follow-up (Kuru et al., 2005).

Casali et al. (2004) avevano riportato casi con progressivo assottigliamento del corpo calloso e ipotizzato una progressiva atrofia del corpo calloso, un processo neurodegenerativo secondario a grave gliosi nella sostanza bianca cerebrale.

Hourani et al. (2009) riportano atrofia del corpo calloso nel 44% dei pazienti studiati, predominante nel lato posteriore del corpo calloso e associata con alterazioni della sostanza

bianca nella corona radiata posteriore e nelle aree peritrigonali, in cui c'è una relazione tra la localizzazione e la gravità delle alterazioni della sostanza bianca e l'atrofia del corpo calloso, suggestive di un processo atrofico del corpo calloso, in opposizione a precedenti casi descritti da Teive et al. (2001) e da Somasundaram et al. (2007), in cui l'assottigliamento era principalmente lungo il lato anteriore del corpo calloso e associato con atrofia del lobo frontale.

Le nuove tecniche di imaging RM sono state raramente usate in studi su pazienti con HSP (Dreha-Kulaczewski et al., 2006) come

- spettroscopia in risonanza magnetica,
- DTI, diffusion tensor imaging,
- SPECT, single-photon emission CT,
- FDG-PET, fluorodeoxyglucose positron-emission tomography.

La spettroscopia in MR a protoni single voxel ha rivelato ridotte concentrazioni di N-acetilaspargato (NAA), creatina (Cr) e colina (Cho) e elevati livelli di mio inositolo. Queste anomalie hanno mostrato progressione durante un periodo di 5 anni. NAA è un marker neuronale; la sua riduzione indica perdita di tessuto neuroassonale. Cr è un marker dell'energia del metabolismo ed è ridotto in aree di diminuita attenuazione cellulare. Cho è un marker della sintesi e degradazione di membrana ed è un marcatore del turnover della mielina; una ridotta concentrazione è stata vista nella ipomielinizzazione e nelle dismielinizzazione. Il mioinositolo è un marker della proliferazione degli astrociti (Moller-Hartmann W et al., 2002). Queste alterazioni metaboliche sono consistenti con la progressiva perdita neuroassonale e la proliferazione di astrociti che è nota ricorrere in HSP. DTI ha mostrato aumentata diffusività media e ridotta anisotropia frazionale nella sostanza bianca periventricolare, compatibile con assoni danneggiati mielinizzati.

SPECT e FDG-PET hanno dimostrato diminuito flusso sanguigno e ipometabolismo nel talamo e nella corteccia frontale, temporale e parietale (Winner et al., 2004). Un follow-up longitudinale clinico e neuroradiologico (Okubo et al., 2000; Ohnishi et al., 2001) ha dimostrato un'ulteriore diminuzione del flusso sanguigno relativo cerebrale nel talamo e nella corteccia cerebrale suggestivo di coinvolgimento progressivo talamico e della corteccia cerebrale.

A livello del midollo spinale, gli studi di Sperfeld et al. (2005) hanno mostrato una significativa atrofia del midollo spinale superiore in pazienti con HSP confrontati con i controlli, entrambe a livello cervicale e toracico. Uno studio di Krabbe et al. (1997) hanno dimostrato una significativa diminuzione nel diametro anteroposteriore del midollo spinale a livello di T3 e T9 in pazienti con HSP pure autosomico dominanti confrontati con i controlli, che corrispondeva a livello neuropatologico alla degenerazione dei tratti corticospinali, dei tratti piramidali non

incrociati, e del fascicolo gracile (colonne posteriori del midollo spinale) dal livello lombare su al livello superiore cervicale. Un altro studio di Hedera et al., (2005) avevano mostrato diminuzione nell'area cross-sezionale del midollo spinale ai livelli C2 e T9 confrontati con i controlli sani. L'atrofia midollare era più importante in pazienti HSP SPG6 e SPG8 piuttosto che in soggetti con tipi SPG3A e SPG4.

I precedenti studi di MRI non potevano analizzare separatamente l'ampiezza dei differenti tratti del midollo spinale anteriori (discendenti) e posteriori (ascendenti) responsabili per la gran parte dell'atrofia del midollo spinale. Comunque questi studi speculavano che l'atrofia fosse soprattutto secondaria alla degenerazione del tratto piramidale discendente, risultando in una marcata atrofia a livello toracico e non a livello cervicale. Anche altri autori avevano descritto atrofia lieve del midollo spinale cervicale e toracico (non quantificata) (Durr et al., 1994; Lesca et al., 2003; Nicolau et al., 1987; e Nielsen et al., 1998). Sebbene questo reperto non sia molto conclusivo nel confermare la diagnosi di HSP, può essere utile nella valutazione della degenerazione della colonna dorsale.

Gli studi di conduzione nervosa (NCS) in elettromiografia (EMG) sono di solito normali nella HSP non complicata. Una neuropatia subclinica sensoria è stata descritta in HSP non complicate (Shady et al., 1990; 1994). Al di là della classica distinzione in HSP "non complicate" e "complicate", un certo numero di forme di HSP (SPG10, SPG14, SPG15, SPG26, SPG3A, SPG36) sono associate con neuropatia periferica ed è stato dimostrato un coinvolgimento del motoneurone secondario.

La degenerazione assonale nelle HSP non complicate spesso coinvolge le fibre delle colonne dorsali in aggiunta ai tratti corticospinali. I potenziali evocati somatosensoriali registrati dagli arti inferiori spesso mostrano un ritardo di conduzione (Battistella et al., 1997). Quando presente questo reperto aiuta a distinguere soggetti HSP da quelli in cui la spasticità agli arti inferiori è una fase della PLS o ASL (in cui pallestesie e funzione della colonna dorsale sono normali) (Fink, 2001).

La velocità di conduzione del tratto corticospinale, misurata attraverso potenziali corticali evocati, è spesso ridotta in HSP. Sebbene i potenziali evocati corticali registrati dalle gambe spesso mostrano ridotta velocità di conduzione o ampiezza (Schulte et al., 2003; Claus et al., 1995), quelli registrati da segmenti spinali cervicali sono tipicamente normali o mostrano una velocità di conduzione solo lievemente ridotta (Claus et al., 1990).

La biopsia muscolare in alcuni ma non in tutti i soggetti con HSP legata a SPG7 (dovuta a mutazioni nella metalloproteasi mitocondriale paraplegina) mostra fibre rosse frastagliate e fibre negative per la citocromo ossidasi C (De Michele et al., 1998). L'anomalia mitocondriale

non è una caratteristica generale di tutti i tipi di HSP. Biopsie muscolari e analisi degli enzimi per la fosforilazione ossidativa sono risultate normali in HSP autosomico dominante “non complicate” SPG3A, SPG4, SPG6, e SPG8 (Fink, 2006).

Neuropatologia:

Studi post-mortem di pazienti con HSP non complicate mostrano degenerazione assonale limitata al sistema nervoso centrale (CNS) che interessa soprattutto le estremità distali delle più lunghe fibre motorie discendenti (tratti corticospinali con massimo coinvolgimento nel midollo spinale toracico) e le estremità distali delle più lunghe fibre ascendenti (fibre del fascicolo gracile, con massimo coinvolgimento nella regione cervico-midollare).

Sono stati pubblicati finora pochi lavori riguardanti la neuropatologia dell’HSP, quasi esclusivamente dedicati alle forme pure di HSP (Reid, 1999; McDermott et al., 2000; Wharton et al., 2003). In accordo a questi articoli si è creduto che le caratteristiche centrali e coerenti neuropatologiche della HSP pura costituiscono un danno alle porzioni terminali dei più lunghi tratti discendenti (ad es., tratti corticospinali laterale e eventrale) e ascendenti (ad es, fascicolo gracile) all’interno del midollo spinale, che possono essere accompagnate da una aggiuntiva degenerazione delle cellule piramidali di Betz dello strato V nella corteccia motoria primaria, del cervelletto e dei tratti spino cerebellari (Sauter et al., 1999; McDermott et al., 2000; Wharton et al., 2003).

La maggiore caratteristica neuropatologica della HSP pura è una assonopatia che dipende dalla lunghezza (Schwarz, 1952; Schwarz and Liu, 1956; Behan and Maia, 1974; Kramer, 1977; Sack et al., 1978; Bruyn, 1992). Le porzioni terminali dei lunghi assoni dei tratti corticospinali discendenti e delle colonne dorsali ascendenti sono più gravemente affetti. Di conseguenza la perdita assonale è più grave nella regione lombare dei tratti corticospinali e nella regione cervicale delle vie della colonna dorsale (soprattutto nel lungo fascicolo gracile). La degenerazione è anche stata osservata nei tratti spinocerebellari approssimativamente nella metà dei casi riportati. Le radici dorsali dei gangli, le radici posteriori e i nervi periferici sono di solito normali. In uno studio quantitativo su 6 casi HSP, l’area dei tratti corticospinali, la densità assonale e il numero degli assoni erano ridotte a tutti i livelli (Deluca et al, 2004). Nella regione lombare il numero degli assoni era ridotto del 56% in confronto ai casi controllo. Il rapporto tra numero degli assoni del tronco encefalo e lombare era significativamente più grande nei casi HSP in confronto ai controlli, suggerendo distalmente una più grande perdita assonale. Simili risultati erano stati dimostrati nei tratti delle fibre sensitive con un 56% di riduzione nel numero degli assoni nel fascicolo gracile in confronto con i controlli. Il più corto fascicolo cuneato ha

mostrato una riduzione nel numero degli assoni di minor grado e questo non raggiunge significatività statistica (23%). Queste osservazioni supportano fortemente l'ipotesi che la HSP è una assonopatia legata alla lunghezza in cui la degenerazione inizia nelle porzioni terminali degli assoni più lunghi e procede in maniera retrograda verso il corpo cellulare. E' stato ipotizzato che il corpo cellulare fosse relativamente non colpito dai processi degenerativi fino a tardi nel corso della malattia e che isolati report di una riduzione nel numero delle cellule di Betz riflettesse un avanzato stato nel processo della malattia (Schwarz e Liu, 1956). Comunque report patologici hanno iniziato a dimostrare la citopatologia in HSP (White et al 2000; Wharton et al., 2003). La citopatologia dai casi post-mortem per la spastina supportano il concetto che la patogenesi di SPG4 coinvolga la disregolazione del citoscheletro. Queste osservazioni correlano con le osservazioni in modelli cellulari e studi molecolari.

Le fibre che innervano gli arti inferiori sono le prime ad essere interessate, a supporto dell'ipotesi che il trasporto assonale, il traffico intracellulare e/o il mantenimento delle fibre lunghe fossero specificamente danneggiati in HSP, un ipotesi che è stata confermata dall'identificazione di geni coinvolti in queste funzioni e attraverso l'analisi di modelli animali. In aggiunta alle fibre lunghe altre strutture cerebrali quali il cervelletto, i gangli della base, la corteccia cerebrale, o la sostanza bianca (incluso il corpo calloso), possono essere interessati nelle forme complicate di HSP, come evidenziato dalla MRI (Franca et al., 2007).

Degenerazione del talamo è stata descritta per la prima volta in un paziente con una forma complicata di HSP, non caratterizzato geneticamente, che aveva sofferto di paraplegia spastica progressiva, disartria deterioramento cognitivo, così come sintomi emozionali (Yanase et al., 2004).

Seidel et al. (2009) hanno condotto uno studio neuropatologico del cervello di una paziente con una HSP complicata, non caratterizzata geneticamente, che mostrava un danno diffuso, con alterazioni degenerative nel cervelletto, corteccia cerebrale, talamo, tronco encefalo e midollo spinale. Gli autori vorrebbero dimostrate che le alterazioni neurodegenerative osservate nella paziente studiata offrono spiegazioni ai sintomi motori, psichiatrici, e neuropsicologici. Secondo gli autori, in funzione di ruoli fisiologici noti delle strutture nervose centrali affette, un sottogruppo di sintomi di malattia clinicamente osservati nella paziente HSP potrebbero essere spiegati sulla base dei reperti trovati nello studio neuropatologico.

1.3.4 Scala di valutazione funzionale (SPRS):

Nel 2003 il GeNeMove (German Network for Hereditary Movement Disorders) è stato fondato per la ricerca sui rari disturbi genetici del movimento in Germania. Un trial multicentrico è stato condotto da una task force del GeNeMove, che consiste di specialisti dei disturbi del movimento provenienti da sei università tedesche, per sviluppare e validare una Scala di Valutazione per la Paraplegia Spastica (SPRS) come misura della gravità e della progressività di malattia.

Schule et al. (2006) hanno descritto la scala SPRS come strumento di misura affidabile e valido del grado di disabilità. Questa scala di 13-item è stata costruita per valutare il deterioramento funzionale che avviene in forme pure di paraplegia spastica (SP). Sintomi aggiuntivi che costituiscono una forma complicata di SP vengono registrati in una lista a parte. L'applicazione di SPRS richiede meno di 15 minuti e non richiede nessuna strumentazione speciale, adatta per un setting di pazienti ambulatoriali. La concordanza della SPRS era alta (ICC=0.99) e l'affidabilità era ulteriormente supportata da una alta consistenza interna (Cronbach $\alpha = 0.91$). I valori di SPRS erano quasi normalmente distribuiti senza un apparente "effetto di pavimento e tetto". La validità del costrutto è stata dimostrata attraverso un'alta correlazione delle SPRS all'indice di Barthel e alla ICARS (validità convergente) e bassa correlazione al MMSE (validità discriminante). La costruzione di SPRS è stata basata sui seguenti punti:

- 1) SPRS deve valutare il danno funzionale e perciò non includere segni neurologici senza implicazioni funzionali come la presenza del riflesso plantare in estensione o l'ipereflessia tendinea;
- 2) SPRS deve porre l'attenzione sulle caratteristiche chiave della HSP pura; le caratteristiche complicanti devono essere registrate in una lista di segni e sintomi complicanti;
- 3) SPRS deve essere pratica. Nessun equipaggiamento speciale deve essere necessario per somministrare la scala; gli items devono basarsi sulle procedure dell'esame obiettivo neurologico standard.

SPRS è adatta per tutti i sottotipi di HSP incluse le forme familiari e sporadiche così come i fenotipi puri o complicati. Questa scala per la valutazione della disabilità utilizza procedure di esame neurologico standard nella maggior parte dei suoi items, le istruzioni per effettuare il test e il punteggio dovrebbero essere brevi per molti items senza compromettere la concordanza. Completare la SPRS richiede meno di 15 minuti e non richiede strumenti particolari. La lista

delle caratteristiche complicate è adattata all'esame neurologico di routine e evita tests aggiuntivi che portano via molto tempo. SPRS è uno strumento particolarmente adatto per un setting ambulatoriale.

L'età pediatrica è stata esclusa dal processo valutativo di SPRS. Le tappe principali dello sviluppo motorio sono inseparabilmente intrecciate con una probabile progressione di malattia nei bambini affetti; una rappresentazione differenziata di queste complesse interrelazioni in un punteggio non specializzato per questo scopo sembra impossibile. Di conseguenza SPRS non è adatto a differenziare tra cambiamenti evolutivi ed età correlati del sistema motorio e cambiamenti dovuti a progressione di malattia.

Sono state usate scale esistenti come la Scala di Ashworth per la valutazione della spasticità e la Medical Research Council Scale (Scala del Concilio di Ricerca Medico) per la valutazione della forza muscolare. Ciascun item della scala deve discriminare 5 gradi (0 a 4), dove 0 rappresenta nessun interessamento e 4 il massimo grado di gravità. Il punteggio risultante è calcolato aggiungendo singoli punteggi a ciascuno dei 13 items, risultando in un massimo punteggio di 52.

Per ogni singolo item, l'intero punteggio è stato raggiunto dai singoli pazienti cui è stata somministrata nello studio preliminare (Schule et al., 2006). Comunque nessun paziente ha raggiunto la somma massima di punteggio di 52 punti. Questa costruzione aiuta a prevenire che il paziente riceva un massimo punteggio alla SPRS prima che lo stadio finale di malattia sia raggiunto (ceiling effect-“effetto tetto”), siccome SPRS dovrebbe essere capace di rappresentare la progressione anche in stadi di malattia molto avanzati. SPRS distingue quasi perfettamente tra pazienti SP e controlli sani, ha mostrato di essere sensibile ai sintomi SP anche in stadi precoci di malattia e ciò argomenta contro un effetto “floor”. SPRS è correlata solo moderatamente con la durata di malattia, la variabilità nella progressività della malattia tra sottotipi risulta in un danno variabile dopo una durata fissa di malattia e riduce la correlazione tra gravità di malattia e durata.

(Per lo specifico protocollo si rimanda al paragrafo 7.1)

1.4 *Ipotesi sui meccanismi patogenetici*

La maggior parte delle HSPs sono associate a neurodegenerazione piuttosto che a sviluppo anomalo. Questa neurodegenerazione è stata caratterizzata in studi istopatologici come un meccanismo di “dying back” degli assoni dipendente dalla lunghezza nel tratto corticospinale e nella colonna dorsale. L'identificazione di geni associati con HSP è utile per spiegare le cause della malattia a livello molecolare.

1.4.1 *Trasporto assonale e traffico di membrana*

I neuroni del tratto corticospinale sono altamente polarizzati e i loro assoni possono crescere più di un metro in lunghezza. La funzione normale in questi neuroni è criticamente dipendente dal corretto traffico dei componenti di membrana. Dagli studi su diversi geni causativi di HSP è derivata l'ipotesi che ci siano interruzioni del trasporto assonale di macromolecole e organelli, che colpiscono prevalentemente le parti distali di questi neuroni (Crosby et al., 2002; Soderblom et al., 2006). Come risultato della morfologia unica dei neuroni spinali, i lunghi assoni (che possono misurare oltre 1 metro in lunghezza) sono molto probabilmente molto suscettibili ai meccanismi di trasporto di membrana, al trasporto associato ai microtubuli e all'organizzazione citoscheletrica. Inoltre dipendono da funzioni mitocondriali per guidare in modo efficiente il trasporto di segnali, molecole e organelli alla parte terminale dei nervi. Per cui il traffico di membrana e il trasporto assonale sono il motivo ricorrente emergente e potenzialmente importante nelle HSP.

Trasporto assonale.

Il trasporto assonale principalmente dipende dai microtubuli, ed è alimentato da due distinte classi di molecole motori, vale a dire la dineina (trasporto retrogrado) e le kinesine (soprattutto trasporto anterogrado). La dineina citoplasmatica è un motore ubiquitario della famiglia delle AAA (ATPasi associate con varie attività cellulari), e comprende molte subunità responsabili per l'aggancio ai microtubuli e il reclutamento del carico. La dineina è necessaria per un'ampia varietà di processi cellulari, quali la divisione cellulare e il mantenimento del Golgi, e i neuroni sono molto dipendenti dal corretto funzionamento di questo complesso molecolare per il loro trasporto assonale. Infatti la dineina è coinvolta nel trasporto assonale di numerosi carichi, quali gli endosomi neurotrofina-segnale, mitocondri, segnali generati da una lesione, e proteine associate all'RNA.

La famiglia delle kinesine comprende diversi membri, alcuni dei quali sono responsabili per il rilascio di materiale alle terminazioni nervose. La kinesina 1 è composta da due catene pesanti e due catene leggere. Le catene pesanti contengono sia domini ATPasi che domini di legame ai microtubuli, mentre le catene leggere si pensa siano selettive per il riconoscimento del carico.

Il mantenimento della trama citoscheletrica inoltre dipende dai motori molecolari, che sono responsabili del trasporto di corti microtubuli e neurofilamenti laddove sono richiesti per la crescita e il riparo. Componenti importanti per il processo di rimodellamento dei microtubuli sono quelle proteine che tagliano i microtubuli in frammenti brevi.

Traffico di membrana.

Tutte le cellule hanno un sistema di traffico di membrana regolato, dinamico che consente le interazioni tra la membrana plasmatica e altri compartimenti cellulari legati alla membrana. Questo traffico è altamente organizzato e comincia con la gemmazione delle vescicole, seguito dal trasporto delle vescicole, *tethering* e fusione con la membrana bersaglio. Endocitosi inizia con la formazione di una vescicola alla membrana plasmatica che contiene recettori o altre proteine transmembrana, ed è legata sul rivestimento proteico della vescicola, la clatrina. Le vescicole vengono trasportate lungo i microtubuli, e quindi *tethering* e fusione degli endosomi avviene per rilasciare il carico alle varie localizzazioni subcellulari. Questi processi dipendono da alcune famiglie di proteine, come la famiglia di piccole GTPasi Rab, che media la destinazione intracellulare delle vescicole, e le proteine associate-ESCRT (complesso di smistamento endosomiale richiesto per il trasporto: endosomal sorting complex required for transport), che smista le proteine bersaglio per la degradazione ubiquitina-dipendente.

Il *pathway* di secrezione fluisce nella direzione opposta all'endocitosi, dal reticolo endoplasmatico (ER) e dall'apparato di Golgi, e permette la distribuzione di proteine di nuova sintesi, carboidrati e lipidi alla superficie cellulare, endosomi e lisosomi.

8 geni causativi HSP e le rispettive proteine codificanti sono coinvolti nella disfunzione del trasporto assonale e del traffico di membrana come causa di HSP:

- 1) *SPAST*/Spastina
- 2) *ATL1*/Atlastina GTPase 1
- 3) *KIF5A*/Kinesina membro della famiglia 5A
- 4) *NIPA1*/Non imprinted nella sindrome di Prader-Willi/Angelman 1
- 5) *ZFYVE26*/Spastizina

- 6) *SPG20*/Spartina
- 7) *SPG21*/Maspardina
- 8) *SPG11*/Spatacsina.

***SPG4*/Spastina.**

I casi associati a *SPG4* costituiscono circa il 40% dei casi HSP autosomico dominanti, rendendo le mutazioni in questo gene la più comune causa di HSP. Oltre 150 mutazioni sono state descritte in *SPG4*, che codifica la spastina, un membro della famiglia delle proteine ATPase-associate (AAA), che sono componenti della dineina motore e sono coinvolte nel trasporto assonale retrogrado (Hollenbeck et al., 2005; van Niekerk et al., 2007). La spastina è presente in differenti isoforme che dipendono dalla traslazione del codone iniziale (ATG) usato e dallo *splicing* degli esoni, in particolare l'esone 4. Questo ha una grandezza prevista fino a 616 amminoacidi. Un lavoro sperimentale ha ipotizzato che il secondo ATG, che dà luogo a una isoforma più corta, è il codone di inizio principale, sebbene uno studio recente in ratti abbia scoperto che l'isoforma più lunga fosse espressa a concentrazioni più alte nei neuroni del midollo spinale piuttosto che in altri neuroni. La spastina possiede due domini di struttura principali, un dominio MIT (interazione con il microtubulo e traffico- Microtubule Interacting and Trafficking) nell'N-terminale e un dominio catalitico AAA nel C-terminale. Le oltre 150 mutazioni sono state descritte in tutti gli esoni, eccetto che nell'esone 4. Queste mutazioni principalmente missenso e non senso, interessano il dominio AAA della spastina, suggerendo una perdita di funzione nella patogenesi di HSP. Più recentemente è stato dimostrato che riarrangiamenti genici, in particolare delezioni esoniche, sono un causa comune di malattia. I neuroni sembrano essere sensibili all'aploinsufficienza della spastina poichè mutazioni che danno luogo ad entrambe le forme della proteina normale e aberrante sono sufficienti a produrre il quadro clinico completo. Studi cellulari hanno dimostrato che la spastina mutata colocalizza con i microtubuli e l'over-espressione della spastina *wilde-type* porta a disassemblaggio dei microtubuli. Nei motoneuroni la spastina è abbondante in regioni cellulari in cui si trovano i microtubuli dinamici, come gli assoni distali. Studi comparativi in neuroni primari su spastina e katanina, un enzima di taglio dei microtubuli connesso alle AAA, suggerisce che il taglio dei microtubuli mediato dalla spastina è coinvolto soprattutto nella ramificazione assonale. L'overespressione di spastina nei neuroni di ippocampo di ratto causa un drammatico aumento nella formazione di ramificazioni assonali associato con un incremento nel numero di microtubuli corti, tagliati. La deplezione della spastina porta a neuroni con assoni più corti con un numero inferiore di ramificazioni. Questi risultati sono in accordo con la crescente evidenza

che la spastina ha un ruolo nel turnover dei microtubuli, e la attività di taglio dei microtubuli della spastina è stata confermata da studi in vitro. Le mutazioni in AAA *cassette* inoltre aboliscono questa attività di taglio della spastina. La spastina potrebbe avere un'ulteriore attività di impacchettamento (“bundling”) dei microtubuli, così come può impacchettare i microtubuli polimerizzati in vitro, e forme mutate possono indurre stabilizzazione dei microtubuli quando overespresso in linee cellulari. Il coinvolgimento della spastina nel pathway endocitico deriva dalla scoperta di un legame della spastina alla proteina 1B modificatrice della cromatina, una proteina associata con il complesso di smistamento endosomiale, probabilmente mediato dal dominio MIT. Una parziale co-localizzazione della spastina con un marcatore endosomiale ed uno del RE è stata inoltre riportata, portando all'ipotesi che la spastina potrebbe funzionare nella regolazione dei microtubuli responsabile del movimento assonale degli organelli di membrana. Recenti studi biochimici hanno dimostrato che la spastina possa formare esameri che si legano alla tubulina polimerizzata inducendo un cambio conformazionale che è responsabile della rottura dei microtubuli. Le mutazioni correlate a malattia sembrano interferire con anelli porosi in questa struttura esamerica.

Numerose mutazioni in spastina soprattutto ampie delezioni, mutazioni che esitano in proteine tronche e cambi non senso, agiscono attraverso una perdita di funzione, ma questo non sembra essere l'unico meccanismo patogenetico (Solowska et al., 2008). Sono state studiate forme patogenetiche di spastina mutata iniziate dal primo codone ATG, questa isoforma di piena lunghezza era stata trovata in concentrazioni più alte nei neuroni di midollo spinale di ratto durante l'età adulta, ma non in altri neuroni. Espressione sperimentale di un peptide disfunzionale nei neuroni che comprenda la regione N-terminale (aa 1-273) espressa dal primo codone ATG, era deleteria per la crescita assonale. Espressione di questo peptide negli assoni giganti di calamaro ha inibito il trasporto veloce assonale, mentre l'espressione di un peptide corto simile tradotto dal secondo codone ATG non aveva questi effetti deleteri. Questi studi sulla spastina implicavano un'interruzione dei processi che mantengono il citoscheletro di microtubuli, che in successione potrebbe agire sfavorevolmente sul trasporto assonale e portare ad una anomala crescita assonale o degenerazione.

Le differenti mutazioni in *SPG4* portano quindi ad aploinsufficienza o a guadagno di funzione, e l'interazione della spastina con CHM1B indica che la spastina è anche coinvolta nel pathway endocitico e nella formazione dei “midbody” durante la citocinesi (Yang et al., 2008).

ATL1/Atlantina GTPase 1.

L'atlastina è una proteina di 64 kDa localizzata soprattutto nel cervello, nei neuroni piramidali e nella corteccia cerebrale e nell'ippocampo (Zhao et al., 2001b; Zhu et al., 2003).

Zhu et al. (2003) hanno clonato per primi *SPG3A*, e l'hanno chiamato *atlastina-1*. La proteina che ne deriva di 558 aminoacidi contiene un motivo di legame GTP nel suo N-terminale e 2 domini trans membrana alla metà del suo C-terminale. Ha anche 3 potenziali siti di N-glicosilazione. L'espressione di atlastina-1 appariva più alta nei tessuti cerebrali di uomo e di ratto, e più bassa in altri tessuti umani, inclusi la muscolatura liscia, il surrene, il rene e il polmone. L'atlastina-1 si autoassocia formando omotetrameri di circa 230 kD. Zhu et al. (2003) hanno dimostrato la sua attività GTPasica. Poiché la proteina è probabilmente attiva come tetramero, si è ipotizzato un effetto dominante-negativo della mutazione.

Esistono tre isoforme per la ATL1, le prime due differiscono per lo *splicing* alternativo dell'esone 14, mentre il terzo trascritto differisce nel 5' UTR confrontato con la variante 1, la risultante isoforma b ha gli stessi N- e C- terminali ma è più corto se confrontato con l'isoforma a. Le varianti 2 e 3 codificano entrambe per l'isoforma b (Muriel et al., 2009; Hu et al., 2009; Chan et al., 2009; Louriero et al., 2009; Smith et al., 2009).

Sulle basi della sua somiglianza con le proteine appartenenti alla superfamiglia delle dinamine delle ampie GTPasi e di studi in sistemi eterologhi di culture cellulari, l'atlastina 1 si ritiene possa essere implicata nella emissione dei neuriti (Zhu et al., 2006; Namekawa et al., 2007) e nel traffico di membrana intracellulare, soprattutto all'interfaccia RE-Golgi. Le funzioni della famiglia dell'atlastina sembrano essere principali nella morfogenesi del RE e del Golgi, ma non sembra essere richiesta nel traffico anterogrado RE-al-Golgi. La morfogenesi anomala del RE e del Golgi potrebbe interferire con una corretta distribuzione di membrana o polarità dei neuroni corticospinali. In neuroni in cultura, l'atlastina 1 è aumentata nei coni di crescita e promuove l'allungamento degli assoni durante lo sviluppo neuronale. Questa proteina dinamina/guanilato binding (GBP) con domini transmembrana ha mostrato diverse localizzazioni subcellulare: reticolo endoplasmatico, cis-Golgi, strutture vescicolari nei coni di crescita assonale, varicosità, e punti di diramazione assonale, che hanno suggerito un ruolo funzionale nel traffico intracellulare ma anche nello sviluppo assonale, che è coerente con l'età di esordio precoce nei pazienti SPG3A. Alcune mutazioni in atlastina-1 interessano l'attività guanosino trifosfato della proteina e sembrano interessare l'estroflessione vescicolare dal reticolo endoplasmatico o il loro segnale al Golgi, che potrebbe essere in connessione con l'interazione dell'atlastina con p24, una proteina della famiglia p24/emp/gp25L.

Atlastina e Spastina interagiscono direttamente, il dominio N-terminale della spastina si lega direttamente al dominio C-terminale citoplasmatico della atlastina, il che suggerisce un pathway comune di patogenesi (Sanderson et al., 2006; Evans et al., 2006).

Orso et al. (2009) hanno dimostrato che l'atlastina in *Drosophila* localizza sulle membrane del reticolo endoplasmatico e la sua perdita causa frammentazione del RE. L'atlastina in *Drosophila* integrata in distinte membrane ha la capacità di formare complessi trans-oligomerici, e la sua sovra-espressione induce un allargamento del profilo del RE, in accordo con una eccessiva fusione delle membrane del RE. Esperimenti in vitro hanno confermato che l'atlastina conduce autonomamente la fusione delle membrane in modo GTP-dipendente. Mentre l'atlastina con deficit di GTP-asi è inattiva, incapace di formare complessi trans-oligomerici che portano al fallimento dell'autoassociazione, e incapace di promuovere la fusione in vitro. I risultati di Orso et al. (2009) hanno dimostrato che l'atlastina media l'assemblamento e la fusione di membrana e suggeriscono che è l'attività GTPasica necessaria per la fusione omotipica del RE.

***KIF5A*/Kinesina membro della famiglia 5A.**

KIF5A è un membro del gruppo di proteine della kinesina a catena pesante. KIF5A è espressa esclusivamente nei neuroni e forma parte del complesso kinesina I, un motore dei microtubuli responsabile per il trasporto veloce anterogrado dal corpo cellulare neuronale all'assone distale microtubulo-dipendente (Xia et al., 1998; Goldstein and Yang, 2000; Goldstein, 2001).

Studi in vitro hanno mostrato che forme mutate di KIF5A portano ad una riduzione del flusso di trasporto lungo i microtubuli dovuta ad una riduzione della affinità per i microtubuli o della velocità di scorrimento, e un deficit nel carico kinesina-dipendente perciò probabilmente sta alla base della degenerazione terminale degli assoni. La mutazione N256S identificata in una famiglia interessa un residuo non variante di asparagina (Reid et al., 2002). In proteine omologhe questo residuo è cruciale nell'attività ATPasi sui legami ai microtubuli (Yun et al., 2001). Nell'omologa di *Saccharomyces cerevisiae*, la mutazione Kar3 che interessa lo stesso residuo disaccoppia nucleotide e legame del microtubulo al motore, dando luogo ad un blocco della stimolazione microtubulo-dipendente dell'attività del motore ATPase (Song e Endow, 1998). Un simile effetto è stato visto con la stessa mutazione nella Kinesina motore Ncd di *Drosophila* (Song e Endow, 1998). Un altro cambio missenso identificato (R280C) interessa un residuo di arginina altamente conservato e si ipotizza possa causare un cambio strutturale che altera il legame con i microtubuli (Fichera et al., 2004).

NIPA1/Non imprinted nella sindrome di Prader-Willi/Angelman 1.

La proteina NIPA1 è una proteina transmembrana neurone-specifica principalmente localizzata nel comparto endosomiale precoce e sulla membrana plasmatica, dove si pensa svolga funzione di trasportatore del magnesio (Goytain et al., 2007). Le mutazioni patogene missenso impediscono il trasferimento della proteina dagli endosomi alla membrana plasmatica. Un guadagno di funzione dominante negativo è probabilmente responsabile per questo effetto, poichè ampie delezioni del gene non determinano un fenotipo HSP. L'introduzione di mutazioni NIPA1 umane nell'ortologo *nipa1* della *Caenorhabditis elegans* causa neurodegenerazione. La deplezione di NIPA1 nell'ortologo di *Drosophila melanogaster*, la spictina, suggerisce che abbia anche un ruolo nel trasporto assonale. L'ortologo di NIPA1 in *Drosophila* (spictina) interagisce con recettori della proteina morfogenetica dell'osso e promuove la loro internalizzazione dalla membrana (Wang et al., 2007). Il *signaling* della proteina morfogenetica dell'osso è necessario per l'assemblaggio normale del citoscheletro microtubulare, e le mutazioni NIPA1 potrebbero perciò interferire con il trasporto assonale allo stesso modo.

ZFYVE26/Spastizina.

I casi SPG15 sono associati con mutazioni che causano proteine tronche in *ZFYVE26*, che codifica una proteina zinco finger chiamata spastizina, e ha un fenotipo caratteristico autosomico recessivo complicato. L'iniziale studio cellulare della spastizina indicava che colocalizza con marcatori endosomiali e del reticolo endoplasmatico, e che si pensa sia coinvolta nel traffico di membrana a questi livelli (Hanein et al., 2008).

SPG20/Spartina.

Le HSP dovute a mutazione in *SPG20* sono una forma autosomico recessiva, la sindrome di Troyer. La sindrome di Troyer è causata da una mutazione *frameshift* (1110delA) nel gene *SPG20*, le mutazioni identificate producono proteine tronche, implicando una perdita di funzione (Patel et al., 2002). Il gene *SPG20* codifica una proteina di 666 aminoacidi (72.7 kDa) chiamata spartina (spastica paraplegia autosomica recessiva della sindrome di Troyer) ubiquitariamente espressa nei tessuti adulti. La spartina presenta omologia con le proteine umane SNX15, VPS4 e Skd1 coinvolte nel traffico proteico, suggerendo un ruolo simile per la spartina. La spartina condivide omologia con la regione N-terminale della spastina, possiede un dominio MIT (dominio N-terminale per l'interazione con i microtubuli e il traffico), suggerendo una funzione simile (Patel et al., 2002; Ciccarelli et al., 2003). In tal senso è stata associata ad

una funzione di trasporto, ma ci sono dati contrastanti che riguardano la sua localizzazione subcellulare, a livello mitocondriale, o con una distribuzioni nucleare e citoplasmatica. E' stata implicata nell'endocitosi e nel trasporto del recettore del fattore di crescita epidermiale (Bakowska et al., 2007) ed è stata trovata in strutture simil-sinaptiche, neuriti e rete trans-Golgi in neuroni differenziati (Robay et al., 2006). La associazione della proteina attraverso i microtubuli con i mitocondri viene persa quando è mutata (Lu et al., 2006). Questo ha fatto ipotizzare che la Troyer syndrome possa essere causata da difetti nel trasporto dei mitocondri mediato dai microtubuli. La spartina si ritiene sia associata alla superficie di gocce lipidiche e ne regoli la grandezza e il numero (Bakowska et al., 2007).

SPG21/ACP33/Maspardina.

Le HSP associate con SPG21 sono forme autosomico recessive. Un'inserzione nucleotidica nel gene SPG21 esita in una proteina tronca ACP33/maspardina che sottende questo disturbo, suggerendo un meccanismo di perdita di funzione (Simpson et al., 2003). Prima che fosse identificato il suo coinvolgimento in HSP la maspardina era stato supposto colocalizzasse con vescicole della rete endosomiale/trans-Golgi, ipotizzando un ruolo nel trasporto della proteina e nello smistamento, e anche con vescicole transferrina positive (Zeitlmann et al., 2001). Uno studio recente ha confermato che essa localizza soprattutto al citoplasma nonché alle membrane, probabilmente agli ultimi compartimenti endosomiali della rete trans Golgi (Hanna et al., 2009).

SPG11/Spatacsina.

Mutazioni *frameshift*, non senso e di *splicing* nel gene *KIAA1840* che codifica la spatacsina sono state identificate in molte famiglie con HSP associata a SPG11, ipotizzando un meccanismo di perdita di funzione. La spatacsina è ubiquitariamente espressa nel sistema nervoso, soprattutto nel cervelletto, nella corteccia cerebrale, e nell'ippocampo. Possiede almeno un dominio trans membrana e gli esperimenti in immunofluorescenza hanno mostrato una diffusa espressione citosolica, con una sfumata colocalizzazione nei mitocondri e nel RE, ma non c'è associazione con il Golgi o con i microtubuli. Ad oggi la patogenesi di questa forma di HSP è sconosciuta, sebbene la scoperta di accumulo di materiale membranoso pleomorfo in assoni non mielinizzati di una biopsia di un nervo surale da un paziente con HSP associata a SPG11 è stata interpretata come compatibile con trasporto assonale disturbato.

1.4.2 Funzioni mitocondriali

Mitocondri e HSP

I mitocondri generano ATP attraverso l'attività dei complessi della catena respiratoria. Deficits di energia intracellulare ricorrono quando le attività dei complessi mitocondriali della catena respiratoria sono disturbati. Altre conseguenze dannose intracellulari di disfunzioni mitocondriali includono: aumentata generazione di specie reattive all'ossigeno, stress ossidativo e danno dell'omeostasi del calcio intracellulare. Il ruolo del danno mitocondriale e dello stress ossidativo in altre malattie neurodegenerative come l'ataxia di Friedreich, malattia del motoneurone e malattia di Huntington è ben riconosciuto (Manfredi e Beal, 2000). I corpi cellulari dei lunghi assoni interessati in HSP devono supportare processi assionali molto lunghi.

3 geni causativi HSP supportano un ruolo per la disfunzione mitocondriale:

- 1) *SPG7*/Paraplegina,
- 2) *HSPD1/HSP60*/ Heat shock 60-kDa protein 1,
- 3) *REEP1*/ Receptor expression-enhancing protein 1.

***SPG7*/Paraplegina.**

Mutazioni in *SPG7*, che codifica la paraplegina costituiscono circa il 5% delle HSPs autosomiche recessive. Paraplegina è una proteina nucleare codificata nel mitocondrio che comprende 795 amminoacidi. Mutazioni nella paraplegina causano forme pure e complicate di HSP, e i pazienti con queste mutazioni hanno difetti nella fosforilazione mitocondriale ossidativa (Casari et al., 1998).

La precisa funzione della paraplegina è sconosciuta, esistono studi su proteine omologhe di lievito, Afg3, Rca1 e Yme1. Queste proteine di lievito, come la paraplegina sono membri della classe di proteine AAA. Appartengono al sottogruppo delle metalloproteasi, dissimili dalla spastina che appartiene al gruppo meiotico delle proteine AAA. Nel lievito Afg3 e Rca1 formano un complesso ad alto peso molecolare localizzato all'interno della membrana mitocondriale dove svolgono diversi ruoli che includono: partecipare all'assemblaggio della sintesi dell'ATP, la formazione del complesso della catena respiratoria e la degradazione di polipeptidi mitocondriali non completamente sintetizzati (Tauer et al., 1994; Tzagoloff et al., 1994; Rep and Grivell, 1996). La delezione o una mutazione di un sito proteolitico conservato di Afg3p o Rca1p porta a disfunzione della attività della catena respiratoria e diminuita capacità degradativa dei polipeptidi mitocondriali non completamente sintetizzati. Proteine simili alla

paraplegina, AFG3L2 e YME1L1, sono state identificate nell'uomo, e sono altamente omologhe allo stesso gruppo delle proteine del lievito (Banfi et al., 1999; Coppola et al., 2000). AFG3L2 è anche localizzata all'interno della membrana mitocondriale dove forma un complesso di 900 kD con la paraplegina, e possiede attività proteolitica (Atorino et al., 2003). In fibroblasti in cultura da pazienti SPG7nil il complesso AFG3L2-paraplegina era assente. I fibroblasti SPG7 hanno un'incrementata sensibilità allo stress ossidativo ed una ridotta attività del complesso I della catena respiratoria che potrebbe essere migliorata dalla espressione esogena di paraplegina *wild type*. La perdita del complesso delle metallo-proteasi AAA in fibroblasti da pazienti con HSP associata a SPG7 causa ridotta attività del complesso I nella catena respiratoria mitocondriale e aumenta la sensibilità allo stress ossidativo (Arnoldi et al., 2008; Wilkinson et al., 2004). I topi nulli per la paraplegina sviluppano rigonfiamenti assonali a causa di un accumulo di mitocondri e neurofilamenti. Questo evento precede la degenerazione assonale ma correla con l'esordio di danno motorio, perciò lascia ipotizzare che sia il trasporto assonale sia la disfunzione mitocondriale possano essere implicate e che la malattia sia dovuta alla perdita di funzione della paraplegina.

I meccanismi attraverso cui un deficit di paraplegina possono interrompere la funzione mitocondriale includono: un accumulo di proteine anomale o ripiegate male (misfolded) nella membrana interna mitocondriale, l'incompleta formazione della catena respiratoria e un danneggiato turnover di una proteina mitocondriale regolatoria. I risultati proposti nello studio su fibroblasti SPG7, che ipotizza un fallimento nel corretto assemblaggio del complesso I causato dalla mancanza del complesso AFG3L2-paraplegina, fornisce un'ulteriore contributo sui meccanismi di disfunzione mitocondriale. In SPG7 sembrerebbe che la causa principale della disfunzione mitocondriale possa essere un disturbo nel trasporto assonale.

I meccanismi patogenetici in SPG7 sono complessi, anche a causa di un ampio numero di polimorfismi missenso, che sono più spesso trovati in stato eterozigote. Questo complica grandemente l'analisi genetica (Arnoldi et al., 2008). Una disfunzione mitocondriale indicata dalla presenza di fibre muscolari negative per la citocromo c ossidasi sono state riportate in tre famiglie con mutazioni nella paraplegina (Casari et al., 1998; McDermott et al., 2001). Altri autori hanno riportato danni biochimici consistenti in una riduzione delle attività del complesso I e del complesso II/III ma non cambi istochimici nelle biopsie muscolari da individui con SPG7 (Wilkinson et al., 2004).

HSPD1/HSP60/ Heat shock 60-kDa protein 1.

La chaperonina mitocondriale heat shock protein 60 (HSP60/ HSPD1) mutata in famiglie con forme pure di HSP autosomica dominante, si manifesta con forme ad esordio tardivo. HSP60 è parte di un complesso multimerico ben caratterizzato che si pensa supporti il *folding* di un sottogruppo di proteine localizzate nei mitocondri. Uno studio cellulare da un paziente con la mutazione Val98Ile ha dimostrato una diminuita espressione delle proteasi per il “controllo di qualità mitocondriale” Lon (ATP-dipendente proteasi La) e ClpP (ATP-dipendente proteasi Clp sub unità proteolitica) ad entrambe i livelli dell’ mRNA e delle proteine (Hansen et al., 2008). È stata proposta in un recente lavoro una mutazione missenso in HSPD1 associata a pazienti con esordio precoce che presentano una mutazione patogenetica in spastina (Hewamadduma et al., 2008). Una riduzione nell’attività degradativa del sistema di “controllo di qualità” proteica nei mitocondri nella HSP associata a HSPD1 si è pensato porti alla conseguente disfunzione mitocondriale.

REEP1/ Receptor expression-enhancing protein 1.

REEP1 codifica la proteina 1 recettore expression enhancing, localizzata nei mitocondri. Questa proteina si suppone possa essere coinvolta in attività chaperone-like. Sono state identificate mutazioni che interessano i siti di riconoscimento dei microRNA nella regione 3’UTR che possono alterare la stabilità degli mRNA. I microRNA rappresentano piccole molecole non tradotte che si legano a specifici siti bersaglio di 7-8 nucleotidi nella regione 3’-UTR degli mRNA, e inibiscono la traduzione e alterano il trascrizione e la stabilità (Bartel, 2004). L’omologo della proteina REEP1 in lievito (Yop1P) interagisce con le proteine Rab ed è implicata nella morfologia tubulare nel reticolo endoplasmatico. Sebbene la localizzazione mitocondriale di REEP1 sia evidente, la sua funzione su questo o su altri organelli rimane da chiarirsi (Zuchner et al., 2006; Beetz, 2008).

1.4.3 Mantenimento e assemblaggio della mielina e migrazione neuronale

I geni causativi di alcune HSPs sono coinvolti nella mielinizzazione.

2 geni causativi HSP che sottendono a due forme X-linked recessive di HSP sono:

- 1) *LICAM*/Molecola di adesione cellulare L1 (LICAM),
- 2) *PLP1*/Proteolipido proteina 1 (PLP1).

L1CAM/Molecola di adesione cellulare L1 (L1CAM).

L1CAM è una glicoproteina trans membrana, principalmente espressa dai neuroni e dalle cellule di Schwann (Joosten e Gribnau, 1998). La proteina ha 6 domini omologhi ai membri della superfamiglia delle immunoglobuline e 5 domini omologhi alla fibronectina di tipo III (Bateman et al., 1996). L1CAM gioca un ruolo essenziale nello sviluppo del sistema nervoso, essendo coinvolta nell'adesione neurone-neurone, nella crescita assonale e nel *pathfinding* (Brummendorf e Rathjen, 1996). L1CAM gioca un importante ruolo nella formazione dei tratti corticospinali (Cohen et al., 1997; Dahmne et al., 1997; Frase et al., 1998; Demyanenko et al., 1999).

PLP1/Proteolipido proteina 1 (PLP1).

Le mutazioni in *PLP1* sono causa di una forma complicata di HSP (SPG2) e della malattia di Pelizaeus-Merzbacher (PMD). PLP1 e la sua isoforma più piccola DM20 sono proteine di membrana integrali che costituiscono circa il 50% del contenuto proteico della mielina del sistema nervoso centrale adulto. Mutazioni nell'esone 3 di *PLP1* potrebbero esitare prevalentemente in SPG2 piuttosto che in PMD perché questo esone è escluso da DM20. Viceversa si ha la malattia PMD solo quando DM20 è interessata da mutazione. Le due proteine mieliniche, PLP e DM20, essendo componenti strutturali della guaina mielinica e hanno un ruolo rilevante nella maturazione degli oligodendrociti. Il preciso meccanismo attraverso cui le mutazioni in PLP causano HSP non è chiaro, ma potrebbero esserne la causa l'alterazione della mielinizzazione del tratto cortico-spinale, forse a causa di effetti di tossicità sugli oligodendrociti indotti da un anomalo traffico intracellulare. In un modello di topo con una mutazione nulla di PLP1 è stato dimostrato il danno del trasporto veloce anterogrado e retrogrado. Alla autopsia di pazienti con mutazioni nulle PLP1 è evidente una perdita assonale che dipende dalla lunghezza degli assoni nel SNC.

Ci sono tre meccanismi ipotizzati per produrre il fenotipo PMD/SPG2 (Inoue, 2005). Innanzitutto i cambiamenti conformazionali della proteina PLP secondari a mutazioni puntiformi porta ad un accumulo di PLP malassemblata nel reticolo endoplasmatico. L'accumulo di proteina *misfolded* può scatenare il *pathway* di risposta della proteina non ripiegata che può portare ad apoptosi degli oligodendrociti. Con le duplicazioni genomiche la PLP in eccesso si accumula nei tardi endosomi/lisosomi con il colesterolo. Questa aggregazione può sconvolgere il normale traffico della mielina necessaria per la normale mielinizzazione. Nelle mutazioni in cui PLP non è tradotta, si forma una mielina compatta in assenza di PLP. Questa mielina è fragile e incline ai successivi cambiamenti di demielinizzazione. Inoltre

l'assenza di PLP porta all'interruzione delle interazioni melina-assone, dando luogo alla degenerazione assonale. Nel topo *plp*-nullo la degenerazione può essere secondaria ad interruzione nel trasporto assonale rapido causata dall'assenza di PLP/DM20 (Edgar et al., 2004).

1.4.4 *Altri meccanismi etiopatogenetici*

Sono noti i geni causativi di altre forme HSP, per le quali le disfunzioni che sottendono alcune mutazioni hanno fatto ipotizzare differenti pathway che possono portare alla malattia, ma i meccanismi patogenetici rimangono largamente sconosciuti.

Sono riportati qui di seguito 7 geni causativi HSP per i quali poco è noto, come le proteine codificanti:

***CYP7B1*/Citocromo P450, famiglia 7, sottofamiglia B, polipeptide 1.**

Nel fegato *CYP7B1* offre un pathway alternativo per la degradazione del colesterolo, mentre nel cervello interviene nel metabolismo dei neurosteroidi. Nel fegato, infatti, gli acidi biliari richiesti per il normale assorbimento dei lipidi e delle vitamine solubili con i lipidi, vengono prodotti dal colesterolo attraverso due processi metabolici: il classico meccanismo che coinvolge *CYP7A1* (colesterol-7 α -idrolasi) e il meccanismo acido che coinvolge *CYP7B1*. Queste idrossilasi rappresentano anche delle molecole chiave per il metabolismo del colesterolo nel cervello. Dato che il trasferimento del colesterolo dal sangue al cervello avviene in piccole quantità, la maggior parte del colesterolo è prodotta localmente nel cervello. *CYP7B1* catalizza la 7 α -idrossilazione del 27-idrossicolesterolo (Martin et al., 1997), del deidropiandrosterone (DHEA) e del pregnenolone nel cervello (Rose et al., 1997). Il DHEA e il pregnenolone sono neurosteroidi attivi che giocano un ruolo importante nello sviluppo neuronale e nell'attivazione dell'N-metil-D-aspartato (Baulieu et al., 1998; Compagnone et al., 1998). La 7 α -idrossilazione del DHEA è uno step metabolico importante nel cervello e può contribuire alla regolazione della concentrazione e dell'attività dei neurosteroidi nel cervello (Robel et al., 1995). Dal punto di vista strutturale il gene *CYP7B1* codifica per una proteina di 506 residui amminoacidici e mostra il 40% di identità di sequenza con il gene umano colesterol-7 α -idrossilasi (*CYP7A1*). Entrambe i geni contengono sei esoni e cinque introni. Il gene *CYP7B1* di 65 Kb ed è molto più lungo del gene *CYP7A1*. Questo potrebbe essere spiegato ammettendo che *CYP7A1* derivi da *CYP7B1* in seguito ad una duplicazione del gene o ad un evento di conversione genica. E' stato ipotizzato che il meccanismo etiopatogenetico della forma di HSP SPG5A, come in quella associata a

PLP1, possa influire sullo sviluppo precoce degli assoni (in funzione anche dei casi ad esordio precoce) prima che sulla degenerazione piuttosto attraverso anomalie nel metabolismo del colesterolo, componente importante della mielina.

SLC33A1/Acetyl-CoA transporter.

Una mutazione nel gene *SLC33A1* (solute carrier family 33, member 1) che codifica il trasportatore dell'acetil-CoA (ACATN, AT1), è stata recentemente associata ad una nuova HSP (SPG42). ACATN trasporta la acetil-CoA nel *lumen* dell'apparato di Golgi e si ritiene abbia un ruolo nella crescita e nel mantenimento degli assoni dei motoneuroni. La proteina SCL33A1 di 549 aa contiene 6 a 10 domini trans membrana e un "leucine zipper motif" nel III dominio trans membrana (Kanamori et al., 1997). Esperimenti di immunofluorescenza hanno indicato che la proteina di 58-kD è localizzata al citoplasma. Usando saggi in vitro con cellule semi-intatte Kanamori et al. (1997) hanno dimostrato che la proteina AT1 (o SLC33A1) è un trasportatore dell'acetil-coA che è coinvolto nel processo di O-acetilazione. Attraverso studi di ibridizzazione in fluorescenza in situ, Bora et al. (1998) hanno mappato il gene *Acatn* nel topo al cromosoma 3E1-E3. La diversità strutturale e la complessità delle catene di zuccheri nei gangliosidi di membrana sono causate in parte dalla ricorrenza di diverse differenti specie di molecole di acido acetilsialicilico, incluse le forme O-acetilate. L'acetilazione dei residui di acido sialicilico delle glicoproteine e dei gangliosidi avviene nel lumen del Golgi, usando l'acetil-coA come donatore di acetato. La transversione in eterozigosi c.339T>G nell'esone 1 del gene *SLC33A1* (Lin et al., 2008), associata al fenotipo SPG42, determina una sostituzione ser113-arg (S113R) all'inizio del secondo dominio trans membrana, che è atteso invertire l'orientamento di tutti i domini successivi nell'analisi in *silico* con SOSUI.

È stato dimostrato che il *knockdown* di *scl33a1* in *D.rerio* causa una crescita assonale difettiva a livello del midollo spinale dei pesci (Lin et al., 2008; Hirabayashi et al., 2004).

GJA12/GJC2/Connessina 47.

Una nuova forma di HSP complicata, lentamente progressiva (SPG44) è stata associata ad una mutazione missenso proteina gap junction, gamma 2 (GJC2), che codifica per la connessina 47 proteina gap junction (CX47), per ora riportata riportata in una sola famiglia (Orthmann-Murphy et al., 2008). I canali CX47-CX43 sono coinvolti nel normale mantenimento della mielina. L'espressione di CX47 mutata in un modello di cultura cellulare indica che può ancora formare placche di gap junction con CX43, sebbene abbiano "gating" voltaggio-dipendente

gravemente alterato che è previsto non funzionare in condizioni fisiologiche. Gli autori propongono per SPG44 un meccanismo di perdita di funzione (Othmann-Murphy et al., 2008).

KIAA0196/Strumpellina

I casi SPG8 sono associati con mutazioni nel gene *KIAA0196*, che codifica per la strumpellina (Valdmanis et al., 2007). La funzione della strumpellina e le modalità di azione dei prodotti mutati rimangono sconosciute. In *D. rerio* sia il knockdown del suo omologo che l'espressione della proteina umana mutata erano state viste produrre assoni motori più corti e anomalie nella ramificazione assonale.

BSCL2/Seipina.

Il gene mutato nella Silver syndrome, *BSCL2*, codifica per la proteina seipina, una proteina integrale di membrana del reticolo endoplasmatico (Windpassinger et al., 2004).

La Silver syndrome è geneticamente eterogenea come dimostrato dai casi clinici pubblicati di fenotipi Silver syndrome senza *linkage* con SPG17 o mutazione in *BSCL2* (Patel et al., 2001; Warner et al., 2004; Windpassinger et al., 2004). Analisi Northern-blot hanno rivelato uno specifico trascritto cerebrale *BSCL2* di circa 1.8 kb e un trascritto ubiquitariamente espresso di 2.2 kb. Entrambe i trascritti sono tradotti in una proteina di 398 amminoacidi. *BSCL2* è costituito da 11 esoni ed entrambe le mutazioni descritte (N88S e S90L) ricadono nell'esone 3 e distruggono una attesa N-glicosilazione della proteina. Gli esperimenti di transfezione in cellule NSC34 hanno dimostrato che la seipina mutata formava aggregati nel citoplasma. Tale effetto sembrerebbe secondario alla perdita del sito di glicosilazione nella seipina mutata che sarebbe atteso condurre alla formazione di seipina male assemblata e disfunzionale, incline alla aggregazione. La funzione della seipina si pensa agisca all'interfaccia del RE con goccioline lipidiche. In uno studio è stato dimostrato che la seipina mutata nella HSP associata a *BSCL2* sembra accumularsi nel RE e aumentare la concentrazione di molecole del RE stress-mediate, che inducono apoptosi in cellule in cultura (Ito, 2009).

PNPLA6/Neuropathy target esterase.

L'enzima NTE è presente nei neuroni e deacila il maggior fosfolipide di membrana, la fosfatidilcolina (PtdCho). Mutazioni nel gene *PNPLA6* (patatin-like phospholipase domain containing 6) codificante per la NTE (neuropathy target esterase), causano degenerazione distale dei lunghi assoni spinali nell'uomo, producendo lo stesso effetto dell'avvelenamento da organo fosfati, inibitori chimici della NTE. Eppure analoghi cambiamenti neuropatologici non sono

stati riportati nei topi *nestin-cre:NTE^{fl/fl}* con deficit di NTE nei tessuti neuronali. Inoltre l'alterata omeostasi di PtdCho non è stata individuata in vertebrati con deficit di NTE. Nei topi *nestin-cre:NTE^{fl/fl}* sostenuti rialzi di PtdCho su molti mesi erano stati accompagnati da progressiva degenerazione ed enormi rigonfiamenti degli assoni nei tratti spinali sensori e motori e da crescenti disfunzioni alle zampe posteriori. La distribuzione delle lesioni assionali assomiglia strettamente a quella nella paraplegia spastica ereditaria (HSP). L'importanza di un difettoso traffico di membrana in HSP e l'associazione di NTE con il reticolo endoplasmatico, punto di partenza per il pathway secretorio e il trasporto di materiale neuronale negli assoni, suggerisce di approfondire il ruolo di NTE nei processi di secrezione. Neuron in cultura con deficit di NTE hanno mostrato danni secretori modesti, coerenti con la sopravvivenza neuronale e il danno "in vivo" inizialmente ristretto alle porzioni distali degli assoni più lunghi (Read 2009).

1.4.5 Modelli animali

Spastina (SPG4)

Per studiare l'effetto dell'attività della spastina e delle mutazioni in vivo sono stati condotti studi su vari modelli animali di HSP che hanno dimostrato un effetto della spastina sul trasporto e sulla crescita assonale. Knockdown di spastina wild-type in drosophila e zebrafish hanno portato ad anomalie nello sviluppo assonale e nella funzione sinaptica.

In un modello di topo con una delezione in *SPG4*, che causa un codone di stop prematuro (che mima una mutazione patogenetica umana), erano stati descritti degenerazione assonale e accumulo di mitocondri in rigonfiamenti anomali vicino al cono di crescita assonale. Questi risultati potrebbero avere una correlazione umana poiché una distribuzione anormale di mitocondri, che si suppone possa essere indicativa di trasporto difettivo, era stata riportata in un reperto post-mortem di motoneuroni spinali da un individuo con HSP associata a *SPG4*.

Fassier et al. (2003), hanno proposto studi di topo *knockout* per *SPG4*. Il vettore bersaglio per il gene *Cre/LoxP* era stato usato per creare topi nei quali gli esoni 5-7 della spastina erano stati deleti e sostituiti dal vettore inserito. Incrociando topi che erano eterozigoti per questa mutazione (*Spdel/+*) con topi transgenici CMV-Cre o con animali transgenici NSE-Cre, erano stati creati topi nei quali il gene deleto per la spastina era presente in tutti i tessuti (topi *Spdel/+ / CMV-Cre*) o solo nei neuroni (topi *Spdel/+ / NSE-Cre*). In studi preliminari alcuni topi *Spdel/+* hanno mostrato un peggioramento nelle performance al *rotarod* paragonati con i controlli normali. Questo fenotipo è altamente variabile indicando l'importanza di altri fattori genetici. In studi non pubblicati sono stati osservati fenotipi simili nel topo *knockout* per *SPG4* recanti una delezione eterozigote degli esoni 7 e 8 (Rainier e Fink, 2005). Osservazioni preliminari su questi animali hanno rivelato un disturbo dell'andatura età-dipendente dovuto ad un peggioramento delle abilità locomotorie degli arti posteriori. Questi deficit erano stati osservati sia nelle osservazioni in campo aperto che sul *rotarod*. I topi *knockout* per *SPG4* di oltre un anno di età mostrano la tendenza a camminare con gli arti posteriori extra-ruotati e spesso hanno dimostrato peggioramento neuromotorio (del controllo del tronco, con trascinarsi della coda, trascinarsi del quarto posteriore) (Rainier e Fink, 2005).

Paraplegina (SPG7)

I topi con deficit di paraplegina sembrano evolutivamente normali alla nascita (Ferreirinha et al., 2004). Problemi motori al *rotarod* sono stati individuati più precocemente ai 4 mesi e continuano a progredire. Essi iniziavano a perdere peso in confronto ai controlli della nidiata a

12 mesi e a 17 mesi hanno iniziato a sviluppare scoliosi e disturbo dell'andatura. Il primo cambio neuropatologico avveniva a 4 mesi nei mitocondri sinaptici. I mitocondri anomali erano ipertrofici, rigonfi e avevano creste anomale. Dagli 8 mesi si erano visti mitocondri anomali lungo tutto l'assone con segni di degenerazione mitocondriale. Nella nidiata più vecchia le disfunzioni mitocondriali erano evidenti con una riduzione nella sintesi di ATP (età >23 mesi) e una riduzione dell'attività del complesso I (età >26 mesi). Cambi alla macromorfologia dell'assone non si vedono fin dagli 8 mesi, quando il rigonfiamento assonale veniva individuato nella materia bianca del midollo spinale. Questi fenomeni progredivano con l'età ma fino ai 15 mesi non era stata visibile una chiara degenerazione assonale. Il rigonfiamento e la degenerazione erano stati osservati soprattutto negli assoni più lunghi del fascicolo gracile (regione cervicale) e nei funicoli laterali e anteriori (regione lombare). Rigonfiamento assonale era anche presente nei nervi ottici. Un'assonopatia progressiva interessava i nervi sciatici nella nidiata più vecchia, prima comparsa a 19 mesi. Rigonfiamenti assonali erano costituiti da accumuli di neurofilamenti e organelli, inclusi mitocondri rigonfi, facendo ipotizzare un danno a livello del trasporto assonale anterogrado. È stato dimostrato anche un danno del trasporto retrogrado in topi con deficit di paraplegina oltre i 17 mesi nei lunghi motoneuroni lombari.

L'evidenza da modello di topo con deficit di paraplegina suggerisce che un deficit nella paraplegina sia causa di interruzione nella funzione mitocondriale. I topi knockout omozigoti per SPG7 hanno mostrato performance peggiori sull'apparato *rotarod* a partire dall'età di 6 mesi e aggravamento con l'età. L'istologia del midollo spinale ha mostrato rigonfiamento prevalente nelle colonne laterali del midollo spinale lombare, in accordo con un'assonopatia retrograda. Questo fenotipo era lentamente progressivo, con segni di degenerazione assonale che iniziano all'età di 12 mesi. Modifiche nella morfologia mitocondriale sembrano precedere modifiche assonali in questo sistema, suggerendo che la degenerazione fosse dovuta a danni nella funzione mitocondriale (Rainier e Fink, 2005).

I topi con deficit di paraplegina sviluppano rigonfiamenti assonali causati da accumulo di organelli e neurofilamenti, simili a quelli visti nei topi con deficit di spastina, che precedono la degenerazione assonale e si correlano con l'esordio di danno motorio. Questo ancora una volta implica un problema di trasporto assonale che potrebbe essere secondario a disfunzione mitocondriale. Lo studio sulla proteina 2 AGF3-like (AGF3L2), metalloproteasi omologa della paraplegina, che forma un supercomplesso con la paraplegina per il controllo della qualità proteica nei mitocondri, ha dimostrato che modelli di topo nullo o missense per *agf3l2* avevano marcati danni nello sviluppo assonale che portavano a morte neonatale (Maltecca et al., 2008). I topi svilupparono una grave tetraparesi ad esordio precoce ed era stato dimostrato che avevano

ridotte fibre mielinizzate nel midollo spinale e una danneggiata attività del complesso I e II della catena respiratoria. Il fenotipo era più grave di quello visto nei topi con deficit di paraplegina dovuto alla più alta espressione neuronale di *agf312*, ma anche questo dimostra l'associazione della funzione mitocondriale con HSP.

L'evidenza scientifica dal modello di topo per la paraplegina suggerisce due possibili ipotesi su come la disfunzione mitocondriale potrebbe portare all'assonopatia retrograda che si osserva in HSP. Primo, può semplicemente esserci un deficit energetico nell'assone distale, e in particolare nella sinapsi, che causa il fallimento di molteplici processi richiesti per una sana funzione neuronale. Nel tempo la funzione sinaptica può deteriorare scatenando una graduale degenerazione assonale retrograda. Secondo, benché molti processi intracellulari ci si aspetta siano interessati da deficit dell'energia, l'effetto su uno specifico processo può essere la principale causa di degenerazione assonale. Il trasporto assonale è gravemente sconvolto nel topo con deficit di paraplegina. I lunghi assoni interessati in HSP dipendono in maniera importante dal trasporto assonale, un processo energia-dipendente, per trasportare molecole e organelli dal corpo cellulare all'assone distale su una via lunga un metro. L'identificazione del deficit del complesso I nel topo per la paraplegina può offrire una spiegazione per lo sviluppo e la progressione della malattia correlate all'età. Il complesso I è suscettibile soprattutto dei cambi correlati all'età indotti dallo stress ossidativo (Wong et al., 2002). Perciò il neurone può essere inizialmente capace di compensare la disfunzione mitocondriale causata da mutazione in paraplegina. Comunque con l'ulteriore carico aggiuntivo del deficit del complesso I correlato all'età, il meccanismo di compenso non è a lungo adeguato e avviene la neurodegenerazione.

Proteolipido proteina (PLP1)

Esistono modelli di topo che contengono mutazioni in *PLP* (*jimpy(jp)*, *jimpy-4j*, *msd*, e *rumpshaker*), così come topi *PLP* null in cui il gene *PLP* è stato interrotto. È importante notare che il fenotipo di questi animali spesso dipende da particolari mutazioni e da "genetic background". In base al tipo di mutazione (mutazioni missenso *PLP* o mutazioni da *splicing* aberrante dell'mRNA) si può determinare una grave ipomielinizzazione e morte precoce (16-20) o semplicemente tremore e un normale arco temporale di vita. Al contrario topi nei quali il gene *PLP* è stato interrotto dal "gene targeting" manifestano degenerazione assonale dipendente dalla lunghezza che è simile a quella dei pazienti con assenza di *PLP*. Questi studi hanno dimostrato che il "genetic background" (ad es l'impatto di geni regolatori) influenza il fenotipo della mutazione del gene *PLP*, le mutazioni del gene *PLP* possono causare o ipomielinizzazione o

degenerazione assonale primaria e la degenerazione assonale in HSP può derivare da un'anomalia primaria della glia (oligodendroglia in questo caso) (Rainier e Fink, 2005).

Molecola di adesione cellulare L1 (L1CAM)

In un modello di topo transgenico, la perdita di L1CAM sconvolge la normale guida degli assoni corticospinali attraverso la linea mediana a livello delle piramidi. La normale decussazione alle piramidi è stimolata da molecole chemorepellenti secrete dal midollo spinale ventrale note come Sema3A (Castellani et al., 2000). L1CAM è una componente del complesso recettore Sema3A e i topi con deficit di L1CAM non rispondono a Sema3A in vitro. Mutazioni in L1CAM causano X-linked CRASH syndrome (ipoplasia del corpo calloso, ritardo, pollice addotto, paraplegia spastica e idrocefalo), MASA syndrome (ritardo mentale, afasia, andatura a passo strascicato e pollice addotto), e idrocefalo X-linked associato con la paraplegia spastica. Sono stati studiati due diversi topi L1CAM. Uno era stato prodotto inserendo un TK NEO cassette nell'esone 8 L1CAM. Questo ha prodotto una proteina L1CAM di ridotta grandezza e quantità. Inoltre i danni motori negli arti posteriori (quando cammina su o è sospeso da una griglia metallica), questi topi erano meno sensibili a stimoli nocicettivi in confronto ad animali di controllo. Studi istologici di questi topi hanno rivelato ridotta grandezza dei tratti corticospinali in confronto ai controlli. Il secondo topo knockout L1CAM era stato prodotto sostituendo gli esoni 13 e 14 di L1CAM con neomycin resistance gene cassette. Ciò ha prodotto la completa assenza della proteina L1CAM in questi animali. Questi animali hanno manifestato numerosi difetti cerebrali, inclusa la ridotta grandezza del corpo calloso e dell'ippocampo, dilatazione ventricolare, anomalie del setto, e un'anomala migrazione dei neuroni dopaminergici mesencefalici. Inoltre gli studi di mutazioni L1CAM in umani e topi hanno dimostrato che la sindrome HSP può essere causata da disturbi dello sviluppo della formazione del tratto corticospinale piuttosto che da degenerazione del tratto corticospinale (Rainier e Fink, 2005).

NIPA1 non-imprinted in Prader-Willi/Angelman syndrome region protein 1

L'introduzione di mutazioni NIPA1 umane nell'ortologo *nipal* della *Caenorhabditis elegans* causa neurodegenerazione. La deplezione di NIPA1 nell'ortologo di *Drosophila melanogaster*, la spictina, suggerisce che ha anche un ruolo nel trasporto assonale. L'ortologo di *Drosophila*, la spictina, mostra una localizzazione preferenziale sui primi endosomi ed è stato recentemente riportato che abbia un ruolo nel mantenimento dei microtubuli e nel trasporto assonale (Wang et al., 2007). Gli studiosi hanno osservato che la spictina ha un ruolo funzionale nel segnale proteico della morfogenesi delle ossa, che porta ad una up-regolazione di diversi

geni, inclusi alcuni con una potente funzione inibitoria assonale. La deplezione della spictina in *drosophila* si è visto porta a iperaccrescimento sinaptico alle giunzioni neuromuscolari e la proteina segnale della morfogenesi ossea anche regola l'architettura microtubulare negli assoni.

Spastizina (ZFYVE26)

Mutazioni tronche nel gene *ZFYVE26* che codifica per una proteina a motivo “zinco finger” con un dominio FYVE è stata recentemente scoperta. La proteina è stata chiamata spastizina e il suo mRNA è stato trovato largamente distribuito nei tessuti, con espressione simile alla spatacsina nel cervello di roditore. Iniziali studi cellulari hanno suggerito localizzazione della spastizina nel RE e negli endosomi, ancora una volta aumentando la possibilità di un ruolo nel traffico di membrana in queste posizioni.

Strumpellina (KIAA0196)

Mutazioni nel gene *KIAA0196* che codifica la proteina strumpellina, sottendono una forma di HSP pura ad esordio in età adulta. In *zebrafish* knockdown della strumpellina o trasfezione con mRNA associato alla malattia porta ad assoni dei motoneuroni più corti con anomale ramificazioni quando confrontati con controlli, benché il meccanismo sottostante sia sconosciuto.

CYP7B1 (SPG5A)

Nel topo il knockout dell' “X receptor alfa” nel fegato, un regolatore critico di CYP7B1 e CYP7A1, porta a degenerazione del motoneurone (Andersson et al., 2005). Il topo CYP7B1 knockout, già disponibile, dovrebbe fornire spiegazioni sulla relazione tra il difetto di CYP7B1 e il fenotipo sul motoneurone lentamente progressivo osservato nei pazienti SPG5, probabilmente dovuto a perdita di neuroprotezione da parte dei neurosteroidi prodotti dal deidroepiandrosterone da CYP7B1.

SPG42 (SLC33A1)

Lin et al. (2008) hanno osservato che il Knockdown del gene *Slc33a1* in *zebrafish* esitava in un fenotipo a “coda curva”. Gli assoni dei motoneuroni spinali nel pesce mutato erano scarsi e poco organizzati in confronto al pesce wildetype. Il fenotipo veniva corretto con l'iniezione contemporanea di SLC33A1 umano *wildetype*, ma non con SLC33A1 mutato S113R. I risultati sono in accordo con un meccanismo di perdita di funzione.

NTE (neuropathy target esterase)

In topi *nestin-cre:NTE^{fl/fl}* di tre settimane e in topi adulti *C57BL/6J* dopo dosi tossiche neuropatologiche di organofosfati è stata descritta degenerazione distale dei più lunghi assoni spinali. In entrambi i gruppi, precoci lesioni degenerative erano state seguite da rigonfiamenti contenenti accumuli di materiale assoplasmatico. Nei topi che avevano ricevuto dosi tossiche di organofosfati il massimo numero di lesioni, nei più lunghi tratti degli assoni spinali sensoriali, si erano ottenuti in alcuni giorni ed erano stati preceduti da un transitorio aumento di PtdCho (fosfatidilcolina) neuronale. Nei topi *nestin-cre:NTE^{fl/fl}* sostenuti rialzi di PtdCho durante molti mesi erano stati accompagnati da progressiva degenerazione ed enormi rigonfiamenti degli assoni nei tratti spinali sensoriali e motori e da crescenti disfunzioni alle zampe posteriori. La distribuzione delle lesioni assonali strettamente assomiglia a quella osservata nella paraplegia spastica ereditaria (HSP).

1.5 *Forme a esordio precoce per i geni analizzati.*

1.5.1 *SPG3A (14q12-q21).*

Le mutazioni nel gene *ATLI* sono responsabili di circa il 10% dei casi di HSP autosomico dominanti con un fenotipo puro ad esordio precoce. La frequenza di HSP dovute a mutazioni in *ATLI* varia nei diversi studi secondo la metodologia usata dall'8 al 38%. Il fenotipo tende ad essere puro, con insorgenza durante l'infanzia con un'età media di esordio di 4,6 anni in un primo studio (Elliot, 2004), tipicamente con una progressione relativamente lenta dei sintomi, ma sono stati descritti anche fenotipi complicati da neuropatia assonale motoria e/o sensitiva (Fusco et al. 2009, Smith et al., 2009). E' stato descritto un caso caratterizzato da fenotipo tipo Silver syndrome e mutazione in *SPG4* che presenta un polimorfismo intronico già noto in *SPG3A* (Salameh et al., 2009). Eccezioni sono state riportate con insorgenza nella 5a e nella 6a decade in una famiglia (Sauter et al., 2004). Penetranza incompleta è stata descritta in un 80enne portatore obbligato clinicamente sano e in portatori asintomatici all'età di 62 e 25 anni (Tessa et al., 2002; D'Amico et al., 2004; Durr et al., 2004). La progressione della malattia tende ad essere lenta con solo approssimativamente un quinto degli individui che richiedono l'uso della sedia a rotelle più tardi nella vita. Le caratteristiche di HSP pura osservate in un numeroso campione studiato da Durr et al. (2004) includono piede cavo lieve (15%), diminuite pallestesie (13%) e disturbi sfinterici (25%). Gli stessi autori ipotizzano che la scoliosi sia presente in un quinto dei casi per la più precoce età d'esordio del fenotipo in confronto ad altre forme di HSP.

Inizialmente è sembrato che le mutazioni in *SPG3A* fossero limitate a cambi missenso in diversi hotspots. Un crescente numero di mutazioni sono state identificate disseminate lungo tutto il gene con cambi missenso riportati negli esoni 4, 7, 8, 9, 12 e 13. In seguito sono state identificate inserzioni che causano *frameshift* e la prematura interruzione della proteina (Tessa et al., 2002, Ivanova et al., 2007; Louriero et al., 2009).

Non sono stati riportati riarrangiamenti ancora in questo gene eccetto una piccola delezione *in-frame* (Meijer et al., 2007) e una singola delezione dell'intero gene che è stata trovata non segregare con la malattia o modificare il fenotipo dei pazienti affetti (Beetz et al., 2007).

Il mappaggio di SPG3A e l'individuazione del gene:

In una su tre famiglie studiate, Hazan et al. (1993) avevano trovato valori di *linkage* significativi con un gruppo di marcatori sul cromosoma 14q, con un massimo multipoint lod score pari a 10. Nelle altre due famiglie lo stesso locus era stato escluso.

Gispert et al. (1995) avevano descritto 3 ampi *pedigrees* Tedeschi con paraplegia familiare spastica autosomica dominante pura. Uno dei tre era stato dimostrato in *linkage* con una regione di 7 cM sul cromosoma 14q. Su 33 famiglie SPG studiate da Fink et al. (1996) il *linkage* al locus 2p era il più comune, essendo positivo in 15 famiglie (45%), due erano in *linkage* con il locus 14q (6%) e in una con il locus 15q (3%).

Huang et al. (1997) hanno mappato una paraparesi spastica autosomica dominante in una famiglia nel Nord del Tibet usando marcatori microsatellitari al locus 14q11.2-q24.3. In tutti gli individui affetti nella famiglia Tibetana i segni di spasticità erano limitati alle gambe, gli individui più giovani mostravano un *Babinski* positivo.

Zhao et al. (2001) hanno analizzato 5 famiglie con paraplegia spastica autosomica dominante che erano risultate in *linkage* con il locus SPG3A sul cromosoma 14 (14q). Lo stesso gruppo ha identificato un individuo ricombinante obbligato, che ha permesso di ridurre l'intervallo contenente il locus SPG3A a 2.7 cM, e di analizzare i geni candidati in questo intervallo per mutazioni causative di malattia (Rainier et al., 2001). Nel lavoro di Zhao et al. (2001) è indicata l'identificazione di una mutazione missenso specifica per la malattia presente in tutti gli individui affetti dalle 5 famiglie in un nuovo gene HSP, chiamato appunto *SPG3A*, che hanno mappato sul cromosoma 14q11-q21.

Zhu et al. (2003) hanno stabilito il mappaggio al cromosoma 14q22.1, per primi hanno clonato *SPG3A*, che hanno chiamato *atlastina-1*. Il gene codifica una proteina di 558 amminoacidi, che forma omotetrameri ed ha attività GTPasica (si veda paragrafo 1.4.1).

Abel et al. (2004) hanno identificato le mutazioni nelle famiglie descritte nei primi studi da Hazan et al. (1993) e da Gispert et al. (1995).

Tabella 1.5. Mutazioni note nel gene *SPG3A*.

R239C	Zhao et al. (2001) identificano il cambio nucleotidico in eterozigosi c.884 C>T (2) nell'esone 7. Abel et al. (2004) identificano la stessa mutazione R239C ma riportano il cambio al nucleotide c.715C>T (1) basata sulla numerazione dal codone iniziale di traduzione. Namekawa et al. (2006) confermano che la mutazione cade in un "hotspot" definito da un dinucleotide CpG metilato.
S259Y	Zhao et al. (2001) identificano il cambio nucleotidico nel cDNA in eterozigosi 776C>A (1) nell'esone 8
H258R	Zhao et al. (2001) trovano il cambio al nucleotide c. 773A>G (1) solo nei pazienti affetti
R217Q	Muglia et al. (2002) identificano il cambio nucleotidico 818G>A (2), in un motivo altamente conservato, c.650G>A (1)
D508fsX522	Tessa et al. (2002) identificano un'inserzione di 1-bp nell'esone 12, che produce un frameshift e un codone di stop prematuro, c.1520-1521insA (1)
M408V	Dal Pozzo et al. (2003) identificano il cambio 1222 A>G (1) nell'esone 12. (Nel database OMIM è indicata come una SNP, ma non sono indicati i dati di frequenza di popolazione)
R415W	D'Amico et al. (2004) trovano la stessa mutazione c.1243 C>T (1) nell'esone 12 in 3 membri affetti della stessa famiglia ma è anche presente in 9 parenti asintomatici di età variabile tra 13 e 70 anni
A161P	Sauter et al. (2004) nell'esone 4, cambio nucleotidico c.481G>C (1) questa mutazione è presente anche in una famiglia con esordio tardivo

H247P	Sauter et al. (2004) nell'esone 8, cambio nucleotidico c.740A>C (1)
F151S	Abel et al. (2004) cambio nucleotidico c.452T>C (1)
I315S	Abel et al. (2004) cambio nucleotidico c.944T>G (1)
S398Y	Abel et al. (2004) cambio nucleotidico c.1193C>A (1)
Q251K	Durr et al. (2004), cambio nucleotidico c.919C>A (2), cambio nucleotidico c.751A>C (1) esone 8
V253I	Durre t al. (2004) cambio nucleotidico c.925G>A (2), c.757G>A (1) esone 8
S398Y	Durre t al. (2004) cambio nucleotidico c.1361C>A (2), esone 12
F413L	Durr et al. (2004) cambio nucleotidico c.1405T>C (2), cambio nucleotidico c.1237T>C (1) esone 12
N440T	Durr et al. (2004) cambio nucleotidico c.1487A>C (2), 1319A>C (1), esone 12
R495W	Durr et al. (2004) cambio nucleotidico c.1651C>T (2), 1483C>T (1), esone 12
S519N	Durr et al. (2004) cambio nucleotidico c.1724G>A (2), c.1556G>A (1), esone 13
T156I	Hedera et al. (2004) cambio nucleotidico c.635 C>T (2), c.467 C>T (1)
T162P	Namekawa et al. (2006) cambio nucleotidico c.484A>C (1)
C375R	Namekawa et al. (2006) cambio nucleotidico c.1123T>C (1)
L157W	Rainier et al. (2006) identificano il cambio nucleotidico c.638T>C nell'esone 4
Delezione del gene <i>SPG3A</i>	Beetz et al. (2007) hanno identificato nella stessa famiglia la delezione patogenetica dell'esone 1 in <i>SPG4</i> e la delezione dell'intero gene <i>SPG3A</i>
Q191R	Ivanova et al. (2007) cambio nucleotidico c.572A>G, esone 5
L250P	Ivanova et al. (2007) cambio nucleotidico c.749T>C, esone 8
Y336H	Ivanova et al. (2007) cambio nucleotidico c.1006C>T, esone 10
M408T	Ivanova et al. (2007) cambio nucleotidico c.1223T>C, esone 12
G469A	Ivanova et al. (2007) cambio nucleotidico c.1406G>C, esone 12
G482V	Ivanova et al. (2007) cambio nucleotidico c.1445G>T, esone 12
A492fsX522	Ivanova et al. (2007) inserzione nucleotidica c.1474_1475insG, esone 12
Y459C	Matsui et al. (2007) cambio nucleotidico c.1376A>G, esone 12
436delN	Meijer et al. (2007) identificano una delezione di 3-bp
R416H	De Leva et al. (2009) cambio nucleotidico c.1247G>A, esone 12
E502fsX522	Louriero et al. (2009) inserzione nucleotidica c.1504_1505insG, esone 12
A165T	Smith et al. (2009) cambio nucleotidico c.493G>A, esone 4
R239L	Smith et al. (2009) cambio nucleotidico c.716G>T, esone 7
H247R	Smith et al. (2009) cambio nucleotidico c.740A>G, esone 8
S259F	Smith et al. (2009) cambio nucleotidico c.776C>T, esone 8
S398F	Fusco et al. (2009) cambio nucleotidico c. 1361, esone 12

(1) - La nomenclatura approvata conta +1 all'A della Metionina del codone d'inizio. GenBank Reference AY032844.1.

(2) - La numerazione tradizionale per le mutazioni in *SPG3A* parte da +1 dall'inizio del trascritto, usata da alcuni autori prima del 2004.

1.5.2 *SPG5A (8q21.3)*.

Questa forma autosomica recessiva è associata a fenotipi puri e complessi con età variabile di esordio, prevalentemente adolescenti e giovani adulti, e lenta progressione. In uno studio di linkage era stato ipotizzato rappresentasse il 10% delle ARHSPs (Klebe et al., 2007).

Hentati e collaboratori (1994) hanno riportato per primi, in seguito ad uno studio effettuato su 5 famiglie tunisine affette da una forma pura di HSP, analisi di *linkage* positive in 4 famiglie, per una regione di 32.2 cM contenente due dei loci che erano stati messi in *linkage*, mappati al cromosoma 8p12 e 8cen-q13, rispettivamente. Hentati et al. (1994) diedero alla regione pericentrica del cromosoma 8 la possibile localizzazione per il locus SPG5A.

Wilkinson et al. (2003) hanno rifinito il locus ad un intervallo di 23.6 cM sul cromosoma 8q11.1-q21.2. Klebe et al. (2007) hanno rifinito il locus a 3.8 cM, un intervallo di 5.9 Mb.

Tsaousidou et al. (2008) hanno identificato il gene responsabile per SPG5, una forma pura di paraplegia spastica autosomica recessiva. Mutazioni missenso e non-senso sono state trovate nel gene *CYP7B1* in cinque famiglie. *CYP7B1* è un membro della superfamiglia delle citocromo P450 di monoossigenasi, coinvolte nel metabolismo del colesterolo, dei neurosteroidi e di altri lipidi. Nel fegato *CYP7B1* offre un pathway alternativo per la degradazione del colesterolo e inoltre fornisce la via metabolica principale per la modificazione del neurosteroido deidroepiandrosterone nel cervello. Le mutazioni in *CYP7B1* si pensa interessino l'omeostasi del colesterolo che è una componente vitale delle cellule neuronali, in particolare della mielina. E' possibile che anomalie nel metabolismo del colesterolo possano influire sullo sviluppo precoce degli assoni (*CYP7B1* è associato con HSP ad esordio precoce) prima che sulla degenerazione, in maniera simile a quella vista nelle HSP associate a PLP1.

Le mutazioni missenso alterano la fosforilazione della proteina; le mutazioni non senso risultano in una perdita di funzione (Tsaousidou et al., 2008).

Goizet et al., (2009) hanno studiato un'ampia casistica di 82 casi ARHSP con fenotipo puro e complesso e 90 casi sporadici di HSP pura, identificando 8 mutazioni in *CYP7B1* in 9 famiglie. L'età media dei pazienti all'esordio è 16±12.1 anni (range 4-47 anni). Dopo una lunga durata di malattia (media 30 anni) la spasticità e il grado di disabilità sono da medio a grave in tutti i casi. Il fenotipo è puro in 7 famiglie SPG5 e complesso in 2 famiglie, con segni cerebellari e neuropatia periferica. La frequenza di mutazioni in *CYP7B1* nello studio di Goizet et al. (2009) è di 7.3% nelle famiglie ARHSP e 3.3% tra i casi sporadici.

Tabella 1.6. Mutazioni note nel gene *SPG5A*.

R388X	Tsaousidou et al. (2008) identificano il cambio nucleotidico in omozigosi c.1162C>T in un paziente sporadico
S363F	Tsaousidou et al. (2008) identificano il cambio nucleotidico in omozigosi c.1088C>T nell'esone 5 nei membri affetti dell'ampia famiglia consanguinea Inglese descritta da Wilkinson et al. (2003) negli studi di linkage
G57R	Tsaousidou et al. (2008) identificano il cambio nucleotidico in omozigosi c.169G>A nell'esone 2 nei membri affetti di una famiglia Tunisina descritta da Hentati et al. (1994) negli studi di linkage
R417H	Tsaousidou et al. (2008) identificano il cambio nucleotidico in omozigosi c.1250G>A nell'esone 6 nei membri affetti di due famiglie Tunisine descritte da Hentati et al. (1994) negli studi di linkage, Goizet et al. (2009), lo stesso cambio nucleotidico, in omozigosi e in eterozigosi
F216S	Tsaousidou et al. (2008) identificano il cambio nucleotidico in omozigosi c.647T>C nell'esone 3
Y275X	Schule et al. (2009) identificano il cambio nucleotidico in omozigosi c.825T>A in una paziente sporadica che a 18 aveva presentato atrofia ottica
A394D	Schule et al. (2009) identificano il cambio nucleotidico in eterozigosi c.1181C>A, nell'esone 5
N105KfsX3	Schule et al. (2009) identificano l'inserzione nucleotidica in eterozigosi c.308_309insA, nell'esone 3
G21fsX47	Biancheri et al. (2009) identificano una delezione in eterozigosi a livello c.66delC che porta ad un codone di stop prematuro, nello stesso paziente la variante c.122+19 A>T <i>in silico</i> porterebbe ad una alterazione dello splicing
A453CfsX470	Criscuolo et al. (2009) identificano in omozigosi l'inserzione c.1362insT nell'esone 6
D269VfsX282	Criscuolo et al. (2009) identificano in omozigosi la delezione c.806delA nell'esone 3
R112X	Goizet et al. (2009), mutazione non senso c.334 C>T, in esone 2, in omozigosi
Y275X	Goizet et al. (2009), mutazione non senso c.825 T>A, in esone 3, in omozigosi
R417C	Goizet et al. (2009), cambio nucleotidico c.1249 C>T, in esone 6, in omozigosi
F470I	Goizet et al. (2009), cambio nucleotidico c.1408 T>A, in esone 6, in eterozigosi
R486C	Goizet et al. (2009), cambio nucleotidico c.1456 C>T, in esone 6, in omozigosi
R63X	Goizet et al. (2009), mutazione non senso c.187 C>T, in esone 2, in eterozigosi
T297A	Goizet et al. (2009), cambio nucleotidico c.889 A>G, in esone 4, in omozigosi e in eterozigosi

1.5.3 *SPG42 (3q25.31)*.

Questa forma di HSP pura autosomica dominante è stata riportata da Lin et al. (2008) in una ampia famiglia Cinese, in cui almeno 20 individui sono stati diagnosticati. È descritta penetranza incompleta in un portatore obbligato, un paziente asintomatico di 43 anni con una figlia che ha avuto esordio di malattia a 8 anni. L'età di esordio è variabile, spaziando tra 4 e 42 anni, ma la maggior parte degli individui affetti manifesta i primi sintomi nelle prime due decadi di vita. Le caratteristiche cliniche includono andatura spastica, aumento del tono agli arti inferiori, iperflessia, ipostenia e atrofia ai muscoli degli arti inferiori, risposte in estensione plantare, e piede cavo. Nessuno dei pazienti è diventato dipendente da sedia a rotelle, non ci sono segni neurologici aggiuntivi. Gli studi elettromiografici, di neuroimmagini e di biopsia muscolare non hanno rivelato anomalie.

Gli autori hanno effettuato inizialmente uno studio di *linkage* per ciascuno dei loci noti di ADHSP, in base al quale tutti sono stati esclusi. Successivamente è stato effettuato lo studio sull'intero genoma, usando 205 marcatori microsatellitari, con una distanza media di 15-20 cM. Tra questi 6 hanno prodotto un "LOD score" positivo, di cui solo 2 mappati sul cromosoma 3q, mentre gli altri 4 sui cromosomi 4, 6, 7 e 20. Con ulteriori microsatelliti a più alta densità questi sono stati esclusi. Mentre 7 ulteriori marcatori sul cromosoma 3q hanno dato "LOD score" significativo >3. L'analisi di linkage "multipoint" con l'uso di 11 marcatori sul cromosoma 3q ha dato un picco di "LOD score" tra i marcatori D3S2326 e D3S3053, questo intervallo di 22 cM corrisponde ad una distanza fisica di 27.54 Mb. Un totale di 130 trascritti mappano all'interno di questa regione, nessuno dei quali poteva essere un buon candidato per la malattia. Sulla base della loro espressione nei neuroni gli autori hanno selezionato un gruppo di geni per l'analisi mutazionale.

Nei membri affetti della famiglia, Lin et al. (2008) hanno identificato in eterozigosi un cambio nucleotidico c.339T>G nell'esone 1 del gene SLC33A1, che produce un cambio aminoacidico ser113-arg (**S113R**) all'inizio del secondo dominio trans membrana. Tramite analisi in silico per la predizione dei domini transmembrana (SOSUI) questo cambio aminoacidico è atteso invertire l'orientamento di tutti i domini successivi. Il residuo 113 è altamente conservato, e la mutazione non era presente in 200 controllo. Lin et al. (2008) hanno ipotizzato un meccanismo di aploinsufficienza funzionale.

Capitolo 2 – OBIETTIVI

Scopo di questa tesi, svolta presso il laboratorio di Neurogenetica del CERC-Fondazione Santa Lucia di Roma, è stato quello di effettuare un'indagine molecolare su casi apparentemente sporadici e familiari affetti da forme ad esordio precoce di HSP.

La scelta del campione è stata effettuata sulla base dei dati anamnestici su pazienti afferenti presso il Dipartimento di Neuroscienze del Policlinico Universitario “Tor Vergata” di Roma.

Le affezioni neurodegenerative ad esordio in età pediatrica in precedenza sono state spesso definite solo sulla base del quadro neuropatologico e per la mancanza di un *marker* biochimico riconoscibile. Grazie all'individuazione del locus genico associato alla malattia o meglio, quando noti, alla natura dei geni coinvolti, sono state dimostrate nella maggior parte dei casi patologie in cui sono alterate proteine a funzione enzimatica o a carattere strutturale, il cui risultato finale è un'alterazione dell'omeostasi cellulare che porta ad apoptosi e precoce impoverimento tissutale.

Nel loro complesso queste patologie, singolarmente rare o rarissime, costituiscono nei paesi occidentali, una delle cause più frequenti di disturbo dello sviluppo e del funzionamento del sistema nervoso centrale (SNC) in età pediatrica. La diagnosi richiede spesso procedure complesse non alla portata di tutti i laboratori. La discrepanza tra il costo della diagnosi e l'utilità di questa sul piano terapeutico (modesto o nullo) ha in passato giustificato uno scarso accanimento diagnostico in queste malattie.

Nel corso degli ultimi 20 anni con lo sviluppo di sempre più sofisticate tecnologie nel campo della neurogenetica, delle neuroimmagini e dell'analisi metabolica nei tessuti e nei liquidi biologici sono state descritte nuove entità cliniche ed è stato svelato il meccanismo etiopatogenetico di molte affezioni già note.

La diagnosi differenziale tra malattie neurodegenerative come le paraparesi spastiche ereditarie (HSPs), oggetto di questo studio di tesi, che esordiscono con disturbi del movimento in età pediatrica e soprattutto nella primissima infanzia non è sempre facile, soprattutto nei confronti delle diverse forme di paralisi cerebrali infantili (PCI) che costituiscono una diagnosi frequente in questa fascia d'età (spesso con etiologia presuntiva). L'emergenza di una patologia lesionale che comprometta lo sviluppo motorio, determinando un deficit di diversa estensione e gravità, si sovrappone ai rapidi fenomeni neuromaturazionali che caratterizzano i primi anni di vita.

L'evoluzione del quadro clinico più o meno rapidamente può chiarire la patologia sottostante, il problema della diagnosi differenziale ha invece un'importanza rilevante in un numero crescente di affezioni che consentono un intervento terapeutico, spesso specifico ed efficace (se precoce). Nel caso specifico di patologie neurodegenerative come le HSPs è da sottolineare la responsabilità clinica nell'informare la famiglia della natura genetica di una affezione e del rischio che questa possa ripetersi in una ulteriore gravidanza. I risultati degli esami genetici possono essere applicati alla diagnosi prenatale. Malgrado gli sviluppi negli esami genetici nelle HSPs, la HSP è una diagnosi di esclusione per molti soggetti. La diagnosi differenziale include i disturbi trattabili così come quelli la cui prognosi è completamente differente. Attualmente, il trattamento per HSP è sintomatico e include terapia fisica riabilitativa e l'uso di farmaci che riducono la spasticità e l'urgenza urinaria.

Studi clinici e genetico-molecolari dei geni e delle funzioni cellulari dei corrispettivi prodotti hanno permesso di avanzare nella comprensione di molti *pathways* critici coinvolti nella HSP. E' auspicabile che in futuro queste conoscenze cominceranno a tradursi in nuovi approcci farmacologici per questa malattia neurodegenerativa.

Come si è tentato di illustrare nel primo capitolo (Tab. 1a e Tab. 2a) le forme ad esordio precoce costituiscono oltre il 50% di tutte le HSP. Per quanto riguarda le forme autosomiche dominanti su 9 geni noti ADHSP 6 sono forme "early onset", mentre per quanto riguarda le 10 forme ADHSP di cui sono noti solo i loci, 6 sono "early onset". Di 22 forme autosomiche recessive 8 geni ARHSP sono noti di cui 6 "early onset", mentre delle 14 forme di cui sono noti solo i loci, 9 sono "early onset". Le HSP X-linked sono tutte forme "early onset".

Una prima parte del lavoro ha previsto uno studio di *linkage* a due punti per ciascuno dei loci noti per una famiglia informativa che presentava una forma ad esordio precoce di ADHSP con caratteristiche cliniche peculiari ai fini di effettuare un *mappaggio di esclusione* (paragrafo 3.2.2) per i loci noti.

Le famiglie ADHSP con forme ad esordio precoce i cui dati sono risultati negativi dall'analisi di *linkage* e alcuni casi apparentemente sporadici sono stati esaminati per il gene *SPG3A*, al fine di identificare mutazioni in uno dei primi geni identificati e causa più frequente (10%) di forme autosomiche dominanti "early onset".

Quindi i casi sporadici negativi per *SPG3A* e ulteriori casi ARHSP che avevano manifestato esordio precoce dei sintomi sono stati esaminati per il gene *SPG5A*, per poter identificare mutazioni in uno dei geni identificati per le forme autosomiche recessive con più

alta prevalenza (7.3% nelle famiglie ARHSP e 3.3% tra i casi sporadici) in forme pure e complesse con età variabile di esordio, prevalentemente in adolescenza e giovane età adulta.

I casi autosomico dominanti negativi per *SPG3A* sono stati sottoposti successivamente ad ulteriori analisi per un altro gene recentemente associato a paraplegia spastica ereditaria, *SPG42*, la cui prevalenza non è nota poiché per ora noto solo in una famiglia (Lin et al., 2008).

I casi familiari autosomici dominanti e quelli apparentemente sporadici negativi alle precedenti indagini molecolari e ritenuti possibili candidati sono stati sottoposti alla metodologia recentemente applicata MLPA per individuare eventuali riarrangiamenti nel gene *SPG3A*, che non fosse stato possibile identificare con la metodica tradizionale del sequenziamento diretto, specifica per mutazioni puntiformi.

Tutti i casi autosomico dominanti erano stati sottoposti in prima istanza all'indagine molecolare per SPG4 non per la specificità di questa forma nei casi ad esordio precoce, ma piuttosto sulla base della elevata prevalenza su tutte le forme ADHSP (circa 40-45% dei casi) ed erano risultati negativi.

Capitolo 3 – MATERIALI E METODI

3.1 Pazienti

Sono stati selezionati 30 soggetti affetti da forme di paraparesi spastica ad esordio in età pediatrica di cui la maggior parte tra i pazienti afferiti presso il Dipartimento di Neuroscienze del Policlinico Universitario “Tor Vergata” di Roma negli anni 2004 – 2008, e per il resto campioni pervenuti al nostro laboratorio attraverso collaborazioni con altri centri italiani e internazionali.

Lo studio clinico dei pazienti è stato effettuato seguendo i protocolli etici previsti e approvati dal comitato etico dell’Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico Santa Lucia di Roma. I campioni di sangue sono stati prelevati in seguito al consenso informato per l’estrazione del DNA.

I campioni di DNA estratti da due pazienti apparentemente sporadici Giapponesi provengono da una collaborazione con un Centro per la Ricerca in Malattie Neurodegenerative in Canada (Centre for Research in Neurodegenerative Diseases, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada) e con un Dipartimento di Neurologia in Giappone (Department of Neurology, Hyogo Brain and Heart Center, Himeji City, Japan).

I campioni di sangue prelevati da sette campioni di pazienti affetti da HSP familiari e sporadiche provengono da altre collaborazioni con Centri di Ricerca e Università Italiane (Udine, Bologna, Sassari, Cagliari, Napoli, Roma, Cefalù, Firenze).

I criteri di inclusione sono stati:

- obiettività neurologica compatibile con diagnosi di HSP
- età di esordio in infanzia ed adolescenza (cut-off 20 anni)
- studio neurofisiopatologico compatibile con diagnosi di HSP
- studio di neuroimmagini compatibile con diagnosi di HSP
- indagini di laboratorio negative per altre patologie.

Descrizione del campione:

- 12 famiglie: 9 con ADHSP, 3 con ARHSP
- 18 casi apparentemente sporadici
- età: *range* all’esordio <1- 20 anni , *range* alla prima visita 14-69 anni
- sex ratio: 24 M/ 6 F
- fenotipo clinico: 20 forme non complicate, 10 forme complesse
- profilo di disabilità (SPRS): *range* 25-50.

Tabella 3.1. Descrizione del campione.

ID / Famiglia	Modalità di ereditarietà	Età all'esordio	Età alla I visita	Sesso	Fenotipo clinico, caratteristiche cliniche aggiuntive	SPRS
FSL1122	Sporadico	9aa	28aa	M	Non complicato	32
FSL1194	Sporadico	6aa	14aa	M	Ritardo dello sviluppo dai primi aa di vita, Ritardo mentale	50
FSL1204	Sporadico	8aa	57aa	M	Non complicato	45
FSL1124	Sporadico	16aa	45aa	F	Non complicato, sindattilia	38
FSL1263	Sporadico	5aa	53aa	F	Neuroimmagini: Atrofia ottica bilaterale. Ipotrofia nuclei caudato e putamen.	48
FSL1283 /RMFSL219	ARHSP	19aa	28aa	M	Non complicato	36
FSL1300	Sporadico	15aa	47aa	M	Non complicato	26
FSL1252 /RMFSL200	ADHSP	18aa	55aa	M	Non complicato, anticipazione (padre esordio a 40aa, figlio esordio a 6aa)	42
FSL1439	Sporadico	8aa	52aa	M	Distrofia maculare	44
FSL284 /RMFSL62	ARHSP	8aa	43aa	M	Complicato	50
FSL590	Sporadico	12aa	59aa	M	Non complicato	46
FSL621	Sporadico	11aa	23aa	M	Neuroimmagini:leucoencefalopatia con riduzione del corpo calloso. Ritardo mentale.	50
FSL658 /RMFSL72	ADHSP	16aa	45aa	M	Non complicato	34
FSL671 /RMFSL79	ADHSP	6aa	34aa	M	Non complicato, anticipazione (padre esordio a 40 anni)	46
FSL933	Sporadico	20aa	32aa	M	Non complicato	25
FSL964	Sporadico	20aa	69aa	F	Non complicato, tremore mano dx	38
FSL1014/ RMFSL152	ADHSP	18aa	67aa	M	Epilessia, Ritardo mentale	50
FSL197 /RM55	ARHSP	20aa	71aa	M	Tetraparesi	50
BO10 /BO(C)	ADHSP	20aa	63aa	M	Non complicato, anticipazione (padre esordio a 60aa, figlio esordio a 10aa)	-
CA1 /CA(A)	ADHSP	20aa	34aa	M	Non complicato	-
FBF909 /FBF(B)	ADHSP	20aa	64aa	F	Assottigliameno corpo calloso	-
JAP104	Sporadico	7aa	44aa	M	Non complicato	-
JAP106	Sporadico	10aa	59aa	F	Non complicato	-
MY 1	Sporadico	<1 aa (4 mesi)	26aa	F	Tetraparesi spastica AAII e mista distonica AASS, disartria e disfonia. Ritardo mentale	-
MY 2	Sporadico	7-8aa	45aa	M	Ritardo mentale dalla infanzia, Epilessia	-
Na29	Sporadico	15aa	33aa	M	Non complicato	-
Sic 3	Sporadico	20aa	35aa	M	Empiparesi brachio-crutale dx a gradiente decrescente, Ritardo mentale	-
SS2 / SS(A)	ADHSP	20aa	36aa	M	Non complicato	-
UD1	Sporadico	12aa	44aa	M	Non complicato. Neuroimmagini: lesioni gliotiche sostanza bianca periventricolari	-
UD3 /UD(B)	ADHSP	10aa	33aa	M	Non complicato	-

3.2 *Tecniche di laboratorio*

Tutte le tecniche di seguito descritte sono state applicate presso il laboratorio di Neurogenetica del CERC-Fondazione Santa Lucia di Roma.

ESTRAZIONE DI DNA GENOMICO:

I campioni di sangue sono stati prelevati presso il Dipartimento di Neuroscienze Sperimentali del Policlinico “Tor Vergata” in provette con anticoagulante ACD (acido citrico destrosio). L'estrazione del DNA è stata effettuata dopo il consenso dei pazienti.

L'estrazione di DNA genomico da sangue intero è stata effettuata mediante estrattore automatico Maxwell 16 System (Promega Corporation U.S.A.).

Il sistema Maxwell 16 purifica i campioni basandosi sull'utilizzo di particelle paramagnetiche (PMP), che generano una fase solida che favorisce la cattura, il lavaggio e l'eluizione del materiale *target*. L'efficienza del metodo basato sulle PMP, utilizzato dallo strumento, evita i comuni problemi associati all'estrazione manuale del DNA. Inoltre lo strumento è molto semplice da programmare e richiede solo 40 minuti circa per l'estrazione di gDNA da 16 campioni.

PCR (REAZIONE DI POLIMERIZZAZIONE A CATENA)

La reazione a catena della polimerasi (PCR) è una tecnica utilizzata per amplificare selettivamente una regione genomica limitata da due sequenze oligonucleotidiche.

La PCR consiste di un certo numero di cicli ripetitivi di denaturazione e rinaturazione del DNA effettuati automaticamente in un apposito apparecchio “Termal Cycling”. Questo metodo avviene in presenza di una DNA polimerasi termostabile (Taq polimerasi, isolata dal batterio termofilo *Thermus aquaticus*), e di due primers, che delimitano la regione da amplificare. I primers sono scelti in modo da ibridarsi ai filamenti opposti della sequenza bersaglio (template) e sono orientati in modo tale che la sintesi ad opera della polimerasi avvenga nella regione tra loro compresa. Poiché i prodotti di sintesi sono a loro volta complementari ai primers e capaci di legarsi a loro, i cicli successivi di amplificazione continueranno a duplicare la quantità di DNA sintetizzata nel ciclo precedente. Il risultato finale è un accumulo esponenziale di template dell'ordine di 2^n (con n uguale al numero di cicli eseguiti). La miscela di reazione contiene il DNA genomico bersaglio, i due primers, un tampone di reazione, i quattro nucleotidi A, T, C e G (dNTPs) in eguale quantità e la DNA polimerasi termostabile (Taq polimerasi). Il profilo termico della reazione di PCR prevede una denaturazione iniziale del DNA stampo. Ogni ciclo di reazione si divide in tre tappe:

1. denaturazione: la temperatura viene aumentata rapidamente (da 15 secondi a 1 minuto) fino a 94°–96°C, e come risultato si ha la separazione delle due catene formanti la doppia elica;

2. allineamento degli oligonucleotidi: la temperatura viene fatta scendere rapidamente fino a una temperatura che può variare tra i 37°C e i 50°C (in base alla specificità dei primers rispetto al segmento da amplificare) permettendo l'allineamento dei due primers ai filamenti complementari di DNA che servono da stampo. La scelta della temperatura di annealing è un fattore critico della specificità della PCR; se la temperatura è troppo alta, infatti, non si ha alcuna ricombinazione, ma se la temperatura è troppo bassa aumenta rapidamente la ricombinazione in siti non specifici;

3. estensione o sintesi dei nuovi filamenti: la temperatura viene fatta risalire nuovamente fino a raggiungere i 72°–74°C, in cui l'efficienza della Taq polimerasi è massima, ottenendo così la sintesi dei nuovi filamenti. E' stato provato che a questa temperatura l'enzima lega da 35 a 100 nucleotidi al secondo, perciò, in un minuto si possono amplificare almeno 2 Kb.

Facendo risalire la temperatura a 94°-96°C, si ottiene la dissociazione delle due catene e può ricominciare un nuovo ciclo. Il numero di cicli varia tra 25 e 40, a seconda del numero di molecole di DNA bersaglio iniziali.

Dopo l'ultimo ciclo, le microprovette contenenti la miscela di reazione sono mantenute a 72°C per 7-10 minuti, per promuovere il completamento dei prodotti di parziale estensione e l'annealing dei singoli filamenti complementari di nuova produzione (Mullis K.B. and Faloona F.A., 1987).

La sequenza e la concentrazione dei *primers* sono determinanti per il successo della PCR. Gli oligonucleotidi sono disegnati in modo tale che siano complementari alla regione che si deve amplificare, che la loro sequenza non permetta appaiamenti tra di loro, che non consentano la formazione di strutture secondarie interne.

La temperatura di fusione (T_m) deve essere simile per i due *primers* e viene calcolata assegnando 2°C per ogni Adenina (A) o Timina (T) e 4°C per ogni Guanina (G) o Citosina (C) presenti nella loro sequenza. La relazione generale per determinare la temperatura di ibridazione (*annealing*) tra i *primers* e il template può essere così riassunta: $T_m = 2(A+T) + 4(C+G) - 5$

In realtà la relazione effettiva per la determinazione accurata della temperatura di *annealing* è la seguente:

$$T_m = 110,5 + 41 \cdot \frac{C + G}{A + G + C + T} - \frac{820}{A + G + C + T} \cdot 16,6 \log_{10}(Na^+)$$

La lunghezza dei *primers* è di solito compresa tra 20 e 30 nucleotidi ed è preferibile che nella sequenza ci sia una percentuale di C-G circa del 50%. Infatti, un *primer* ricco in A-T è meno stabile e richiede una temperatura di *annealing* più bassa con conseguente minore specificità nella reazione di PCR.

L'enzima utilizzato è la *Taq* DNA polimerasi che ha un'attività polimerasica 5'→3' ed un'attività esonucleasica 5'→3'. Il successo della reazione spesso è dovuto all'aggiunta di altri componenti come il DMSO (dimetilsolfossido).

RFLP (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM, polimorfismi nella lunghezza dei frammenti generati mediante digestione con enzimi di restrizione)

Una delle tecniche di biologia molecolare impiegate per analizzare la variabilità genetica è quella che utilizza gli enzimi di restrizione.

Gli enzimi di restrizione o endonucleasi di restrizione sono capaci di tagliare il DNA a doppia elica a livello di specifiche sequenze, chiamate siti di restrizione, o sequenze di riconoscimento. Ne sono stati identificati più di 150 e prendono il nome dal batterio da cui vengono isolati. Per convenzione si usa un sistema a tre lettere in corsivo seguite da un numero romano; lettere addizionali possono essere aggiunte per specificare il particolare ceppo batterico di provenienza.

La maggior parte degli enzimi di restrizione riconosce una sequenza di quattro o sei basi. I frammenti risultanti possono essere separati con elettroforesi su gel d'agarosio all'1,5% e osservati colorando il DNA oppure usando sonde (probes) per geni specifici. Per frammenti che hanno differenze di poche poche basi e che quindi non riescono a discriminarsi su un gel d'agarosio classico è possibile utilizzare gel di poliacrilammide che presenta maglie di polimero più strette e quindi riesce a separare meglio i frammenti.

La tecnica RFLP, rivelando la variabilità soltanto per un piccolo sottoinsieme di nucleotidi che compongono un gene, sono meno efficaci del sequenziamento, che permette di rilevare tutte le differenze nucleotidiche che esistono sulla molecola.

Digestione con enzimi di restrizione:

La reazione è allestita utilizzando 10 µl di DNA genomico e 5-10 unità enzimatiche in un volume finale di 20 µl. Il tampone di incubazione richiesto per la reazione di idrolisi è specifico per ogni enzima utilizzati. Al termine la reazione è posta alla temperatura alla quale l'enzima agisce per due ore e poi bloccata in ghiaccio. I prodotti della reazione sono analizzati su gel di poliacrilammide. Occorre caricare accanto ad ogni digestione lo stesso DNA genomico non sottoposto ad idrolisi per confrontare la diversa migrazione. Sul gel è necessario analizzare

anche il *marker* di peso molecolare per stimare la lunghezza dei frammenti di DNA. Gli enzimi utilizzati per le varianti trovate nei singoli geni sono riportati nel cap 4.

TECNICHE ELETTROFORETICHE

Le tecniche di elettroforesi sono tecniche di separazione di una qualsiasi molecola o gruppo di molecole, dotate di una carica, in base alla differente velocità che raggiungono quando vengono sottoposte ad un campo elettrico.

Gel d'agarosio:

L'*agar-agar* è un polimero d'origine naturale e si estrae da particolari alghe rosse, ad esempio da *Gelidium*. E' un polimero lineare formato da ripetizioni di un disaccaride di agarobiosa. L'agar naturale si può separare mediante precipitazioni selettive nei suoi componenti: uno relativamente libero di sostituenti anionici, conosciuto come agarosio; e uno ricco in sostituenti, l'agarpectina. Per i gel d'elettroforesi si utilizza esclusivamente l'agarosio; questo polisaccaride origina gel termoreversibili in acqua o in soluzioni saline, di considerevole consistenza anche a concentrazioni basse del polimero. Il processo di gelificazione avviene a temperature molto più basse del processo di fusione del gel. I gel d'agarosio si formano perché le catene del polimero si uniscono tra loro originando una rete tridimensionale rigida, che mantiene unite le molecole d'acqua tramite ponti d'idrogeno. Le catene di polimero si associano tramite ponti d'idrogeno formando eliche doppie, queste eliche doppie si associano a loro volta in gruppi di 10-20 originando fibre elicoidali che danno rigidità al gel.

Gel di Poliacrilammide:

I gel di poliacrilammide si formano tramite la polimerizzazione dell'acrilammide in una soluzione che contiene il monomero, i catalizzatori della polimerizzazione e un tampone a *pH* desiderato; si possono aggiungere additivi come detergenti o urea.

La polimerizzazione inizia per la formazione di radicali liberi nella soluzione che si formano tramite l'aggiunta di catalizzatori o iniziatori del processo. Abitualmente gli iniziatori del processo di polimerizzazione sono:

- *Persolfato d'ammonio* (PSA), il quale sciogliendosi in acqua, in presenza di una base debole, si dissocia originando un radicale libero.

- *Riboflavina o riboflavina-5-fosfato*, che in presenza di luce ultravioletta e di tracce d'ossigeno origina radicali liberi. In questo caso si mescola la riboflavina con una soluzione del monomero e la reazione inizia illuminando la soluzione (fotopolimerizzazione).

In entrambi i casi si aggiunge una ammina per favorire la formazione dei radicali liberi, normalmente l'ammina utilizzata è la *N, N, N', N'tetrametiletildiammina* (TEMED).

Le concentrazioni ottimali del *PSA* e del *TEMED* dipendono dalla concentrazione dell'acrilammide, comunque tra 1 e 10mM. Una concentrazione troppo bassa può causare la non polimerizzazione completa del monomero d'acrilammide, al contrario, un eccesso del catalizzatore origina un numero elevato di catene di acrilammide corte; in entrambi i casi, le proprietà del gel come matrice per l'elettroforesi ne risentono. Il tempo di polimerizzazione è direttamente proporzionale alla temperatura e alla concentrazione dell'acrilammide, poiché la polimerizzazione è tanto più rapida quanto maggiore è la concentrazione.

La polimerizzazione si interrompe quando finiscono i radicali liberi nella soluzione, tra gli agenti che producono la scomparsa dei radicali liberi con maggior efficacia c'è l'ossigeno molecolare. Per questo motivo è di estrema importanza isolare tutte le superfici della soluzione del monomero dal contatto con l'aria, poiché l'ossigeno presente nell'aria è un forte inibitore del processo di polimerizzazione; l'inibizione si ha anche per la presenza di bolle d'aria presenti nella soluzione. La reazione di polimerizzazione è esotermica e alla fine si ottiene una riduzione del volume di reazione, quest'effetto è tanto più marcato quanto più alta è la concentrazione d'acrilammide. La polimerizzazione della sola acrilammide non origina un gel, ma solo una specie di gomma che è una miscela molto viscosa di lunghe catene lineari di poliacrilammide. Per far sì che si formi un gel propriamente detto è necessario che si creino dei legami covalenti tra queste catene; per far ciò si deve unire alla soluzione una molecola capace di formare dei legami crociati. La più utilizzata è la *N,N'*metilen-bis-acrilammide (*BIS*), per la sua capacità di unirsi contemporaneamente in due catene in crescita.

I gel di poliacrilammide sono gel neutri nel senso che non esistono gruppi carichi tra le fibre del polimero.

Elettroforesi su gel di poliacrilammide:

I prodotti digeriti sono stati separati tramite elettroforesi verticale con *Mini-Protean III* (*BIORAD*), su gel di poliacrilammide al 12% (3 ml acrilammide 40%, 2ml bisacrilammide 2%, 1ml TBE 10X, 100µl ammonio persolfato (10%), 5µl TEMED e 3,895ml ddH₂O), usando come tampone di corsa TBE 1X. 10 µl di ciascun prodotto amplificato vengono mescolati con 1µl di "gel loading buffer" contenente: 2,5% xylene cyanol FF; 40% saccarosio in acqua. Insieme ai campioni si fa correre un opportuno marcatore di peso molecolare del DNA per verificare la lunghezza dei frammenti di restrizione ottenuti.

3.2.1 Sequenziamento diretto DNA

Il sequenziamento diretto è tra i metodi più utilizzati per determinare l'eventuale presenza di varianti nel tratto di DNA utilizzato.

Per la determinazione nucleotidica dei prodotti PCR a doppio filamento purificati viene utilizzato nel nostro laboratorio il sequenziatore automatico *Genetic Analyzer 3130 Applied Biosystem*.

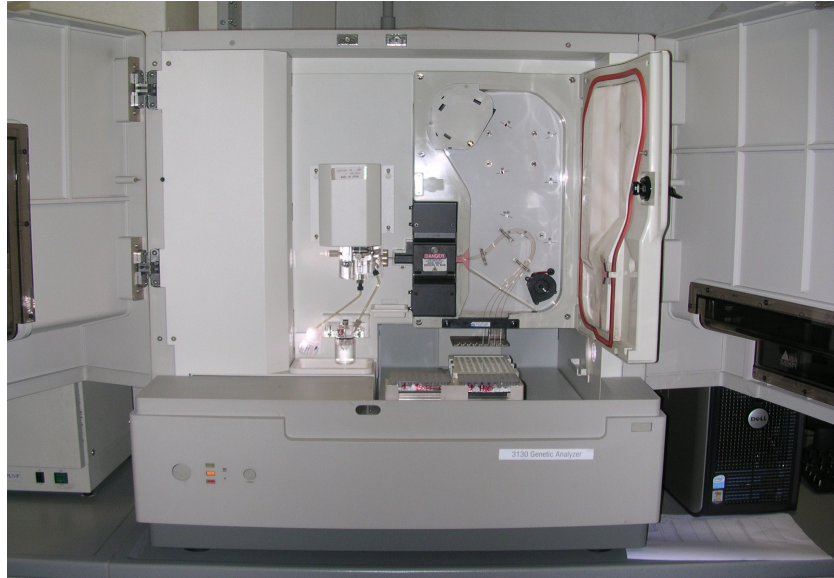


Figura 3.1. Immagine del sequenziatore automatico.

Questo strumento si basa su un'elettroforesi capillare usando come mezzo di separazione un *gel* di poliacrilammide (chiamato polimero) incluso nel capillare di silice.

Molti sono i vantaggi nell'utilizzare questa tecnica d'elettroforesi:

- rapidità della tecnica, poiché la preparazione del *gel* e il caricamento del campione si effettuano in maniera automatica,
- maggiore sensibilità, poiché si possono ottenere buoni risultati anche da campioni con bassa intensità di segnale dopo l'amplificazione tramite *PCR*,
- i risultati ottenuti sono analizzati tramite un *software* evitando così problemi d'interpretazione dei risultati.

La metodica usata si basa su un programma che individua la fluorescenza proveniente da quattro differenti colori ognuno dei quali è associato ad una base nucleotidica: adenina, citosina, timina e guanina. Ogni colore emette luce a una lunghezza d'onda diversa quando viene eccitato da un *laser*; in questo modo le quattro basi nucleotidiche, possono essere facilmente identificati attraverso un *software* associato al sequenziatore automatico. Per marcare le quattro basi nucleotidiche con i colori fluorescenti si possono usare due diversi metodi di marcatura, entrambi basati su una *PCR* che permette l'incorporazione del composto fluorescente nel template. Il primo metodo usa il 5'- *dye labeled primers (dyeprimers)*, cioè *primers* marcati nella loro estremità 5' da molecole chiamate fluorocromi; il secondo si basa sull'impiego dei 3'-

dye-labeled dideossi-nucleotidi-trifosfato (*dye terminators*); la scelta di utilizzare un metodo o l'altro dipende dalla finalità dello studio.

DYE PRIMERS LABELING: questo metodo permette d'identificare i prodotti di sintesi utilizzando i *primers* marcati con quattro differenti colori fluorescenti in quattro reazioni base-specifiche separate. I vantaggi nell'uso dei *dye-labeled primers* sono i seguenti:

- sono disponibili *primers* marcati per i più comuni siti d'innesco;
- generalmente producono segnali più intensi di quanto possano fare i *dye terminators*.

DYE TERMINATOR LABELING: con i *dye terminators* ognuno dei quattro terminatori dideossi (*ddNTPs*) è marcato con un differente colore fluorescente. Così, l'estensione della catena è contemporaneamente bloccata e marcata con il colore che corrisponde a quella base. I vantaggi nell'utilizzare i *dye-labeled terminators* sono i seguenti:

- può essere utilizzato un *primer* non marcato;
- le quattro reazioni di sequenza sono realizzate contemporaneamente in una provetta;
- falsi stop, causati dall'enzima, durante l'estensione della catena possono essere individuati dal non legame del *dye terminator*;
- l'utilizzo dei *dye terminators* richiede meno fasi di preparazione rispetto a quelle richieste con l'impiego dei *dye primer*.

Il capillare, nel quale avviene l'elettroforesi è coperto di poliacrilammide opaca ad eccezione di una piccola zona chiamata "finestra del capillare", la quale è attraversata da un fascio di luce emessa dal *laser* e permette l'eccitazione dei campioni che l'attraversano. Infine, i dati analizzati sono inviati al computer che li trasforma in una successione di quattro basi o in microsattelliti con i loro alleli assegnati.

Il *software* utilizzato per l'analisi dei dati definisce aree specifiche in una camera *CCD* per riconoscere esclusivamente le emissioni provenienti dal gruppo di fluorocromi che si sta utilizzando. Tali aree si chiamano filtri virtuali e il loro funzionamento è simile a quello dei filtri fisici che si utilizzano per separare le diverse lunghezze d'onda. Poiché esiste una certa sovrapposizione tra i diversi *range* definiti dalla camera *CCD* è fondamentale creare una matrice matematica nel *computer*. Questa matrice è formata da quattro righe e quattro colonne e i numeri indicano il grado di sovrapposizione tra le lunghezze d'onda emesse dai quattro fluorocromi. I valori della matrice variano secondo il tipo di sequenziatore automatico, il filtro virtuale e le condizioni di elettroforesi, per cui è necessario creare una nuova matrice per ogni sequenziatore automatico e per ogni chimica utilizzata.

In questo laboratorio per l'analisi delle sequenze di DNA è utilizzato il software *Sequencing Analysis*. Per facilitare l'analisi delle sequenze si può utilizzare anche il programma

SeqScape attraverso il quale è possibile allineare le sequenze ottenute direttamente con una sequenza di controllo.

Invece, per l'analisi dei microsatelliti è stato utilizzato il *software GeneMapper*.

Protocollo Sequenziamento (per gli specifici protocolli si rimanda al paragrafo 7.2):

Dopo la *PCR* il prodotto risultante non è solo l'amplificato del template, ma è un insieme di amplificato, *primers*, *dNTPs*, DNA polimerasi e *buffer*. Quindi i prodotti dell'amplificazione sono stati purificati con etanolo:

- portare il prodotto amplificato ad un volume di 100 µl con ddH₂O autoclavata e aggiungere: 10 µl di ammonio acetato 5M e 200 µl di etanolo assoluto freddo;
- agitare per inversione e lasciare precipitare l'amplificato per 20 minuti a -20°C. Una volta terminata la precipitazione, separare il prodotto amplificato dal resto della miscela tramite una centrifugazione a 14.000 rpm per 15 minuti;
- lavare il *pellet* aggiungendo 200 µl di etanolo all'80% freddo e effettuare una seconda centrifugazione a 14.000 rpm per 15 minuti. Per ottenere il prodotto amplificato purificato e concentrato liofilizzare per circa 3-4 minuti il *pellet* ottenuto dalla seconda centrifugazione.

Segue amplificazione per la marcatura del template per cui è stato utilizzato il *kit "Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing"* (Applied Biosystem Foster City CA).

La preparazione dei prodotti marcati per il sequenziatore automatico prevede una precipitazione in etanolo. Il protocollo è il seguente:

- aggiunger al campione: 2 µl sodio acetato 3M pH 4.6 e 50 µl etanolo al 95% freddo, e lasciare a temperatura ambiente per 15 minuti,
- centrifugare i campioni a 2.500 rpm per 30 minuti e aspirare il sovrantante,
- lavaggio con 150 µl di etanolo 70% e centrifuga a 14.000 rpm per 10 minuti,
- eliminare nuovamente il sovrantante e liofilizzare per 3-4 minuti il *pellet* ottenuto.

Il template liofilizzato ottenuto dalla precipitazione viene risospeso e caricato al sequenziatore automatico dopo la preparazione con:

- addizione di 20 µl di formammide deionizzata al materiale liofilizzato;
- denaturazione il template a una temperatura di 95°C per 3 minuti;
- in ghiaccio per evitare una rinaturazione e caricamento al sequenziatore.

3.2.2 *Linkage*

Sono detti in *linkage loci* genici localizzati sullo stesso cromosoma, così vicini per cui non seguono più la legge di Mendel della “segregazione indipendente”, con il risultato di venire ereditati insieme. La seconda legge di Mendel stabilisce che i geni si distribuiscono indipendentemente durante la meiosi e che il comportamento di un gene su un determinato *locus* non influenza il comportamento di un altro su un altro cromosoma. Eccezione a questa regola sono loci genetici vicini sullo stesso cromosoma: durante la prima fase della meiosi due o più loci genici segregano insieme e raramente sono separati da eventi di *crossing-over*, per questo vengono definiti concatenati o in *linkage*.

L’analisi di *linkage* si basa sulla frequenza di co-segregazione durante la meiosi di due o più *loci* rispetto a quella dovuta al caso.

Un *marker* che si trova vicino ad un allele sullo stesso cromosoma tenderà ad essere ereditato insieme a quel medesimo allele all’interno della stessa famiglia. Se un gene influenza un determinato carattere, i parenti che condividono quel *marker* saranno tra loro più simili per quella determinata caratteristica rispetto a due parenti che non lo condividono.

Per mappare un gene malattia mediante *linkage* è necessario disporre di un numero di marcatori localizzati lungo tutto il genoma, ad una distanza genetica espressa in *centiMorgan* (cM) . A questo scopo si utilizzano siti polimorfici del DNA, cioè sequenze di DNA variabili in termini di lunghezza nei diversi individui di una popolazione. La classe di polimorfismi più utilizzata per questi studi è quella dei microsatelliti. Questi elementi ripetitivi di DNA sono distribuiti in almeno 30.000-50.000 copie nel genoma umano e comprendono unità di ripetizioni in tandem da una a quattro basi. I microsatelliti sono facilmente analizzabili mediante PCR.

Dal momento che la lunghezza media del genoma, è intorno a 3500 cM, è possibile analizzare l’intero genoma utilizzando un centinaio di *markers* uniformemente distribuiti.

L’analisi di *linkage*, dunque, si basa sulla co-segregazione alla meiosi di 2 o più loci più frequentemente di quanto ci si aspetta per caso. Se due loci vengono ereditati insieme frequentemente , è probabile che siano localizzati vicini fra di loro sul cromosoma.

Si definisce un valore detto frazione di ricombinazione la misura della distanza di due loci. La frazione di ricombinazione indicata con la lettera greca tetha (θ) non può mai superare il 50%:

$$\theta = \text{n}^\circ \text{ ricombinanti} / \text{n}^\circ \text{ consanguinei}$$

Valori di $\theta = \frac{1}{2}$ indicano che i loci sono assortiti in maniera indipendente (pari al 50%).

Valori di $\theta < \frac{1}{2}$ indicano che i loci sono collegati.

Tanto più sono vicini, tanto più piccola è la probabilità che avvenga un *crossing-over*.

In questo senso la frequenza di ricombinazione (θ) è una misura della distanza genetica, intendendo per distanza genetica il numero atteso di crossing-overs fra 2 loci per meiosi. La percentuale di ricombinazione viene indicata con la lettera greca θ e l'1% di ricombinazione corrisponde all'unità di mappa o centiMorgan (cM), unità di misura della distanza genetica, ricordando che la distanza genetica non è uguale alla distanza fisica.

Le frequenze di ricombinazione fra loci piuttosto distanti non sono additive (a causa dell'effetto dei crossing-over multipli).

Per $\theta < 10\%$ c'è una corrispondenza $\sim 1:1$ fra θ e cM : $1 \text{ cM} \approx \theta = 1\%$.

Per $\theta > 10\%$ si usano delle “funzioni di mappa” per convertire θ in cM e viceversa. Le “funzioni di mappa” indicano la relazione fra frazione di ricombinazione e distanza genetica: funzione di Haldane: $\omega = -1/2 \ln(1-2\theta)$, $\theta = 1/2 (1-e^{-2\omega})$, dove ω è la distanza di mappa e θ è la frazione di ricombinazione.

La tipizzazione di famiglie ampie ed informative, dove segrega una specifica malattia genetica, consente di stabilire se esiste una “concatenazione” tra un marcatore specifico ed il locus malattia. L'esistenza di un rapporto di concatenazione viene dimostrato tramite vari metodi tra cui quello del rapporto di massima verosimiglianza (o metodo dei lod scores). La base logica di questo metodo è dovuta al fatto che in una progenie si possono osservare due situazioni, o quella del riassortimento indipendente di due geni (o di un marcatore con un gene) o quella della concatenazione degli stessi. I *lod scores* vengono così calcolati prendendo in considerazione una meiosi alla volta e confrontando la probabilità dei genotipi osservati nelle ipotesi alternative di concatenazione (*linkage*) o di assortimento indipendente. Tuttavia anche quando due loci sono localizzati sullo stesso cromosoma bisogna tener conto che si possono osservare fenomeni di ricombinazione per il *crossing-over* che è dovuto alla distanza dei due loci. La percentuale di ricombinazione è tanto maggiore quanto più distanti sono i loci.

Si calcolano cioè due probabilità:

- 1) la probabilità L_0 che la progenie di quella famiglia sia ottenuta in assenza di concatenazione (50% di ricombinazione, assenza di concatenazione, $\theta=0.5$);
- 2) la probabilità L_1 che la stessa progenie si sia generata in presenza di concatenazione ($\theta < 0.5$).

Queste probabilità vengono più esattamente definite come verosimiglianza delle osservazioni nelle due ipotesi di indipendenza e di linkage. Si calcola quindi il rapporto di verosimiglianza: $L = L_1/L_0$ e si cerca il valore di θ per cui tale rapporto risulta massimo, si usa il logaritmo in base 10 del rapporto di verosimiglianza: $Z = \log (L_1/L_0)$.

Likelihood ratio test: per θ significativamente < 0.5

Ho = i due loci sono indipendenti -> $\theta = 0.5$

H1= i due loci sono in linkage -> $0 < \theta < 0.5$

Likelihood $[L(\theta)]$ = Probabilità che i dati osservati si verificano quando la frazione di ricombinazione è θ .

LOD = log of the odds $Z(\theta) = \log_{10} [L(\theta)/L(\theta = 0.5)]$

La mappatura di una malattia si ottiene così quando il valore di Z è uguale o superiore a 3. Il valore di $Z=3$ che deriva dal $\log_{10}(1000)$, corrisponderebbe ad una probabilità di 1000:1, cioè pari a $p < 0.001$, ad indicare che l'ipotesi di concatenazione per un determinato valore di θ è 1000 volte più probabile di quella di indipendenza. Per $Z > 3$ evidenza di linkage è significativa, per $Z < -2$ si può escludere la presenza di linkage. Valori di LOD score $3 \leq Z \leq -2$ non consentono di accettare né di rigettare l'ipotesi di linkage. Bisogna considerare che non soltanto i valori di $Z > 3$ sono utili, poiché di contro i valori $Z < -2$ permettono di escludere delle regioni genomiche dall'ipotesi di linkage, si parla in tal caso di *mappaggio di esclusione*.

I punteggi di logaritmo di odds (*LOD scores*) sono stati calcolati usando il sottoprogramma MLINK del pacchetto di software LINKAGE (LINKAGE User's Guide, version 5.2 (May 31, 1993), <http://linkage.rockefeller.edu/soft/linkage/right.html>)

Protocollo Linkage (per gli specifici protocolli si rimanda al paragrafo 7.2):

Lo studio di *linkage* è stato effettuato utilizzando i pannelli di microsatelliti *ABI PRISM Linkage Mapping Set version 2.5* che coprono l'intero genoma umano.

Il primo passaggio è la preparazione della reazione di PCR (v.f.: 15 μ l) contenente:

- | | |
|----------------------------------|-------------|
| 1. DNA [20 ng/ μ l] | 1,2 μ l |
| 2. <i>True allele PCR Premix</i> | 9,0 μ l |
| 3. <i>DYE Primers</i> | 0,5 μ l |
| 4. H ₂ O | 4,3 μ l |

La *True allele PCR Premix* è una master mix per la PCR che contiene: AmpliTaq Gold DNA polymerase, dNTPs MgCl₂ e buffer.

I *DYE primers* sono coppie di oligonucleotidi fiancheggianti i marcatori di interesse (descritti nel paragrafo 7.2) di cui uno dei due è marcato con un fluoroforo con (6-FAM, VIC o NED).

Il profilo di reazione di amplificazione è il seguente:

95°C per 12 minuti
10 CICLI: 94°C per 15 secondi
55°C per 15 secondi
72°C per 30 secondi
20 CICLI: 94°C per 15 secondi
55°C per 15 secondi
72°C per 30 secondi
72°C per 10 minuti
4°C ∞

I prodotti di amplificazione devono essere preparati per l'analisi dei microsatelliti tramite sequenziatore automatico 3130 (*Applied Biosystems, Foster City, CA*) aggiungendo:

1. 1 µl del prodotto amplificato
2. 0,5 µl di *Size Standard (LIZ 500)*
3. 18,5 µl di formammide deionizzata (agente denaturante).

Il LIZ 500 è costituito da 16 frammenti di DNA di lunghezza standard (35bp, 50bp, 75bp, 100bp, 139bp, 150bp, 160bp, 200bp, 250bp, 300bp, 340bp, 350bp, 400bp, 450bp, 490bp, 500bp). La miscela viene denaturata a 95°C per 3'.

Il sequenziatore automatico *Genetic Analyzer 3130* utilizza sei tipi di filtri virtuali chiamati: A, B, C, D, E ed F. I filtri A, C, D e F sono utilizzati nello studio dei microsatelliti, mentre i filtri A, B ed E si usano per le applicazioni del sequenziamento del DNA.

Al termine della corsa elettroforetica i campioni sono stati analizzati con un *software*, specifico per l'analisi dei microsatelliti: GENEMAPPER v.4.0.

3.2.3 MLPA

MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification: amplificazione di sonde multiple ibridate ligate) è una tecnica per individuare aberrazioni del numero di copie di sequenze di DNA genomico che si basa sull'ibridazione di più sonde specifiche amplificate contemporaneamente in un'unica PCR. Questo metodo permette di individuare su larga scala riarrangiamenti che coinvolgono uno o più esoni che di solito non vengono visti con le tecniche classiche di *screening genetico* (sequenziamento diretto o DHPLC).

La tecnica è più utile in patologie in cui la frequenza di numero di copie aberranti è più alta, piuttosto che nelle malattie ereditarie in cui le parziali delezioni o duplicazioni geniche costituiscono circa il 10% di tutte le mutazioni causative di malattia.

Per quanto riguarda le HSP è stato dimostrato che le delezioni di esoni in SPG4 sono una causa frequente di malattia, costituendo circa il 20% dei pazienti che sono negativi per mutazioni puntiformi (Beetz et al., 2006; Depienne et al., 2007).

Il metodo di PCR multipla di MLPA ha molti vantaggi: può individuare variazioni nel numero di copie di 45 differenti sequenze genomiche di DNA (o di RNA) in un'unica reazione, e distinguere le sequenze che differiscono anche in un solo nucleotide (Schouten et al., 2002).

Sono disponibili kit specifici per:

- Spastic paraplegia, hereditary (HSP): SPG3A 14q21, SPAST 2p22 (*P165-HSP*),
- Hereditary Spastic Paraplegias (HSPs) region: SPAST 2p22, NIPA1 15q11 (*P211-HSP region*),
- Hereditary spastic paraplegia (HSP or SPG): SPG11 or KIAA1840 15q21.1 (*P306-SPG11*),
- Hereditary spastic paraplegias (HSPs): REEP1 (SPG31) 2p11.2, SPG7 16q24.3 (*P213-HSP2*),
- Leukodystrophy: LMNB1 5q23.2, PLP1 Xq22.2, (*P071-LMNB1-PLP1*).

La specificità della reazione MLPA è che non sono le sequenze bersaglio ad essere amplificate, ma le sonde MLPA che ibridizzano le sequenze target. Al contrario di una PCR multipla standard, un singolo paio di primers per la PCR è usato per l'amplificazione MLPA.

I prodotti di amplificazione sono separati attraverso elettroforesi capillare. I tests MLPA sono disegnati in modo tale che la lunghezza di ciascun prodotto di amplificazione sia unica. La lunghezza aumenta un passo alla volta da 6 o 9 nucleotidi, con un intervallo totale di grandezza tra 120-480 nucleotidi. Questo range di grandezza fornisce un'ottima separazione dei frammenti

e un basso rumore di fondo al sequenziatore.

La ragione per cui MLPA è più affidabile rispetto ad una PCR *multiplex* classica sta nel fatto che tutti i frammenti sono amplificati usando un solo paio di primers, cosa impossibile con una tradizionale PCR multipla. Il trucco di MLPA è che non è il campione di DNA ad essere amplificato, ma le sonde MLPA che sono aggiunte al campione. Queste sonde consistono di due separati oligonucleotidi, ciascuno contenete una delle sequenze di primer per la PCR. Solo quando queste due emi-sonde sono entrambe ibridizzate ai loro bersagli adiacenti possono essere ligate. E solo le sonde ligate saranno amplificate esponenzialmente nella reazione di PCR. La quantità dei prodotti delle sonde ligate perciò dipende dal numero delle sequenze bersaglio nel campione.

I prodotti di amplificazione di un kit SALSA MLPA variano quindi tra 120 e 480 nucleotidi in lunghezza e sono analizzati attraverso elettroforesi capillare. Il confronto tra i pattern dei picchi ottenuti con quelli dei campioni di riferimento indica quali sequenze mostrino aberranti numeri di copie.

La reazione MLPA può essere divisa in 5 passaggi principali:

- 1) Denaturazione del DNA e ibridazione delle sonde MLPA
- 2) Reazione di ligazione (il processo di unire due pezzi di DNA ad un singolo pezzo attraverso l'uso di una ligasi)
- 3) Reazione di PCR
- 4) Separazione dei prodotti di amplificazione attraverso elettroforesi

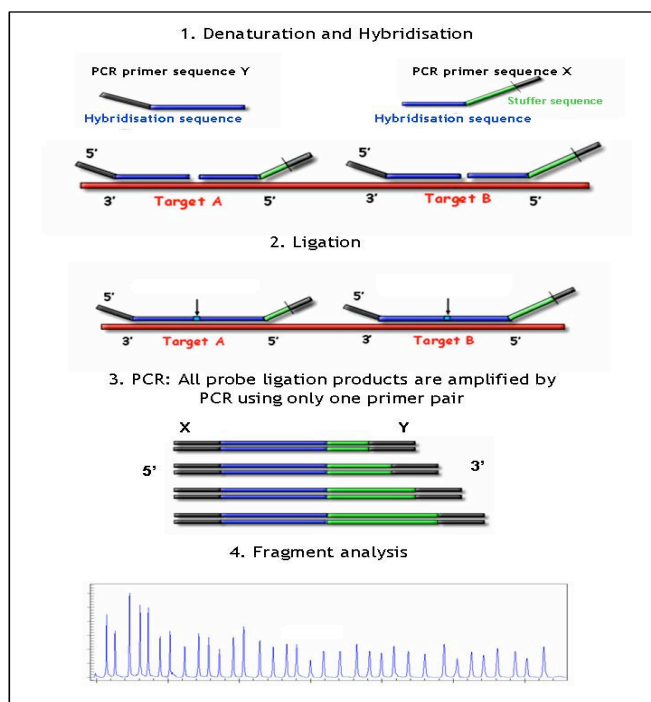


Figura 3.2. I passaggi principali della reazione MLPA.

Durante il primo passaggio il DNA è denaturato e messo in incubazione durante la notte con una miscela di sonde MLPA. Ciascun oligonucleotide sonda è complementare ad una data sequenza bersaglio ed è costituita di due parti: contiene una sequenza non ibridizzante di lunghezza variabile (“stuffer sequence”) differente per ciascuna sonda e una sequenza di primer per PCR. I due oligonucleotidi sonda ibridizzano alle sequenze target immediatamente adiacenti.

Solo quando i due oligonucleotidi sonda ibridizzano, le due emi-sonde possono essere ligate durante la reazione di ligazione da uno specifico enzima ligasi. La reazione di ligazione è così specifica che è in grado di distinguere sequenze che differiscono in un singolo nucleotide.

I prodotti della ligazione contengono entrambe le sequenze di primer per la PCR in ogni frammento e quindi saranno amplificate esponenzialmente durante la reazione di PCR. Al contrario gli oligonucleotidi sonda che non sono stati ligati contengono solo una sequenza di primer e di conseguenza, le emi-sonde non ligate non saranno amplificate esponenzialmente e non genereranno un segnale. La rimozione delle sonde non legate è perciò non necessaria in MLPA.

Poiché solo le sonde ligate saranno esponenzialmente amplificate durante la successiva reazione di PCR, il numero dei prodotti è una misura del numero delle sequenze bersaglio nel campione, in un grafico che ha in ascissa il range di grandezza in nucleotidi (da 120-480 nt), nel nostro caso gli esoni, e in ordinata il segnale di fluorescenza, che esprime l'area del picco, indice della quantità di prodotto.

Ci sarà sempre qualche sequenza la cui quota di amplificazione per ciclo sarà dell'1-2% inferiore alle altre, dando luogo ad un'area di picco finale più bassa. Un singolo profilo di amplificazione MLPA non è sufficiente per determinare se ci siano dei cambiamenti nel numero di copie: ogni profilo di picco dovrà sempre essere confrontato con quello di un campione di riferimento. Confrontato a questo campione di riferimento, la relativa area del picco di ciascun prodotto di amplificazione allora riflette il relativo numero di copie della sequenza bersaglio della sonda nel campione di pazienti analizzato. Una delezione di uno o più esoni in un paziente diventa evidente come diminuzione nella relativa area del picco dei prodotti di amplificazione delle sonde corrispondenti a questi esoni.

La concentrazione di sonde presenti in una reazione MLPA e la durata della reazione di ibridazione sono sufficienti per consentire la quasi completa ibridizzazione delle sequenze bersaglio ai corrispondenti oligonucleotidi sonda. In una tipica reazione MLPA circa 500.000.000 copie di ciascun oligonucleotide sonda sono presenti, mentre ci sono solo 20.000 copie della maggior parte delle sequenze bersaglio in un campione di 60 ng di DNA umano. Il

prolungando della reazione di ibridizzazione o l'aggiunta di più sonde non influenza il risultato ottenuto, rendendo la reazione estremamente affidabile.

Le molecole sonda che non trovano una sequenza bersaglio non saranno ligate e di conseguenza tantomeno amplificate esponenzialmente, perciò non sarà generato il corrispettivo segnale di fluorescenza. La forza del corrispettivo segnale di ciascun prodotto di amplificazione è determinata soprattutto dal numero di copie della sequenza bersaglio nel campione. Poiché non bisogna rimuovere l'eccesso di sonde MLPA, il protocollo per ogni reazione è abbastanza pratico.

Protocollo MLPA:

1. Denaturazione del DNA: 5 minuti a 98°C.
2. Ibridizzazione: aggiungere la miscela di sonde SALSA e il buffer MLPA. Mettere in incubazione per 1 minuto a 95°C, lasciare ibridizzare per 16 ore a 60°C.
3. Ligazione: aggiungere la miscela di ligasi e lasciare incubare per 15 minuti a 54°C. Inattivare con il calore la ligasi per 5 minuti a 98°C.
4. Aggiungere i primers, dNTPs e polimerasi e dare inizio alla PCR.
5. Elettroforesi capillare.

Successivamente vengono esportare le lunghezze dei frammenti e le aree dei picchi. I dati ottenuti vengono analizzati con il software COFFALYSER v.9.4.

Esistono degli svantaggi con l'utilizzo di questa tecnica legati soprattutto alla limitata specificità. Il metodo identifica principalmente delezioni/inserzioni e non è utile per individuare mutazioni puntiformi non note, una mutazione o un polimorfismo nella sequenza ibridizzata dalla sonda può anche causare una riduzione nella relativa area del picco. Inoltre le reazioni sono più sensibili a contaminanti (come inibitori della PCR) rispetto a reazioni di PCR ordinarie e lo sviluppo di miscele di sonde SALSA MLPA è limitato dai costi e dai tempi che richiede.

3.3 *Analisi dei dati*

Database e software utilizzati:

HUGO : <http://www.genenames.org/>

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

HGMD The Human Gene Mutation Database

<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>

HGVS The Human Genome Variation Society <http://www.hgvs.org/mutnomen/>

LINKAGE User's Guide, version 5.2 (May 31, 1993), pacchetto di software LINKAGE:

<http://linkage.rockefeller.edu/soft/linkage/right.html>

Rockefeller University, Lab of Statistical Genetics : <http://www.rockefeller.edu/>

CEPH, Fondation Jean Dausset, Human Pymorphism Study Center:

<http://www.cephb.fr/>

MRC-Holland-MLPA : <http://www.mlpa.com/>

Applied Biosystem : <http://www3.appliedbiosystems.com/AB Home/index.htm>

REBASER The Restriction Enzyme Database

<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>

NEB cutter scelta degli enzimi di restrizione

<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>

ENSEMBL scelta dei microsatelliti: <http://www.ensembl.org/index.html>

SOSUI: predizione domini transmembrana delle proteine http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui_submit.html

Expasy, database di proteine: <http://www.expasy.ch/>

NetPhos v.2.0, predizione sito di fosforilazione

<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

Polyphen predizione di effetto funzionale delle nsSNPs umane:

<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>

Fruitfly, predizione sito di *splicing* : http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html

Saccharomyces Genome Database: disegno *primers*: <http://www.yeastgenome.org/>

ClustalW : allineamento multiplo sequenze:

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>

Cyrillic v. 2.1.2: disegno alberi genealogici

SeqScape v. 2.5: allineamento sequenze

Sequencing Analysis v. 5.2: visualizzazione elettroferogrammi

Gene mapper V.4.0: analisi dei microsatelliti

SLINK, MLINK: analisi di *linkage*

Coffalyser V.9.4: software per l'analisi dei dati MLPA

Capitolo 4 – RISULTATI

4.1 Analisi del gene *SPG3A*

Una prima parte del lavoro ha previsto uno studio di *linkage* a due punti per ciascuno dei loci noti per una famiglia italiana con ADHSP, RMFSL200, in cui 8 membri in 4 generazioni sono affetti. E' stata effettuata un'analisi genetica di *linkage* tramite microsatelliti.

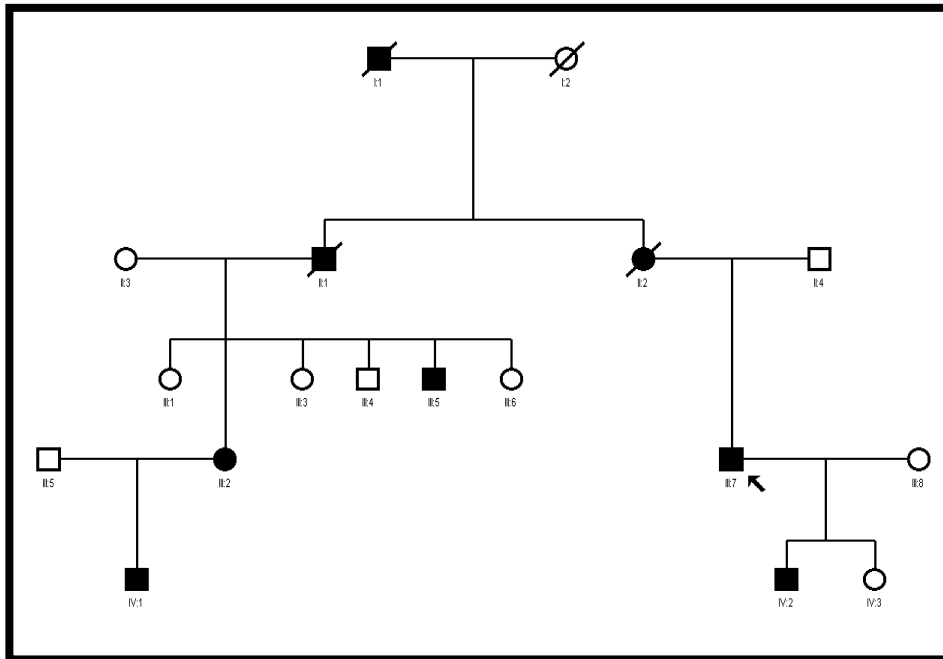


Fig. 4.1. Pedigree della famiglia RM150.

La famiglia RMFSL200 è stata valutata attraverso il programma di simulazione SLINK per calcolare il potere statistico sufficiente per determinare il *linkage*, il quale dipende da fattori come la struttura della famiglia, il numero degli affetti, l'informatività dei marcatori.

Questa famiglia presentava una forma ad esordio precoce di ADHSP non complicata ad espressività variabile, con anticipazione genetica.

Le *size* degli alleli sono stati analizzati con il *software* GENEMAPPER (versione 4.0).

I punteggi di logaritmo di *odds* (*LOD scores*) sono stati calcolati usando il sottoprogramma MLINK del pacchetto di *software* LINKAGE (versione 5.2). MLINK è la funzionalità di LINKAGE più utilizzata: consente di calcolare i *LOD score* a due punti per valori desiderati della frazione di ricombinazione. Il suo limite è che non può operare su più di 8 loci per volta in famiglie senza consanguineità (in famiglie con consanguineità si scende a 4, 5 loci).

Tabella 4.1. Analisi d'esclusione: *LOD scores* a due punti per i loci noti ADHSP.

Sottotipo	Marcatori	LOD score per la frazione di ricombinazione (θ)					
		0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
SPG	microsatellitari						
SPG3A	D14S288	2.36	1.91	1.43	0.91	0.39	0.00
	D14S276	1.78	1.42	1.04	0.63	0.24	0.00
SPG4	D2S165	-5.43	-0.55	0.05	0.11	0.11	0.00
	D2S367	0.59	0.49	0.39	0.27	0.15	0.00
SPG6	D15S128	0.10	0.24	0.26	0.22	0.13	0.00
	D15S165	-5.16	-0.45	-0.01	0.13	0.11	0.00
SPG10	D12S368	-5.71	-0.19	-0.07	-0.03	-0.01	0.00
	D12S83	0.60	0.50	0.39	0.28	0.15	0.00
SPG12	D19S220	-5.92	-1.68	-0.77	-0.32	-0.08	0.00
	D19S414	0.29	0.23	0.18	0.12	0.06	0.00
SPG8	D8S514	-6.95	-1.87	-0.99	-0.52	-0.21	0.00
	D8S284	-6.64	-0.71	-0.30	-0.12	-0.03	0.00
SPG13	D2S306	-5.32	0.02	0.16	0.13	0.05	0.00
	D2S335	-0.35	-0.14	-0.05	-0.01	0.01	0.00
SPG31	D2S286	-6.69	-0.67	-0.19	-0.01	0.04	0.00
	D2S388	-7.22	-0.74	-0.26	-0.05	0.03	0.00

Nota: per la descrizione dei microsatelliti si rimanda in appendice (tabella 7.2)

L'analisi dei dati ha evidenziato in realtà valori di *LOD score* altamente significativi per *SPG3A* (vedi Tab. 4.1) quindi si è proceduto con l'indagine molecolare per sequenziamento diretto dell'isoforma a del suddetto gene.

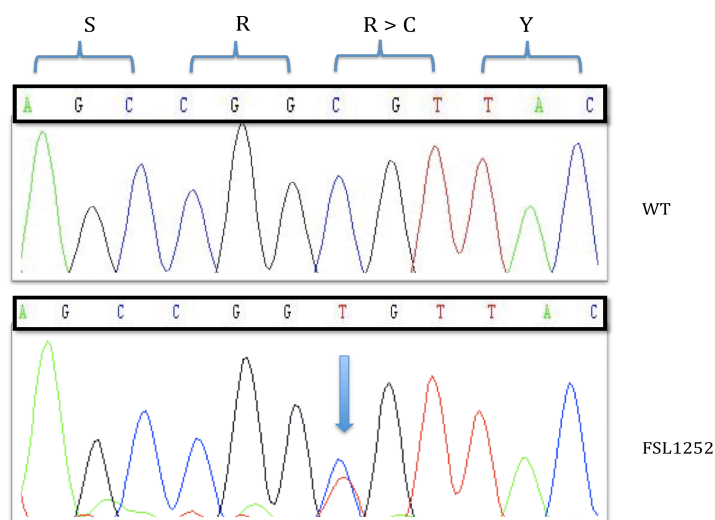


Figura 4.2. Elettroferogramma del paziente FSL1252 mostra cambio nucleotidico c. 1246 C>T (Htz).

Il sequenziamento diretto dei 14 esoni e delle loro regioni fiancheggianti ha evidenziato una transizione C>T in stato di eterozigosi nell'esone 12 (Fig. 4.2). Questo cambio nucleotidico genera una modifica nella proteina con una sostituzione di una Arginina con una Cisteina in posizione 416 della sequenza dell'Atlasina (NP_056999.2).

La mutazione p.R416C è stata confermata tramite una seconda PCR indipendente eseguita sul probando. La segregazione della mutazione missenso, all'interno della famiglia, è stata verificata tramite digestione con l'enzima di restrizione *NaeI* (Fig. 4.3).

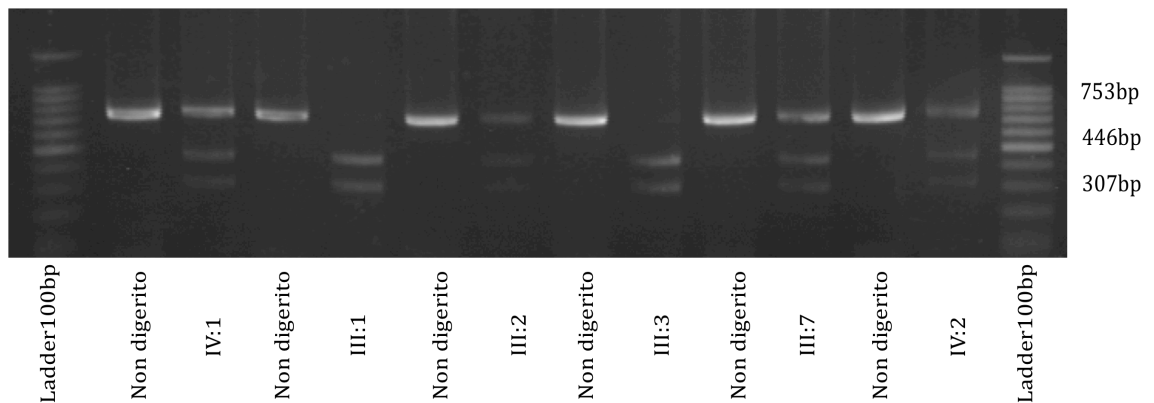


Figura 4.3. Segregazione della mutazione p.R416C all'interno della famiglia RMFSL200.

Le restanti otto famiglie ADHSP non erano sufficientemente informative per procedere ad analisi di *linkage*. Quindi tutti i probandi delle famiglie e i casi apparentemente sporadici (18) sono stati sottoposti a studio per sequenziamento diretto del gene *SPG3A*.

Tabella 4.2. Pazienti con mutazioni in *SPG3A*.

ID paziente /Famiglia	FSL1252 /RMFSL200	FSL671/RMFSL79	JAP106
Mutazione	c.1246 C>T g.68126 C>T	c.1246 C>T g.68126 C>T	c.1243 C>T g.68123 C>T
Cambio aminoacidico	p.R416C	p.R416C	p.R415W
Sesso	M	M	M
Etnia	Caucasico	Caucasico	Asiatico
Modalità di ereditarietà	ADHSP	ADHSP	Sporadico
Età di esordio	18aa	6aa	10aa
Età alla I visita	55aa	34aa	59aa
Fenotipo	Non complicato, anticipazione genetica	Non complicato, anticipazione genetica	Non complicato

Sono state individuate due mutazioni missenso, una delle quali è presente nei probandi delle due famiglie non imparentate RMFSL200 e RMFSL79. Il fenotipo dei tre pazienti è sostanzialmente puro. Le due famiglie presentano entrambe espressività variabile con anticipazione genetica.

Infine, per escludere la presenza della mutazione p.R416C nella popolazione sana è stata effettuato uno *screening* con digestione tramite *NaeI* su 200 cromosomi di controllo. Tale analisi ha escluso che la variante individuata in *SPG3A* possa essere un polimorfismo (fig. 4.4).

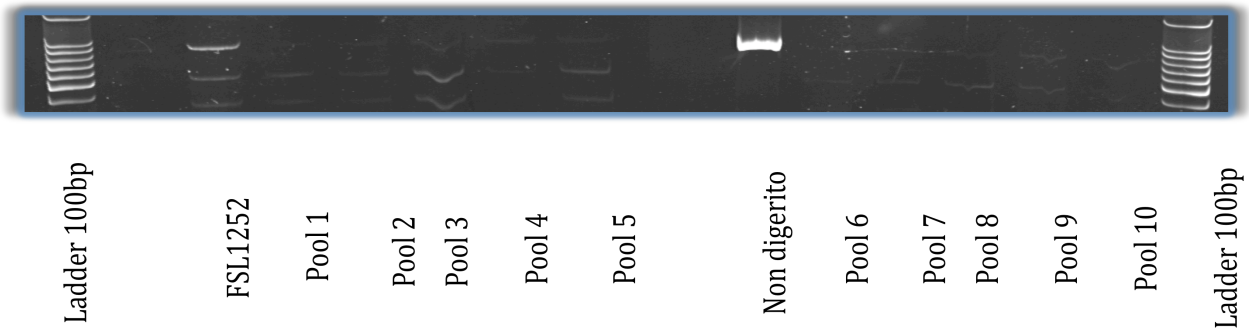


Figura 4.4. Digestione con enzima di restrizione *NaeI* su 200 cromosomi di controllo. Ogni pool è costituito da 10 controlli per un totale di 200 cromosomi.

Il cambio aminoacidico R416C è localizzato entro il motivo “SRR” nel dominio “protein kinase C phosphorylation” (“dominio 5” da Zhao et al., 2001). Questo aminoacido è identico nella famiglia dell’atlastina umana (ATL1, ATL2, ATL3) (Zhu et al., 2003), ed inoltre la regione tra gli aminoacidi 402 e 422 è altamente conservata in differenti specie (*Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Macaca fascicularis*, *Gallus gallus* and *Xenopus tropicalis*) (fig4.5).

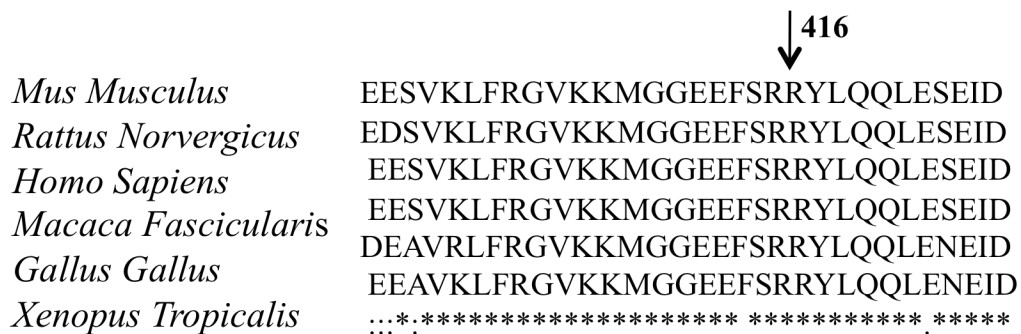


Figura 4.5. Analisi comparativa della regione altamente conservata di ATL tra gli aminoacidi da 402 a 422 in differenti specie.

La seconda variante g.68123 C>T è stata trovata, in stato di eterozigosi, in un paziente apparentemente sporadico proveniente dal Giappone (JAP106) (Fig. 4.6). Dal punto di vista della proteina la mutazione genera una sostituzione di una Arginina con una Treonina in posizione 415. Questo cambio aminoacidico era già stato riportato in letteratura (D'amico et al., 2004).

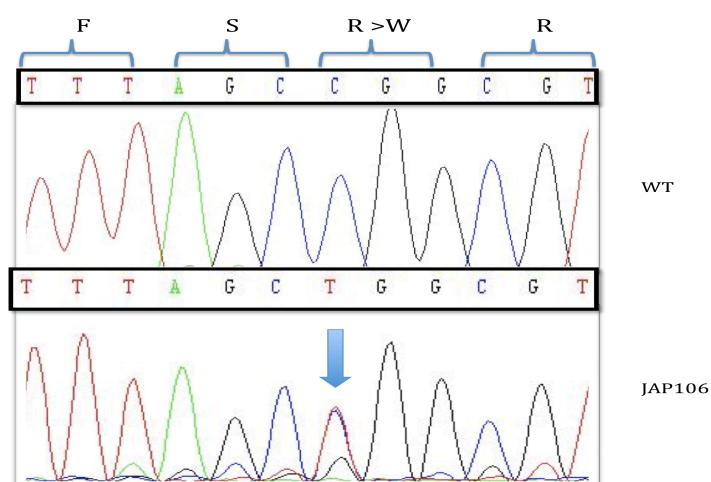


Figura 4.6. Elettroferogramma del paziente JAP106 mostra il cambio nucleotidico c. 1243 C>T (Htz).

L'analisi del campione SPG3A ha evidenziato due polimorfismi già riportati nella banca dati delle SNPs e due già ritrovati in letteratura (Tab.4.3).

Tabella 4.3. Polimorfismi identificati nel gene *SPG3A*.

Polimorfismo	Cambio nucleotidico a livello genomico	Status	Pazienti (n)	Bibliografia	SNPs
p. P28P	g.27849 A>G	Htz	4		rs355014209
p.E117E	g.30978 G>A	Htz/Hmz	16		rs1060197
IVS4 -19 G>T	g.31485 G>T	Htz/Hmz	25	Durr et al., 2004	
IVS6 +7 G>A	g.35608 G>A	Htz	3	Durr et al., 2004	

Successivamente, al fine di verificare grandi delezioni o inserzioni, sui pazienti negativi per lo studio del gene *SPG3A* è stata effettuata l'analisi tramite MLPA, che non ha indicato la presenza di anomalie quantitative, indicativo dell'assenza di riarrangiamenti nel gene per i pazienti esaminati.

4.2 Analisi del gene *SPG5A*.

L'analisi del gene *SPG5A* è stata effettuata esclusivamente mediante sequenziamento diretto per le caratteristiche delle famiglie ARHSP e per l'assenza del kit MLPA specifico per *SPG5A*.

Un totale di 17 pazienti apparentemente sporadici, negativi per *SPG3A* e i probandi di 3 famiglie ARHSP sono stati sottoposti a studio per sequenziamento diretto del gene *SPG5A*.

In due pazienti apparentemente sporadici sono state trovate tre mutazioni di cui due nuove e una già nota (Tab. 4.4).

Tabella 4.4. Pazienti con mutazioni in *SPG5A*.

ID paziente /Famiglia	FSL1263	FSL1122
Mutazione	c. 995 T>C g.183042 T>C	c.1362insT, g.201991insT201992; c.344C>T, g.182595 C>T;
Stato	Hmz	Htz composita
Cambio aminoacidico	p.F264S	p.A453CfsX470; p.S115F
Sesso	F	M
Etnia	Caucasico	Caucasico
Modalità di ereditarietà	sporadico	sporadico
Età di esordio	5aa	9aa
Età alla I visita	53aa	28aa
Fenotipo	Neuroimmagini: Atrofia ottica bilaterale. Ipotrofia nuclei caudato e putamen.	Non complicato

La prima mutazione trovata nell'individuo FSL1263, non riportata in letteratura, riguarda la sostituzione nucleotidica T>C in posizione 183042 della sequenza genomica *CYP7B1* (NT_008183) in omozigosi (Fig. 4.7).

Dal punto di vista della proteina la mutazione genera un cambio aminoacidico Fenilalanina in Serina alla posizione 264 (NP_004811).

Il fenotipo della paziente è apparso complicato da riduzione del visus e parkinsonismo, con neuroimmagini positive per “atrofia ottica bilaterale e ipotrofia dei nuclei caudato e putamen”.

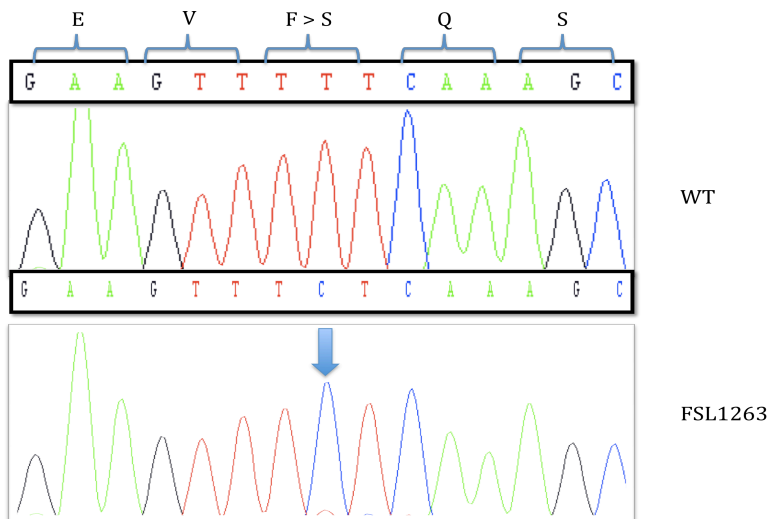


Figura 4.7. Elettroferogramma del paziente FSL1263 mostra il cambio nucleotidico c. 995 T>C (Hmz).

In un secondo paziente apparentemente sporadico (FSL1122), con fenotipo puro, sono state individuate due mutazione in eterozigosi composita. La prima mutazione già riportata in letteratura (Criscuolo et al., 2009), è rappresentata da una inserzione di una Timina in posizione 1362 della sequenza codificante (NM_004820) (Fig.4.8). L'inserzione crea un *frameshift* a livello di traduzione e genera un codone di stop dopo 17 amminoacidi (p.A453CfsX470).

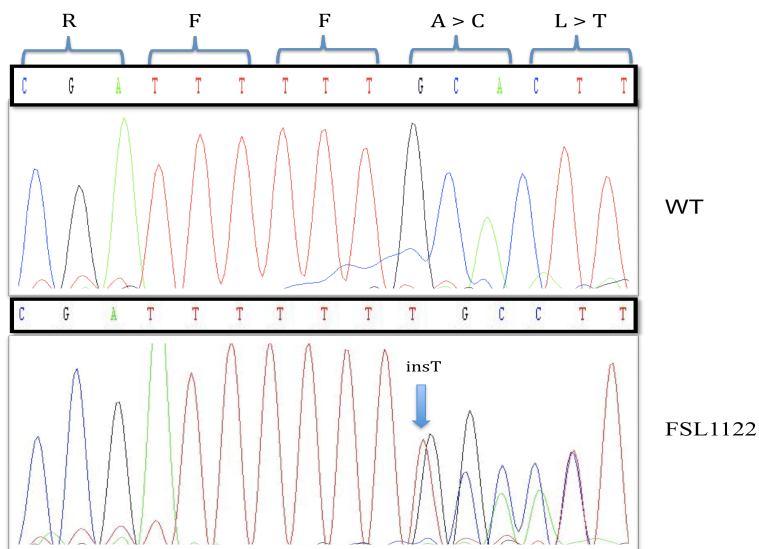


Figura 4.8. Elettroferogramma del paziente FSL1122 mostra l'inserzione c.1362insT.

Il secondo cambio nucleotidico, ad oggi non riportato, è rappresentato da una transizione C>T in posizione 344 del c.DNA (Fig. 4.9). La mutazione provoca la sostituzione della Serina in posizione 115 con una Fenilalanina.

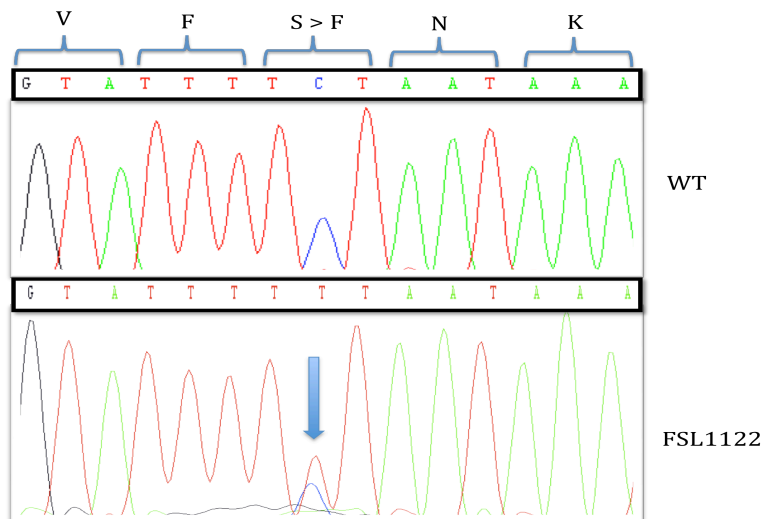


Figura 4.9. Elettroferogramma del paziente FSL1122 mostra il cambio nucleotidico c. 344 C>T (Htz).

Anche per le mutazioni non note di *SPG5A* è stato effettuato uno studio sulla popolazione sana per verificare se le varianti fossero dei polimorfismi. L'analisi tramite enzima di restrizione effettuata su circa 200 cromosomi di controllo ha evidenziato il non polimorfismo. In figura 4.8 è stata riportata, come esempio, la digestione con enzima *XmnI* su 210 cromosomi di controllo, per la mutazione p.F264S (fig. 4.10).

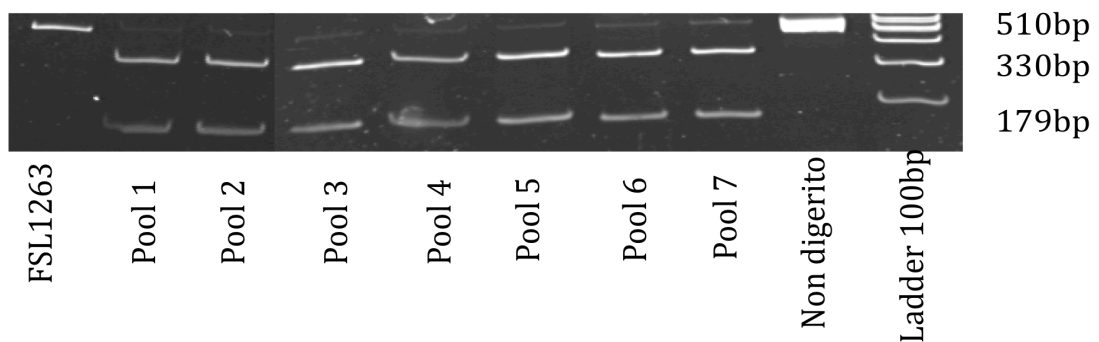


Fig. 4.10. Digestione con enzima di restrizione *XmnI* su 210 cromosomi di controllo. Ogni pool è costituito da 15 controlli per un totale di 210 cromosomi.

Tramite l'allineamento delle sequenze proteiche di diverse specie si è osservato che il residuo aminoacidico sostituito dalla mutazione missenso (p.F264S) è conservato attraverso l'evoluzione (Fig. 4.11).

↓

Homo sapiens 249 FSSEKLAKMQGWSEVF 264 QSRQDVLEKYYVHEDL 280
Pan troglodytes 249 FSSEKLAKMQGWSEVF 264 QSRQDVLEKYYVHEDL 280
Macaca mulatta 301 LSSENLAQMKGWSEVF 316 QSRQDVLEKYYVHEDL 332
Mus musculus 247 LTSEKVAQMGGQSKIV 263 QERQDLLKRYRHHDD 277
Rattus norvegicus 247 LTPEKVAQMQRSEIV 263 QERQEMLKKYYGHEEF 278
Bos taurus 552 LTIESLAKLQGMSEVV 564 QRRNDILEKYYTPKD 579
Gallus gallus 629 FLLQNMTKWLGGSKVV 645 QARQDIFEKYELLGDY 561

Fig. 4.11. Analisi comparativa della regione di CYP7B1 tra gli aminoacidi da 249 a 280 in differenti specie.

Infine l'analisi del campione ha evidenziato un polimorfismo nuovo e polimorfismi già noti per il gene *SPG5A* (Tab.4.5).

Tabella 4.5. Polimorfismi identificati nel gene *SPG5A*.

Polimorfismo	Cambio nucleotidico a livello genomico	Status	Pazienti (n)	Bibliografia
g.116 C>G (5'UTR)	g.116 C>G (5'UTR)	Htz	1	Presente studio
c.122 + 19 A>T	g.345 A>T	Hmz/Htz	16	Schulle et al., 2008
c.971 G>A, p.R324H	g.183680 G>A	Htz	3	Schulle et al., 2008

E' interessante osservare che il cambio nucleotidico C>G presente nel paziente AO184, cade nella regione 5'UTR che precede l'ATG, ma tale trasversione non altera il sito di *splicing*.

4.3 Analisi del gene *SPG42*

Il gene *SPG42* è stato analizzato mediante sequenziamento diretto dei probandi delle famiglie negative per *SPG3A* (7) e nei pazienti sporadici (15) negativi per l'analisi dei due geni *SPG3A* e *SPG5A* candidati come più frequenti nelle forme ad esordio precoce.

La scelta dello studio di questo gene è stata guidata dalle caratteristiche cliniche dell'unica famiglia riportata in letteratura (Lin et al., 2008) e per la frequenza al momento della scelta sconosciuta, nonché dalla struttura della sequenza genomica relativamente non complessa (6 esoni).

L'analisi mediante sequenziamento diretto non ha evidenziato mutazioni patogenetiche.

In 3 pazienti si è evidenziata la presenza di un polimorfismo in posizione 893 della sequenza genomica, precisamente questa variante nell'esone 1 è una transizione A>G. Tale cambio nucleotidico genera una sostituzione di un Acido Aspartico con una Glicina in posizione 171 della sequenza aminoacidica della proteina SLC33A1 (NP_004724.1). Il polimorfismo è presente in forma eterozigote nel nostro campione. Tale cambio nucleotidico è già stato riportato nella banca dati delle SNPs (rs3804796).

Tabella 4.6 Polimorfismi identificati nel gene *SPG42*.

Esone	Mutazione	Effetto sulla proteina	Status	Tipo di mutazione	Pazienti (n)	SNPs
Esone 1	g.893 T>C	D171G	Htz	Transizione	3	rs3804796

Capitolo 5 – DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'indagine molecolare condotta su 18 casi sporadici e 9 familiari affetti da forme ad esordio precoce di HSP è stata effettuata attraverso l'analisi dei geni *SPG3A*, *SPG5A* e *SPG42*.

Questo studio ha portato all'identificazione di cinque mutazioni diverse di cui una *frameshift* e le rimanenti missenso. Due mutazioni missenso sono state identificate nel gene *ATL1*, di cui una non ancora riportata in letteratura (c.1246 C>T, p.R416C) e l'altra già nota (c.1243 C>T, p.R415W) (D'amico et al., 2004). Per quanto riguarda lo studio del gene *CYP7B1* ho identificato due mutazioni missenso non ancora riportate in letteratura (c. 995 T>C, p.F264S e c.344C>T, p.S115F) e un'inserzione che esita in un *frameshift* con l'introduzione di uno stop prematuro dopo 17 amminoacidi al codone C-terminale della proteina (c.1362insT, p.A453CfsX470) già riportata in letteratura (Criscuolo et al., 2009).

Attraverso il sequenziamento diretto degli esoni codificanti e delle regioni fiancheggianti gli introni del gene *SPG3A* è stata individuata la mutazione missenso nell'esone 12 al nucleotide c.1246 C>T, che causa una sostituzione aminoacidica dell'Arginina in posizione 416 con una Cisteina.

La stessa mutazione missenso p.R416C è condivisa da una seconda famiglia italiana del campione che ho esaminato. Le due famiglie, non imparentate, manifestano un fenotipo sostanzialmente sovrapponibile, con ADHSP pura ad esordio precoce e una espressività variabile con un probabile meccanismo di anticipazione genetica.

Un cambio simile nella stessa posizione della proteina ATL1 è stato di recente identificato da uno studio su un'altra famiglia italiana (de Leva et al., 2009), in cui la Arginina 416 è sostituita da una Istidina.

Questo cambio aminoacidico è localizzato all'interno del motivo "SRR" nel dominio "protein kinase C phosphorylation" ("dominio 5" da Zhao et al., 2001), nella metà di una alfa elica vicino al C-terminale, poco prima del dominio transmembrana. Questo aminoacido è conservato nella famiglia dell'atlastina umana (*ATL1*, *ATL2*, *ATL3*) (Zhu et al., 2003), ed inoltre la regione tra gli aminoacidi 402 e 422 è altamente conservata in differenti specie (*Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Macaca fascicularis*, *Gallus gallus* and *Xenopus tropicalis*).

L'analisi in silico con il *software* predittivo PolyPhen indica che la sostituzione aminoacidica potrebbe alterare la struttura della proteina. Poiché la mutazione p.R416C non ricade all'interno del dominio catalitico GTPasi, si potrebbe ipotizzare che ci possa essere un ruolo nella associazione di membrana o nella oligomerizzazione, probabilmente esercitando un

effetto patogenetico attraverso la formazione di una struttura secondaria alterata che disturba l'interazione della atlastina con altre proteine.

Entrambe le mutazioni osservate nell'analisi del gene *SPG3A* ricadono all'interno dell'esone 12. Questo studio si aggiunge ai precedenti che indicano l'esone 12 come un *hotspot* mutazionale con una frequenza fino al 35% delle mutazioni in *SPG3A* (Namekawa et al., 2006, Smith et al., 2009).

Attraverso il sequenziamento diretto per il gene *SPG5A* ho individuato una seconda mutazione missenso, non ancora pubblicata in letteratura, in una paziente apparentemente sporadica con fenotipo complicato da riduzione del visus e parkinsonismo, ed un quadro di neuroimmagini che indica atrofia ottica bilaterale e ipotrofia dei nuclei caudato e putamen. Questa mutazione riguarda la transizione T>C in posizione 183042 della sequenza genomica di *SPG5A* in stato di omozigosi, e prevede la sostituzione di una Fenilalanina con una Serina in posizione 264 della proteina.

Il residuo aminoacidico sostituito dalla mutazione missenso è conservato attraverso l'evoluzione tra le specie (*Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Macaca mulatta*) e da ciò si può ipotizzare la sua patogenicità per la funzione della proteina CYP7B1.

In questo caso un amminoacido aromatico (Ser), con un notevole ingombro sterico, viene sostituito da un amminoacido polare non carico (Phe). Dunque, questo cambio amminoacidico potrebbe provocare un'alterazione nella struttura proteica e quindi della sua funzione.

La sostituzione p.Phe264Ser genera, inoltre, un sito ipotetico di fosforilazione osservato mediante il programma *NetPhos*. Infatti, la fosforilazione dei residui di Serina agisce come regolatore importante per la funzione di molte molecole di citocromo P450 (Oesh-Bartlomowicz et al., 2003).

Le mutazioni individuate nell'analisi del gene *SPG5A* nel presente studio interessano due pazienti, con manifestazioni cliniche in un caso pure e nel secondo complicate. La scelta di estendere lo *screening* per di gene anche alle forme complicate di HSP è in accordo a quanto riportato in letteratura (Goizet et al., 2009).

L'analisi MLPA effettuata nei pazienti candidati per *SPG3A* (kit P165-HSP-B1, MRC-Holland) non ha individuato nessun cambiamento patogenetico.

L'assenza di riarrangiamenti patogenetici nel presente studio non sorprende, poiché in letteratura tale tecnica è indicata come più utile in patologie in cui la frequenza di numero di

copie aberranti è maggiore, piuttosto che nelle malattie ereditarie in cui le parziali delezioni o duplicazioni geniche costituiscono circa il 10% di tutte le mutazioni causative di malattia. In letteratura è riportata solo una famiglia in cui è stata identificata la delezione patogenetica dell'esone 1 in *SPG4* e la delezione dell'intero gene *SPG3A* (Beetz et al.,2007).

Questo studio ha comunque contribuito ad arricchire lo spettro mutazionale dei geni *SPG3A* e *SPG5A* confermando l'eterogeneità sia *intra* che *inter locus* nella genetica delle HSP.

Sono risultati positivi per l'analisi tramite sequenziamento diretto del gene *ATLI* tre pazienti, di cui due probandi di famiglie ADHSP e un caso apparentemente sporadico, in un campione di 27 soggetti che presentavano forme di HSP ad esordio precoce (11,1%).

I pazienti positivi per mutazioni nel gene *SPG5A* sono due soggetti apparentemente sporadici, in un campione di 21 soggetti che ha incluso solo tre famiglie ARHSP (9,5%).

I risultati ottenuti in questa tesi confermano i dati osservati in letteratura per cui i geni *SPG3A* e *SPG5A* mostrano una alta frequenza mutazionale nelle forme ad esordio precoce di ADHSP e ARHSP (rispettivamente il 10% e il 7%) e nei casi apparentemente sporadici.

Capitolo 6 – BIBLIOGRAFIA

- Abel, A.; Fonknechten, N.; Hofer, A.; Durr, A.; Cruaud, C.; Voit, T.; Weissenbach, J.; Brice, A.; Klimpe, S.; Auburger, G.; Hazan, J. Early onset autosomal dominant spastic paraplegia caused by novel mutations in SPG3A. *Neurogenetics* 5: 239-243, 2004.
- Al Yahyaee S, Al Gazali LI, De Jonghe P, et al.: A novel locus for hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum and epilepsy. *Neurology* 2006, 66:1230–1234.
- Alber B, Pernauer M, Schwan A, et al. Spastin related hereditary spastic paraplegia with dysplastic corpus callosum. *J Neurol Sci* 2005; 236: 9–12.
- Allan VJ, Thompson HM, McNiven MA. Motoring around the Golgi. *Nat Cell Biol* 2002;4:236–42
- Andersson S, Gustafsson N, Warner M, Gustafsson JA: Inactivation of liver X receptor beta leads to adult-onset motor neuron degeneration in male mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102:3857–3862.
- Arnoldi A, Tonelli A, Crippa F, Villani G, Pacelli C, Sironi M, Pozzoli U, D'Angelo MG, Meola G, Martinuzzi A, Crimella C, Redaelli F, Panzeri C, Renieri A, Comi GP, Turconi AC, Bresolin N, Bassi MT. A clinical, genetic, and biochemical characterization of SPG7 mutations in a large cohort of patients with hereditary spastic paraplegia. *Hum Mutat.* 2008, 29(4):522-31.
- Auer-Grumbach, M.; Schlotter-Weigel, B.; Lochmuller, H.; Strobl-Wildemann, G.; Auer-Grumbach, P.; Fischer, R.; Offenbacher, H.; Zwick, E. B.; Robl, T.; Hartl, G.; Hartung, H.-P.; Wagner, K.; Windpassinger, C.; Austrian Peripheral Neuropathy Study Group : Phenotypes of the N88S Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2 mutation. *Ann. Neurol.* 57: 415-424, 2005.
- Bakowska JC, Jupille H, Fatheddin P, et al.: Troyer syndrome protein spartin is mono-ubiquitinated and functions in EGF receptor trafficking. *Mol Biol Cell* 2007, 18:1683–1692.
- Battistella PA, Suppiej A, Mandara V: Evoked potentials in familial spastic paraplegia: description of three brothers and review of the literature. *Giorn Neuropsi Evol* 1997, 17:201–212.
- Bayley, W. D. Hereditary spastic paraplegia. *J. Nerv. Ment. Dis.* 24: 697-701, 1897.
- Beetz C, Nygren A O, Schickel J, et al. High frequency of partial SPAST deletions in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Neurology* 2006; 67:1926–1930.
- Beetz, C.; Nygren, A. O. H.; Deufel, T.; Reid, E. An SPG3A whole gene deletion neither co-segregates with disease nor modifies phenotype in a hereditary spastic paraplegia family with a pathogenic SPG4 mutation. (Letter) *Neurogenetics* 8: 317-318, 2007.

- Behan, W. M. H.; Maia, M. Strumpell's familial spastic paraplegia: genetics and neuropathology. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 37: 8-20, 1974.
- Biancheri R, Ciccolella M, Rossi A, Tessa A, Cassandrini D, Minetti C, Santorelli FM. White matter lesions in spastic paraplegia with mutations in SPG5/CYP7B1. *Neuromuscul Disord.* 2009 Jan;19(1):62-5.
- Bizzi A, Castelli G, Bugiani M, Barker PB, Herskovits EH, Danesi U, et al. Classification of childhood white matter disorders using proton MR spectroscopic imaging. *Am J Neuroradiol* 2008; 29: 1270–5.
- Blair MA, Riddle ME, Wells JF, et al.: Infantile onset of hereditary spastic paraplegia poorly predicts the genotype. *Pediatr Neurol* 2007;36:382–386.
- Boukhris A, Stevanin G, Feki I, Denora P, Elleuch N, Miladi MI, Goizet C, Truchetto J, Belal S, Brice A, Mhiri C. Tunisian hereditary spastic paraplegias: clinical variability supported by genetic heterogeneity. *Clin Genet.* 2009 Jun;75(6):527-36. Epub 2009 May 5.
- Boukhris A, Stevanin G, Feki I, et al.: Hereditary spastic paraplegia with mental impairment and thin corpus callosum in Tunisia: SPG11, SPG15 and further genetic heterogeneity. *Arch Neurol* 2008, 65:393–402
- Bouslam N, BouhoucheA, Benomar A, et al. A novel locus for autosomal recessive spastic ataxia on chromosome 17p. *Hum Genet* 2007;121:413–420.
- Boustany, R.-M. N.; Fleischnick, E.; Alper, C. A.; Marazita, M. L.; Spence, M. A.; Martin, J. B.; Kolodny, E. H. The autosomal dominant form of 'pure' familial spastic paraplegia: clinical findings and linkage analysis of a large pedigree. *Neurology* 37: 910-915, 1987.
- Braschinsky M, Luus SM, Gross-Paju K, Haldre S. The prevalence of hereditary spastic paraplegia and the occurrence of SPG4 mutations in Estonia. *Neuroepidemiology.* 2009;32(2):89-93. Epub 2008 Nov 27.
- Braschinsky M, Zopp I, Kals M, Haldre S, Gross-Paju K. Bladder Dysfunction in Hereditary Spastic Paraplegia: What to Expect? *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2009 Sep 2. [Epub ahead of print]
- Brugman F, Scheffer H, Schelhaas HJ, Nillesen WM, Wokke JH, van de Warrenburg BP, van den Berg LH. Seipin/BSCL2 mutation screening in sporadic adult-onset upper motor neuron syndromes. *J Neurol.* 2009 May;256(5):824-6.
- Brugman F, Scheffer H, Wokke JHJ, et al. Paraplegin mutations in sporadic adult-onset upper motor neuron syndromes. *Neurology* 2008;71:1500–1505.
- Bruyn RP. The neuropathology of hereditary spastic paraplegia. *Clin Neurol Neurosurg* 1992; 94 (suppl): S16–18.
- Burdick, A. B.; Owens, L. A.; Peterson, C. R. Slowly progressive autosomal dominant spastic paraplegia with late onset, variable expression and reduced penetrance: a basis for diagnosis and counseling. *Clin. Genet.* 19: 1-7, 1981.

- Byrne P, McMonagle P, Webb S, Fitzgerald B, Parfery NA, Hutchinson M. Age-related cognitive decline in hereditary spastic paraplegia linked to chromosome 2p. *Neurology* 2000, 54: 1510–17.
- Cambi F, Tartaglino L, Lublin F, et al. X-linked pure familial spastic paraparesis: characterization of a large kindred with magnetic resonance imaging studies. *Arch Neurol* 1995;52:665– 69.
- Casali C, Valente EM, Bertini E, et al. Clinical and genetic studies in hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum. *Neurology* 2004;62:262– 68.
- Casari G, De Fusco M, Ciarmatori S, et al. Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell* 1998; 93:973–83
- Chan KY, Ching CK, Mak CM, Lam CW, Chan AY. Hereditary spastic paraplegia: identification of an SPG3A gene mutation in a Chinese family. *Hong Kong Med J*. 2009 Aug;15(4):304-7.
- Claus D, Jaspert A: Central motor conduction in hereditary spastic paraparesis (Strumpell's disease) and tropical spastic paraparesis. *Neurol Croatica* 1995, 44:23–31.
- Claus D, Waddy HM, Harding AE: Hereditary motor and sensory neuropathies and hereditary spastic paraplegia: a magnetic stimulation study. *Ann Neurol* 1990, 28:43–49.
- Cooley, W. C.; Melkonian, G.; Moses, C.; Moeschler, J. B. Autosomal dominant familial spastic paraplegia: description of a large New England family and a study of management. *Dev. Med. Child Neurol.* 32: 1087-1104, 1990.
- Cooley, W. C.; Rawnsley, E.; Melkonian, G.; Moses, C.; McCann, D.; Virgin, B.; Coughlan, J.; Moeschler, J. B. Autosomal dominant familial spastic paraplegia: report of a large New England family. *Clin. Genet.* 38: 57-68, 1990.
- Coutinho P, Barros J, Zemmouri R, et al.: Clinical heterogeneity of autosomal recessive spastic paraplegias: analysis of 106 patients in 46 families. *Arch Neurol* 1999, 56:943–949
- Crimella C, Arnoldi A, Crippa F, Mostacciuolo ML, Boaretto F, Sironi M, D'Angelo MG, Manzoni S, Piccinini L, Turconi AC, Toscano A, Musumeci O, Benedetti S, Fazio R, Bresolin N, Daga A, Martinuzzi A, Bassi MT. Point mutations and a large intragenic deletion in SPG11 in complicated spastic paraplegia without thin corpus callosum. *J Med Genet.* 2009 May;46(5):345-51. Epub 2009 Feb 5.
- Crippa F, Panzeri C, Martinuzzi A, et al.: Eight novel mutations in SPG4 in a large sample of patients with hereditary spastic paraplegia. *J Paediatr Child Health* 2006, 63:750–755.
- Criscuolo C, Filla A, Coppola G, Rinaldi C, Carbone R, Pinto S, Wang Q, de Leva MF, Salvatore E, Banfi S, Brunetti A, Quarantelli M, Geschwind DH, Pappatà S, De Michele G. Two novel CYP7B1 mutations in Italian families with SPG5: a clinical and genetic study. *J Neurol.* 2009 Aug;256(8):1252-7. Epub 2009 Apr 12.

- Criscuolo C, Sacca F, DeMichele G, et al. Novel mutation of SACS gene in a Spanish family with autosomal recessive spastic ataxia. *MovDisord* 2005; 20:1358–1361.
- Crosby AH, Proukakis C. Is the transportation highway the right road for hereditary spastic paraplegia? *Am J Hum Genet* 2002; 71: 1009–16.
- D'Amico, A.; Tessa, A.; Sabino, A.; Bertini, E.; Santorelli, F. M.; Servidei, S. Incomplete penetrance in an SPG3A-linked family with a new mutation in the atlastin gene. *Neurology* 62: 2138-2139, 2004.
- Dalpozzo, F.; Rossetto, M. G.; Boaretto, F.; Sartori, E.; Mostacciolo, M. L.; Daga, A.; Bassi, M. T.; Martinuzzi, A. Infancy onset hereditary spastic paraplegia associated with a novel atlastin mutation. *Neurology* 61: 580-581, 2003.
- de Leva MF, Filla A, Criscuolo C, Tessa A, Pappatà S, Quarantelli M, Bilo L, Peluso S, Antenora A, Longo D, Santorelli FM, De Michele G. Complex phenotype in an Italian family with a novel mutation in SPG3A. *J Neurol.* 2009 Sep 19. [Epub ahead of print]
- De Michele G, DeFusco M, Cavalcanti F, et al.: A new locus for autosomal recessive hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 16q24.3. *Am J Hum Genet* 1998, 63:135–139.
- Deluca GC, Ebers GC, Esiri MM. The extent of axonal loss in the long tracts in hereditary spastic paraplegia. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2004; 30: 576–84.
- Denora PS, Schlesinger D, Casali C, Kok F, Tessa A, Boukhris A, Azzedine H, Dotti MT, Bruno C, Truchetto J, Biancheri R, Fedirko E, Di Rocco M, Bueno C, Malandrini A, Battini R, Sickl E, de Leva MF, Boespflug-Tanguy O, Silvestri G, Simonati A, Said E, Ferbert A, Criscuolo C, Heinemann K, Modoni A, Weber P, Palmeri S, Plasilova M, Pauri F, Cassandrini D, Battisti C, Pini A, Tosetti M, Hauser E, Masciullo M, Di Fabio R, Piccolo F, Denis E, Cioni G, Massa R, Della Giustina E, Calabrese O, Melone MA, De Michele G, Federico A, Bertini E, Durr A, Brockmann K, van der Knaap MS, Zatz M, Filla A, Brice A, Stevanin G, Santorelli FM. Screening of ARHSP-TCC patients expands the spectrum of SPG11 mutations and includes a large scale gene deletion. *Hum Mutat.* 2009 Mar;30(3):E500-19.
- Depienne C, Fedirko E, Faucheux JM, et al.: A de novo SPAST mutation leading to somatic mosaicism is associated with a later age at onset in HSP. *Neurogenetics* 2007, 8:231–233.
- Depienne C, Fedirko E, Forlani S, et al. Exon deletions of SPG4 are a frequent cause of hereditary spastic paraplegia. *J Med Genet* 2007; 44:281–284.
- Depienne C, Tallaksen C, Lephay JY, et al.: Spastin mutations are frequent in sporadic spastic paraparesis and their spectrum is different from the one observed in familial cases. *J Med Genet* 2006,43:259–265.
- Depienne, C., Stevanin, G., Brice, A., Dürr, A., 2007. Hereditary spastic paraplegias: an update. *Curr. Opin. Neurol.* 20, 674-680
- Di Bella D, Mariotti C, Plumari M, et al.:Molecular and functional analysis of paraplegin gene (SPG7) mutations in patients with familial and sporadic spastic paraplegia [abstract

848]. Paper presented at the annual meeting of The American Society of Human Genetics. San Diego, CA; October 23–27, 2007. <http://www.ashg.org/genetics/ashg07s/index.shtml>.

- Dib, C., Faure S, Fizames C, Samson D, Drout N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Morissette J, Wiessenbach J. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature*, 1996. 380:6570, 152–154.
- Dick KJ, Al-Mjeni R, Baskir W, Koul R, Simpson MA, Patton MA, Raeburn S, Crosby AH. A novel locus for an autosomal recessive hereditary spastic paraplegia (SPG35) maps to 16q21-q23. *Neurology*. 2008 Jul 22;71(4):248-52. Epub 2008 May 7.
- Dion PA, Daoud H, Rouleau GA. Genetics of motor neuron disorders: new insights into pathogenic mechanisms. *Nat Rev Genet*. 2009 Nov;10(11):769-82.
- Dreha-Kulaczewski S, Dechent P, Helms G, et al. Cerebral metabolic and structural alterations in hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum assessed by MRS and DTI. *Neuroradiology* 2006; 48:893–98.
- Dube, M.-P.; Mlodzienski, M. A.; Kibar, Z.; Farlow, M. R.; Ebers, G.; Harper, P.; Kolodny, E. H.; Rouleau, G. A.; Figlewicz, D. A. Hereditary spastic paraplegia: LOD-score considerations for confirmation of linkage in a heterogeneous trait. *Am. J. Hum. Genet.* 60: 625-629, 1997.
- Dürr, A., 2008. Genetic testing for the spastic paraplegias: drowning by numbers. *Neurology* 71, 236–238.
- Durr, A.; Brice, A.; Serdaru, M.; Rancurel, G.; Derouesne, C.; Lyon-Caen, O.; Agid, Y.; Fontaine, B. The phenotype of 'pure' autosomal dominant spastic paraplegia. *Neurology* 44: 1274-1277, 1994.
- Durr, A.; Camuzat, A.; Colin, E.; Tallaksen, C.; Hannequin, D.; Coutinho, P.; Fontaine, B.; Rossi, A.; Gil, R.; Rousselle, C.; Ruberg, M.; Stevanin, G.; Brice, A. *Atlastin1* mutations are frequent in young-onset autosomal dominant spastic paraplegia. *Arch. Neurol.* 61: 1867-1872, 2004.
- Dursun U, Koroglu C, Kocasoy Orhan E, Ugur SA, Tolun A. Autosomal recessive spastic paraplegia (SPG45) with mental retardation maps to 10q24.3-q25.1. *Neurogenetics*. 2009 Oct;10(4):325-31. Epub 2009 May 5.
- Eastman SW, Yassaee M, Bieniasz PD. A role for ubiquitin ligases and Spartin/SPG20 in lipid droplet turnover. *J Cell Biol.* 2009 Mar 23;184(6):881-94.
- Engert JC, Berube P, Mercier J, et al. ARSACS, a spastic ataxia common in northeastern Quebec, is caused by mutations in a new gene encoding an 11.5-kb ORF. *Nat Genet* 2000; 24:120–125
- Erichsen AK, Koht J, Stray-Pedersen A, Abdelnoor M, Tallaksen CM. Prevalence of hereditary ataxia and spastic paraplegia in southeast Norway: a population-based study. *Brain*. 2009 Jun;132(Pt 6):1577-88. Epub 2009 Mar 31.

- Evans, K.; Keller, C.; Pavur, K.; Glasgow, K.; Conn, B.; Luring, B. Interaction of two hereditary spastic paraplegia gene products, spastin and atlastin, suggests a common pathway for axonal maintenance. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 103: 10666-10671, 2006.
- Filla A, DeMichele G, Marconi R, Bucci L, Carillo C, Castellano AE, Iorio L, Kniahynicki C, Rossi F, Campanella G (1992). Prevalence of hereditary ataxias and spastic paraplegias in Molise, a region of Italy. *J Neurol* 239: 351–353.
- Fink JK: Progressive spastic paraparesis: hereditary spastic paraplegia and it's relation to primary and amyotrophic lateral sclerosis. *Semin Neurol* 2001, 21:199–208.
- Fink JK. Advances in the hereditary spastic paraplegias. *Exp Neurol* 2003; 184 (suppl 1): S106–10.
- Fink JK. Hereditary spastic paraplegia. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2006, 6 :65–76.
- Fink, J. K. Advances in hereditary spastic paraplegia. *Curr. Opin. Neurol.* 10: 313-318, 1997.
- Fink, J. K.; Heiman-Patterson, T.; Bird, T.; Cambi, F.; Dube, M.-P.; Figlewicz, D. A.; Haines, J. L.; Hentati, A.; Pericak-Vance, M. A.; Raskind, W.; Rouleau, G. A.; Siddique, T. Hereditary spastic paraplegia: advances in genetic research. *Neurology* 46: 1507-1514, 1996.
- Finsterer, J., 2003. Hereditary spastic paraplegia. *Nervenarzt* 74, 497–504.
- Fonknechten N, Mavel D, Byrne P, et al. Spectrum of SPG4 mutations in autosomal dominant spastic paraplegia. *HumMol Genet* 2000; 9:637–644.
- Franca MC Jr, D'Abreu A, Maurer-Morelli CV, et al.: Prospective neuroimaging study in hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum. *Mov Disord* 2007, 22:1556–1562.
- Fusco C, Frattini D, Farnetti E, Nicoli D, Casali B, Fiorentino F, Nuccitelli A, Giustina ED. Hereditary spastic paraplegia and axonal motor neuropathy caused by a novel SPG3A de novo mutation. *Brain Dev.* 2009 Sep 5. [Epub ahead of print]
- Garland, H. G.; Astley, C. E. Hereditary spastic paraplegia with amyotrophy and pes cavus. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 13: 130-133, 1950.
- Gispert, S.; Santos, N.; Damen, R.; Voit, T.; Schulz, J.; Klockgether, T.; Orozco, G.; Kreuz, F.; Weissenbach, J.; Auburger, G. Autosomal dominant familial spastic paraplegia: reduction of the FSP1 candidate region on chromosome 14q to 7 cM and locus heterogeneity. *Am. J. Hum. Genet.* 56: 183-187, 1995.
- Goizet C, Boukhris A, Durr A, Beetz C, Truchetto J, Tesson C, Tsaousidou M, Forlani S, Guyant-Maréchal L, Fontaine B, Guimarães J, Isidor B, Chazouillères O, Wendum D, Grid D, Chevy F, Chinnery PF, Coutinho P, Azulay JP, Feki I, Mochel F, Wolf C, Mhiri C, Crosby A, Brice A, Stevanin G. CYP7B1 mutations in pure and complex forms of hereditary spastic paraplegia type 5. *Brain.* 2009 Jun;132(Pt 6):1589-600. Epub 2009 May 12.

- Goizet C, Boukhris A, Maltete D, Guyant-Maréchal L, Truchetto J, Mundwiller E, Hanein S, Jonveaux P, Roelens F, Loureiro J, Godet E, Forlani S, Melki J, Auer-Grumbach M, Fernandez JC, Martin-Hardy P, Sibon I, Sole G, Orignac I, Mhiri C, Coutinho P, Durr A, Brice A, Stevanin G. SPG15 is the second most common cause of hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum. *Neurology*. 2009 Oct 6;73(14):1111-9.
- Goizet C, Boukhris A, Mundwiller E, Tallaksen C, Forlani S, Toutain A, Carriere N, Paquis V, Depienne C, Durr A, Stevanin G, Brice A. Complicated forms of autosomal dominant hereditary spastic paraplegia are frequent in SPG10. *Hum Mutat*. 2009 Feb;30(2):E376-85.
- Goytain A, Hines RM, El Husseini A, Quamme GA: NIPA1(SPG6), the basis for autosomal dominant form of hereditary spastic paraplegia, encodes a functional Mg²⁺ transporter. *J Biol Chem* 2007, 282:8060–8068.
- Grieco GS, Malandrini A, Comanducci G, et al. Novel SACS mutations in autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay type. *Neurology* 2004; 62:103–106.
- Gyapay, G. et. al. 1994. Généthon Human Genetic Linkage Map. *Nature Genet*. 7:246–339.
- Haberlová J, Claeys KG, Zámečník J, De Jonghe P, Seeman P. Extending the clinical spectrum of SPG3A mutations to a very severe and very early complicated phenotype. *J Neurol*. 2008 Jun;255(6):927-8.
- Hanein S, Durr A, Ribai P, et al.:A novel locus for autosomal dominant “uncomplicated” hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 8p21.1-q13.3. *Hum Genet* 2007,122:261–273.
- Hanein S, Martin E, Boukhris A, Byrne P, Goizet C, Hamri A, Benomar A, Lossos A, Denora P, Fernandez J, Elleuch N, Forlani S, Durr A, Feki I, Hutchinson M, Santorelli FM, Mhiri C, Brice A, Stevanin G. Identification of the SPG15 gene, encoding spastizin, as a frequent cause of complicated autosomal-recessive spastic paraplegia, including Kjellin syndrome. *Am J Hum Genet*. 2008 Apr;82(4):992-1002.
- Hanna MC, Blackstone C. Interaction of the SPG21 protein ACP33/masparidin with the aldehyde dehydrogenase ALDH16A1. *Neurogenetics*. 2009 Jul;10(3):217-28. Epub 2009 Jan 31.
- Hansen J, Coryden TJ, Palmfeldt J, et al. Decreased expression of mitochondrial matrix proteases Lon and ClpP in cells from patient with hereditary spastic paraplegia (SPG13). *Neuroscience* 2008; 153: 474–82.
- HaraK, ShimboJ, Nozaki H, et al. Sacsin-related ataxia with neither retinal hypermyelination nor spasticity. *MovDisord*2007; 22:1362–1363.
- Harding, A. E. Hereditary 'pure' spastic paraplegia: a clinical and genetic study of 22 families. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr*. 44: 871-883, 1981.
- Hazan, J.; Lamy, C.; Melki, J.; Munnich, A.; de Recondo, J.; Weissenbach, J. Autosomal dominant familial spastic paraplegia is genetically heterogeneous and one locus maps to chromosome 14q. *Nature Genet*. 5: 163-167, 1993.

- Hazan J, Fonknechten N, Mavel D, et al. Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia. *Nat Genet* 1999; 23:296–303.; 7
- Hedera P, Eldevik OP, Maly P, et al. Spinal cord magnetic resonance imaging in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Neuroradiology* 2005;47:730–34.
- Hedera P, Fenichel GM, Blair M, Haines JL. Novel mutation in the SPG3A gene in an African American family with an early onset of hereditary spastic paraplegia. *Arch Neurol* 2004;61:1600-1603.
- Hewamadduma C, McDermott C, Kirby J, Grierson A, Panayi M, Dalton A, Rajabally Y, Shaw P. New pedigrees and novel mutation expand the phenotype of REEP1-associated hereditary spastic paraplegia (HSP). *Neurogenetics*. 2009 Apr;10(2):105-10. Epub 2008 Nov 26.
- Hewamadduma CA, Kirby J, Kershaw C, Martindale J, Dalton A, McDermott CJ, Shaw PJ. HSP60 is a rare cause of hereditary spastic paraparesis, but may act as a genetic modifier. *Neurology*. 2008 May 6;70(19):1717-8.
- Hirayama, K.; Takayanagi, T.; Nakamura, R.; Yanagisawa, N.; Hattori, T.; Kita, K.; Yanagimoto, S.; Fujita, M.; Nagaoka, M.; Satomura, Y.; Sobue, I.; Iizuka, R.; Toyokura, Y.; Satoyoshi, E. Spinocerebellar degenerations in Japan: a nationwide epidemiological and clinical study. *Acta Neurol. Scand.* 89 (suppl. 153): 1-22, 1994.
- Hodgkinson CA, Bohlega S, Abu-Amero SN, et al. A novel form of autosomal recessive pure hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 13q14. *Neurology* 2002;59:1905–09
- Hollenbeck, P. J. & Saxton, W. M. The axonal transport of mitochondria. *J. Cell Sci.* 118, 5411–5419 (2005).
- Hourani R, El-Hajj T, Barada WH, Hourani M, Yamout BI. MR imaging findings in autosomal recessive hereditary spastic paraplegia. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2009 May;30(5):936-40. Epub 2009 Feb 4.
- Hu G, Agarwal P. Human disease-drug network based on genomic expression profiles. *PLoS One.* 2009 Aug 6;4(8):e6536.
- Hu J, Shibata Y, Zhu PP, Voss C, Rismanchi N, Prinz WA, Rapoport TA, Blackstone C. A class of dynamin-like GTPases involved in the generation of the tubular ER network. *Cell.* 2009 Aug 7;138(3):549-61.
- Huang, S.; Zhuyu; Li, H.; Labu; Baizhu; Lo, W. H. Y.; Fischer, C.; Vogel, F. Another pedigree with pure autosomal dominant spastic paraplegia (AD-FSP) from Tibet mapping to 14q11.2-q24.3. *Hum. Genet.* 100: 620-623, 1997.
- Ito D, Suzuki N. Seipinopathy: a novel endoplasmic reticulum stress-associated disease. *Brain.* 2009 Jan;132(Pt 1):8-15. Epub 2008 Sep 12. Review.
- Ivanova, N.; Claeys, K. G.; Deconinck, T.; Litvinenko, I.; Jordanova, A.; Auer-Grumbach, M.; Haberlova, J.; Lofgren, A.; Smeyers, G.; Nelis, E.; Mercelis, R.; Plecko, B.; and 11

- others Hereditary spastic paraplegia 3A associated with axonal neuropathy. *Arch. Neurol.* 64: 706-713, 2007.
- Jouet, M. et al. X-linked spastic paraplegia (SPG1), MASA syndrome and X-linked hydrocephalus result from mutations in the L1 gene. *Nature Genet.* 7, 402–407 (1994).
 - Kassubek J, Sperfeld AD, Baumgartner A, et al. Brain atrophy in pure and complicated hereditary spastic paraparesis: a quantitative 3D MRI study. *Eur J Neurol* 2006;13:880 – 86.
 - Klebe S, Durr A, Bouslam N et al.: Spastic paraplegia 5: locus refinement, candidate gene analysis and clinical description. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2007, 144:854–861.
 - Krabbe K, Nielsen JE, Fallentin E, et al. MRI of autosomal dominant pure spastic paraplegia. *Neuroradiology* 1997;39:724 –27
 - Kuru S, Sakai M, Konagaya M, et al. Autopsy case of hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum showing severe gliosis in the cerebral white matter. *Neuropathology* 2005;25:346 –52 *Eur Neurol* 2005;54:181– 85
 - Lee M, Paik SK, Lee MJ, Kim YJ, Kim S, Nahm M, Oh SJ, Kim HM, Yim J, Lee CJ, Bae YC, Lee S. *Drosophila* Atlastin regulates the stability of muscle microtubules and is required for synapse development. *Dev Biol.* 2009 Jun 15;330(2):250-62. Epub 2009 Mar 31.
 - Leone M, Bottachi E, D'Alessandro G, Kustermann S (1995). Hereditary ataxias and paraplegias in Valle d'Aosta, Italy: a study of prevalence and disability. *Acta Neurol Scand* 91: 183–187.
 - Lesca G, Eymard-Pierre E, Santorelli FM, et al. Infantile ascending hereditary spastic paralysis (IAHSP): clinical features in 11 families. *Neurology* 2003;60:674 – 82.
 - Lin P, Li J, Liu Q, Mao F, Li J, Qiu R, Hu H, Song Y, Yang Y, Gao G, Yan C, Yang W, Shao C, Gong Y. A missense mutation in SLC33A1, which encodes the acetyl-CoA transporter, causes autosomal dominant spastic paraplegia (SPG42). *Am J Hum Genet.* 2008 Dec;83(6):752-9.
 - Loureiro JL, Miller-Fleming L, Thieleke-Matos C, Magalhães P, Cruz VT, Coutinho P, Sequeiros J, Silveira I. Novel SPG3A and SPG4 mutations in dominant spastic paraplegia families. *Acta Neurol Scand.* 2009 Feb;119(2):113-8. Epub 2008 Jul 29.
 - Lu J, Rashid F, Byrne PC: The hereditary spastic paraplegia protein spartin localises to mitochondria. *J Neurochem* 2006, 98:1908–1919.
 - Magen D, Georgopoulos C, Bross P, et al. Mitochondrial hsp60 chaperonopathy causes an autosomal-recessive neurodegenerative disorder linked to brain hypomyelination and leukodystrophy. *Am J Hum Genet* 2008;83:30–42.
 - Maltecca F, Aghaie A, Schroeder DG, Cassina L, Taylor BA, Phillips SJ, Malaguti M, Previtali S, Guénet JL, Quattrini A, Cox GA, Casari G. The mitochondrial protease

- AFG3L2 is essential for axonal development. *J Neurosci.* 2008 Mar 12;28(11):2827-36.
- Mannan AU, Krawan P, Sauter SM, et al. ZFYVE27 (SPG33), a novel spastin binding protein is mutated in hereditary spastic paraplegia. *Am J Hum Genet* 2006; 79: 351–57.
 - Mannan AU. The role of ZFYVE27/protrudin in hereditary spastic paraplegia [author's reply]. *Am J Hum Genet* 2008; 83: 128–30.
 - Martignoni M, Riano E, Rugarli EI. The role of ZFYVE27/ protrudin in hereditary spastic paraplegia. *Am J Hum Genet* 2008; 83: 127–28.
 - Martinez MF, Kobayashi H, Pegoraro E, et al.: Genetic localization of a new locus for recessive familial spastic paraparesis to 15q13-15. *Neurology* 1999;53:50–56.
 - Matsui M, Kawarai T, Hase Y, Tomimoto H, Iseki K, Rogaeva E, Orlacchio A, Bernardi G, St George-Hyslop P, Takahashi R, Matsui M. A novel mutation in the SPG3A gene (atlastin) in hereditary spastic paraplegia. *J Neurol.* 2007 Jul;254(7):972-4.
 - McDermott CJ, Burness CE, Kirby J, et al. Clinical features of hereditary spastic paraplegia due to spastin mutations. *Neurology* 2006; 67: 45–51.
 - McDermott CJ, Dayaratne RK, Tomkins J, et al. Paraplegin gene analysis in hereditary spastic paraparesis (HSP) pedigrees in northeast England. *Neurology* 2001;56: 476–471.
 - McDermott, C., White, K., Bushby, K., Shaw, P., 2000. Hereditary spastic paraparesis: a review of new developments. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 69, 150–160;
 - McLeod, J. G.; Morgan, J. A.; Reye, C. Electrophysiological studies in familial spastic paraplegia. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 40: 611-615, 1977.
 - McMonagle P, Byrne P, Hutchinson M. Further evidence of dementia in SPG4-linked autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Neurology* 2004; 62: 407–10.
 - McMonagle P, Webb S, Hutchinson M. The prevalence of pure HSP in the island of Ireland. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002; 72: 43–46.
 - Meijer IA, HandCK, Grewal KK, et al. A locus for autosomal dominant hereditary spastic ataxia, SAX1, maps to chromosome12p13. *AmJ Hum Genet* 2002.
 - Meijer, I. A.; Dion, P.; Laurent, S.; Dupre, N.; Brais, B.; Levert, A.; Puymirat, J.; Rioux, M. F.; Sylvain, M.; Zhu, P.-P.; Soderblom, C.; Stadler, J.; Blackstone, C.; Rouleau, G. A. Characterization of a novel SPG3A deletion in a French-Canadian family. *Ann. Neurol.* 61: 599-603, 2007.
 - Muglia, M.; Magariello, A.; Nicoletti, G.; Patitucci, A.; Gabriele, A. L.; Conforti, F. L.; Mazzei, R.; Caracciolo, M.; Ardito, B.; Lastilla, M.; Tedeschi, G.; Quattrone, A. Further evidence that SPG3A gene mutations cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Ann. Neurol.* 51: 794-795, 2002.
 - Muriel MP, Dauphin A, Namekawa M, Gervais A, Brice A, Ruberg M. Atlastin-1, the dynamin-like GTPase responsible for spastic paraplegia SPG3A, remodels lipid membranes

and may form tubules and vesicles in the endoplasmic reticulum. *J Neurochem.* 2009 Sep;110(5):1607-16. Epub 2009 Jul 1.

- Murphy S, Gorman G, Beetz C, Byrne P, Dytko M, McMonagle P, Kinsella K, Farrell M, Hutchinson M. Dementia in SPG4 hereditary spastic paraplegia: clinical, genetic, and neuropathologic evidence. *Neurology.* 2009 Aug 4;73(5):378-84.
- Nakamura A, Izumi K, Umehara F, et al. Familial spastic paraplegia with mental impairment and thin corpus callosum. *J Neurol Sci* 1995;131:35– 42
- Namekawa, M. et al. Mutations in the SPG3A gene encoding the GTPase atlastin interfere with vesicle trafficking in the ER/Golgi interface and Golgi morphogenesis. *Mol. Cell Neurosci.* 35, 1–13, 2007
- Namekawa, M.; Nelson, I.; Ribai, P.; Durr, A.; Denis, E.; Stevanin, G.; Ruberg, M.; Brice, A. A founder effect and mutational hot spots may contribute to the most frequent mutations in the SPG3A gene. (Letter) *Neurogenetics* 7: 131-132, 2006.
- Namekawa, M.; Ribai, P.; Nelson, I.; Forlani, S.; Fellmann, F.; Goizet, C.; Depienne, C.; Stevanin, G.; Ruberg, M.; Durr, A.; Brice, A. SPG3A is the most frequent cause of hereditary spastic paraplegia with onset before age 10 years. *Neurology* 66: 112-114, 2006.
- Olmez A, Uyanik G, Ozugul RK, et al.: Further clinical and genetic characterization of SPG11: hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum. *Neuropediatrics* 2006, 37:59–66.
- Opjordsmoen, S.; Nyberg-Hansen, R. Hereditary spastic paraplegia with neurogenic bladder disturbances and syndactyly. *Acta Neurol. Scand.* 61: 35-41, 1980.
- Orlacchio A, Kawarai T, Gaudiello F, St George-Hyslop PH, Floris R, Bernardi G. New locus for hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 1p31.1-1p21.1. *Ann Neurol.* 2005 Sep;58(3):423-9.
- Orlacchio A, Kawarai T, Gaudiello F, Totaro A, Schillaci O, Stefani A, Floris R, St George-Hyslop PH, Sorbi S, Bernardi G. Clinical and genetic study of a large SPG4 Italian family. *Mov Disord.* 2005 Aug;20(8):1055-9.
- Orlacchio A, Kawarai T, Totaro A, Errico A, St George-Hyslop PH, Rugarli EI, Bernardi G. Hereditary spastic paraplegia: clinical genetic study of 15 families. *Arch Neurol.* 2004 Jun;61(6):849-55.
- Orlacchio A., Kawarai T., Rogaeva E., Song Y.Q., Paterson A.D., Bernardi G., St. George-Hyslop P.H.. Clinical and genetic study of a large Italian family linked to SPG12 locus. *Neurology.* 2002, 59:1395-1401.
- Orlacchio A., Patrono C., Gaudiello F., Rocchi C., Moschella V., Floris R., Bernardi G., Kawarai T. Silver syndrome variant of hereditary spastic paraplegia: a locus to 4p and allelism with SPG4. *Neurology.* 2008, 70:1959-1966.
- Orso, G.; Pendin, D.; Liu, S.; Tosetto, J.; Moss, T. J.; Faust, J. E.; Micaroni, M.; Egorova, A.; Martinuzzi, A.; McNew, J. A.; Daga, A. Homotypic fusion of ER membranes requires

the dynamin-like GTPase *Atlastin*. *Nature*, 2009, 460: 978-983.

- Orthmann-Murphy JL, Salsano E, Abrams CK, Bizzi A, Uziel G, Freidin MM, Lamantea E, Zeviani M, Scherer SS, Pareyson D. Hereditary spastic paraplegia is a novel phenotype for GJA12/GJC2 mutations. *Brain*. 2009 Feb;132(Pt 2):426-38. Epub 2008 Dec 4.
- Ouyang Y, Takiyama Y, Sakoe K, et al. SACS related ataxia (ARSACS): expanding the genotype upstream from the gigantic exon. *Neurology* 2006; 66:1103–1104.
- Panza E, Pippucci T, Cusano R, Lo Nigro C, Pradella L, Contardi S, Rouleau GA, Stevanin G, Ravazzolo R, Liguori R, Montagna P, Romeo G, Seri M. Refinement of the SPG9 locus on chromosome 10q23.3-24.2 and exclusion of candidate genes. *Eur J Neurol*. 2008 May;15(5):520-4.
- Polo JM, Calleja J, Combarros O, Berciano J: Hereditary ataxias and paraplegias in Cantabria, Spain. An epidemiological and clinical study. *Brain* 1991; 114 (Pt 2): 855–866;
- Polo, J. M.; Calleja, J.; Combarros, O.; Berciano, J. Hereditary 'pure' spastic paraplegia: a study of nine families. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 56: 175-181, 1993.
- Rainier, S.; Hedera, P.; Alvarado, D.; Zhao, X.; Kleopa, K. A.; Heiman-Patterson, T.; Fink, J. K. Hereditary spastic paraplegia linked to chromosome 14q11-q21: reduction of the SPG3 locus interval from 5.3 to 2.7 cM. *J. Med. Genet.* 38: e39, 2001. Note: Electronic Article.
- Rainier, S.; Sher, C.; Reish, O.; Thomas, D.; Fink, J. K. De novo occurrence of novel SPG3A/atlastin mutation presenting as cerebral palsy. *Arch. Neurol.*, 2006; 63: 445-447.
- Reid E. Science in motion: common molecular pathological themes emerge in the hereditary spastic paraplegias. *J Med Genet* 2003;40:81–86
- Reid, E. et al. A kinesin heavy chain (KIF5A) mutation in hereditary spastic paraplegia (SPG10). *Am. J. Hum. Genet.* 71, 1189–1194, 2002
- Reid, E., 1999. The hereditary spastic paraplegias. *J. Neurol.* 246, 995-1003;
- Riano E, Martignoni M, Mancuso G, Cartelli D, Crippa F, Toldo I, Siciliano G, Di Bella D, Taroni F, Bassi MT, Cappelletti G, Rugarli EI. Pleiotropic effects of spastin on neurite growth depending on expression levels. *J Neurochem*. 2009 Mar;108(5):1277-88. Epub 2009 Jan 29.
- Robay D, Patel H, Simpson MA, et al.: Endogenous spartin, mutated in hereditary spastic paraplegia, has a complex subcellular localization suggesting diverse roles in neurons. *Exp Cell Res* 2006, 312:2764–2777.
- Sack, G. H.; Huether, C. A.; Garg, N. Familial spastic paraplegia--clinical and pathologic studies in a large kindred. *Johns Hopkins Med. J.* 143: 117-121, 1978.
- Salameh JS, Shenoy AM, David WS. Novel SPG3A and SPG4 mutations in two patients with Silver syndrome. *J Clin Neuromuscul Dis*. 2009 Sep;11(1):57-9.

- Salinas S, Proukakis C, Crosby A., Warner T.T. Hereditary spastic paraplegia: clinical feature and pathogenetic mechanism. *Lancet Neurol* (2008); 7:1127-38.
- Saugier-Verber, P. et al. X-linked spastic paraplegia and Pelizaeus–Merzbacher disease are allelic disorders at the proteolipid protein locus. *Nature Genet.* 6, 257–262 (1994).
- Sauter SM, Engel W, Neumann LM, Kunze J, Neesen J. Novel mutations in the *Atlastin* gene (SPG3A) in families with autosomal dominant hereditary spastic paraplegia and evidence for late onset forms of HSP linked to the SPG3A locus. *Hum Mut* 2004;23:98-101.
- Sauter, S., Neesen, J., Paulus, W., Engel, W., 1999. Hereditary spastic paraplegia (HSP). *Dtsch. Arztebl.* 7, 434–440;
- Schady, W.; Dick, J. P. R.; Sheard, A.; Crampton, S. Central motor conduction studies in hereditary spastic paraplegia. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 54: 775-779, 1991.
- Schady, W.; Sheard, A. A quantitative study of sensory function in hereditary spastic paraplegia. *Brain* 113: 709-720, 1990.
- Schady, W.; Smith, C. M. L. Sensory neuropathy in hereditary spastic paraplegia. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 57: 693-698, 1994.
- Scheltens, P.; Bruyn, R. P. M.; Hazenberg, G. J. A Dutch family with autosomal dominant pure spastic paraparesis (Strumpell's disease). *Acta Neurol. Scand.* 82: 169-173, 1990.
- Schickel J, Pamminger T, Ehram A, et al.: Isoform-specific increase of spastin stability by N-terminal missense variants including intragenic modifiers of SPG4 hereditary spastic paraplegia. *Eur J Neurol* 2007,14:1322–1328.
- Schouten JP et al. (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification *Nucleic Acids Res* 30, e57.
- Schüle R, Bonin M, Dürr A, Forlani S, Sperfeld AD, Klimpe S, Mueller JC, Seibel A, van de Warrenburg BP, Bauer P, Schöls L. Autosomal dominant spastic paraplegia with peripheral neuropathy maps to chr12q23-24. *Neurology.* 2009 Jun 2;72(22):1893-8. Epub 2009 Apr 8.
- Schüle R, Brandt E, Karle KN, Tsaousidou M, Klebe S, Klimpe S, Auer-Grumbach M, Crosby AH, Hübner CA, Schöls L, Deufel T, Beetz C. Analysis of *CYP7B1* in non-consanguineous cases of hereditary spastic paraplegia. *Neurogenetics.* 2009 Apr;10(2):97-104. Epub 2008 Oct 15.
- Schule, R.; Holland-Letz, T.; Klimpe, S.; Kassubek, J.; Klopstock, T.; Mall, V.; Otto, S.; Winner, B.; Schöls, L. :The spastic paraplegia rating scale (SPRS): a reliable and valid measure of disease severity. *Neurology* 67: 430-434, 2006.
- Schulte T, Mitterski B, Bornke C, et al.: Neurophysiological findings in SPG4 patients differ from other types of spastic paraplegia. *Neurology* 2003, 60:1529–1532.
- Schwarz, G. A.; Liu, C. N. Hereditary (familial) spastic paraplegia: further clinical and pathologic observations. *Arch. Neurol. Psychiat.* 75: 144-162, 1956.

- Scuderi C, Fichera M, Calabrese G, Elia M, Amato C, Savio M, Borgione E, Vitello GA, Musumeci SA. Posterior fossa abnormalities in hereditary spastic paraparesis with spastin mutations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009 Apr;80(4):440-3.
- Seidel K, De Vos R, Derksen L, Bauer P, Riess O, den Dunnen W, Deller T, Hageman G, Rüb U. Widespread thalamic and cerebellar degeneration in a patient with a complicated hereditary spastic paraplegia (HSP). *Ann Anat*. 2009 Apr;191(2):203-11. Epub 2009 Jan 20.
- Seri, M.; Cusano, R.; Forabosco, P.; Cinti, R.; Caroli, F.; Picco, P.; Bini, R.; Morra, V. B.; De Michele, G.; Lerone, M.; Silengo, M.; Pela, I.; Borrone, C.; Romeo, G.; Devoto, M. Genetic mapping to 10q23.3-q24.2, in a large Italian pedigree, of a new syndrome showing bilateral cataracts, gastroesophageal reflux, and spastic paraparesis with amyotrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 64: 586-593, 1999
- Shimazaki H, Sakoe K, Nijjima K, Nakano I, et al. An unusual case of a spasticity-lacking phenotype with a novel SACS mutation. *J Neurol Sci* 2007; 255:87–89.
- Silva MC, Coutinho P, Pinheiro CD, Neves JM, Serrano P (1997). Hereditary ataxias and spastic paraplegias: methodological aspects of a prevalence study in Portugal. *J Clin Epidemiol* 50: 1377–1384.
- Skre, H. Hereditary spastic paraplegia in Western Norway. *Clin. Genet.* 6: 165-183, 1974.
- Smith BN, Bevan S, Vance C, Renwick P, Wilkinson P, Proukakis C, Squitieri F, Berardelli A, Warner TT, Reid E, Shaw CE. Four novel SPG3A/atlastin mutations identified in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia kindreds with intra-familial variability in age of onset and complex phenotype. *Clin Genet.* 2009 May;75(5):485-9.
- Soderblom C, Blackstone C. Traffic accidents; molecular genetic insights into the pathogenesis of hereditary spastic paraplegias. *Pharmacol Ther* 2006; 109: 42–56.
- Solowska JM, Morfini G, Falnikar A, et al. Quantitative and functional analyses of spastin in the nervous system: implications for hereditary spastic paraplegia. *J Neurosci* 2008; 28: 2147–57.
- Somasundaram S, Raghavendra S, Singh A., et al. Hereditary spastic paraplegia with a thin corpus callosum. *Pediatr Radiol* 2007;37:503– 05.
- Sperfeld AD, Baumgartner A, Kassubek J. Magnetic resonance investigation of the upper spinal cord in pure and complicated hereditary spastic paraparesis. *Eur Neurol* 2005;54:181– 85.
- Sperfeld AD, Bretschneider V, Flaith L, et al. MR-pathologic comparison of the upper spinal cord in different motor neuron diseases. *Eur Neurol* 2005;53:74 –77.
- Steinmuller, R.; Lantigua-Cruz, A.; Garcia-Garcia, R.; Kostrzewa, M.; Steinberger, D.; Muller, U. Evidence of a third locus in X-linked recessive spastic paraplegia. *Hum. Genet.* 100: 287-289, 1997
- Stevanin G, Azzedine H, Denora P, et al.: Mutations in SPG11 are frequent in autosomal

recessive spastic paraplegia with thin corpus callosum, cognitive decline and lower motor neuron degeneration. *Brain* 2008, 131:772–784.

- Stevanin G, Ruberg M, Brice A. Recent advances in the genetics of spastic paraplegias. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2008 May;8(3):198-210. Review.
- Svenson IK, Kloos MT, Gaskell PC, et al. Intragenic modifiers of hereditary spastic paraplegia due to spastin gene mutations. *Neurogenetics* 2004; 5:157–164
- Svenstrup K, Bross P, Koefoed P, Hjermand LE, Eiberg H, Born AP, Vissing J, Gyllenborg J, Nørremølle A, Hasholt L, Nielsen JE. Sequence variants in SPAST, SPG3A and HSPD1 in hereditary spastic paraplegia. *J Neurol Sci.* 2009 Sep 15;284(1-2):90-5. Epub 2009 May 6.
- Tallaksen CM, Guichart-Gomez E, Verpillat P, et al. Subtle cognitive impairment but no dementia in patients with spastin mutations. *Arch Neurol* 2003; 60: 1113–18.
- Tallaksen, C.M., Durr, A., Brice, A., 2001. Recent advances in hereditary spastic paraplegia. *Curr. Opin. Neurol.* 14, 457–463;
- Teive HA, Iwamoto FM, Della Coletta MV, et al. Hereditary spastic paraplegia associated with thin corpus callosum. *Arq Neuropsiquiatr* 2001;59:790 –92.
- Tessa, A.; Casali, C.; Damiano, M.; Bruno, C.; Fortini, D.; Patrono, C.; Cricchi, F.; Valoppi, M.; Nappi, G.; Amabile, G. A.; Bertini, E.; Santorelli, F. M. SPG3A: an additional family carrying a new atlastin mutation. *Neurology* 59: 2002-2005, 2002.
- Thiffault I, RiouxMF, Tetreault M, et al. A new autosomal recessive spastic ataxia associated with frequent white matter changes maps to 2q33–34. *Brain* 2006; 129:2332-2340.
- Thurmon, T. F.; He, C.; Haskell, C.; Thorpe, P.; Thurmon, S. G.; Rosen, D. R. Genetic anticipation in a large family with pure autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Am. J. Med. Genet.* 83: 392-396, 1999.
- Tsang HT, Edwards TL, Wang X, Connell JW, Davies RJ, Durrington HJ, O’Kane CJ, Luzio JP, Reid E. The hereditary spastic paraplegia proteins NIPA1, spastin and spartin are inhibitors of mammalian BMP signalling. *Hum Mol Genet.* 2009 Oct 15;18(20):3805-21. Epub 2009 Jul 20.
- Tsaousidou MK, Ouahchi K, Warner TT, et al.: Sequence alterations within CYP7B1 implicate defective cholesterol homeostasis in motor-neuron degeneration. *Am J Hum Genet* 2008, 82:510–515.
- van Niekerk, E. A. et al. Sumoylation in axons triggers retrograde transport of the RNA-binding protein La. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104, 12913–12918 (2007)
- Wang X, Shaw WR, Tsang HT, Reid E, O’Kane CJ. *Drosophila* spichthyn inhibits BMP signalling and regulates synaptic growth and axonal microtubules. *Nat Neurosci* 2007; 10: 177–85.
- Warner TT. Hereditary spastic paraplegia. *ACNR Adv Clin Neurosci Rehabil* 2007; 6: 16–17

- Weissenbach, J., et al. 1992. A second-generation linkage map of the human genome. *Nature*. 359:794–801.
- Wharton, S.B., McDermott, C.J., Grierson, A.J., Wood, J.D., Gelsthorpe, C., Ince, P.G., Shaw, P.J. The cellular and molecular pathology of the motor system in hereditary spastic paraparesis due to mutation of the spastin gene. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2003; 62: 1166–1177.
- White KD, Ince PG, Lusher M, et al. Clinical and pathological findings in hereditary spastic paraplegia with spastin mutations. *Neurology* 2000; 55: 89–95.
- Wilkinson PA, Crosby AH, Turner C, et al. A clinical, genetic and biochemical study of SPG7 mutations in hereditary spastic paraplegia. *Brain* 2004; 127: 973–80.
- Wilkinson PA, Hart PE, Patel H, Warner TT, Crosby AH. SPG3A mutation screening in English families with early onset autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *J Neurol Sci* 2003;216:43-45.
- Yanase, D., Komai, K., Hamaguchi, T., Okino, S., Yokoji, H., Makifuchi, T., Takano, H., Yamada, M., 2004. Hereditary spastic paraplegia with frontal lobe dysfunction. *Neurology* 63, 2149–2152
- Yang, D. et al. Structural basis for midbody targeting of spastin by the ESCRT-III protein CHMP1B. *Nature Struct. Mol. Biol.* 15, 1278–1286 (2008).
- Zhao GH, Hu ZM, Shen L, Jiang H, Ren ZJ, Liu XM, Xia K, Guo P, Pan Q, Tang BS. A novel candidate locus on chromosome 11p14.1-p11.2 for autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Chin Med J (Engl)*. 2008 Mar 5;121(5):430-4.
- Zhao, X.; Alvarado, D.; Rainier, S.; Lemons, R.; Hedera, P.; Weber, C. H.; Tukel, T.; Apak, M.; Heiman-Patterson, T.; Ming, L.; Bui, M.; Fink, J. K. Mutations in a newly identified GTPase gene cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Nature Genet.* 29: 326-331, 2001.
- Zhu, P. P., Soderblom, C., Tao-Cheng, J. H., Stadler, J. & Blackstone, C. SPG3A protein atlastin-1 is enriched in growth cones and promotes axon elongation during neuronal development. *Hum. Mol. Genet.* 15, 1343–1353, 2006
- Zhu, P.; Patterson, A.; Lavoie, B.; Stadler, J.; Shoeb, M.; Patel, R.; Blackstone, C. Cellular localization, oligomerization, and membrane association of the hereditary spastic paraplegia 3A (SPG3A) protein atlastin. *J. Biol. Chem.* 278: 49063-49071, 2003.
- Zuchner S, Wang G, Tran-Viet KN, et al.: Mutations in the novel mitochondrial protein REEP1 cause hereditary spastic paraplegia type 31. *Am J Hum Genet* 2006, 79:365–369
- Zuchner, S. et al. A new locus for dominant hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 2p12. *Neurogenetics* 7, 127–129, 2006.

Capitolo 7 – APPENDICI

7.1 *Protocolli clinici.*

Tabella 7.1. SPRS - Scala di Valutazione per la Paraplegia Spastica.*

(1) DISTANZA COPERTA DA UNA DEAMBULAZIONE SENZA SOSTE

(dall'anamnesi, sono consentiti aiuti per camminare)

- 0: Normale, illimitata
- 1: Anormale stanchezza dovuta alla spasticità dopo 500m
- 2: Capacità di camminare per distanze inferiori a 500m
- 3: Capacità di camminare per distanze inferiori ai 10m
- 4: Incapacità a camminare

(2) QUALITA' DELL'ANDATURA

(si richiede al paziente di camminare più velocemente possibile pre una distanza di 10 metri incluso voltarsi)

- 0: Normale
- 1: Lieve rigidità, correre è ancora possibile
- 2: Andatura francamente spastica, che interferisce con la corsa
- 3: Andatura spastica che richiede l'uso del bastone /deambulatore
- 4: Incapacità a camminare per una distanza di 10 metri anche con il massimo supporto

(3) MASSIMA VELOCITA' DEL PASSO

(tempo impiegato per coprire una distanza di 10 metri incluso voltarsi, preso con il cronometro)

- 0: Normale
- 1: Leggermente ridotto (10m: ≥ 5 sec)
- 2: Moderatamente ridotto (10m: ≥ 10 sec)
- 3: Gravemente ridotto (10m: ≥ 20 sec)
- 4: Incapacità a camminare per una distanza di 10 metri o con un tempo ≥ 40 sec

(4) SALIRE LE SCALE

(salire 5 scalini- girarsi- scendere 5 scalini)

- 0: Normale: nessuna necessità di supporto alla ringhiera
- 1: Danno lieve: necessità intermittente di supporto alla ringhiera
- 2: Danno medio: necessità costante di supporto alla ringhiera
- 3: Danno grave: necessità di supporto di un'altra persona o di ausili per camminare per effettuare il compito
- 4: Incapacità di salire le scale

(5) VELOCITA' DI SALITA DELLE SCALE

(tempo impiegato per salire 5 scalini- girarsi- scendere 5 scalini, preso con un cronometro)

- 0: Normale
- 1: Leggermente ridotto (≥ 5 secondi per effettuare il compito)
- 2: Moderatamente ridotto (≥ 10 secondi per effettuare il compito)
- 3: Gravemente ridotto (≥ 20 secondi per effettuare il compito)

4: Incapacità di salire le scale

(6) ALZARSI DA UNA SEDIA

(il paziente cerca di alzarsi da una sedia con lo schienale in legno o di metallo con le braccia piegate al petto)

0: Normale

1: Lento, o può necessitare di più di un tentativo

2: Si spinge in su dai braccioli della sedia

3: Tende a cadere indietro e può fare più di un tentativo ma può alzarsi senza aiuto

4: Incapace di alzarsi senza aiuto

(7) SPASTICITA' DEI MUSCOLI ADDUTTORI DELLE ANCHE (SCALA ASHWORTH MODIFICATA)

(assegnare un punteggio al lato più gravemente affetto)

0: Nessun incremento nel tono muscolare

1: Lieve incremento nel tono muscolare, manifestata dal "fenomeno del temperino" ("catch and release")

2: Più marcato incremento nel tono muscolare persistente nella maggior parte dei movimenti

3: Considerevole incremento nel tono muscolare- difficoltà nel movimento passivo

4: Arti rigidi in adduzione

(8) SPASTICITA' ALLA FLESSIONE DEL GINOCCHIO (SCALA ASHWORTH MODIFICATA)

(assegnare un punteggio al lato più gravemente affetto)

0: Nessun incremento nel tono muscolare

1: Lieve incremento nel tono muscolare, manifestata dal "fenomeno del temperino" ("catch and release")

2: Più marcato incremento nel tono muscolare persistente nella maggior parte dei movimenti

3: Nessun incremento nel tono muscolare

4: Rigidità negli arti in flessione o in estensione

(9) IPOSTENIA IN ADDUZIONE DELL'ANCA (MEDICAL RESEARCH COUNCIL 1976)

0: Nessuna ipostenia

1: Ipostenia lieve (4/5)

2: Ipostenia moderata (3/5)

3: Ipostenia grave (1-2/5)

4: Paralisi (0/5)

(10) IPOSTENIA NELLA DORSIFLESSIONE DEL PIEDE (MEDICAL RESEARCH COUNCIL 1976)

0: Nessuna ipostenia

1: Ipostenia lieve (4/5)

2: Ipostenia moderata (3/5)

3: Ipostenia grave (1-2/5)

4: Paralisi (0/5)

(11) CONTRATTURE DEGLI ARTI INFERIORI

(assegnare il punteggio in posizione supina)

- Anca in estensione: la colonna lombare e le cosce toccano il piano d'appoggio. Anca in abduzione: abduzione fino ad un angolo >di 60 gradi tra le gambe se possibile.
- Ginocchia in estensione: cosce e polpaccio toccano il piano d'appoggio.

- *Caviglia in estensione dorsale: >10 gradi se possibile. Caviglia in pronazione: >10 gradi se possibile.)*

- 0: Nessuna contrattura
- 1: Lieve, non fissa, postura anomala di una articolazione (unilaterale o bilaterale)
- 2: Contrattura fissa di una articolazione (unilaterale o bilaterale)
- 3: Contrattura fissa di due articolazioni (unilaterale o bilaterale)
- 4: Contrattura fissa di più di due articolazioni (unilaterale o bilaterale)

(12) DOLORE DOVUTO A SINTOMI CORRELATI ALLA SP

- 0: Nessuno
- 1: presente \leq 50% della giornata E di intensità 0-3 su una scala visiva analogica
- 2: presente \leq 50% della giornata E di intensità 4-10 su una scala visiva analogica
- 3: presente $>$ 50% della giornata E di intensità 0-3 su una scala visiva analogica
- 4: presente $>$ 50% della giornata E di intensità 4-10 su una scala visiva analogica

(13) FUNZIONI URINARIE E RETTALI

- 0: Normale funzione urinaria e rettale
- 1: Urgenza urinaria e fecale (difficoltà a raggiungere il bagno in tempo)
- 2: Rara o lieve incontinenza (non necessario il pannolino)
- 3: Moderata incontinenza (necessario il pannolino o il catetere quando fuori casa)
- 4: Permanente cateterismo o pannolino

LISTA DEI SEGNI E SINTOMI COMPLICANTI:

- Ritardo mentale
- Demenza
- Psicosi
- Epilessia
- Perdita dell'acuità visiva
- Cataratta
- Nistagmo
- Disartria
- Disfagia
- Atassia degli arti
- Andatura atassica
- Segni motori extrapiramidali
- Ipotrofia muscolare (arti superiori)
- Ipotrofia muscolare (arti inferiori)
- Perdita del riflesso miotatico fasico (arti superiori)
- Perdita del riflesso miotatico fasico (arti inferiori)
- Danno della sensibilità tattile
- Danno della sensibilità dolorifica
- Danno delle pallestesie
- Danno della sensibilità cinestetica
- Danno della sensibilità termica

- **Dismorfismi facciali**
- **Anomalie della cute**
- **Anomalie scheletriche**
- **Altro**

*(adattata da Schule et al., 2006)

7.2 *Protocolli di laboratorio.*

Tabella 7.2. Microsatelliti utilizzati per lo studio di linkage a 2 punti sulla famiglia RMFSL200.

Sottotipo SPG	Marcatori microsatellitari	Sequenze dei <i>DYE primers</i>	Eterozigosità	Fluorescenza
SPG3A	D14S288	AGCTAGACTCTGCCATAAACA TGGAGACAGGAACAACACAC	0.83	NED
	D14S276	TGCTTTACCAAGTGCATCAC AGCTCAGAATCTAGGCCCT	0.76	NED
SPG4	D2S165	AACTTCTACCTTGGCTGTGG TTCAACNCCTTTGAGATTGT	0.85	FAM
	D2S367	TTCTTTGGTCTAAGGGTCAC AGCTTCTTGTTACAGGTGT	0.86	FAM
SPG6	D15S128	GCTGTGTGTAAGTGTGTTTTATATC GCAAGCCAGTGGAGAG	0.78	NED
	D15S165	GTTTACGCCTCATGGATTTA GGGCACACAGTCCCAA	0.79	VIC
SPG10	D12S368	GCAACACCTTTGTGATGAAAAT AGTCTGCACAGCCTGTCC	0.81	FAM
	D12S83	TTTTTGGAAGTCTATCAATTTGA TAGCAGAGAAAGCCAATTCA	0.81	FAM
SPG12	D19S220	ATGTTACAGAAAGGCCATGTCATTTG TCCCTAACGGATACACAGCAACAC	0.84	FAM
	D19S414	CCAGACCTGTCCATCTTGTATGAAT TTAGAACAACGCTTGGGCATTT	0.78	NED
SPG8	D8S514	CCAGTTGGCAAGCATTGT CTGAACCCAGTAGAGTTAGGAGA	0.77	NED
	D8S284	GGGCATGTTACTGCATGTC TTTGAACACAGGTCTGCCA	0.83	VIC
SPG13	D2S306	AAAGGCTAAACAATAAACATC CACCTTACTTTCTGCATGG	0.70	NED
	D2S335	TTAATTTCAAGAGGGCTGA ATTCATCATTTTCTATTACTCTGTG	0.79	NED
SPG31	D2S286	TTAAAATTGTTTCTATGACATGATG TGGTGGTTTATCTTACCAGTC	0.66	FAM
	D2S388	CTAAAAAATGTGTTAAGCAAAAA TTGGCCCTGCATTACT	0.64	FAM

Nota: i microsatelliti sono stati selezionati dall'“ABI PRISM Linkage Mapping Set version 2.5 Panel Guide”. I valori forniti sono basati sui dati di genotipizzazione dalla mappa genetica “Genethon 1994” (CEPH database).

Tabella 7.3. Elenco degli oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione degli esoni dei geni *SPG3A*, *SPG5A* e *SPG42*.

<i>SPG3A</i>		
Esone	Oligonucleotidi	Temperatura di annealing
1	5' -GAGGGTGTGACGCTGGTATC-3' 5' -AAGTGGAGGGCCAGAAGACC-3'	60°C
2	5' -CTGTGTCCGGATGTTTGAGAG-3' 5' -TGGAATGGTTACACCACAGC-3'	60°C
3	5' -TCGAATTGGAGAGGGATAAG-3' 5' -AAGTGCAACTTCAAGGATCC-3'	60°C
4	5' -TGGTAACCTAATGACCTAG-3' 5' -ATGATTCCCAATTTCTGTTG-3'	60°C
5	5' -GTAGGGAATGATGAAGTAAG-3' 5' -CTAATTGGGCCAATAGTTCC-3'	60°C
6	5' -GTTATACCTAGAGGGAAAAG-3' 5' -GACCCTAATTAATATACCTGG-3'	60°C
7	5' -GGCACCTTAAAGTCCTCATA-3' 5' -CACCAAATGATCCAACAGA-3'	60°C
8	5' -TTAGTAGCAGCCCTGTCGTG-3' 5' -CATCAGCCTCCTATCAGTGG-3'	60°C
9	5' -TGGAGGACTGGGAAGGATTC-3' 5' -TTCCTCGTACCTTTGCTCCC-3'	60°C
10	5' -GCATTTTCAGGAAAGGGAAAAC-3' 5' -ATTTCTGACAGCCAGAAATC-3'	60°C
11	5' -GAAATGTGAACTGCCTGTGG-3' 5' -AGTTGCATGAAGGATACTGG-3'	60°C
12	5' -GCAGGCTCCTGATTATTAAC-3' 5' -TCTAATGCAGTGGCTGGCAC-3'	60°C
13	5' -CTGCAGGAGTATCTGTTCTG-3' 5' -CACCAAAGATTGTTCTAATC-3'	60°C
14	5' -ATGCACACATTGAGGAGTTG-3' 5' -TACTCCGTTCTGATGGAAGC-3'	60°C

<i>SPG5A</i>		
esone	Oligonucleotidi	Temperatura di annealing
1	5'-GAACTTTTGTCAATTCAGCCT-3' 5'-TGTCTGCACTGGAAATCATG-3'	56°C
2	5'-AGCAGTGCAATCCATGCAGT-3' 5'-GGTTCCTAAGTACCATGAAG-3'	57°C
3	5'-CATGTAGTGTACCTTCGAATG-3' 5'-TTCAAGGTCGCCATTTTGTC-3'	57°C
4	5'-GGTTCTCATTAGCATGCACTG-3' 5'-AATTAGGCAGCTGTGTCCTC-3'	57°C
5	5'-GAGAGCAGTTTTCAGGACCA-3' 5'-GGCGCAATGTCCACTTCATT-3'	57°C
6	5'-AGCAACTTTGTGGACTTGAAC-3' 5'-CTGGACTGATATCAGATCAAAT-3'	57°C

<i>SPG42</i>		
esone	Oligonucleotidi	Temperatura di <i>annealing</i>
1	5'-GTGCCCTTATCGCTCTGAG-3' 5'-GTGTTATTTGATGGGTTGC-3'	60°C
2	5'-CCTGCCTTTTTGGTTGTTGT-3' 5'-TGGTAGTGGAAAGGGACCTG-3'	60°C
3	5'-TGACTCATGGGGAGATACT-3' 5'-AACTCAGCAGGACTACGAT-3'	60°C
4	5'-ATTGGTAGAAGAGGGAGTAC-3' 5'-TTTAAGACAACGTAGAAAGC-3'	60°C
5	5'-GTCACATCTTTGTATTGCTGG-3' 5'-ACGCCTTTAAGGGAAGTAG-3'	60°C
6	5'-CACCCGTAATTCAGCATTT-3' 5'-CACCCGTGACTACTGCATTG-3'	60°C