



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

FACOLTA' DI MEDICINA

DOTTORATO DI RICERCA IN
NEUROSCIENZE

CICLO DEL CORSO DI DOTTORATO
XXI CICLO

Titolo della tesi

*"Studio clinico e molecolare di forme autosomiche recessive di paraparesi
spastica ereditaria"*

Antonella Borreca

Docente Guida/Tutor: Prof. Antonio Orlacchio

Coordinatore: Prof. Giorgio Bernardi

*Per Mamma, Papà,
Checco e Pino*

Abstract

Abstract

Le paraparesi spastiche ereditarie (HSP) sono un gruppo di disordini neurodegenerativi clinicamente e geneticamente eterogeneo, che hanno come fattore comune il danneggiamento dei motoneuroni superiori e delle loro proiezioni assonali. Sulla base del meccanismo di trasmissione genetica le HSP possono essere classificate in autosomiche dominanti (ADHSP), autosomiche recessive (ARHSP) o X-linked. Dal punto di vista clinico, invece, le HSP possono essere suddivise in forme pure e complicate in base alla presenza o meno di sintomi neurologici o non neurologici associati alla spasticità.

Il progetto di ricerca svolto prevede tra gli obiettivi l'analisi genetico-molecolare di famiglie affette da una forma complicata di ARHSP con assottigliamento del corpo calloso (ARHSP-TCC); famiglie affette da una forma pura di ARHSP e casi apparentemente sporadici puri e complicati.

Il gene più frequentemente mutato nei casi di ARHSP-TCC è *SPG11* che codifica per la spatacsina, mentre i due geni più comunemente studiati per le forme ARHSP pure e complicate sono *SPG5A* e *SPG7*.

Lo studio dei casi ARHSP con TCC è stato condotto mediante analisi di *linkage*. Il successivo *screening* genetico-molecolare delle famiglie in *linkage* con il *locus SPG11* è stato messo a punto con l'ausilio dell' *High Resolution Melting* (HRM), la *Conformation Sensitive Capillary Electrophoresis* (CSCE) e del sequenziamento diretto. L'utilizzo di queste tecniche è stato richiesto anche per lo *screening* genetico-molecolare delle forme pure e complicate di famiglie e casi sporadici ARHSP.

Pertanto, è stato condotto uno studio di *linkage* su 14 famiglie ARHSP-TCC al fine di identificare un'eventuale associazione tra la malattia e il *locus SPG11*. L'analisi ha evidenziato 5 famiglie in *linkage* per *SPG11*. Il successivo *screening* dei 40 esoni del gene

sui probandi di tali famiglie ha rivelato 5 di mutazioni nel DNA dei pazienti di cui tre riportate in letteratura.

In seguito, le restanti famiglie ARHSP e i casi apparentemente sporadici sono stati analizzati per i geni *SPG7* e *SPG5A*. I probandi di due famiglie ARHSP, di cui uno complicato da TCC, sono risultati positivi allo *screening* mutazionale del gene *SPG5A*; le due mutazioni identificate ad oggi non sono ancora riportate in letteratura. Contrariamente, l'indagine per il gene *SPG7* non ha evidenziato mutazioni patogenetiche, ma solo polimorfismi già noti in letteratura.

I risultati di questa tesi confermano dati di letteratura secondo i quali il gene *SPG7* risulta poco frequente come causa di ARHSP; mentre, il gene *SPG5A* ed *SPG11* mostrano una frequenza mutazionale più elevata rispettivamente per le forme ARHSP (pure e complicate) e per le ARHSP-TCC (7% e 28%).

Hereditary spastic paraplegias (HSP) are a clinically and genetically heterogeneous group of neurodegenerative disorders. The predominant symptom of HSP is the degeneration of upper motoneurons and their corticospinal tract axons. They are classified genetically into autosomal dominant (ADHSP), autosomal recessive (ARHSP), and X-linked HSP forms. The clinical classification may distinguish between pure and complicated forms of HSP based on the presence of neurological or non neurological symptoms associated to spasticity.

This study aims at genetic-molecular investigation of families affected by a complicated form of ARHSP with thin corpus callosum (ARHSP-TCC), families affected by a pure form of ARHSP, and apparently sporadic cases.

The study of the ARHSP cases with TCC was carried out by linkage analysis. The next genetic-molecular screening of families in linkage with *SPG11* locus was based on HRM, CSCE, and direct sequencing techniques. These techniques were also used for the screening of pure and complicated forms and apparently sporadic cases of HSP.

In particular we performed a linkage study on 14 ARHSP-TCC families to identify a probable association between HSP and the *SPG11* locus. The analysis revealed 5 pedigrees in linkage with *SPG11*. The next screening of 40 exons of the *SPG11* gene on probands of the families revealed 5 mutations; three of these mutations were just reported in literature.

After that, the remaining families with ARHSP and the apparently sporadic cases were analyzed for *SPG7* and *SPG5A* genes. Two probands of the families, one of which complicated by TCC, were positive to mutational screening of the gene *SPG5A*; two identified mutations were novel.

On the other hand, the *SPG7* analysis has not revealed pathogenic mutations, but only polymorphisms reported in literature.

These results confirm data observed in literature according to which the *SPG7* gene is not a frequent cause of ARHSP while the *SPG5A* and *SPG11* genes show an high mutational frequency in ARHSP and ARHSP-TCC (respectively 7% and 28%).

Indice

Indice

<i>Capitolo 1-Introduzione</i>	Pag 14
<i>1.1 La paraparesi spastica ereditaria</i>	Pag 15
<i>1.2 Aspetti storici</i>	Pag 17
<i>1.3 Epidemiologia</i>	Pag 18
<i>1.4 Classificazione dell'HSP</i>	Pag 19
<i>1.5 Aspetti clinici essenziali</i>	Pag 19
<i>1.5.1 Forme pure</i>	Pag 20
<i>1.5.2 Forme complicate</i>	Pag 21
<i>1.6 Metodi di trasmissione</i>	Pag 21
<i>1.7 Locus e geni della paraparesi</i>	Pag 22
<i>ADHSP</i>	Pag 23
<i>ARHSP</i>	Pag 25
<i>1.8 Descrizione dei geni analizzati nel presente studio</i>	Pag 27
<i>- SPG5A</i>	Pag 27
<i>- SPG7</i>	Pag 30
<i>- SPG11</i>	Pag 30
<i>1.9 Meccanismi patogenetici associati alla malattia</i>	Pag 33
<i>- Anomalie del trasporto assonale e di membrana: SPG11</i>	Pag 34
<i>- Anomalie della funzione mitocondriale: SPG7</i>	Pag 35
<i>- Altri tipi di anomalie delle proteine HSP: SPG5A</i>	Pag 35
<i>1.10 Neuroradiologia e neurofisiologia</i>	Pag 36
<i>1.11 Trattamenti farmacologici</i>	Pag 37
<i>1.12 Possibili prospettive terapeutiche future</i>	Pag 38
<i>1.13 Scopo della tesi</i>	Pag 39

<i>Capitolo 2- Materiali e Metodi</i>	Pag 41
<i>2.1 Il Campione</i>	Pag 42
<i>2.2 Tecniche di laboratorio</i>	Pag 43
<i>2.2.1 Estrazione DNA</i>	Pag 43
<i>2.2.1.2 Estrazione RNA</i>	Pag 44
<i>2.2.2 PCR (reazione di polimerizzazione a catena)</i>	Pag 44
<i>2.2.2.1 Parametri che influenzano l'amplificazione per PCR</i>	Pag 47
<i>2.2.3 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism = polimorfismi nella lunghezza dei frammenti generati mediante digestione con enzimi di restrizione)</i>	Pag 50
<i>2.2.4 Tecniche elettroforetiche</i>	Pag 51
<i>- Gel d'agarosio</i>	Pag 52
<i>- Gel di poliacrilammide</i>	Pag 54
<i>2.2.5 Sequenziamento diretto del DNA</i>	Pag 57
<i>2.2.6 Linkage</i>	Pag 60
<i>2.2.7 Tecniche di screening genetico</i>	Pag 63
<i>- CSCE (Conformation sensitive capillare elettrophoresis: elettroforesi capillare conformazione-sensibile)</i>	Pag 63
<i>- HRM (High Resolution Melting)</i>	Pag 64
<i>2.3 Protocolli</i>	Pag 65
<i>2.3.1 Estrazione di DNA con kit commerciali</i>	Pag 65
<i>- Metodi automatizzati</i>	Pag 67
<i>2.3.2 Calcolo della quantità di DNA</i>	Pag 69
<i>2.3.3 Protocollo di PCR per linkage</i>	Pag 71
<i>2.3.3.1 Preparazione dei campioni per analisi di linkage</i>	Pag 73

<i>2.3.4 Protocollo PCR</i>	Pag 74
<i>2.3.5 Elettroforesi dei campioni analizzati</i>	Pag 76
<i>2.3.5.1 Corsa elettroforetica</i>	Pag 77
<i>2.3.6 Preparazione dei campioni per la CSCE</i>	Pag 78
<i>2.3.6.1 Preparazione per l'elettroforesi capillare</i>	Pag 79
<i>2.3.7 Protocollo per l'High resolution melting</i>	Pag 79
<i>- Fasi della reazione di HRM</i>	Pag 80
<i>2.3.8 Purificazione del tratto amplificato</i>	Pag 81
<i>2.3.9 Amplificazione per la marcatura del temprato</i>	Pag 82
<i>2.3.10 Precipitazione dei prodotti marcati</i>	Pag 83
<i>2.3.11 Preparazione del templatato marcato per il sequenziamento automatico</i>	Pag 84
<i>2.3.12 Digestione con enzimi di restrizione</i>	Pag 84
<i>2.3.13 Elettroforesi su gel di poliacrilammide</i>	Pag 85
<i>2.3.14 Estrazione RNA</i>	Pag 85
<i>2.4 Software utilizzati</i>	Pag 87
<i>Capitolo 3-Risultati</i>	Pag 88
<i>3.1 Analisi del gene SPG11</i>	Pag 89
<i>3.2 Analisi del gene SPG7</i>	Pag 98
<i>3.3 Analisi del gene SPG5A</i>	Pag 99
<i>Capitolo 4- Discussione e Conclusioni</i>	Pag 104
<i>4.1 Discussione</i>	Pag 105
<i>4.2 Conclusioni</i>	Pag 108
<i>- Appendice</i>	Pag 110
<i>- Bibliografia</i>	Pag 121

- Ringraziamenti

Pag 136

Capitolo 1-Introduzione

1.1 La paraparesi spastica ereditaria

La Paraparesi Spastica Ereditaria (*HSP*: dall'inglese *H*ereditary *S*pastic *P*araparesis), anche chiamata malattia di Strumpell-Lorrain (Strumpell A. 1880; Lorrain M. 1898), è un tipo di degenerazione che colpisce da 1,2 a 9,6 su 100000 casi e per questo è considerata una malattia rara (Zuchner S., 2007).

Venne descritta per la prima volta da Strumpell nel 1880 (Strumpell, 1880) e più tardi definita da Sutherland nel 1975 (Sutherland, 1975).

In generale l'HSP comprende un gruppo eterogeneo di malattie neurologiche nelle quali il primo sintomo è una progressiva spasticità e debolezza degli arti inferiori.

La lesione patologica principale riguarda il tratto corticospinale (Figura.1.1). Gli assoni che lo compongono sono particolarmente lunghi, talora anche superiori ad un metro, con un volume assonale che può essere mille volte superiore a quello del pirenoforo. I neuroni del tratto corticospinale forniscono un esempio estremo delle difficoltà dei processi cellulari, quali 'trafficking', trasporto e metabolismo energetico. E' oramai chiarito (Fink JK 1999) che il principale evento patologico della HSP è rappresentato dalla progressiva degenerazione delle fibre lunghe del tratto corticospinale e della colonna dorsale (in particolare, degenerano gli assoni dei motoneuroni primari, massimalmente a livello distale).

Età di esordio, velocità di progressione della malattia e il grado di invalidità sono spesso variabili a seconda del tipo di HSP (Fink and Hedera, 1999).

1.2 Aspetti storici

Nel 1880 Strumpell pubblicò un lavoro in cui descriveva la prima forma “pura” di HSP. In questo lavoro riferiva di una famiglia in cui due fratelli mostravano una sindrome piramidale bilaterale confinata alle gambe, caratteristica simile osservata anche nel padre, il che suggeriva una trasmissione autosomica dominante.

Alla fine del secolo Lorrain aggiunse altri tre casi simili così che il nome della patologia fu assegnato sia a Strumpell che a Lorrain.

In breve tempo, dopo queste descrizioni, numerosi altri casi di HSP apparirono in letteratura.

Pratt, che considerava impossibile associare altri fattori neurologici alle descrizioni iniziali, classificò molti di questi casi come HSP complicate (Pratt et al., 1967; McDermott et al., 2000).

La definizione di forma “pura” variava tra i vari autori (Holmes et al., 1977; Osvath et al., 1968; Belle et al., 1939; Bickerstaff et al., 1950; McDermott et al., 2000); fu Harding che nel 1981, dopo aver valutato clinicamente 22 famiglie, suggerì i criteri per classificare le HSP in forme pure e forme complicate (Harding et al., 1981; McDermott et al., 2000).

Successivamente alla suddivisione fatta da Harding le HSP furono classificate in base all’età di esordio della malattia.

In alcune famiglie si trovò che tale classificazione poteva essere suddivisa in due gruppi: una con un’età di esordio prima dei 35 anni (tipo I) e l’altra considerando l’età di esordio dopo i 35 anni (tipo II). Sebbene le due forme siano molto simili hanno, però, dei tratti clinici differenti. Nella forma di tipo I si denota un decorso lento e variabile rispetto alla forma di tipo II, dove sono molto più marcati anche altri fattori come la debolezza muscolare, sintomi urinari e compromissione del sensorio.

Behan e Maia (Behan et al., 1974; Bruyn et al., 1992) fecero un'ulteriore distinzione in due gruppi: un gruppo con età di esordio "*middle life*" (sopra i 35 anni) e un secondo gruppo con età d'esordio nella prima e seconda decade.

Solo Strumpell riuscì a discernere i due gruppi sulla base dell'età in cui si manifestava: uno con età di esordio nella terza decade e l'altro gruppo con età di esordio tra il terzo e il sesto anno di vita (Strumpell et al., 1904).

1.3 Epidemiologia

Sebbene le HSP siano un gruppo di patologie che mostra segni clinici altamente eterogenei il loro elemento cardine è la spasticità bilaterale e debolezza degli arti inferiori.

A differenza del fatto che spesso le varie forme di HSP possono essere considerate diversamente (Polo et al., 1991; Mc Monagle et al., 2002; Soderblom et al., 2006), alcuni lavori che adoperano criteri e metodologie simili hanno trovato una percentuale di affetti di circa tre persone ogni 100000 (Filla et al., 1992; Leone et al., 1995; Silva et al., 1997; McDermott et al., 2000; Soderblom et al., 2006). Tutte queste differenze nei vari lavori sono il frutto della combinazione di diversi fattori; ad esempio alcune differenze possono dipendere da criteri diagnostici, da metodi epidemiologici o i fattori geografici utilizzati. Altre pubblicazioni in cui si utilizzano criteri e metodi simili hanno trovato una diffusione di HSP pari a 2,7 persone su 100.000 nel Molise, 4,3 su 100.000 in Val D'Aosta e 2,0 su 100000 in Portogallo (Filla et al., 1992; Leone et al., 1995; Silva et al., 1997; McDermott et al., 2000). Questi lavori utilizzano criteri diagnostici suggeriti anche da Harding (1991) e utilizzati da tutte le Istituzioni che si occupano della salute e del benessere. Polo nel 1991 (Polo et al., 1991) riportò un'elevata incidenza della malattia nella popolazione spagnola della Cantabria: 9,6 su 100.000. In altri

lavori solo le registrazioni dell'ospedale sono state utilizzate per accertare dei casi, sebbene molti casi secondari sono stati identificati dall'esame di tutti i rischi relativi.

1.4 Classificazione dell'HSP

Dal punto di vista clinico le HSP possono essere divise in due grandi gruppi: forme pure e forme complicate (o sindromiche) (Sedel et al., 2007). Le forme pure sono caratterizzate da progressiva spasticità e debolezza degli arti inferiori, spesso associate a disturbi urinari, pallestesie degli arti inferiori e, occasionalmente, a sensibilità chinestetica. Le forme complicate sono caratterizzate dalla presenza di sintomi neurologici o non neurologici aggiuntivi (Valente e.m., 2004). Il quadro clinico principale è caratterizzato da progressiva debolezza ed aumento del tono muscolare agli arti inferiori (Fink J.K., 2003a), il tutto dovuto ad una specifica neurodegenerazione del tratto piramidale del motoneurone primario.

Invece, si distinguono le forme complicate di HSP: possono essere ad esempio ritardo mentale, atassia corticale e cerebellare, amiotrofia, neuropatia periferica, sordità, bassa statura o atrofia ottica (Zuchner S., 2007; Rugarli E.I. et al., 2006; Harding A.E., 1983).

Molto spesso i sintomi dell'HSP sono alla base di altre malattie ereditarie, quali la leucodistrofia, l'atassia di Friederich, la malattia di Machado Joseph, la Sclerosi Multipla e la malattia di Alzheimer.(Fink, 2003b).

1.5 Aspetti clinici essenziali

Generalmente si manifesta con un disturbo nella marcia causato da rigidità delle gambe. Un forte ipertono predomina sui muscoli estensori causando maggiore difficoltà nello scendere che nel salire. Il piede, spesso cavo, tende a trascinare la punta e ad inciampare

contro le asperità del terreno. Con il tempo aumenta l'affaticamento muscolare ed insorgono perdite dell'equilibrio. La percezione delle vibrazioni è generalmente alterata e non sono infrequenti i problemi urinari.

1.5.1 Forme pure

Nelle forme "pure" l'età di insorgenza è altamente variabile, estendendosi dalla prima infanzia all'età adulta avanzata e la malattia generalmente progredisce lentamente con l'età.

Esami neurologici mostrano debolezza degli arti inferiori che possono essere leggeri o gravi, aumento del tono muscolare iperriflessia degli arti inferiori e risposta del muscolo estensore (Valente et al., 2004). In alcuni casi c'è una diminuzione della posizione delle articolazioni e del senso di oscillazione negli arti inferiori. La forza e la destrezza degli arti superiori sono di solito risparmiati sebbene di solito possono osservarsi sintomi di iperriflessia o diminuzione delle pallestesie anche in questi.

Gli individui affetti provano difficoltà nel camminare e possono eventualmente ricorrere ai bastoni da passeggio o addirittura alla sedia a rotelle. Sintomi urinari sono frequenti e possono arrivare anche all'incontinenza.

Le forme pure di HSP possono essere diagnosticate sulla base di esami clinici e neurologici, in base alla storia familiare e escludendo altre forme di neurodegenerazione.

L'MRI (Magnetic Resonance Imaging) del cervello e del midollo spinale sono di solito normali anche se un piccolo assottigliamento del midollo, specialmente nell'area toracica, può essere osservato in alcuni pazienti. La MEP (motor evoked potentials) sono ritardati o assenti se si registrano a livello degli arti inferiori mentre risultano normali se le registrazioni vengono prese a livello degli arti superiori. L'elettromiografia (EMG), la neurografia dell'area sensitiva periferica e motoria risulta normale.

1.5.2 Forme complicate

Nelle forme complesse di HSP il fenotipo è altamente variabile e dipende dai fattori neurologici che accompagnano gli aspetti clinici di base delle HSP. Ad esempio *SPG9* risulta caratterizzato da cataratta bilaterale, reflusso esofageo con persistente fenomeni di vomito e amiotrofia, mentre *SPG17* presenta come caratteristica l'amiotrofia distale sia nelle mani che nei piedi.

Tra le forme autosomiche recessive si osservano pazienti con difetti associati al *locus SPG7*. Essi hanno atrofia ottica, coinvolgimento bulbare, atrofia cerebellare e corticale. Talvolta però pazienti affetti da HSP associati al *locus SPG7* possono manifestare una semplice forma pura.

Tipiche forme complicate sono quelle associate ai loci: *SPG11* (assottigliamento del corpo calloso), *SPG15* (sindrome di Kjellin), *SPG17* (sindrome di Silver), *SPG20* (sindrome di Troyer), *SPG21* (sindrome di MAST), *SPG38* (amiotrofia distale con sindrome di Silver).

1.6 Metodi di trasmissione

Dal punto di vista genetico le diverse forme di HSP possono essere divise secondo modalità di trasmissione: autosomica dominante (AD), autosomica recessiva (AR) e *X-linked*.

Possono inoltre essere suddivise in base alla localizzazione cromosomica o al gene causativo, se noto. La modalità di trasmissione autosomica dominante è la più frequente, dato che è presente nel 70-80% delle famiglie HSP.

I casi sporadici, che riuniscono la maggioranza dei pazienti con HSP, possono essere casi autosomici recessivi (AR), dominanti (AD) o *X-linked*.

I casi sporadici AR possono significare un rischio del 25% di avere fratelli malati ma un rischio quasi nullo per i figli affetti. I casi sporadici AD, invece, possono corrispondere a una mutazione *de novo* in uno dei geni HSP e quindi rappresentare un rischio di ricorrenza del 50% per i figli.

Casi sporadici di pazienti HSP maschi possono corrispondere a mutazioni X-linked, che comportano un rischio di ricorrenza del 50% per altri figli dell'eventuale madre portatrice. A tutte le forme di paraparesi geneticamente definite è stata assegnata una sigla costituita dall'acronimo *SPG* (*SPastic Gait*) seguito da un numero di serie progressiva.

Mediante studi di linkage, sino ad oggi sono state identificate almeno 41 diverse forme genetiche di HSP (classificate con il termine *SPG1-41* a seconda dell'ordine di identificazione). Delle forme pubblicate 18 sono a trasmissione autosomica dominante, 17 a trasmissione autosomica recessiva e 4 associate al cromosoma X. Di seguito sono riportati i vari loci e i geni associati (se noti) (Tabella 1_Appendice) raggruppati in base alla modalità di trasmissione.

1.7 Locus e geni della paraparesi

Le forme di HSP legate al cromosoma X sono caratterizzate da alterazioni dei geni presenti sul cromosoma X e sono più frequenti forme *X-linked* recessive

Ad oggi sono stati identificati 3 loci: *SPG1* (Xq28), *SPG2* (Xq22), *SPG16* (Xq11.2) ed Xq21), ma solo per due di essi sono stati identificati i geni responsabili. *SPG1* corrisponde al gene *L1CAM* e da una forma di HSP complicata caratterizzata da ritardo mentale, ipoplasia del TCC e idrocefalo.

SPG2 corrisponde al gene *PLP1* ed origina anch'essa una forma di HSP complicata ed è prevalentemente associata a neuropatia periferica ed alterazioni della sostanza bianca.

Infine il *locus SPG16* è associata ad una rara forma di HSP X-linked complicata. Gli individui affetti presentano quadriplegia, afasia motoria, problemi alla vista e lieve ritardo mentale.

ADHSP

Le forme autosomiche dominanti di paraparesi spastica si verificano quando la presenza di un solo allele alterato da origine alla malattia. Una persona affetta ha almeno un genitore affetto e la probabilità che un figlio sia a sua volta affetto è del 50%.

Per quanto riguarda le forme dominanti sono stati mappati almeno diciotto loci, per otto dei quali sono stati identificati i geni responsabili. La forma più comune di AD-HSP, che comprende circa il 40% dei casi, è associata a mutazioni del gene *SPAST* (2p21-p24). *SPAST* codifica per una proteina di 616 aminoacidi, la Spastina, appartenente alla famiglia delle proteine AAA (ATPasi Associate a diverse Attività cellulari).

Studi di espressione cellulare hanno dimostrato che la spastina è associata ai microtubuli in vivo, la dissociazione dai quali è *ATPasi* dipendente. Sono state finora descritte più di 100 mutazioni nella spastina che comprendono mutazioni missenso, nonsense, inserzioni/delezioni, *frameshift*, di *splicing* e grandi delezioni.

Un altro gene frequente nelle forme di ADHSP è il gene *SPG3A* (~10%). Tale gene è, generalmente associato ad un esordio precoce della malattia (entro i 20 anni). Il gene *SPG3A*, codifica per la proteina atlastina (14q11.2-q24.3) (Hazan et al., 1993).

SPG3A codifica per una GTPasi della famiglia delle dinamine, espressa in particolare nel cervello e nel midollo spinale. È stato recentemente dimostrato che le dinamine si associano con le vescicole e con gli endosomi e mediano attivamente i processi di trasporto intracellulare (Mc Niven et al., 2000). Gli altri geni noti per le AD-HSP sono: *SPG6* (15q11.1), *SPG10* (12q13),

SPG13 (2q24-q34), *SPG17* (11q12-q14), *SPG31* (2p12), e *SPG33* (10q24.2). *SPG6*, detto anche *NIPAI* (*NonImprinted in Prader-Willi/Angelman syndrome 1*) codifica per una proteina di membrana di cui non si conosce la funzione. Per le HSP associate a *SPG10*, forme pure o con atrofia muscolare distale, sono state individuate mutazioni nel gene *KIF5A* (catena pesante della chinesina). La proteina prodotta dal gene *KIF5A* è implicata nel trasporto di membrana degli organelli negli assoni, espressa solo nei neuroni; mutazioni osservate in questo gene prevengono l'attivazione delle *ATPasi* motoria che porta al legame dei microtubuli (Reid et al., 2002). In un'altra forma di AD-HSP pura (*locus SPG13*) è stata identificata una mutazione nel gene *HSP60*, che codifica per la chaperonina mitocondriale Hsp60. Sono state trovate mutazioni nel gene *BSCL2* in famiglie con sindrome di Silver (*locus SPG17*), una forma complicata di HSP associata con un marcato indebolimento e atrofia dei muscoli delle mani e, in alcuni casi, anche dei muscoli dei piedi. Il gene *BSCL2*, che codifica per la proteina seipina, era stato precedentemente associato ad una malattia autosomica recessiva, la lipodistrofia congenita di Berardinelli-Seip. Di recente sono state identificate diverse mutazioni nel gene *REEPI* (*locus SPG31*), che codifica per una proteina mitocondriale, coinvolta nel trasporto di vescicole Rebbmediato, con attività tipo Chaperone (Zuchner et al., 2006). Gli altri *loci* associati alle forme ADHSP sono: *SPG12* (19q13) (Reid et al., 2001; Ashley-Koch et al., 2001; Orlacchio et al., 2002), *SPG19* (9q33-34) (Valente et al. 2002), *SPG29* (1p31.1-21.1) (Orlacchio et al., 2005) e *SPG38* (4p16-p15) (Orlacchio et al., 2008). Di questi *loci* non sono stati ancora identificati i geni responsabili della malattia.

Un altro *locus* per le forme dominanti di paraparesi è stato individuato recentemente: *SPG41* localizzato sul cromosoma 11p14.1-p11.2.

ARHSP

Nelle forme autosomiche recessive dell'HSP entrambi gli alleli sono alterati. La malattia quindi si manifesta solo negli omozigoti mentre gli eterozigoti sono portatori sani. Il rischio di avere un bambino affetto, ad ogni nascita è del 25%. In questo caso, a differenza delle forme autosomiche dominanti, il fenotipo alterato non è presente in tutte le generazioni. La consanguineità può essere importante nelle malattie autosomiche recessive dato che aumenta la possibilità di omozigosi. Si stima che ogni essere umano sia un eterozigote per un numero da sei a otto alleli che, allo stato omozigote, porterebbero la malattia.

Per quanto riguarda le forme autosomiche recessive di HSP sono stati identificati finora 17 *loci* di cui solo 7 geni sono stati riportati.

La forma più nota di ARHSP (pura) è dovuta a mutazioni sul gene della *paraplegina* sul cromosoma 16q24 associata al *locus SPG7* (Casari et al., 1998).

Gli altri *loci* per le ARHSP sono: *SPG5A* (8q21.3) (Wilkinson PA et al., 2003); *SPG11* (15q21.1)(rif.); *SPG14* (3q27-q28); *SPG15* (14q22-24); *SPG20* (13q12.3); *SPG21* (15q21-q22); *SPG23* (1q24-q32); *SPG24* (13q14); *SPG25* (6q23-q24.1); *SPG26* (12q11.1-q14); *SPG27* (10q22.1-q24.1); *SPG28* (14q21.3-q22.3); *SPG30* (2q27.3); *SPG32* (14q12-q21); *SPG39* (19q13).

Oltre alla paraplegina gli altri geni noti per le ARHSP sono: il gene della spatacsina, associata al *locus SPG11*, *CYP7B1* associato al *locus SPG5A*, *ZFYVE26* associato al *locus SPG15*, il gene della spartina associata al *locus SPG20*, il gene della maspardina associata al *locus SPG21*.e il gene della *NTE* (*Neuropathy Target Esterase*) associato al *locus SPG39*.

Mutazioni sui geni *SPG15*, *SPG20* e *SPG21* causano forme complicate di ARHSP. In particolare *SPG15* è associato alla sindrome di *Kjellin*, *SPG20* è associato alla sindrome di *Toyler* mentre *SPG21* è associato alla sindrome di *MAST*.

La sindrome di Kjiellin è caratterizzata da esordio in età adolescenziale, retinopatia pigmentosa, segni cerebellari e ritardo mentale. ZFYVE26 codifica per una proteina *Zinc Finger* con dominio *FYVE* ed è espressa in tutti i tessuti.

La sindrome di Troyer non è altro che una forma complicata di HSP in cui la spasticità degli arti inferiori è associata anche a disartria, amiotrofia distale, ritardo mentale e bassa statura. (Patel et al., 2002). Il gene responsabile della malattia produce una proteina, la spartina, di 666 amminoacidi e di peso molecolare di 84 KDa. Tale proteina è espressa in maniera ubiquitaria, con alti livelli di espressione nel tessuto adiposo. Inoltre, la spartina mostra una regione di omologia nella regione N-terminale con la spastina. Tale regione (*MIT domain*) è responsabile della capacità di legame con i microtubuli. Quindi anche la spartina è implicata probabilmente nel traffico endosomale e nella dinamica dei microtubuli.

Infine la sindrome di MAST, invece, rappresenta una forma complicata di HSP associata a disturbi cognitivi, ipertonicità, iperriflessia, assottigliamento del corpo calloso e anomalie della sostanza bianca.

Simpson e collaboratori (2003) hanno individuato il *locus* responsabile della malattia localizzato su una regione ristretta (15q22.31) in cui sono presenti solo tre geni. L'analisi di sequenza dei tre trascritti ha rivelato una mutazione omozigote nel gene *ACP33*. La proteina, denominata poi maspardina, è stata localizzata nelle vescicole di trasporto endosomale/*trans*-Golgi e quindi la sua funzione è stata associata a quella del trasporto e dello smistamento delle proteine.

Rainier e collaboratori (2008) hanno riportato un nuovo *locus* localizzato sul cromosoma 19p13 il cui gene codifica per una esterasi (*SPG39*).

1.8 Descrizione dei geni analizzati nel presente studioSPG5A

Hentati et collaboratori (1994) hanno riportato per primi il *locus SPG5A*, localizzato sul cromosoma 8q12.3 in seguito ad uno studio effettuato su 5 famiglie tunisine affette da una forma pura di HSP (Figura 1.2).

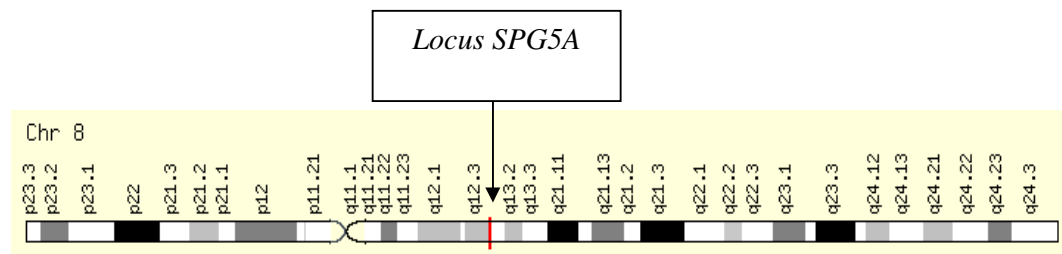


Figura 1.2: rappresentazione schematica della localizzazione del gene SPG5A sul cromosoma 8q12.3

Solo nel 2008 Tsaousidou e collaboratori hanno identificato il gene responsabile della malattia: *CYP7B1* che codifica per il citocromo P450-7B1. 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 prodotte dal colesterolo attraverso due processi metabolici: il classico meccanismo che coinvolge *CYP7A1* (colesterolo-7 α -idrolasi) e il meccanismo acido che coinvolge *CYP7B1* (Figura 1.3). 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.

Infatti è stato dimostrato che *CYP7B1* catalizza la 7 α -idrossilazione del 27-idrossicolesterolo (Martin K O. et al., 1997), del deidroandrosterone (DHEA) e del pregnenolone nel cervello (Rose K.A. 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 N.A. 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 P. 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 colesterolo-7 α -idrossilasi (*CYP7A1*). Entrambi i geni contengono sei esoni e cinque introni. D'altra parte però 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.

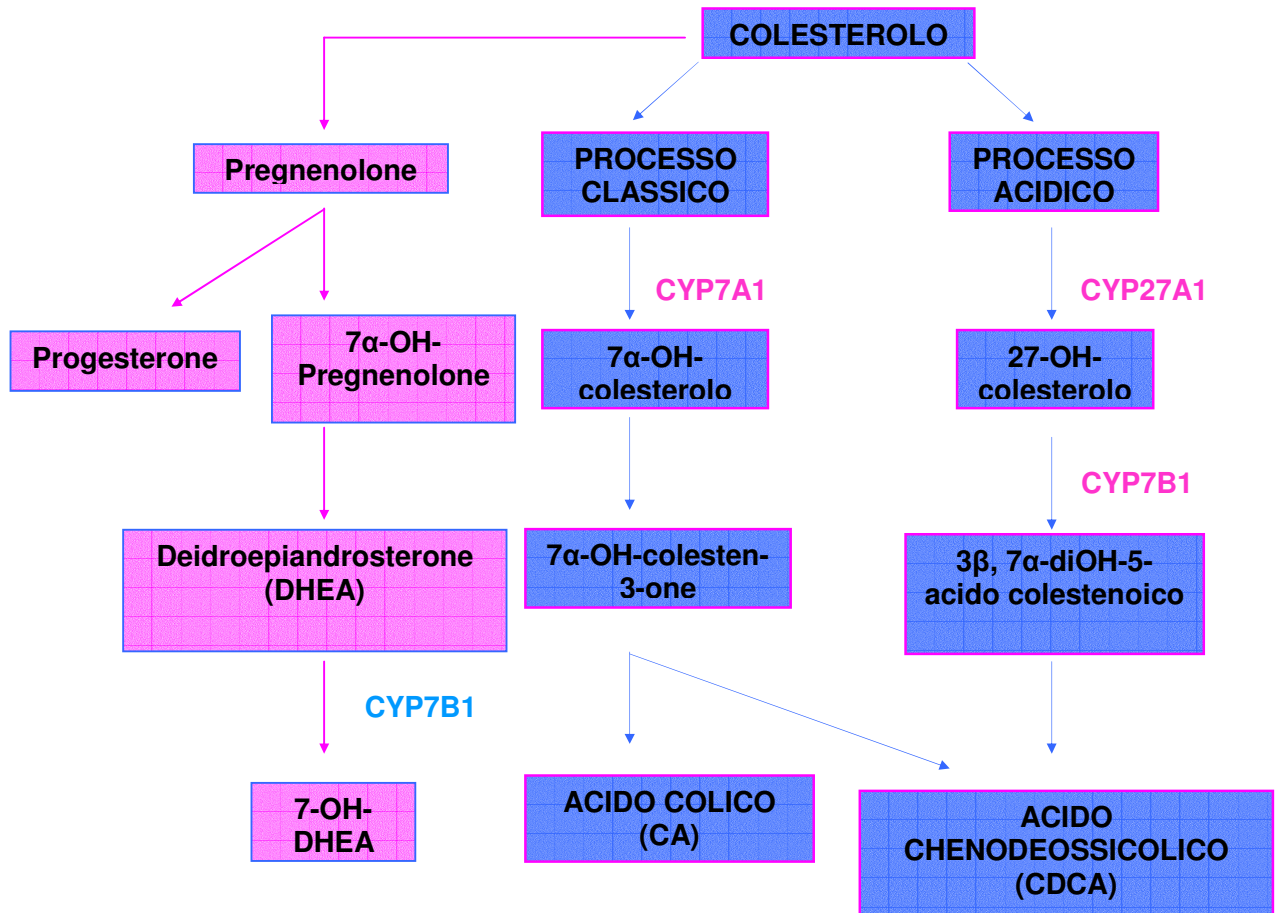


Figura 1.3: rappresentazione semplificata del principale processo sintetico degli acidi biliari e dei neurosteroidi. Il meccanismo degli acidi biliari è rappresentato in blu mentre il meccanismo sintetico dei neurosteroidi è rappresentato in rosa. (Tsaousidou et al., 2008)

SPG7

Il gene *SPG7* è stato il primo gene ad essere identificato (16q24.3). Le mutazioni di questo gene sono responsabili sia di forme pure che complicate (De Michele et al., 1998). Il gene *SPG7* codifica per la paraplegina, una proteina appartenente alle metalloproteasi mitocondriali, che sono un sottogruppo delle AAA-metalloproteine. La paraplegina si localizza a livello della membrana interna mitocondriale e potrebbe alterare la funzione mitocondriale causando HSP.

Infatti biopsie muscolari di pazienti con mutazioni in *SPG7* hanno mostrato segni tipici di disfunzione mitocondriale, dovuta forse all'accumulo di proteine non funzionali. Inoltre è stato dimostrato che la paraplegina si assembla con una proteina omologa, AFG3L2, sulla membrana mitocondriale interna. Queste due proteine formano un complesso ad alto peso molecolare che risulta aberrante nei fibroblasti di pazienti con HSP, e la cui perdita causa una ridotta attività del complesso I dei mitocondri ed un aumento della sensibilità allo stress ossidativo (Casari et al., 1998).

SPG11

Mutazioni nel gene *SPG11* sembrano essere frequenti nei casi di ARHSP complicata. In particolare *SPG11* è associato a paraparesi spastica con ipoplasia del corpo calloso (ARHSP-TCC), un disordine neurodegenerativo caratterizzato da ritardo mentale e paraparesi spastica lentamente progressiva, complicata da neuropatia periferica. Normalmente la malattia esordisce nella seconda decade di età. La caratteristica neuroradiologica della sindrome è l'assottigliamento della parte anteriore del corpo calloso (*Thin Corpus Callosum*, TCC) (Figura 1.4) e le alterazioni della sostanza bianca, che in genere si verificano nel corso della malattia

(Iwabuchi et al, 1994). La prima identificazione del *locus* per questa condizione, denominato *SPG11* (15q13-15) è stata riportata in famiglie nord-americane e giapponesi con ARHSP-TCC (Martinez Murillo et al, 1994; Shibasaki et al, 2000). Successivamente è stata confermata in 5 famiglie italiane (Casali et al, 2004) ed in due famiglie consanguinee arabo-israeliane (Lossos et al, 2006).

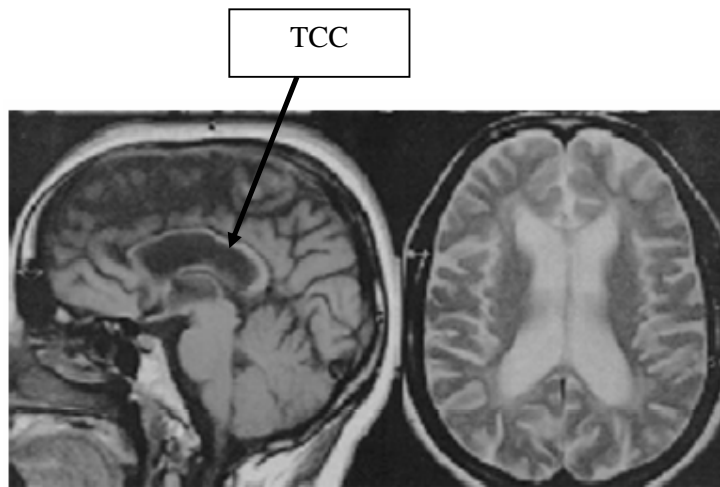


Figura 1.4: Risonanza Magnetica Nucleare in sezione sagittale (sinistra) e coronale (destra) in un tipico paziente con ARHSP-TCC mostra assottigliamento della porzione rostrale del corpo calloso ed alterazioni della sostanza bianca periventricolare.

Dopo l'identificazione del *locus SPG11*, sono state descritte ulteriori famiglie di differenti etnie (Teive et al, 2001; Kang et al 2004; Sperfeld et al, 2004; Tang et al 2004; Winner et al, 2004, Brockmann et al, 2005; Winner et al, 2005) suggerendo che questa particolare patologia non è rara come inizialmente si credeva, e che la sua frequenza nei paesi occidentali potrebbe essere sottostimata. Inoltre in letteratura sono stati descritti casi sporadici con HSP-TCC. Va ricordato che l'ipoplasia del corpo calloso può essere associata anche ad

altre forme di HSP, fra cui quelle legate ad *SPG4*, *SPG7* ed *SPG21* (Coutinho et al, 1999; Orlacchio et al, 2004; Simpson et al, 2003).

I criteri clinici per l'identificazione del fenotipo ARHSP-TCC includono la frequente presenza di alterazioni della sostanza bianca periventricolare, la presenza in circa il 60-75% dei casi di neuropatia periferica di tipo assonale, ed un grado lieve-moderato di ritardo mentale che aiutano ad orientare la diagnosi.

Casali e collaboratori (2004) hanno condotto un'analisi di *linkage* su 12 famiglie ARHSP-TCC dimostrando che in sei famiglie i valori di *lod score* erano totalmente non informativi mentre in una famiglia i marcatori polimorfici indicavano una esclusione del *locus* genico; in cinque famiglie la probabilità di *linkage* era alta e mediante l'analisi di ulteriori marcatori è stato ristretto l'intervallo genico a circa 19.8 cM. Successivamente Stevanin e collaboratori (2006) hanno esteso lo studio su famiglie del bacino mediterraneo. I dati genetici ottenuti ci hanno consentito di identificare altre famiglie in *linkage* al *locus SPG11* e ridurre sensibilmente l'estensione dell'intervallo genico a circa 1.5 cM. Inoltre, l'analisi di nuovi microsatelliti sul cromosoma 15q13-21 ha permesso di escludere il suddetto *locus* in un sottogruppo di famiglie con ARHSP-TCC rinforzando la nozione di eterogeneità genetica della malattia. Infine, dopo aver sequenziato 15 geni nella regione in *linkage*, sono state identificate mutazioni che causano perdita di funzione nel nuovo gene KIAA1840 (rinominato *SPG11*) in 10 delle famiglie studiate (Stevanin G, et al., 2007).

Ad oggi, in 36 famiglie ARHSP-TCC (di cui 16 italiane) sono state trovate mutazioni in *SPG11* (Stevanin et al., 2007; Hehr et al., 2007; Liao et al., 2008; Bauer et al., 2008; Paisan-Ruiz et al., 2008; Samaranch et al., 2008; Lee et al., 2008; Zhang et al., 2008; Pippucci et al., 2008).

Il gene *SPG11* è espresso in tutti i tessuti, e codifica per una proteina nuova che è stata denominata spatacsina (*spatacsin* dall'acronimo *SPAsticity with Thin or Atrophied Corpus callosum Syndrome proteIN*).

In particolare, la spatacsina è espressa prevalentemente nel cervelletto, nell'ippocampo e nella ghiandola pineale (Stevanin et al., 2007). La spatacsina non presenta omologia con altre proteine ma analisi bioinformatiche dimostrano la presenza di almeno un dominio transmembrana. Questo dato permette di ipotizzare una sua probabile funzione come recettore o trasportatore di membrana.

Il fenotipo ARHSP-TCC è caratterizzato da un interessamento precoce del tratto piramidale, inizialmente confinato agli arti inferiori con successiva diffusione agli arti superiori, e progressivo deterioramento cognitivo o ritardo mentale. Le disfunzioni motorie si manifestano in modo progressivo e non è possibile la deambulazione autonoma intorno ai 20 anni circa. Un comportamento fatuo ed infantile è comune in questi pazienti, ma non è proporzionato ai deficit motori. Si ha un progressivo declino cognitivo.

Gli studi neurofisiologici mostrano per lo più un ritardo della conduzione motoria centrale e segni di polineuropatia sensitivo-motoria.

1.9 Meccanismi patogenetici associati alla malattia (Salinas et al., 2008)

I meccanismi genetici più studiati nelle HSP coinvolgono diversi compartimenti cellulari e portano difetti nel trasporto di macromolecole e organelli, della funzione mitocondriale o anomalie nello sviluppo assonale. In figura 1.5 sono evidenziati i diversi siti cellulari dove si pensa siano localizzate le proteine responsabili della HSP. In particolare sono descritti i meccanismi patogenetici riguardanti i tre geni delle ARHSP studiati in questa tesi.

■ Anomalie del trasporto assonale e di membrana: SPG11

Gli assoni delle vie corticospinali sono particolarmente suscettibili a modificazioni del trasporto di membrana e assonale e questo porta ad un anomalo sviluppo assonale ed eventualmente a degenerazione.

Tale anomalie coinvolgono otto geni responsabili sia di ADHSP che ARHSP (*SPG10*, *SPAST*, *SPG3A*, *SPG6*, *SPG11*, *SPG15*, *SPG20*, *SPG21*).

In particolare, esperimenti di immunofluorescenza sulla spatascina hanno dimostrato che la proteina è espressa principalmente nel *citofosoma* e in maniera minore nei mitocondri e nel reticolo endoplasmatico.

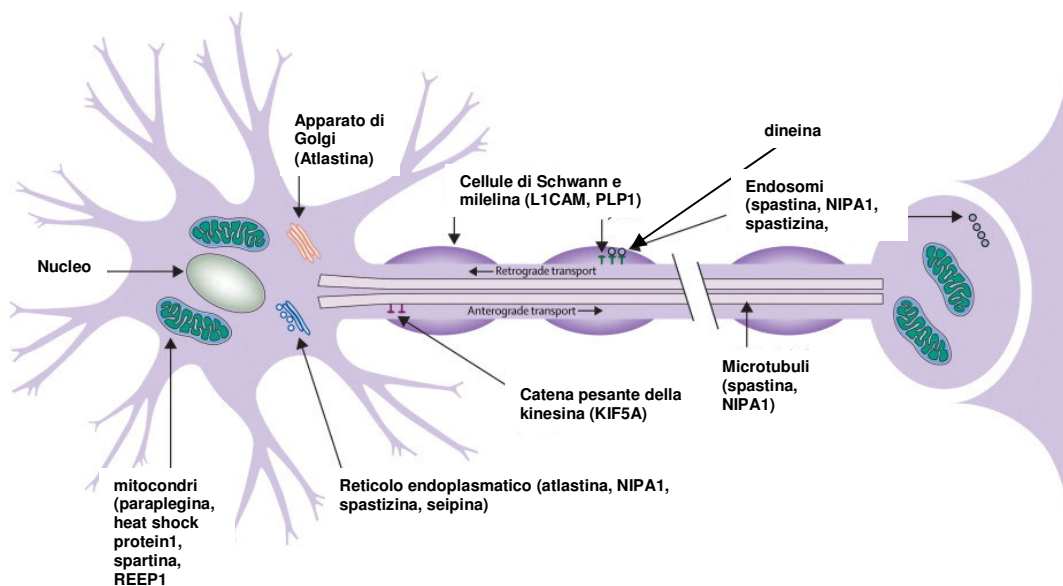


Figura 1.5: rappresentazione schematica del neurone in cui sono rappresentati tutti i siti dei potenziali meccanismi patogenetici delle proteine mutanti della paraparesi spastica ereditaria (Salinas et al., 2008)

Inoltre, non sembra esserci associazione della spatacsina con Golgi e microtubuli. Sebbene la patogenesi di questa forma di HSP non sia nota, studi su biopsia del nervo surale di pazienti *SPG11* ipotizzano una probabile anomalia del trasporto assonale.

Anomalie della funzione mitocondriale: SPG7

I mitocondri sono fondamentali nella funzione del sistema nervoso ed in particolare svolgono un ruolo cruciale nel caso di alcune neuropatie distali. Tre geni (*SPG7*, *REEP1* e *HSP60*) causano anomalie nella funzione mitocondriale.

In particolare, la paraplegina appartiene al complesso delle metalloproteasi AAA, un complesso proteolitico ATP-dipendente localizzato nella membrana interna del mitocondrio. Questo complesso controlla la sintesi proteica e regola l'assemblaggio ribosomiale.

Studi su fibroblasti di pazienti *SPG7* dimostrano che la mancanza del complesso delle metalloproteasi AAA causa una ridotta attività del complesso I della catena respiratoria mitocondriale e una maggiore vulnerabilità allo stress ossidativo.

Altri tipi di anomalie delle proteine HSP: SPG5A

Recentemente in letteratura sono state riportate mutazioni nel gene che codifica per il Citocromo P450 o 7B1 (*CYP7B1*). In particolare, nel cervello, ha un ruolo primario nel metabolismo dei neurosteroidi. Questo lascia ipotizzare, per la prima volta, un potenziale ruolo del metabolismo del colesterolo nella patogenesi di una malattia neurodegenerativa.

1.10 Neuroradiologia e neurofisiologia

Gli studi di neuroradiologia e neurofisiologia sono utili nella valutazione dei soggetti con HSP al fine di escludere altre affezioni. La Risonanza Magnetica (RM) dell'encefalo nella HSP non complicata è di solito normale. Una importante eccezione, tuttavia, è rappresentata dalla HSP autosomica recessiva legata al cromosoma 15 (che da sola comprende il 50% delle forme recessive di HSP) che può essere associata ad assottigliamento del corpo calloso (Cambi et al., 1995). La RM del midollo spinale nella HSP non complicata può essere normale o mostrare atrofia (diminuzione del diametro trasverso particolarmente del midollo spinale toracico) (Cambi et al., 1995).

L'elettromiografia e gli studi di conduzione nervosa sono normali nella HSP non complicata. Queste indagini sono importanti per distinguere l'HSP non complicata dalla Sclerosi Laterale Amiotrofica e dalle altre affezioni nelle quali vi è evidenza clinica e neurofisiologica di coinvolgimento del motoneurone inferiore (Tedeschi et al., 1991).

I potenziali evocati dimostrano nella HSP alterazioni del tratto cortico-spinale. I potenziali evocati corticali (impiegati per misurare la velocità di conduzione del tratto cortico-spinale) sono frequentemente patologici quando vengono misurati agli arti inferiori; sono invece normali quando vengono misurati in quelli superiori. Questo è spiegabile dal punto di vista neuropatologico dal maggior grado di degenerazione del tratto cortico-spinale nel midollo spinale toracico rispetto al midollo spinale cervicale. Allo stesso modo i potenziali evocati somato-sensoriali agli arti inferiori (ma non agli arti superiori) spesso dimostrano interessamento della colonna dorsale. Dal punto di vista neuropatologico ciò è legato alla maggiore degenerazione della porzione terminale degli assoni lunghi ascendenti (fibre del fascicolo gracile) (Fink et al., 2003a).

1.11 Trattamenti farmacologici

I trattamenti per la cura della malattia si limitano a risolvere o almeno a ridurre la spasticità muscolare attraverso esercizi e trattamento con medicinali. L'agonista del recettore GABA_b, *Baclofen* o *Lioresal*, è particolarmente usato per questo tipo di malattia. I dosaggi del farmaco sono soggettivi dato che alcuni pazienti hanno maggior debolezza e meno spasticità (e questo non migliorerà in seguito ad alte dosi di *Lioresal*); altri individui che, invece, mostrano una spasticità più grave richiedono alte dosi di *Lioresal* (somministrata oralmente oppure tramite una pompa per via intratracheale). Altri farmaci, come il *Tizanidine*, *Dantrolene* e *Botox*, vengono comunque usati per ridurre la spasticità muscolare. L'*Oxybutynin*, agente che rilassa la muscolatura liscia, è, invece, d'aiuto nel ridurre i problemi urinari. Altri medicinali che vengono usati per curare gli spasmi muscolari sono il *Zanaflex*, *Diazepam* e *Clonazepam*.

Alcuni pazienti possono essere curati grazie alla chemodenervazione. Questo tipo di approccio potrebbe ridurre l'iperattività muscolare e può essere eseguita mediante iniezioni intramuscolari della tossina del botulino. In alcuni pazienti, invece, è necessario operare chirurgicamente.

Molti medici sostengono che pazienti affetti da HSP debbano partecipare a terapie quotidiane che hanno lo scopo di 1) mantenere e migliorare la flessibilità dei muscoli e l'estensione dei movimenti (esercizi di *stretching*); 2) migliorare la forza muscolare (attraverso esercizi di resistenza); mantenere i riflessi durante la marcia; e 4) migliorare l'attività cardiaca. Queste raccomandazioni sono basate su risultati ottenuti su circa 200 soggetti affetti da HSP che hanno riportato benefici in seguito a un quotidiano esercizio fisico (Fink 2003b)

Sfortunatamente, però non ci sono ancora terapie che rallentano lo sviluppo o la prevenzione della distruzione assonale nelle HSP.

1.12 Possibili prospettive terapeutiche future

Il vasto e sempre crescente numero di *loci* identificato per le varie forme di HSP sono certamente preziosi strumenti per comprendere i difetti molecolari che sono alla base della malattia. Si spera che questa grande quantità di dati accumulati condurranno tutti ad un unico risultato comune. Questo consentirebbe un approccio più razionale per l'identificazione di target terapeutici. Sia modelli cellulari sia modelli di *Drosophila* (Orso et al., 2005) hanno dimostrato che lo studio sui microtubuli potrebbe rappresentare una giusta strategia in soggetti affetti da HSP che mostrano mutazioni per il *locus SPG4*, dato che la proteina associata, la spastina, porta ad un'iperstabilizzazione dei microtubuli (soderblom et al., 2007). È stato visto che alcuni agenti farmacologici per il trattamento dell'HSP possono comprendere alcune droghe, come il *Nocodazole* (Trotta et al., 2004) e alcaloidi *Vinka* (Orso et al., 2005). Infatti, è stato dimostrato che il nocodazole sopprime i fenotipi mutati osservati in modelli di *Drosophila* mutati per *SPG4* (Trotta et al., 2004). Comunque, *Drosophila* non è un completo e perfetto sostituto dei modelli di mammifero, ma può essere un primo passo. I nuovi progressi nel campo della genetica hanno consentito il disegno di terapie di trasferimento genico come il successo ottenuto in seguito a iniezione virale intramuscolare della paraplegina (*locus SPG7*) eseguita da Pirozzi et al., (2006).

Inoltre, il potenziale coinvolgimento dei siti di legame per i microRNA in alcuni casi di HSP potrebbero condurre a nuove sperimentali strategie terapeutiche. I microRNA legano specifiche regioni conservate nella regione non tradotta al 3' di molti ma non tutti gli mRNA. La distruzione di alcuni siti interferisce con il legame dei microRNA e causa un'alterata traduzione o alterata stabilità di quel mRNA. Questo ad esempio accade per il *locus SPG31*, dove il gene, mutato nella regione 3'UTR interferisce con il legame di microRNA e questo potrebbe alterare la disponibilità di specifici mRNAs che codificano per il gene HSP.

1.13 Scopo della tesi

La paraparesi spastica ereditaria (HSP) rappresenta un gruppo di malattie geneticamente e clinicamente eterogeneo caratterizzato da un progressivo indebolimento e spasticità degli arti inferiori dovuti a una degenerazione degli assoni corticospinali. Sulla base delle caratteristiche cliniche le HSP possono essere suddivise in forme “pure” o forme “complicate” in base alla presenza o assenza di altri fattori neurologici.

Sulla base del meccanismo di trasmissione genetica le HSP possono essere classificate in autosomiche dominanti (ADHSP), autosomiche recessive (ARHSP) e *X-linked*. In letteratura sono descritti anche casi sporadici. Studi di *linkage* hanno permesso di identificare finora almeno 41 *loci* associati alla malattia e solo in 17 casi è stato identificato il corrispondente gene.

Harding e collaboratori (1981) dividono le HSP in base all'età di insorgenza della malattia distinguendo in esordio precoce e esordio tardivo.

A livello clinico i principali indizi che consentono di identificare la malattia sono: l'età e la natura di esordio, la modalità di trasmissione, la progressione dei sintomi, la presenza di una storia familiare e l'esistenza di altri fattori clinici. Sulla base di questi criteri fare una diagnosi di HSP presenta molte difficoltà. A livello genetico i casi in cui non è disponibile la storia familiare del paziente e l'incremento del numero dei geni associati alla malattia rendono complicata la classificazione della patologia. Le forme più diffuse di HSP sono quelle a trasmissione autosomica dominante (70% dei casi). Nella maggior parte dei casi, dunque lo *screening* genetico viene effettuato sulle due forme più comuni di ADHSP associate ai geni *SPAST* e *SPG3A*. Inoltre, la maggior parte delle forme pure di HSP sono dominanti mentre le forme complicate risultano essere a trasmissione autosomica recessiva e sono meno frequenti (Harding AE 1993; Harding AE 1983; Fink JK 2003b).

Lo scopo della tesi svolta presso il laboratorio di Neurogenetica del CERC-Fondazione Santa Lucia di Roma, è stato quello di effettuare un'indagine molecolare su casi sporadici e

familiari affetti da ARHSP (sia forme pure che forme complicate). L'analisi molecolare dei pazienti ARHSP è stata eseguita sequenziando tre geni *SPG11*, *SPG7* e *SPG5A*.

La diagnostica molecolare delle HSP è complessa e laboriosa, dato l'alto tasso di mutazioni private e la relativa grandezza dei geni coinvolti (40 esoni *SPG11*, 17 esoni *SPG7* e 6 esoni *SPG5A*). Per questo motivo uno *screening* molecolare mirato e veloce consente di semplificare le analisi.

Un primo studio riguarda le famiglie affette da ARHSP complicate da assottigliamento del corpo calloso (ARHSP-TCC), in cui è stata effettuata un'analisi di linkage allo scopo di identificare associazione tra la malattia e uno dei *loci* responsabili di questa forma di ARHSP: *SPG11* localizzato sul cromosoma 15 (15q13-15). Una volta identificata l'associazione i probandi delle famiglie risultate positive sono stati esaminati e sequenziati per tutto il gene *SPG11* al fine di identificare mutazioni patogenetiche. Per rendere più semplice e più veloce l'indagine molecolare del gene *SPG11* è stato necessario mettere a punto una nuova tecnica di *screening* molecolare, l'HRM (vedi paragrafo n.2.2.7 capitolo 2 materiali e metodi).

Le famiglie ARHSP i cui dati sono risultati negativi dall'analisi di linkage e i casi sporadici sono stati esaminati per il gene *SPG7*, che rappresenta uno dei primi geni identificati per le forme autosomiche recessive, e poi per il gene *SPG5A*. Quest'ultimo gene, identificato di recente (Tsaousisou et al., 2008), dimostra la tipica caratteristica eterogenea della patologia. Di recente Schule ha identificato nuove mutazione nel gene *SPG5A* sia in forme ARHSP sia in forme ADHSP, nonché in forme pure e complicate. Questo dimostra che il ruolo del gene *SPG5A* presenta un quadro eterogeneo e il suo ruolo nella malattia non è ancora ben chiaro. Inoltre il suo coinvolgimento nel meccanismo di formazione dei neurosteroidi nel cervello dimostra un'ulteriore eterogeneità neuropatologica delle HSP. Ulteriori studi si rendono comunque necessari per quei casi in cui non è stata trovata nessuna correlazione fenotipo-genotipo.

Capitolo 2-Materiali e Metodi

2.1 Il Campione

Nel progetto di ricerca sono stati analizzati 14 casi apparentemente sporadici e 17 famiglie affette da ARHSP.

La diagnosi neurologica è stata eseguita presso il Dipartimento di Neuroscienze del Policlinico Universitario “Tor Vergata” di Roma. Tutte le caratteristiche cliniche sono riportate in tabella 2.1 in appendice. In figura 2.1 in appendice sono riportati gli alberi delle famiglie ARHSP.

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, Roma. I campioni di sangue sono stati prelevati in seguito al consenso informato dei membri della famiglia per l’estrazione del DNA. Gli individui sono stati esaminati dal punto di vista neurologico al policlinico “Tor Vergata” di Roma, mentre altri campioni ci sono pervenuti dal Canada in seguito a una collaborazione del nostro laboratorio con il Canada e il Giappone. La valutazione neurologica dei pazienti, inclusa l’età di esordio e l’età in cui sono stati esaminati, è stata condotta come descritto in precedenza in altri lavori di letteratura (Orlacchio et al., 2002; Orlacchio et al., 2005)

L’età di esordio è corrispondente al momento in cui sono comparsi i primi sintomi della malattia. Lo stato di disabilità è stato calcolato in base ad una scala a cinque punti: il primo punto stabilisce che non ci sono problemi nella mobilità o rigidità agli arti inferiori; il punto due stabilisce una moderata rigidità nell’andatura; il punto tre equivale a problemi nella corsa, ma capacità nel camminare da soli; il punto quattro corrisponde a problemi nel camminare e infine il punto cinque indica uno stato in cui il paziente è relegato nella sedia a rotelle. La gravità dei problemi urinari è stabilita dalla scala: *EDSS* (*Expanded Disability Status Scale*). Inoltre, il danno cognitivo è stato valutato mediante il test *CAMCOG*

(*Cambridge Cognitive Evaluation*). Infine, l'atrofia al cervello è stata visualizzata mediante risonanza magnetica quantificata (MRI) usando una scala a quattro punti.

2.2 Tecniche di laboratorio

2.2.1 Estrazione Di DNA

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. Una buona preparazione di DNA genomico è alla base della buona riuscita di qualunque analisi di biologia molecolare.

Il DNA può essere estratto da qualsiasi tessuto costituito da cellule nucleate (sangue, villi coriali, cellule amniotiche etc.). Accanto ai metodi classici utilizzati per l'estrazione (fenolo-cloroformio e *salting out*) esistono e diventano ogni giorno più numerosi i *kit* commerciali che hanno il pregio di accorciare notevolmente i tempi di purificazione del DNA.

Esiste una pletera di metodi, tra i quali la scelta si effettua in base a:

- 1) tipo di acido nucleico (ssDNA, dsDNA, RNA totale, mRNA, etc.),
- 2) fonte (tessuti animali o vegetali, eucarioti, procarioti, virus),
- 3) materiale di partenza (organo intero, tessuto, coltura cellulare, sangue, etc.),
- 4) risultato desiderato (quantità, purezza, tempo richiesto),
- 5) applicazione prevista post-estrazione (PCR, clonaggio, sequenziamento diretto, restrizione enzimatica, *southern blotting*, RT-PCR, sintesi di cDNA, etc).

Indipendentemente dalla tecnica di estrazione usata, essa deve rispondere a due requisiti principali: la *resa* e la *purezza*, intesa sia come presenza in soluzione dell'acido nucleico in

esame, sia come assenza di sostanze contaminanti che, legandosi ai reagenti in soluzione, potrebbero modificare i risultati del sequenziamento.

In particolare, l'estrazione di DNA genomico da sangue intero è stata effettuata mediante *kit* commerciali ed estrattore automatico.

2.2.1.2 Estrazione di RNA

Per l'estrazione di RNA occorre utilizzare molte precauzioni per evitare che agiscano le RNasi, enzimi ubiquitari che degradano le molecole di RNA. Queste precauzioni sono: indossare i guanti, utilizzare puntali con filtro, provette sterili ovvero autoclavate. Inoltre è opportuno, prima di iniziare l'estrazione, pulire con candeggina diluita il bancone da lavoro e le micropipette da utilizzare.

2.2.2 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 “*Thermal Cycling*”. Questo metodo avviene in presenza di una DNA polimerasi termostabile (*Taq* polimerasi), isolata dal batterio termofilo *Thermus aquaticus*, e di due sequenze oligonucleotidiche, dette *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) (Figura 2.2).

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 (Figura 2.3):

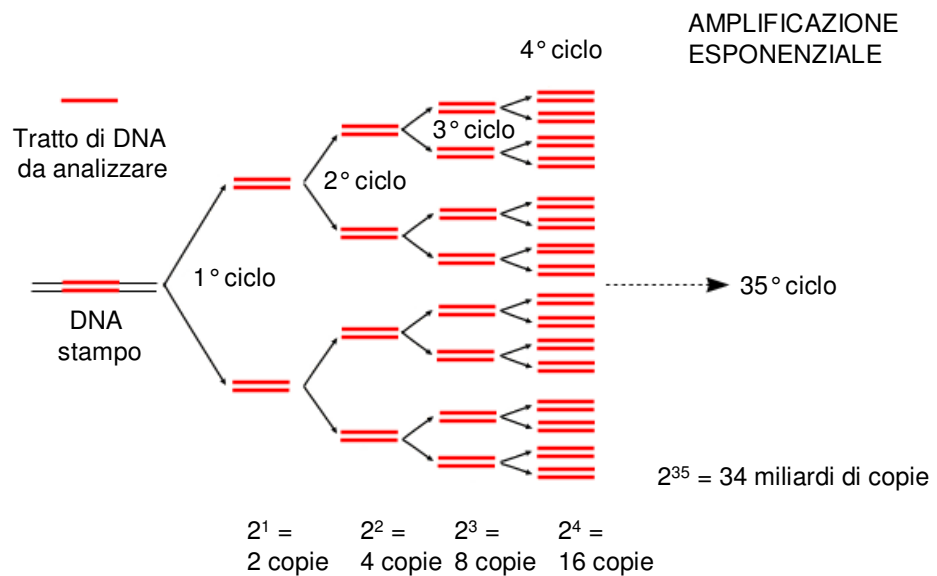


Figura 2.2: processo di amplificazione del DNA mediante PCR

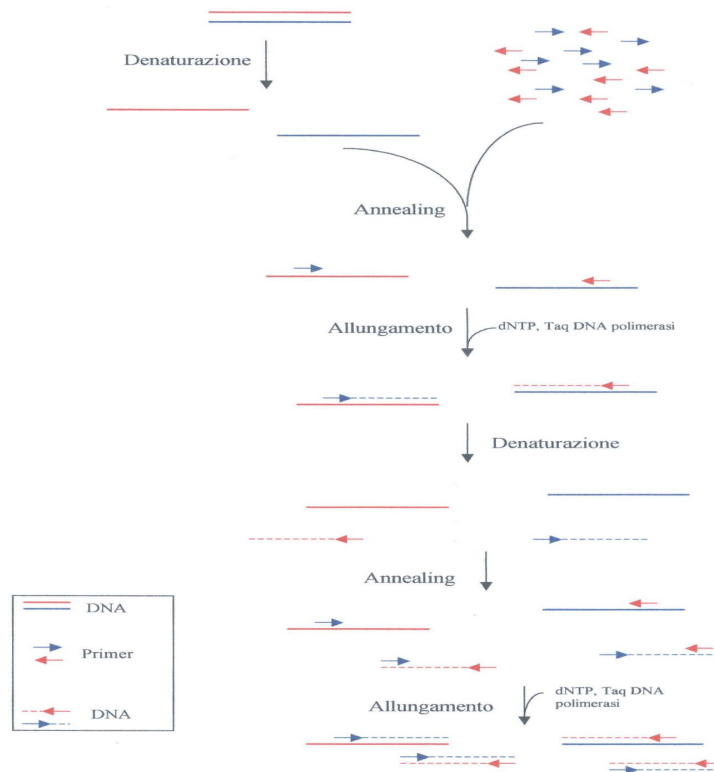


Figura 2.3: rappresentazione schematica di una reazione di PCR. La quantità amplificata del frammento di DNA compresa tra i due *primers* aumenta in modo esponenziale

- 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;
- 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.

- 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).

2.2.2.1 Parametri che influenzano l'amplificazione per PCR

Per una reazione di PCR sono necessari:

- ◆ DNA stampo
- ◆ *Primers*
- ◆ *Taq* DNA polimerasi
- ◆ MgCl₂
- ◆ *dNTPs*

Ciascuno dei componenti elencati influenza il risultato della PCR.

◆ Effetto della lunghezza, della sequenza e del contenuto di GC dei primers

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 s'intende 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 riportata di seguito:

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

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.

◆ **Enzima utilizzato**

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).

◆ **Effetto della concentrazione del Cloruro di Magnesio**

Lo ione magnesio (Mg^{2+}) è un catione indispensabile per l'attività della *Taq* DNA polimerasi ed inoltre stabilizza le interazioni tra lo stampo di DNA e l'oligonucleotide che funziona da innesco. Gli ioni Mg^{2+} formano un complesso solubile con i *dNTPs*, per produrre il vero substrato che la polimerasi riconosce. La concentrazione di ioni Mg^{2+} liberi dipende dalla concentrazione dei composti che legano gli ioni, compresi i *dNTPs*, il pirofosfato libero (PPi) e l'acido etilendiamminotetraacetico (EDTA). La concentrazione di ioni Mg^{2+} influenza l'attività enzimatica ed aumenta la stabilità del doppio filamento di DNA.

◆ **Effetto della concentrazione dei deossiribonucleotidi**

La concentrazione finale dei *dNTPs* risulta dalla somma delle concentrazioni dei singoli nucleotidi, che devono essere bilanciati per minimizzare possibili errori della *Taq* DNA polimerasi.

Aumentando la concentrazione dei *dNTPs*, si deve aumentare la concentrazione di Mg^{2+} per non causare la riduzione dell'attività della *Taq* DNA polimerasi e l'efficienza di *annealing* dei *primers*.

2.2.3 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 aggiuntive 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 basi e che quindi non riescono a discriminarsi su un gel d'agarosio classico è possibile utilizzare gel di poliacrilammide che presenta maglie di polinmero 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.

2.2.4 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. Inizialmente la migrazione della molecola avveniva in un mezzo libero, poiché non esiste nessun impedimento al movimento della molecola questa tecnica si conosce come elettroforesi “libera” o elettroforesi con fronte mobile.

Come metodo alternativo alla elettroforesi in un mezzo libero, nasce poi l’elettroforesi che impiega come mezzo di migrazione un gel, chiamata elettroforesi di “zona”.

- **Elettroforesi in un gel**

Come scritto in precedenza, l’elettroforesi di zona è nata come alternativa all’elettroforesi “libera” per evitare l’elevata sensibilità alle perturbazioni del mezzo dove migrano le molecole. Questo si risolve immergendo nel tampone di corsa elettroforetica una matrice tridimensionale formata da fibre incrociate di un polimero idrofilico che originano un gel.

- **Tipi di supporto per l’elettroforesi di zona**

Un gel per elettroforesi deve possedere le seguenti caratteristiche:

1. Non deve interagire ne con il campione ne con i componenti del tampone di migrazione
2. Deve essere chimicamente e meccanicamente stabile

3. Deve permettere la visualizzazione delle molecole separate
4. E' indispensabile che si possa controllare la sua maglia, ovvero il diametro medio dei suoi pori.

-*Agarosio*. E' un componente dell'agar ed è un polisaccaride lineare che origina gel con pori di dimensione abbastanza grande. Si utilizza fundamentalmente per la separazione degli acidi nucleici e per l'immuno-elettroforesi.

-*Poliacrilammide*. A differenza di tutti gli altri gel, il gel si origina "in situ" per la polimerizzazione in soluzione del monomero. E' possibile controllare la grandezza del poro con una estrema riproducibilità ed è il gel più utilizzato per l'elettroforesi di proteine di grandezza compresa tra i 10.000 e i 25.000 Dalton e per altre molecole di grandezza similare, compresi gli acidi nucleici. Sono gel completamente inerti, meccanicamente stabili e trasparenti.

• 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 agarobiosio, la cui struttura e' riportata nella figura 2.4:

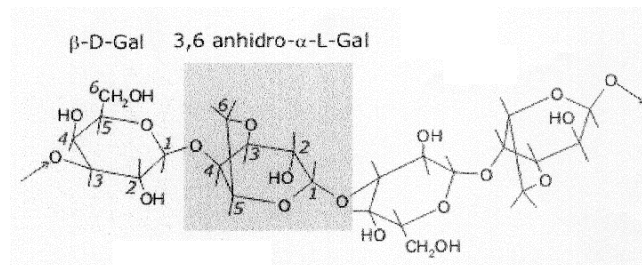


Figura 2.4: struttura del polimero di agar.

Le catene risultanti sono di elevata lunghezza, può avere gruppi solfato, di piruvato e di metossile; tanto il grado di sostituzione che la lunghezza del polimero influiscono nelle proprietà fisiche del gel risultante. 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'agaropectina.

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 (Figura 2.5) 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.

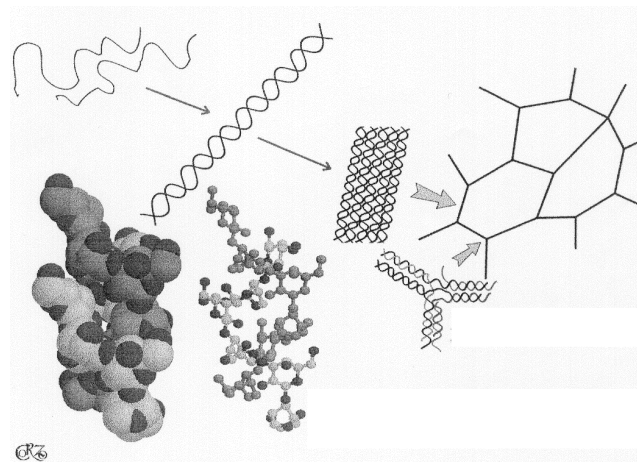


Figura 2.5: processo di gelificazione dell'agarosio.

🌿 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 (Figura 2.6) inizia per la formazione di radicali liberi nella soluzione che si formano tramite l'aggiunta di catalizzatori, o per meglio dire 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 si inizia illuminando la soluzione (fotopolimerizzazione).

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

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 (Figura 2.7).

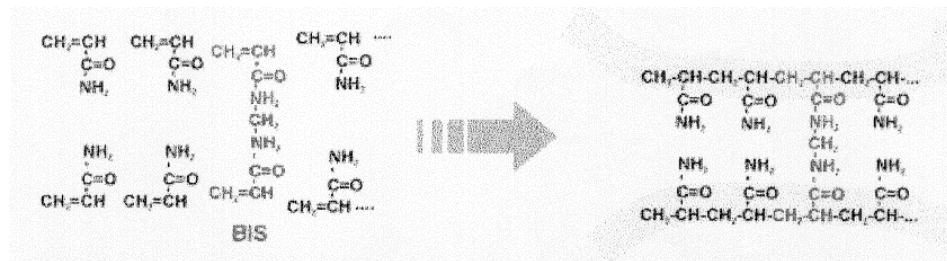


Figura 2.7: struttura della molecola della *N,N'*metilen-bis-acrilammide.

I gel di poliacrilammide sono gel neutri nel senso che non esistono gruppi carichi tra le fibre del polimero, sempre che la soluzione di acrilammide e bis-acrilammide sia stata preparata di recente. Nel caso contrario, visto che nella soluzione acquosa si produce l'idrolisi spontanea

del gruppo ammidico, rimarranno integrati nella struttura del gel resti carbossilici dell'acido acrilico che possono alterare la separazione elettroforetica.

2.2.5 Sequenziamento diretto del 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 2.8). Questo strumento si basa su una 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.

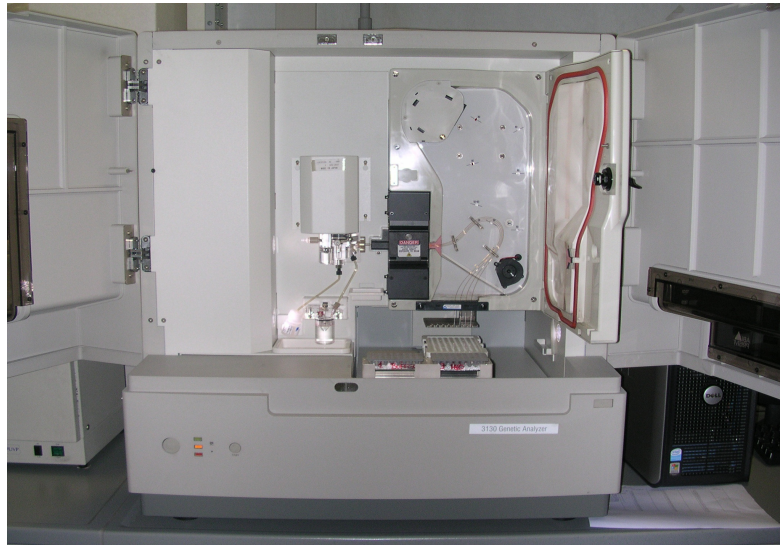


Figura 2.8: immagine del sequenziatore automatico *Genetic Analyzer 3130 Applied Biosystem*

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 dideoossi (*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.

Infine, 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. In questa tesi per l'analisi delle sequenze di DNA è stato 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*.

2.2.6 Linkage

L'analisi di *linkage* è un approccio molto utile per il mappaggio e l'identificazione di geni responsabili di malattie mendeliane. In particolare, permette di determinare la posizione di un *locus* responsabile di una determinata malattia/carattere genetico rispetto a marcatori polimorfici la cui localizzazione è nota.

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. C'è un'eccezione a questa regola che correla 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.

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. Sono disponibili interi pannelli di microsatelliti distanti meno di 1 cM, utili all'analisi dell'intero genoma umano.

La tipizzazione di famiglie ampie ed informative rispetto ad una specifica malattia genetica,

consente di stabilire se esiste un' "associazione" tra un marcatore specifico ed il *locus* malattia. L' esistenza di un rapporto di *linkage* viene dimostrato tramite vari metodi statistici tra cui quello del rapporto di massima verosimiglianza (o metodo dei *lod scores*¹).

La base logica di questo metodo è molto semplice ed 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 valori di Z vengono così calcolati prendendo in considerazione una meiosi alla volta e confrontando la probabilità dei genotipi osservati nelle ipotesi alternative di concatenazione 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 dipende dalla distanza tra i due *loci*. Ovvero, più due *loci* sono distanti maggiore è la probabilità di *crossing-over*.

¹ Il *lod score* (Z) è definito come il logaritmo delle probabilità che i *loci* siano associati piuttosto che non associati

La percentuale di ricombinazione viene indicata con la lettera greca θ e l'1% di ricombinazione corrisponde all'unità di mappa o centiMorgan (cM) dal nome del ricercatore T.H.Morgan che scoprì la concatenazione genica nel 1911.

Dunque, l'analisi di *linkage* consiste in un'analisi statistica e quindi sulla probabilità (θ) con cui un allele di un *locus* co-segrega con un allele di un altro *locus*.

Se due *loci* sono su cromosomi diversi segregano indipendentemente. La probabilità che vengano ereditati insieme è del **50%**.

La frequenza di ricombinazione (θ) è una misura della distanza genetica.

Si possono calcolare due probabilità:

- 1) la probabilità L_0 che la progenie di quella famiglia sia ottenuta in 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 come il rapporto tra L_1/L_0 e si cerca il valore di θ per cui tale rapporto risulta massimo.

Per semplicità di calcolo il *lod score* è espresso in chiave logaritmica in base 10 del rapporto di verosimiglianza:

$$Z = \log (L_1/L_0)$$

Un valore di $Z > 3$, con un valore di θ inferiore a 50 cM tra due *loci*, è considerato dimostrativo di forte evidenza di concatenazione (probabilità di *linkage* circa 1000:1). Un valore di *lod score* < 2 è considerato compatibile con l'assenza di associazione tra *locus* e gene-malattia.

2.2.7 TECNICHE DI SCREENING GENETICO

Sebbene il sequenziamento diretto sia uno dei metodi più accurato e preciso per l'analisi delle mutazioni, molti laboratori hanno sviluppato un metodo per uno *screening* più economico e rapido.

Per questo motivo presso il nostro laboratorio sono state messe a punto due tecniche per lo screening dei geni responsabili delle ARHSP:

• **CSCE (Conformation Sensitive Capillary Elettrophoresis: elettroforesi capillare conformazione-sensibile)**

• **HRM (High Resolution Melting)**

In seguito ad identificazione di un campione con una ipotetica mutazione si procede con il sequenziamento diretto per confermare la presenza della mutazione stessa.

CSCE (Conformation Sensitive Capillary Electrophoresis: elettroforesi capillare conformazione-sensibile)

La CSCE è una tecnica basata sulla formazione di molecole di DNA *eteroduplex* e sulla loro differenza di mobilità durante la corsa elettroforetica. Tale tecnica richiede un'amplificazione mediante PCR della regione di interesse con uno dei due *primers* marcato, seguita da denaturazione dei prodotti amplificati e un successivo passaggio in cui avviene una lenta rinaturazione. Al termine di questa fase i campioni con un'ipotetica mutazione contengono una miscela di DNA *omoduplex* e *eteroduplex* (Figura 2.9). L'elettroforesi capillare dei campioni viene effettuata in condizioni parzialmente denaturanti. La corsa deve avvenire in

presenza di uno *standard* di lunghezza e parallelamente ad un campione di controllo usato come riferimento. Campioni con mobilità elettroforetica anomala rispetto al controllo saranno successivamente sequenziati per identificare la probabile mutazione.

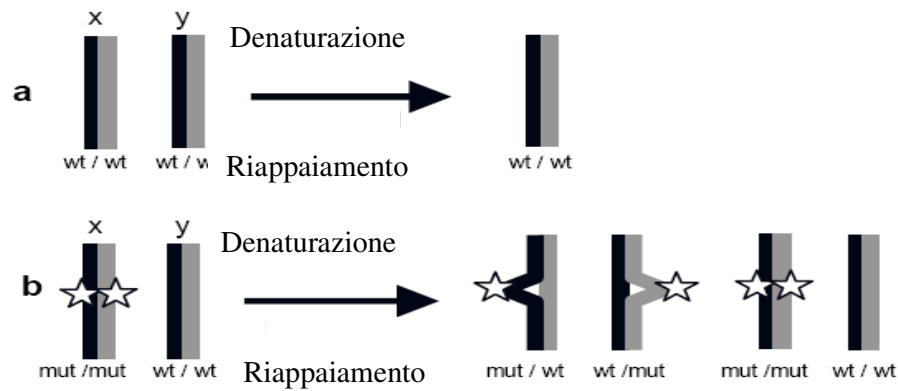


Figura 2.9: rappresentazione schematica dei processi di denaturazione e riappaiamento.

HRM (High resolution melting)

L'HRM è un'analisi molecolare che può essere applicata per:

- l'identificazione di nuove mutazioni
- uno screening per la perdita di eterozigotà
- DNA fingerprinting
- L'analisi di polimorfismi del DNA
- Analisi della metilazione del DNA
- DNA mapping
- Identificazione delle specie
- Studi di associazione
- Identificazione di geni candidati

L'HRM, a differenza della CSCE, non richiede la presenza di *primers* marcati e prevede una semplice reazione di PCR. L'HRM individua, quindi, in un solo passaggio varianti di sequenza di DNA tramite l'analisi della curva di *melting* alla fine dell'amplificazione.

Tale tecnica utilizza come strumento una PCR *Real Time* e l'uso di un intercalante fluorescente a saturazione, ovvero in grado di inserire una molecola di fluoroforo per ogni legame nucleotidico. I *primers* pur non essendo marcati, devono però avere caratteristiche particolari: avere una temperatura di *melting* di circa 60°C e produrre ampliconi di 100-250 bp. È possibile utilizzare dei *software* per disegnare *primers* ottimali per l'HRM. È necessario, inoltre, che i *primer* siano purificati mediante DHPLC e che la loro concentrazione nella reazione di PCR sia compresa tra 0.1 e 0.3 µM.

Infine, un altro elemento importante per il risultato finale della reazione è la concentrazione di MgCl₂, è consigliabile effettuare una diluizione seriale di MgCl₂ per ogni coppia di *primers*.

Infatti, viene scelta come condizione ideale la minor concentrazione di magnesio che permetta la maggiore resa del prodotto di PCR; tale concentrazione può variare da esone a esone

2.3 Protocolli

2.3.1 Estrazione di DNA con Kit commerciali

La maggior parte dei *kit* di estrazione di DNA da tessuto, presenti in commercio, si basano sulle proprietà chimico fisiche della molecola di DNA. In tutti i casi è necessaria una fase di preparazione iniziale comune a tutte le metodiche: la lisi cellulare.

Il kit utilizzato (*Wizard Genomic DNA Purification*) si basa su un processo a quattro fasi: la lisi delle cellule e dei nuclei, la digestione con *Rnasi*, la rimozione delle proteine ed infine una serie di lavaggi finali con etanolo.

Per l'estrazione del DNA genomico (gDNA) si prelevano 3 ml di sangue a cui si aggiungono 9 ml di tampone di lisi. Si miscela per inversione e si incuba a temperatura ambiente per 10 minuti. È necessario invertire due o tre volte la miscela durante l'incubazione per favorire l'azione della soluzione di lisi. Successivamente si centrifuga per 1' a 13000 g. Al termine della centrifuga si preleva il supernatante evitando di interferire con il *pellet* di cellule (globuli bianchi) che si è appena formato e lasciando circa 100 µl di soluzione necessari per risospendere le cellule. A questo punto si passa alla fase successiva aggiungendo 300 µl di soluzione di lisi dei nuclei. È necessario risospendere la soluzione con attenzione, evitando la formazione di agglomerati di cellule. Per facilitare la risospensione delle cellule si può agire incubando a 37°C per 10'. E' possibile aggiungere 130 µl di soluzione di lisi dei nuclei e ripetere l'incubazione a 37°C.

Per rimuovere i residui di RNA si aggiungono 15 µl di soluzione di *RNasi* e si inverte per 2-5 volte e si incuba nuovamente a 37°C per circa un'ora.

Successivamente si procede alla rimozione delle proteine con l'aggiunta di 3 ml di soluzione di precipitazione delle proteine. L'aggiunta di questa soluzione forma un agglomerato bianco che viene risospeso mediante agitazione. In seguito si centrifuga a 2000 g per 10'. Le proteine formano un *pellet* bianco e la fase superiore viene trasferita in una nuova provetta per i successivi lavaggi.

Il passaggio successivo prevede il trasferimento della fase acquosa superiore in una nuova provetta contenente 3 ml di isopropanolo. A questo punto bisogna agitare la provetta fino alla formazione di una "flocculo bianco" che costituisce a molecola di DNA.

Si centrifuga per 1' a 2000 g, si elimina il supernatante, si aggiungono 3 ml di etanolo al 70% e si centrifuga nuovamente a 2000 g per 1'. Si aspira il supernatante lasciando il *pellet* di DNA sul fondo e si lascia ad asciugare a temperatura ambiente.

Quando il *pellet* è completamente asciutto si aggiunge 1 ml di soluzione di reidratazione del DNA. Per risospendere correttamente il DNA si pone la provetta in un agitatore orbitale.

► Metodi automatizzati

Di recente nel nostro laboratorio l'estrazione di gDNA è stata anche eseguita mediante l'utilizzo di un estrattore automatico.

Maxwell 16 System (Promega Corporation U.S.A.) è un nuovo sistema automatizzato per l'estrazione di acidi nucleici e proteine che combina la praticità di uno strumento compatto, la comodità di cartucce monouso pronte all'utilizzo, con ottima qualità e grande flessibilità. Inoltre, minimizza il tempo necessario per la purificazione di DNA (anche da campioni forensi), RNA e proteine, garantendo la massima riproducibilità ad ogni esperimento. Con il sistema automatizzato Maxwell 16, infatti, è possibile non solo l'estrazione di DNA da sangue intero ma anche da altri tessuti e da cellule utilizzando opportuni *kit*.

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 (Figura 2.10).

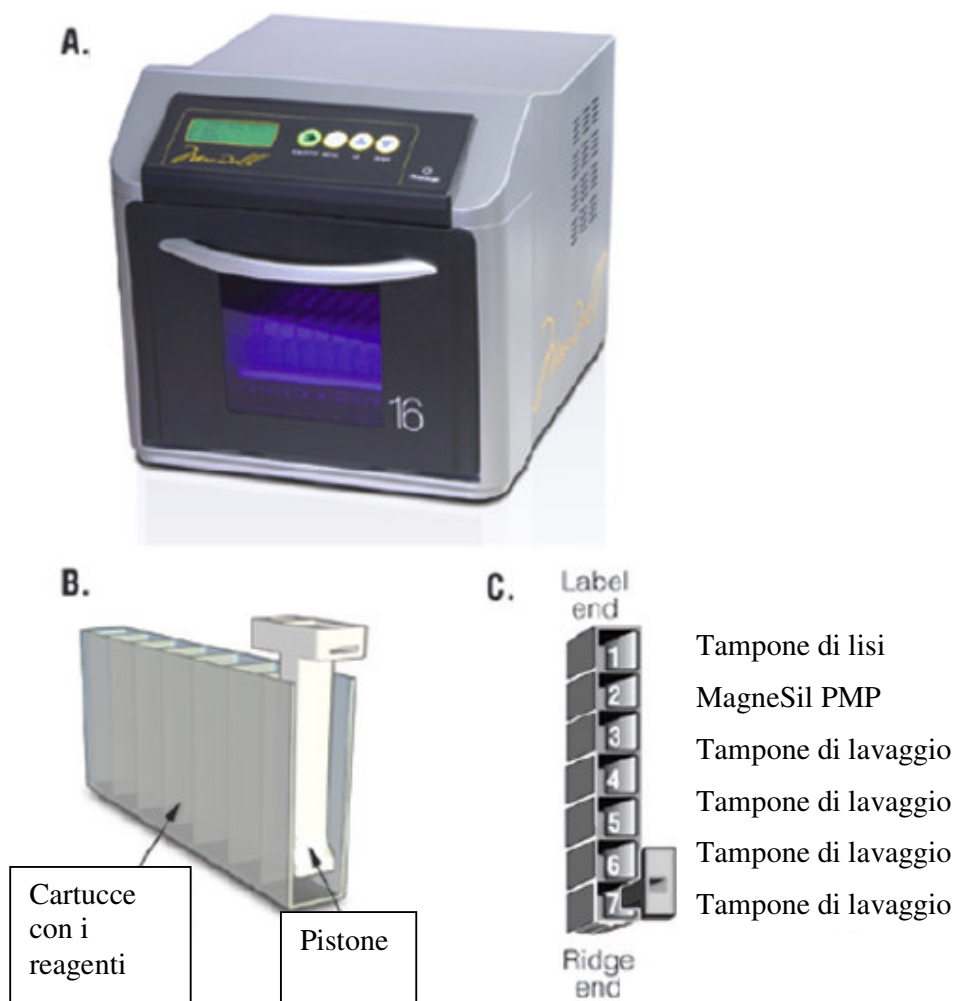


Figura 2.10: a) rappresentazione dell'estrattore automatico; b) cartucce utilizzate per l'estrazione; c) descrizione reagenti presenti nelle cartucce

2.3.2 Calcolo della quantità di DNA

La concentrazione del gDNA è determinata spettrofotometricamente misurando l'assorbanza a 260 nm.

L'assorbimento delle radiazioni nell'ultravioletto (100-400 nm) e nel visibile (400-800 nm) è descritto quantitativamente dalla legge di Lambert-Beer.

La legge di Lambert-Beer è una relazione empirica che correla la quantità di luce assorbita da un mezzo, alla natura chimica, alla concentrazione e dal cammino ottico.

Quando un fascio di luce (monocromatica) di intensità I_0 attraversa uno strato di spessore l di un mezzo, una parte di esso viene assorbita dal mezzo stesso e una parte ne viene trasmessa con intensità residua I_1 .

Il rapporto tra le intensità della luce incidente e trasmessa con il mezzo attraversato è espresso dalla seguente relazione

$$I_1/I_0 = e^{-K_\lambda l}$$

dove k_λ è detto *coefficiente di estinzione* ed è una costante tipica del mezzo attraversato per la lunghezza d'onda λ .

Definita quindi la trasmittanza (T) come il rapporto I_1/I_0 e come assorbanza (A) il logaritmo decimale del reciproco della trasmittanza, la legge assume una forma ancora più semplificata:

$$A = K_\lambda l$$

L'assorbanza può anche essere espressa come:

$$\log I_0 / I = A = \epsilon C l$$

Dove I_0 ed I sono le intensità relative di luce incidente e trasmessa, l è lo spessore della

soluzione attraversata dal raggio espresso in centimetri e C rappresenta la concentrazione espressa in moli/litro. L'assorbanza (A) può essere misurata direttamente allo spettrofotometro.

Il coefficiente di proporzionalità ϵ è chiamato *coefficiente di estinzione* molare ed indica l'assorbanza di una soluzione 1 M della sostanza in esame quando viene letta in una cuvetta con percorso ottico uguale ad 1 cm ad una determinata lunghezza d'onda.

E' evidente, dalla definizione data, che il coefficiente di estinzione molare lo si può calcolare solo se è disponibile il valore del peso molecolare. Quando, per esempio nel caso di macromolecole come le proteine e gli acidi nucleici, non è disponibile il peso molecolare, si fa uso di un altro parametro: il coefficiente di estinzione percentuale

$E_{1\%1\text{cm}}$

Tale coefficiente indica l'assorbimento di una soluzione all' 1% della sostanza in esame, quando viene letta in una cuvetta di quarzo dal percorso ottico di 1 cm.

La misura dell'assorbanza si può fare ad una sola lunghezza d'onda (che è in genere quella alla quale si ha l'assorbanza massima ed è detta λ_{max}), oppure si può registrare in modo continuo la variazione dell'assorbanza in funzione della variazione della lunghezza d'onda. In questo modo si ottiene lo spettro di assorbimento che appare come un picco allargato.

Lo spettro di una sostanza sciolta in un'appropriata soluzione si effettua ponendo la soluzione in cuvette di vetro o plastica per la lettura nel visibile o in cuvette di quarzo per la lettura nell'ultravioletto. La cuvetta è costruita in modo tale da permettere al raggio di luce di attraversare la soluzione per lo spessore di 1 cm. Si prepara poi una cuvetta di riferimento contenente un solvente puro ed ambedue vengono poste nello spettrofotometro. L'intensità del raggio trasmesso dalla soluzione in esame viene registrata per confronto con quello trasmesso dal solvente puro (Bianco di riferimento).

Lo spettro di una macromolecola (acido nucleico o proteina) misurato nell'intervallo di

λ compreso tra 200 e 300 nm può essere suddiviso in due zone ben distinte: la prima, che va da 200 a 245 nm circa, in cui si ha un forte assorbimento per la molteplicità dei cromofori responsabili, non utilizzabile per scopi analitici; la seconda che va da 245 a 300 nm, in cui lo spettro si rivela diverso per i due gruppi di macromolecole. Gli acidi nucleici (per la presenza di raggruppamenti eteroaromatici) presentano un massimo di assorbimento intorno a 260 nm, mentre le proteine (per la presenza degli amminoacidi aromatici) presentano un massimo di assorbimento intorno a 280 nm.

Normalmente l'assorbanza a 260 nm di una soluzione di 1 mg/ml di DNA corrisponde a 24 O.D (Densità Ottica). Nella lettura del DNA è necessario determinare anche la lettura della soluzione a 280 nm. Infatti, il rapporto tra assorbenza a 260 e quella a 280 nm (A_{260}/A_{280}) deve essere ≥ 1.8 per una preparazione pura di DNA. Se il rapporto è < 1.8 , significa che è presente una contaminazione da parte di proteine.

La qualità e la quantità del DNA estratto può essere controllata anche mediante elettroforesi su gel d'agarosio (paragrafo 2.2.4).

2.3.3 Protocollo di PCR per linkage

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

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

■ DNA [20 ng/ μ l]	1,2 μ l
■ True allele PCR Premix ²	9,0 μ l
■ DYE Primers	0,5 μ l
■ H ₂ O	4,3 μ l

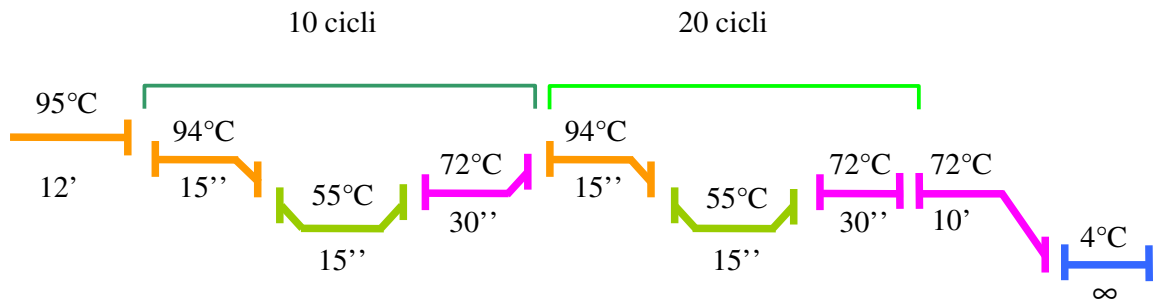
² La True allele PCR Premix è una master mix per la PCR che contiene: AmpliTaq Gold DNA polymerase , dNTPs MgCl₂ e buffer.

I *DYE primers* sono coppie di oligonucleotidi fiancheggianti i marcatori di interesse (descritti in tabella 2.4) di cui uno dei due è marcato con un fluoroforo con (6-FAM, VIC o NED).

Tabella 2.4. Descrizione dei microsatelliti utilizzati per l'analisi di linkage

<i>Microsatelliti</i>	<i>Oligonucleotidi</i>	<i>Lunghezza amplicone (bp)</i>
D15S1042	CTCTGGCTAATGCCATGA GCTGCTTAATTTCCCTGTAGAC	180 bp
D15S1007	GGGGAACCTACACTCCG CCAGGAATCTCAAATGGCTT	165 bp
D15S659	GTGGATAGACACATGACAGATAGG TATTTGGCAAGGATAGATACAGG	174bp
D15S1012	CAACAAGAACGAAACTGTCA AGCCTTAAGTTCCTGGACTC	160 bp
D15S143	CTAAGGAGGCAACAGCAAAG ATGTAAAGACTGGTATCTGTAGCAC	189 bp
D15S978	AGCTTCATACTGAAATTGTTG CACCGGGAAACCTTGAT	193 bp
D15S117	TTCTGTTCACCCTGTCTAATTC CCTAAGGGGTCTCTGAAGAG	254 bp
D15S1040	TGGGAGGCTGAGTCAC AAAGCCAAATGTAGAGGAAT	181 bp
D15S1044	TTAAAATCAGGAACAAGGCAAAG GAATTTCCGATGCAAACAATTAC	183 bp
D15S161	ATGGTGGAAAGGAAAAGTGT AGCCAAGACTTGTCATCAAA	280 bp
D15S1039	TGCCGGTAGTAACATCTG CCAAGGATAAAGTATTTGTGTC	227 bp

Il profilo di reazione di amplificazione è riportato nel seguente schema:



2.3.3.1 Preparazione dei campioni per l'analisi di linkage

La fase successiva prevede la preparazione del campione amplificato per l'analisi dei microsatelliti tramite sequenziatore automatico 3130 (*Applied Biosystems, Foster City, CA*):

- Ⓢ 1 µl del prodotto amplificato
- Ⓢ 0,5 µl di *Size Standard (LIZ 500)*
- Ⓢ 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'.

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

2.3.4 Protocollo PCR

Per l'amplificazione del tratto di DNA di interesse è stato utilizzato DNA genomico estratto da campioni di sangue intero. Ad 1 µl di DNA concentrato 40 ng/ µl sono stati aggiunti i seguenti reagenti:

- ◆ 10 µl di tampone 5 X³ (Promega)
- ◆ 5 µl di MgCl₂ [25 mM]
- ◆ 1 µl di *dNTPs* [10 mM]
- ◆ 0,2 µl di *Taq* DNA Polimerasi (Promega) [5 U/µl]
- ◆ 2 µl di *primers* concentrati [10 pmol/µl]
- ◆ ddH₂O fino ad un volume finale di 50 µl

In alcuni casi è stata utilizzata una “*Master-Mix*” contenente tutto il necessario per la reazione ad eccezione dei *primers* che sono specifici per il prodotto da amplificare. In tal caso la reazione di PCR è stata così preparata:

- ◆ 12,5 µl *Master Mix* (Promega)
- ◆ 1 µl di ogni *primer* [10 µM]
- ◆ ddH₂O fino ad un volume finale di 25 µl

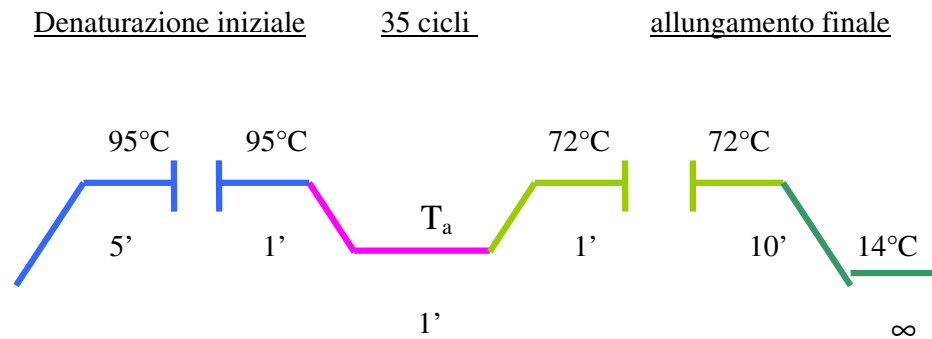
Per l'amplificazione di templati particolarmente difficili è stato necessario aggiungere Dimetilsolfossido (DMSO) (10%) nella reazione di PCR. Oppure è stato necessario l'utilizzo di

³ Il buffer 10X contiene 200 mM Tris-HCl pH 8.5 e 500 mM KCl. Il buffer della *Go Taq* Polimerase da noi utilizzata contiene anche Magnesio concentrato 7,5 mM per una concentrazione finale di 1,5 mM

una *Taq* polimerasi specifica per amplificare tratti di DNA particolarmente ricchi in G o C oppure con regioni altamente ripetute.

Per ogni reazione di PCR viene allestito anche un controllo negativo con le stesse componenti di reazione ma mancante del DNA stampo, a verifica della bontà dei risultati ottenuti.

Il profilo di reazione di PCR scelto è stato:



T_a = temperatura di *annealing*

Si inizia da una prima fase di denaturazione a 95°C per 5 minuti al fine di separare completamente i filamenti del DNA, a cui segue l'appaiamento degli inneschi allo stampo che avviene a temperature specifiche per ogni coppia di *primers* per 1 minuto. L'allungamento dei *primers* si effettua a 72°C per 1 minuto. La reazione è ripetuta per 35 cicli e è stata effettuata un'estensione a 72°C per 10 minuti e successiva fase di mantenimento a 14°C.

Le sequenze dei *primers* utilizzati e le specifiche condizioni di *annealing* sono riportate in tabella 2.5 in appendice.

2.3.5 Elettroforesi dei prodotti amplificati

I prodotti di PCR sono stati analizzati su gel di agarosio al 1% contenente bromuro di etidio (EtBr) ad una concentrazione di 0,5 mg/ml e osservati in seguito ad esposizione con luce Ultravioletta (U.V). Il bromuro di etidio intercalato tra le coppie di basi del DNA diventa fluorescente per illuminazione con UV, emettendo una caratteristica fluorescenza rosso-arancio in corrispondenza delle bande di DNA.

Nell'elettroforesi su gel d'agarosio a *pH* neutro o alcalino c'è una relazione lineare tra il logaritmo della mobilità del DNA (μ) e la concentrazione del gel (T) descritta dalla seguente equazione:

$$\log \mu = \log \mu_0 - K_r T$$

in cui μ_0 è la mobilità elettroforetica in fase libera e K_r è il coefficiente di ritardo, una costante correlata tanto alle proprietà del gel quanto alle dimensioni ed alla forma delle molecole sottoposte a migrazione. Per risolvere e separare molecole di DNA, le cui lunghezze sono comprese in ampi intervalli di chilobasi (Kb) si devono utilizzare gel a concentrazione di agarosio diverse. Le seguenti relazioni correlano concentrazione di agarosio e intervalli di lunghezze dei frammenti di DNA:

% di agarosio	range efficiente di separazione (Kb)
0,3	60-5
0,6	20-1
0,7	10-0,8
0,9	7-0,5
1,2	6-0,4
1,5	4-0,2
2,0	3-0,1

In particolare, sono stati utilizzati gel d'agarosio al 1% e al 1,2%, usando il tampone TBE (TRIS- ACIDO BORICO-EDTA).

Il tampone TEB 1X contiene:

- ◆ **Tris [0,089 M]**
- ◆ **20 mL concentrazione finale [0,5 M] EDTA**
- ◆ **Acido borico [2 mM]**

5 µl di ciascun prodotto amplificato sono mescolati con 1µl di un "*gel loading buffer*" costituito da:

Glicerolo	50%
Blu di bromofenolo	0,42%
Xilene cianolo	0,42%
ddH ₂ O	49,2%

I prodotti di PCR sono quindi colorati con bromuro d'etidio e visualizzati agli UV a 350nm.

Per determinare le lunghezze dei frammenti di DNA migrati su gel d'agarosio sono stati utilizzati i seguenti marcatori di peso molecolare: *marker* 100 bp e *marker* 1Kb opportunamente diluiti.

2.3.5.1 Corsa elettroforetica

La corsa elettroforetica viene eseguita in tampone TEB 1X (lo stesso tampone utilizzato per la preparazione del gel), a temperatura ambiente, applicando una differenza di potenziale costante da 1 a 3 V/cm. L'elettroforesi viene effettuata per circa 30 minuti.

2.3.6 Preparazione del campione per la CSCE

Tutti i frammenti analizzati per CSCE devono essere amplificati mediante PCR secondo i protocolli e le condizioni descritte nel paragrafo 2.2.2.

Per una buona riuscita di questa tecnica è fondamentale che i frammenti da amplificare non siano più lunghi di 400 bp.

La reazione di PCR è stata eseguita con il *primer forward* marcato al 5' con il fluoroforo 6-FAM e il *primer reverse* non marcato.

Il passaggio fondamentale nella preparazione del campione è la formazione di DNA *eteroduplex* che si realizza secondo lo schema descritto nella seguente tabella.

Tabella 2.6. Preparazione del prodotto PCR alla CSCE.

FASE	°C	TEMPO	CICLO
Denaturazione	96	10'	
Formazione dell' <i>eteroduplex</i>	96→60	20''	x72 cicli (diminuendo la temperatura di 0.5°C per ciclo)
Mantenimento	60	30'	

La possibile presenza di mutazioni omozigoti, come nel caso di malattie recessive (per esempio ARHSP) rende necessario fare una mix in cui il campione di PCR venga miscelato 1:1 con un prodotto *wild type*, così che possano formarsi gli *eteroduplex*, prima della fase di denaturazione.

2.3.6.1 Preparazione per l'elettroforesi capillare

I campioni, dopo il trattamento di denaturazione e rinaturazione sono stati diluiti 1/100 in acqua con un volume finale di 10 µl e successivamente miscelati con 0.2 µl di *GeneScan-500LIZ Size Standard* (Applied Biosystem Foster City CA).

L'elettroforesi capillare è stata eseguita sullo strumento 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Foster City CA), utilizzando un capillare di 36 cm e un particolare polimero CAP (Polimero per Analisi Conformazionale) con proprietà semidenaturanti con additivi specifici alle seguenti concentrazioni finali:

- polimero CAP 5%
- urea 4M
- saccarosio 7.5%
- Tampone TTE (Tris, Taurina, EDTA) 1x

Per ogni esone sono state eseguite corse elettroforetiche a 3 diverse temperature (18°C, 22°C, 30°C), per evidenziare gli eventuali cambiamenti di mobilità dei frammenti. L'analisi dei tracciati dell'elettroforesi è stata eseguita con il *software GeneMapper v 4.0*, con il quale è stato confrontato il profilo dei picchi di un controllo normale con i campioni ARHSP al fine di individuare frammenti con mobilità elettroforetica anomala.

2.3.7 Protocollo per l' HIGH RESOLUTION MELTING

Per lo *screening* mediante l'HRM è stata utilizzata una *Master Mix*, contenente *FastStart Taq* DNA Polimerasi, un *buffer*, *dNTPs*, e l'*High Resolution melting dye* (Roche, Basel, Switzerland).

Il protocollo di PCR utilizzato prevede (v.f.: 20 µl):

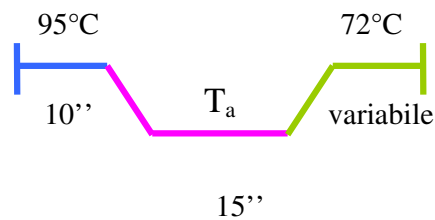
☞ gDNA [80 ng/µl]	5µl
☞ Master Mix (2x)	10µl
☞ Primer forward [10µM]	1µl
☞ Primer reverse [10µM]	1µl
☞ MgCl ₂ [25mM]	2,4µl
☞ dd H ₂ O	0,6µl

⊕ **Fasi della reazione di HRM**

La reazione di HRM prevede quattro fasi:

1. Pre-incubazione
2. PCR
3. High Resolution Melting (HRM)
4. Raffreddamento

Nella prima fase, che dura 10' ad una temperatura di 95°C, si ha la denaturazione del DNA e l'attivazione della *Taq* polimerasi (*Hot-Start*). La seconda fase è la reazione di PCR che prevede il seguente profilo termico:



Questa fase consiste nell'amplificazione del tratto di interesse. La temperatura di *annealing* (T_a) dipende dalla temperatura dei *primer*. Una temperatura di *annealing* ottimale è intorno a 60°C. In alcuni casi è stato utilizzato un protocollo di PCR "Touchdown" con un intervallo di temperatura di *annealing* da $T_m + 2^\circ\text{C}$ a $T_m - 2^\circ\text{C}$ che diminuisce di 0,5°C ogni ciclo al fine di aumentare la specificità della reazione.

La durata della fase di allungamento a 72°C dipende, anch'essa dalla lunghezza del frammento di interesse. Per calcolare i secondi necessari si divide la lunghezza dell'intero amplicone per 25. La terza fase consiste nella formazione degli *eteroduplex* come descritto nel seguente schema.

FASE	°C	TEMPO	CICLO
Denaturazione	95°C	1'	
<i>Pre-hold</i>	40°C	1'	
Formazione dell' <i>eteroduplex</i>	60°C	1''	x 1 ciclo
Acquisizione	95°C	Continuo	

2.3.8 Purificazione del tratto amplificato

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 secondo il seguente protocollo:

– si porta il prodotto amplificato ad un volume di 100 μ l con ddH₂O autoclavata e si aggiungono:

10 μ l di ammonio acetato 5M

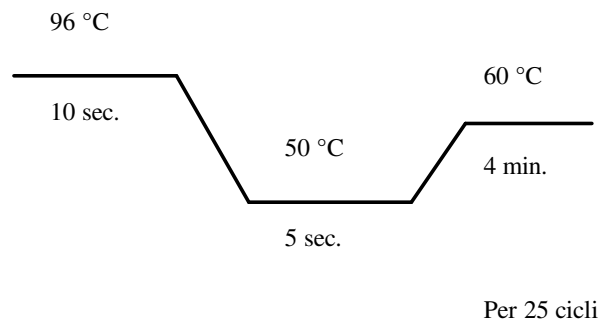
200 μ l di etanolo assoluto freddo

– si agita per inversione e si lascia precipitare l'amplificato per 20 minuti a -20°C. Una volta terminata la precipitazione, si separa il prodotto amplificato dal resto della miscela tramite una centrifugazione a 14.000 rpm per 15 minuti;

- si lava il *pellet* aggiungendo 200 μ l di etanolo all' 80% freddo e si effettua una seconda centrifugazione a 14.000 rpm per 15 minuti. Per ottenere il prodotto amplificato purificato e concentrato si liofilizza per circa 3-4 minuti il *pellet* ottenuto dalla seconda centrifugazione.

2.3.9 Amplificazione per la marcatura del templat

È stato utilizzato il kit “*Big De Terminator v3.1 Cycle Sequencing*” (Applied Biosystem Foster City CA). Il profilo e le condizioni della *PCR* per il loro inserimento nel templat sono le seguenti:



- 1,57 µl di *primer* 3,2 µM (*forward* e *reverse*)
- 2 µl *Big-Dye* (contenente i *dye terminators*)
- ddH₂O fino ad un volume finale di 10 µl.

Nel volume finale della reazione bisogna tener presente anche la quantità di DNA da aggiungere. Tutto dipende dal prodotto ottenuto dalla PCR e dalla successiva purificazione del template. Ovviamente, meno è la quantità di DNA maggiore è il volume da aggiungere alla reazione di marcatura.

2.3.10 Precipitazione dei prodotti marcati

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

- si aggiungono al campione : 2 µl sodio acetato 3M pH 4.6
- 50 µl etanolo al 95% freddo
- si lascia a temperatura ambiente per 15 minuti
- si centrifugano i campioni a 2.500 rpm per 30 minuti
- si aspira il sovrantante
- si esegue un lavaggio con 150 µl di etanolo 70%
- si centrifuga a 14.000 rpm per 10 minuti
- si elimina nuovamente il sovrantante
- si liofilizza per 3-4 minuti il *pellet* ottenuto

2.3.11 Preparazione del templatato marcato per il sequenziamento automatico

Il templatato liofilizzato ottenuto dalla precipitazione viene risospeso e caricato al sequenziatore automatico.

-si aggiungono 20 µl di formammide deionizzata al materiale liofilizzato;

-si denatura il templatato a una temperatura di 95°C per 3 minuti;

-si mette in ghiaccio per evitare una rinaturazione e si carica al sequenziatore.

2.3.12 Digestione con enzimi di restrizione

La reazione è stata allestita utilizzando 10 µl di DNA genomico e 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 stata posta alla temperatura alla quale l'enzima agisce per due ore e poi bloccata in ghiaccio. I prodotti della reazione sono stati analizzati su gel d'acrilammide preparato secondo la procedura descritta nel paragrafo 2.2.4 di questo capitolo. In questo caso però bisogna tener presente che 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 e le specifiche condizioni sono riportate in tabella 2.7.

TABELLA 2.7.- CARATTERISTICHE DI CIASCUNO DEI SITI DI RESTRIZIONE

ENZIMA DI RESTRIZIONE	SEQUENZA DEI PRIMERS	LUNGHEZZA (bp) PRODOTTO DI PCR	LUNGHEZZA (bp) FRAMMENTI DI RESTRIZIONE
<i>EcoP15I</i>	SPG11-ex30BF TGAGGTGGGAGGATCTCTTG	604	517 87
	SPG11-ex30BR GATGTGTTTCAGAGCAGCCAA		

2.3.13 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.

2.3.14 Estrazione RNA

Per l'estrazione dell'RNA dai campioni di sangue intero è stato utilizzato il Kit Qiagen "QIAamp RNA Blood" che si basa sulle proprietà di legame di membrane in silice. Durante l'estrazione con il Kit "QIAamp" gli eritrociti sono lisati e i leucociti sono recuperati

mediante centrifugazione. I leucociti vengono lisati in alte condizioni denaturanti che immediatamente inattivano le *RNasi* facilitando l'isolamento dell'RNA intatto.

Ad 1,5 ml di sangue intero sono stati aggiunti 7,5 ml di tampone EL e il tutto è stato incubato per 10-15 minuti in ghiaccio. Si centrifuga a 400 g per 10 minuti con una centrifuga refrigerata a 4°C e si rimuove il supernatante. Si aggiunge di nuovo tampone EL per risospendere le cellule e si centrifuga nuovamente a 400g per 10 minuti. Si elimina il supernatante e si aggiungono 600 µl di tampone RLT a cui in precedenza sono stati aggiunti 60 µl il β-mercaptoetanololo. Il lisato ottenuto si trasferisce in una colonnina in dotazione con il *kit* e si centrifuga per 2 minuti alla massima velocità. Una volta eliminata la colonnina e si aggiungono 600 µl di etanolo 70% all'eluato e si miscela con una micropipetta e il tutto si trasferisce in seguito in una nuova colonnina. Si centrifuga per 15'' a 8000 g . Successivamente si trasferisce la colonnina in una nuova provetta e si aggiungono 700 µl di tampone RW1. si centrifuga nuovamente per 15'' a 8000 g e si trasferisce ancora la colonnina in una nuova provetta aggiungendo 500 µl di tampone RPE. Si centrifuga nuovamente per 15'' a 8000 g; si aggiunge nuovamente il tampone RPE e si centrifuga per 3' alla massima velocità. Dopo aver trasferito la colonnina in una nuova provetta si aggiungono da 30 a 50 µl di H₂O *RNAsi-free* direttamente sulla membrana della colonnina e si centrifuga a 8000 g per 1', recuperando in questo modo l'RNA. L'RNA così estratto viene così conservato a -80°C.

La quantità e la purezza dell'RNA vengono osservate su un gel gel d'agarosio al 2% preparato come descritto nel paragrafo 2.3.5; si osservano le tre bande tipiche dell'RNA ribosomale (5/8S, 18S, 25/28S) .

2.4 Software e database utilizzati

- ▮ **Primer3** <http://frodo.wi.mit.edu> : disegno *primers*
- ▮ **ENSEMBL**: <http://www.ensembl.org/index.html>: scelta dei microsatelliti
- ▮ **NEB cutter**: <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>: scelta degli enzimi di restrizione
- ▮ **ClustalW**: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>: allineamento multiplo sequenze
- ▮ **HUGO** : <http://www.genenames.org/>: elenco dei *loci SPG*
- ▮ **HGMD The Human Gene Mutation Database** <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>
- ▮ **SOSUI** <http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>: predizione domini transmembrana delle proteine
- ▮ **Expasy** <http://www.expasy.ch/>: *database* di proteine
- ▮ **NetPhos v.2.0** <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>: predizione sito di fosforilazione
- ▮ **Fritfly** http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html: predizione sito di *splicing*

Software

- ▮ **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
- ▮ **Allegro 1.2**: analisi di *linkage*
- ▮ **Light Cycler 480 Gene Scanning**: analisi dei risultati HRM
- ▮ **Light Cycler Probe D. v.2.0**: disegno *primers* per HRM

3.1 Analisi del gene SPG11

I dati clinici dei membri di 17 famiglie ARHSP sono riportati in tabella 2.1 in appendice. Il quadro clinico di 18 pazienti ARHSP rivela un fenotipo clinico che potrebbe essere associato alla forma complicata *SPG11* (caratterizzata da assottigliamento del corpo calloso). Per questo motivo è stata effettuata un'analisi di linkage nella regione 15q13-15 tramite nove marcatori riportati in tabella 2.4 (paragrafo 2.3.3). In seguito ad una analisi statistica del tipo Multipoint Linkage Analysis sono stati identificati i valori di lod score relativi ai nove microsatelliti per le 14 famiglie ARHSP-TCC. Solo per 5 di esse è stato individuato un valore di *lod score* positivo (Figura 3.1).

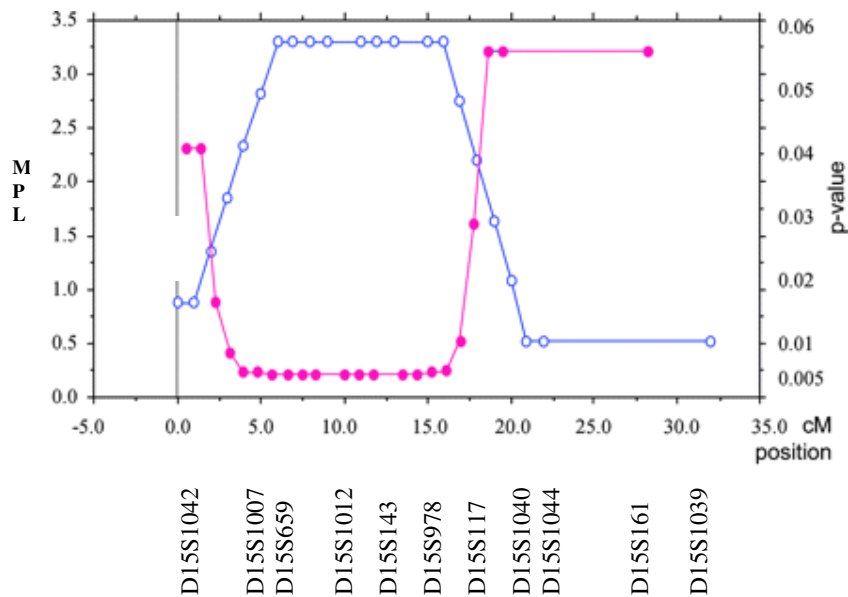


Figura 3.1: esempio di un valore di *lod score* positivo ottenuto per in una famiglia ARHSP-TCC

Successivamente, è stato condotto uno *screening* mutazionale sull'intero gene *SPG11*, costituito da 40 esoni, sui probandi delle cinque famiglie risultate positive all'analisi di *linkage*. Per un'analisi più rapida è stata utilizzata la tecnica dell'HRM. Gli esoni che mostravano curve di *melting* anomale rispetto a un campione controllo sono stati successivamente analizzati per sequenziamento diretto. Le mutazioni identificate sono riportate in tabella 3.1.

Paziente (ID)	Famiglia	Mutazione (esone/introne)	Effetto sulla Proteina	Status	Riferimento Bibliografico
FSL579	RM123	c.2842_2843 insG (ex16); c.6832_6833 delAG(ex37)	p.V948GfsX5; p.S2278LfsX60	Htz; Htz	Stevanin et al.,2007; Stevanin et al., 2007b
SIE104	SIE101	c.5255delT(ex30); c.5986_5987insT(ex31)	p.F1752SfsX85 p.C1996LfsX3;	Htz Htz	Stevanin et al., 2007b Hehr et al., 2007
FSL401	RM110	c.6100C>T(ex32)	p.R2034X	Hmz	Stevanin et al.,2007
CNRD 4383	TOR102	c.5957+1G>A (introne30)	Sito di <i>splicing</i>	Hmz	Presente studio
BO101	BO(A)	c.2608A>G(ex14) c.6258G>T (ex33)	p.I870V (Sito di <i>splicing</i>) p.Leu2086Leu	Hmz Hmz	Presente studio Presente studio

Tabella 3.1: mutazioni e polimorfismi identificati nel gene *SPG11*.

Htz: eterozigote; Hmz: omozigote; IVS: introne; ex: esone; c.: numerazione riferita alla sequenza del cDNA; p.: numerazione riferita alla sequenza proteica; ins: inserzione; del: delezione; fs: *frameshift*

In particolare, nel probando della famiglia RM123 sono state riscontrate curve di *melting* anomale in due esoni del gene *SPG11*. Dal sequenziamento diretto dei due esoni sono risultate due mutazioni in eterozigosi. La mutazione nell'esone 16 è dovuta ad un'inserzione di una G tra il nucleotide 2842 e il nucleotide 2843 della sequenza del cDNA del gene *SPG11* riportata in banca dati (NG_008885). Tale mutazione, già riportata in letteratura da Stevanin et al. (2007), genera una sostituzione di una valina in posizione 948 della proteina spatacsina (NP_079413) con una glicina e un successivo *frameshift*, creando un codone di *stop* dopo 5 amminoacidi. La mutazione sull'esone 37 è una piccola delezione di due basi (AG) tra i nucleotidi 6832 e 6833 della sequenza del cDNA. In particolare, in posizione 2278 della proteina spatacsina si genera la sostituzione di una serina con una leucina e la formazione di un *frameshift* che crea un codone di *stop* dopo 60 triplette. Anche questa mutazione già era stata riportata in letteratura da Stevanin et al., (2007b).

Nella famiglia SIE101 il probando SIE104, esaminato mediante HRM, presenta due curve di *melting* differenti rispetto al controllo, rispettivamente per gli esoni 30 e 31. Dal sequenziamento diretto si evince che anche in questo caso si tratta di un eterozigote composto. Entrambe le mutazioni sono già state identificate in letteratura (Stevanin et al., 2007b; Hehr et al., 2007). La mutazione nell'esone 30 riguarda una delezione di una T in posizione 5255 del cDNA. Questa delezione comporta la sostituzione di una fenilalanina con una serina in posizione 1752 della spatacsina e genera anche in questo caso la formazione di un *frameshift* con un codone di *stop* dopo 85 triplette. Per quanto riguarda la mutazione nell'esone 31 si tratta in questo caso di una inserzione di una T tra i nucleotidi 5986 e 5987 del cDNA, che genera un cambio amminoacidico da cisteina a leucina in posizione 1996. Anche in questo caso si ha la formazione di un *frameshift* e di un codone di *stop* dopo 3 amminoacidi.

Nella figura 3.2 sono riportati gli elettroferogrammi relativi all'esone 30 e 31 del campione SIE104.

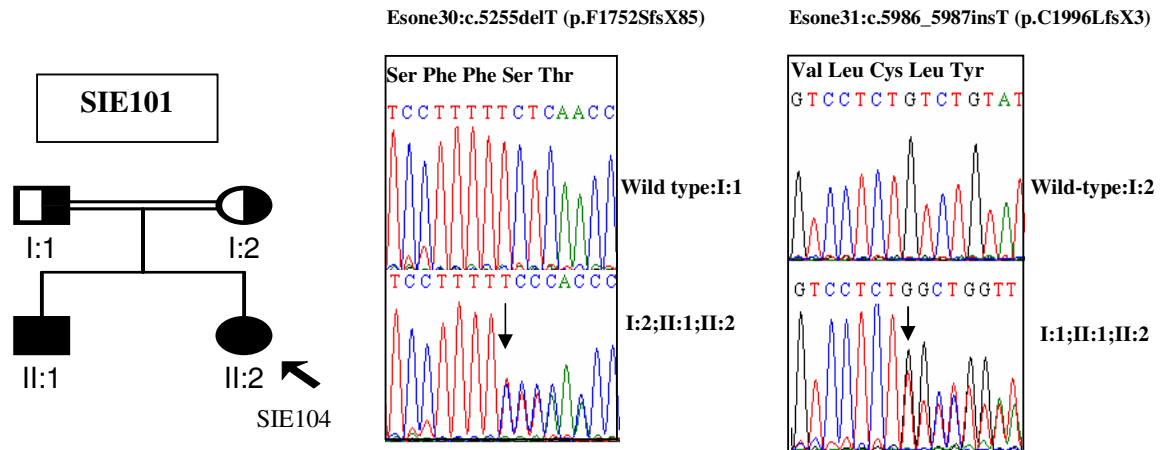


Figura 3.2: rappresentazione dell'albero genealogico della famiglia SIE101 e degli elettroferogrammi delle mutazioni osservate negli esoni 30 e 31.
 c: cDNA; del: delezione; T: timina; p: proteina; F: fenilalanina; S: serina; fs: *frameshift*; X: codone di *stop*; ins: inserzione; C: cisteina; L: leucina; le indicano i nucleotidi mutati

Per quanto riguarda l'analisi della famiglia RM110 il probando (FSL401) ha riportato un profilo di *melting* anomalo nell'esone 32. Il successivo sequenziamento ha evidenziato, in questo caso, una mutazione di tipo omozigote, già riportata in letteratura da Stevanin et al. (2007) (c.6100C>T; p.R2034X) (Figura 3.3). Questa mutazione genera un codone di stop in corrispondenza dell'arginina in posizione 2034 della proteina con conseguente formazione di una proteina tronca che è più corta del 27% rispetto alla proteina normale.

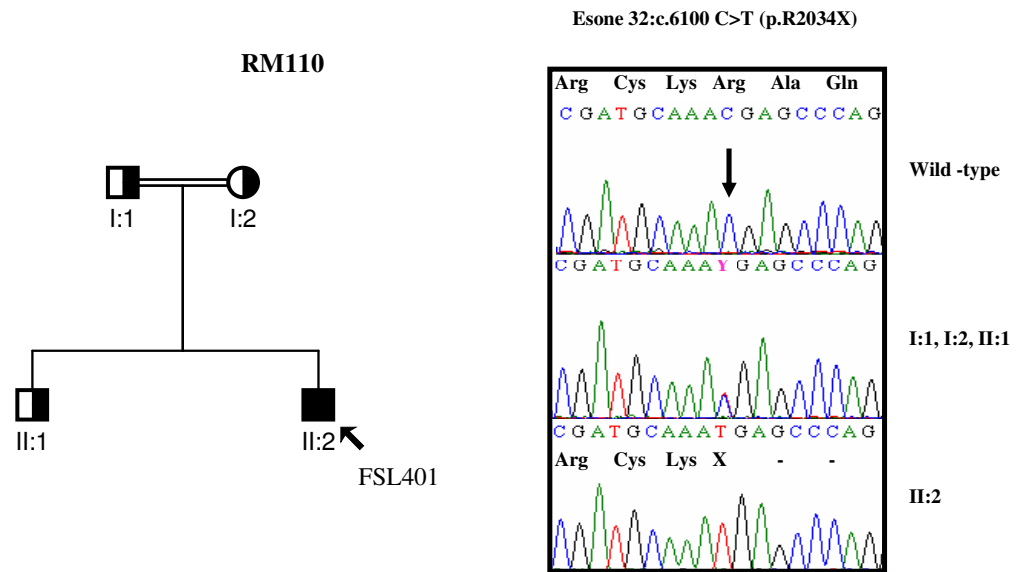


Figura 3.3: rappresentazione dell'albero genealogico della famiglia RM110 in cui il probando è indicato da una freccia. Rappresentazione dell'elettroferogramma di un campione wild-type rispetto al probando e gli altri componenti della famiglia. c: cDNA; C: citosina; T: timina; p: proteina; X: codone di stop; la freccia indica il nucleotide mutato

Nella famiglia TOR102, invece, in seguito ad analisi con l'HRM (Figura 3.4) è stata identificata una transizione da G>A in omozigosi non ancora riportata in letteratura, in corrispondenza del sito accettore di *splicing* (GT) dell'esone 30 (Figura 3.5).

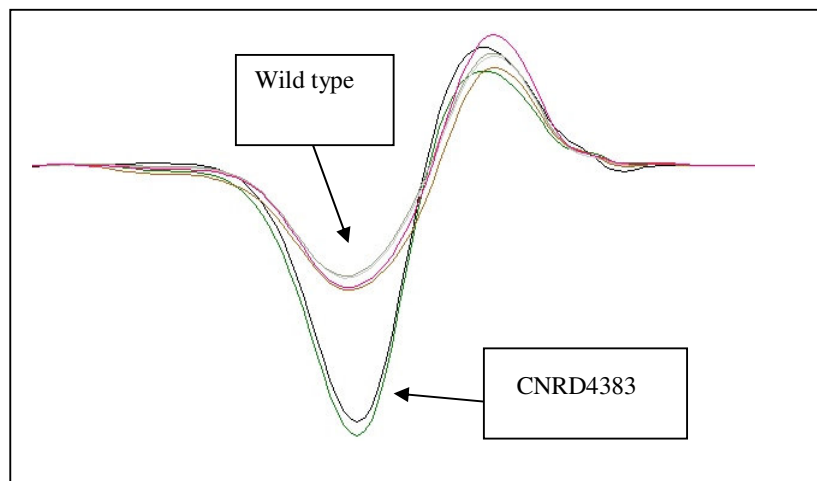


Figura 3.4: curve di *melting* osservate nell'esone30 di alcuni campioni rispetto al *wild-type*.

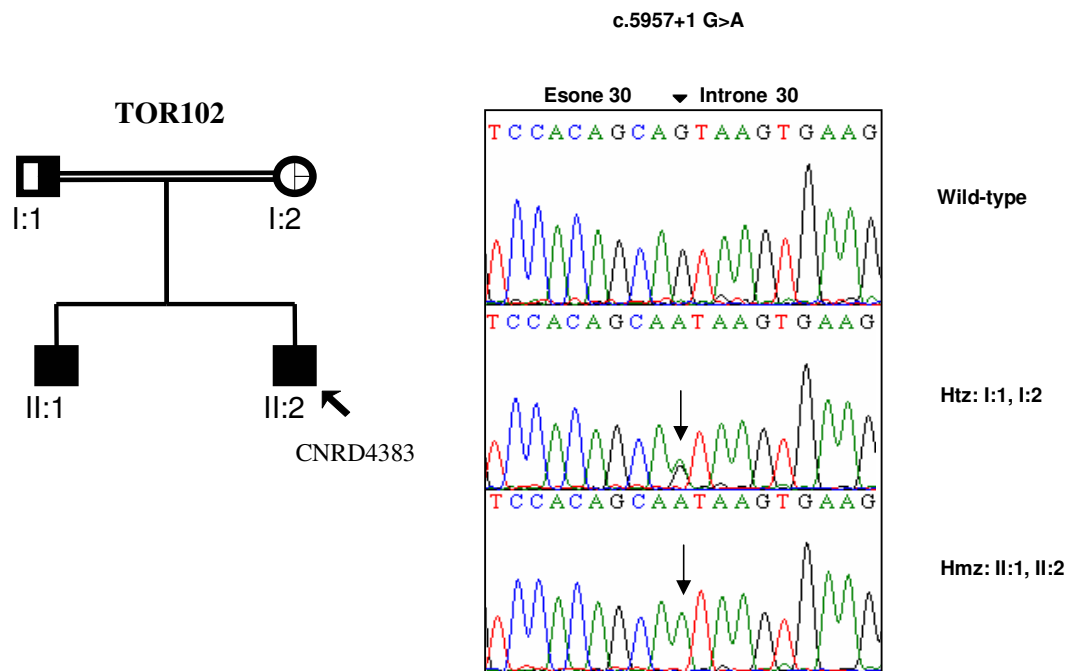


Figura 3.5: albero genealogico della famiglia TOR102 e rappresentazione degli elettroferogrammi del campione *wild-type*, dei membri non affetti e dei membri affetti che riportano la mutazione in omozigosi. Htz: eterozigote; Hmz: omozigote; G: guanina; A: adenina; le frecce indicano il nucleotide mutato

Infine, nel probando BO101 della famiglia BO(A) l'analisi con l'HRM dell'intero gene *SPG11* ha rivelato un'anomalia della curva di *melting* in corrispondenza dell'esone 14, come osservato in figura 3.6. Il sequenziamento di questo esone ha evidenziato la transizione A>G in posizione 2608 del cDNA (Figura 3.7) con conseguente sostituzione di una isoleucina con una valina in posizione 870 della spatacsina.

Per verificare l'effetto della mutazione, apparentemente missenso (c.2608A→G; p.I870V), è stata eseguita una PCR sul cDNA del probando. Il successivo sequenziamento ha dimostrato che l'mRNA del paziente era privo di un frammento di 13 nucleotidi (r.2608_2620del) rispetto al *wild-type*. Questa delezione è dovuta alla creazione di un nuovo sito di *splicing* formatosi (Figura 3.8) in seguito alla mutazione. La delezione crea un *frameshift* a livello di traduzione e genera una proteina tronca.

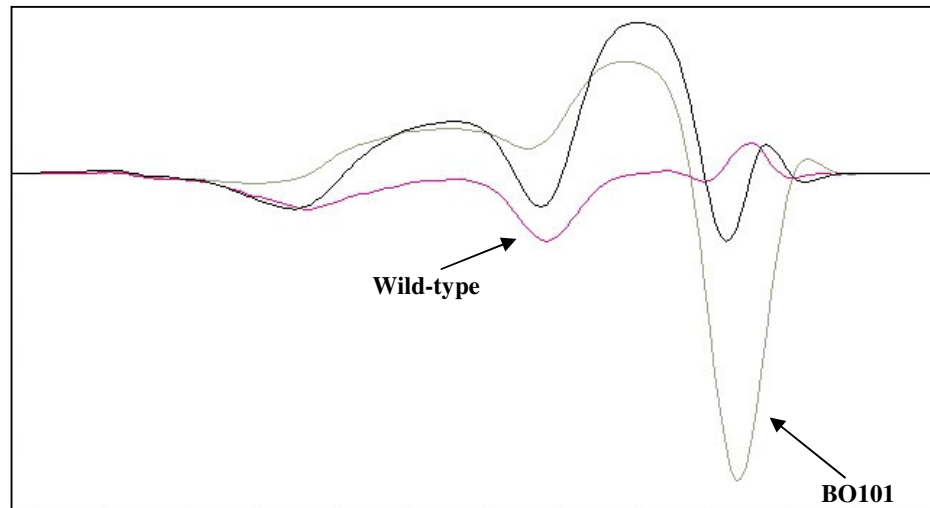


Figura 3.6: curve di *melting* osservate nell'esone 14 di alcuni campioni rispetto al *wild-type*

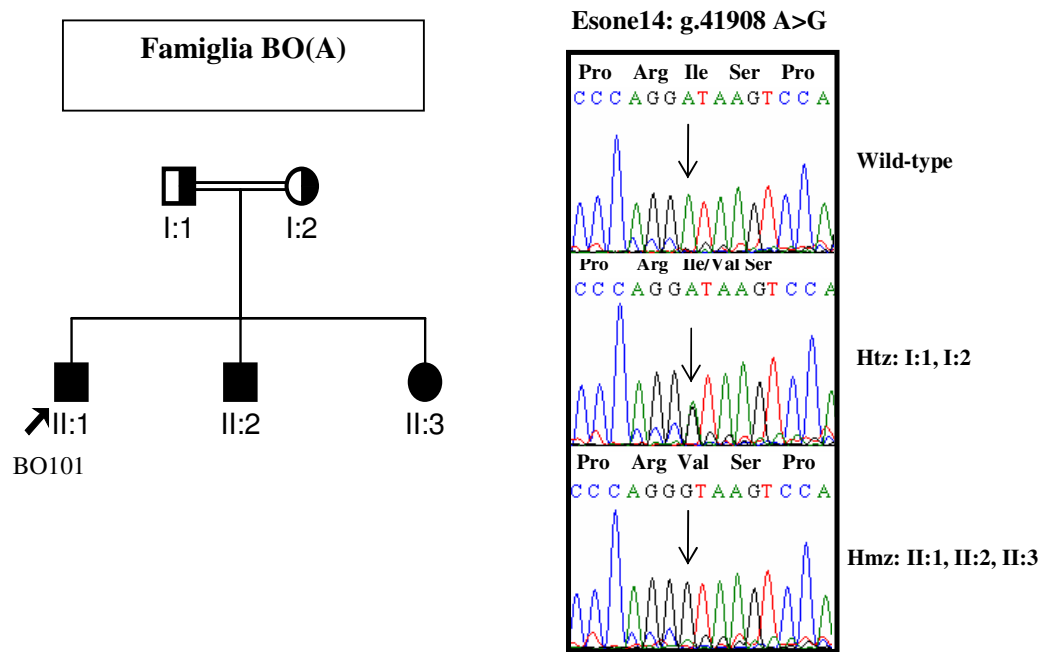


Figura 3.7: albero genealogico della famiglia BO(A). Rappresentazione degli elettroferogrammi di un campione *wild-type*, dei membri non affetti e dei membri affetti che mostrano la mutazione omozigote. Htz: eterozigote; Hmz: omozigote; g.: DNA genomico A: adenina; G: guanina;

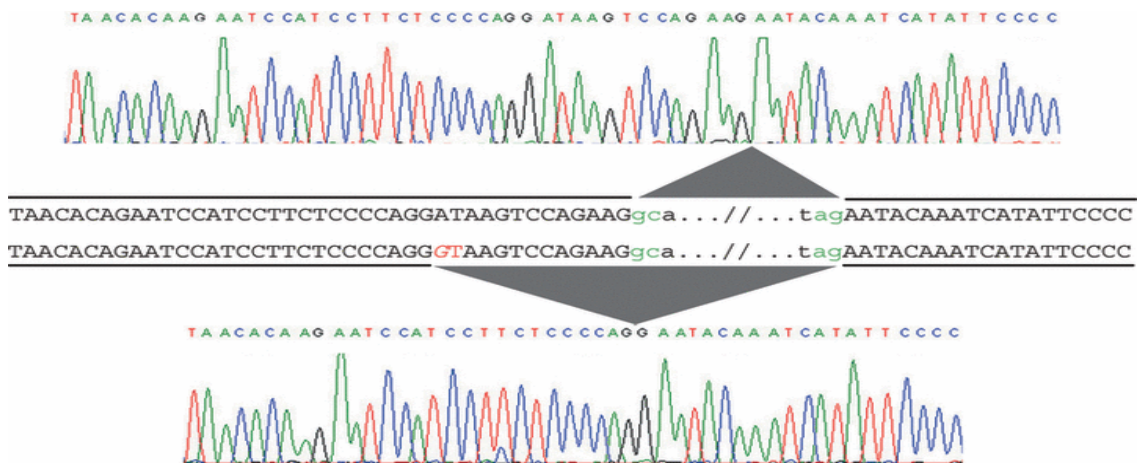


Figura 3.8: elettroferogramma delle sequenze dell'esone 14 a livello del cDNA. In alto è riportata la sequenza del campione di controllo mentre in basso è riportata la sequenza del campione osservato con la mutazione

Inoltre, nella famiglia BO(A) è stata individuata una variante silente in omozigosi nell'esone 33 (c.6289G→T; p.L2086L) e due polimorfismi intronici in eterozigosi (g.323G→A; g.29996_97insT) rispetto alla sequenza genomica di *SPG11* riportata in *Gene Bank* (NC_000015.8). Fino ad ora sia la mutazione silente dell'esone 33, sia i due polimorfismi che ricadono rispettivamente nell'introne 1 e nell'introne 7, non sono riportati in letteratura.

Tutte le mutazioni identificate in *SPG11* sono state confermate tramite una seconda PCR indipendente eseguita sul probando. Invece, la segregazione delle mutazioni all'interno delle famiglie è stata verificata o con digestione tramite enzimi di restrizione o tramite il sequenziamento diretto di tutti i membri affetti e non affetti.

Infine, per escludere la presenza delle mutazioni nella popolazione sana è stato effettuato uno *screening* su 100 cromosomi di controllo. Questa analisi è stata condotta mediante CSCE, una tecnica più rapida rispetto al sequenziamento diretto. Tale analisi ha escluso che le varianti riscontrate in *SPG11* possano essere polimorfismi.

3.2. Analisi del gene SPG7

I 12 probandi delle famiglie ARHSP pure e complicate e 14 casi apparentemente sporadici sono stati analizzati per il gene *SPG7*, uno dei geni più conosciuti, responsabile di ARHSP sia pura che complicata.

L'analisi del gene *SPG7* è stata effettuata mediante l'HRM: sono state ottenute curve di *melting* anomale negli esoni 4, 7, 9 e 10, nella maggior parte dei campioni, e nell'esone 11 e 15 solo per il campione FSL1283, rispetto a un controllo *wild-type*. Il successivo sequenziamento ha individuato le varianti riportate in tabella 3.2.

Tabella 3.2 Polimorfismi identificati nel gene *SPG7*

Esone/introne	Mutazione	Effetto sulla proteina	Status	Tipo di mutazione	Pazienti (n)	Bibliografia
Introne 4	g.15863 T>C	-	Htz/Hmz	Transizione	21	Presente studio
Introne 7	g.22417 A>G	-	Htz/Hmz	Transizione	15	Presente studio
Introne 6	g. 22253 G>T	-	Hmz	Transizione	1	Presente studio
Introne 9	g.24280G>A	-	Htz/Hmz	Transizione	7	Presente studio
Introne 10	g.36395 G>A	-	Htz/Hmz	Transizione	6	Presente studio
Introne 10	g.38233 G>A	-	Htz	Transizione	1	Presente studio
Esone 11	g.38319 A>G	p.T503A	Htz	Missenso	1	Wilkinson et al., 2004
Esone 15	g.45524 G>A	p.R688Q	Htz	Missenso	2	Wilkinson et al., 2004

In particolare, nel campione FSL1283 sono presenti 2 polimorfismi esonici (g.38319 A>G; g.45524 G>A) rispetto alla sequenza genomica di *SPG7* (NC_000016). La prima variante si trova nell'esone 11 è una transizione A>G. Tale cambio nucleotidico genera una modifica nella proteina con sostituzione di una treonina con una alanina in posizione 503 della sequenza

della paraplegina (NP_955399.1). La seconda, invece, si trova nell'esone 15 ed è una transizione G>A, che genera un cambio amminoacidico da arginina a glutammina in posizione 688 della proteina.

3.3 Analisi del gene SPG5A

I campioni apparentemente sporadici e i probandi delle famiglie ARHSP risultati negativi per il gene *SPG7* sono stati analizzati per il gene *SPG5A*. L'analisi mediante l'HRM ha rivelato un'alterazione nell'esone 1 nella maggior parte dei campioni (74%).

Dal successivo sequenziamento diretto dei campioni in questione si è evidenziata la presenza di un polimorfismo in posizione 345 della sequenza genomica (NT_008183), precisamente nell'introne 1 dopo 19 nucleotidi rispetto alla sequenza codificante (c.122+19A>T; NM_004820). Il polimorfismo è presente sia in forma eterozigote sia in forma omozigote. Tale cambio nucleotidico era già stato riportato nella banca dati delle SNPs (rs7842714) e pubblicato di recente anche da Schüle e collaboratori (2008) riscontrato in circa la metà dei campioni analizzati.

Inoltre, sono state trovate alterazioni nella curva di *melting* nell'esone 4 del probando FSL205 della famiglia RM109 affetta da ARHSP-TCC e dell'esone 5 nel campione FSL1047 probando della famiglia RM142.

Il sequenziamento diretto dell'esone 4 ha identificato la sostituzione di una A>G in posizione 183598 della sequenza genomica del gene *SPG5A*. Tale mutazione è stata osservata in omozigosi (Figura 3.9).

Dal punto di vista della proteina la mutazione genera la sostituzione di una treonina con un'alanina in posizione 297 (NP_004811).

La seconda mutazione trovata nel probando FSL1047 (RM142), non riportata in letteratura, riguarda la sostituzione nucleotidica T>C in posizione 194097 della sequenza genomica di *CYP7B1* in omozigosi (Figura 3.10).

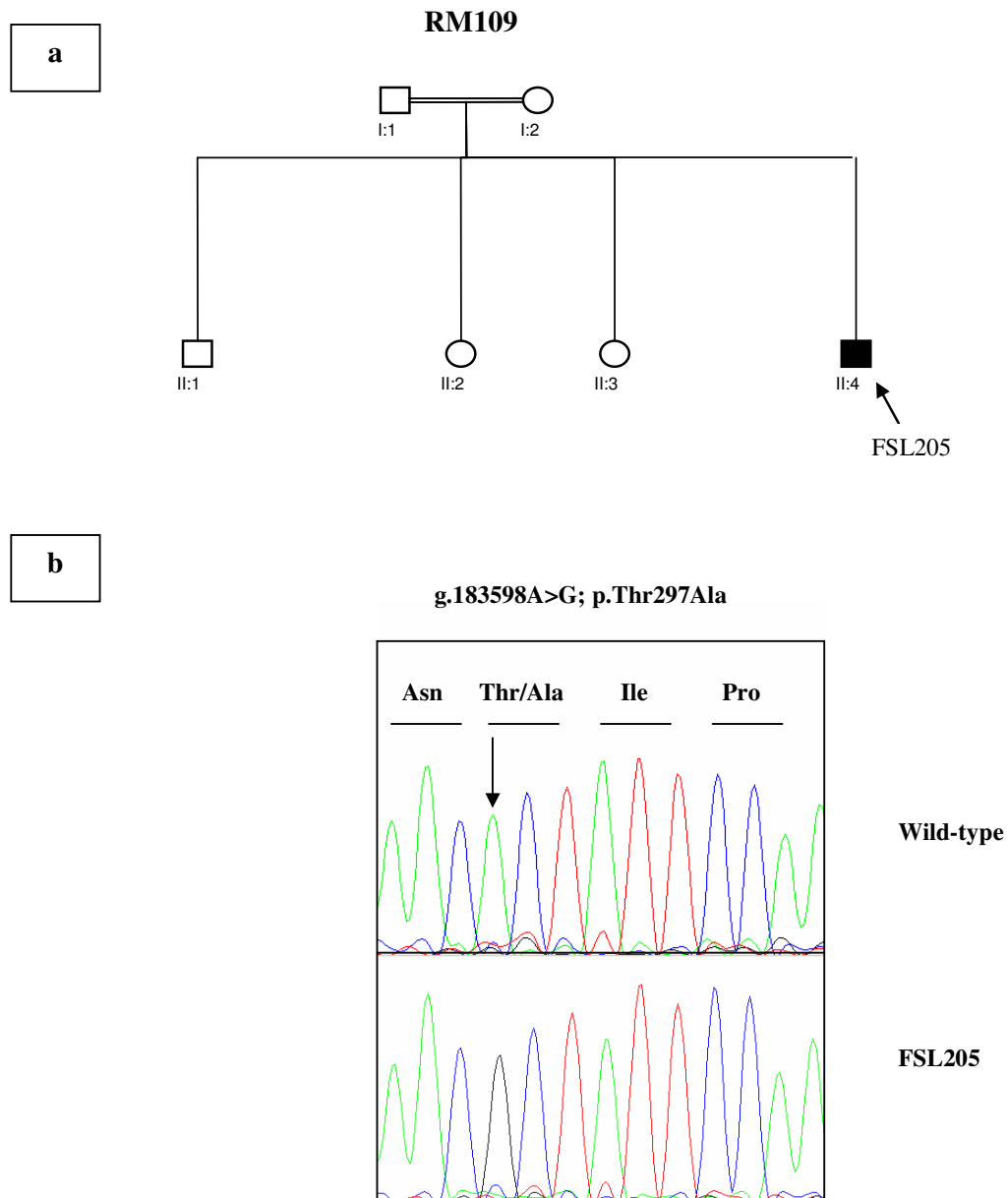


Figura 3.9: albero genealogico della famiglia RM109 (a). Rappresentazione degli elettroferogrammi di un campione *wild-type*, del paziente FSL205 che mostra la mutazione omozigote (b). g.: DNA genomico A: adenina; G: guanina.

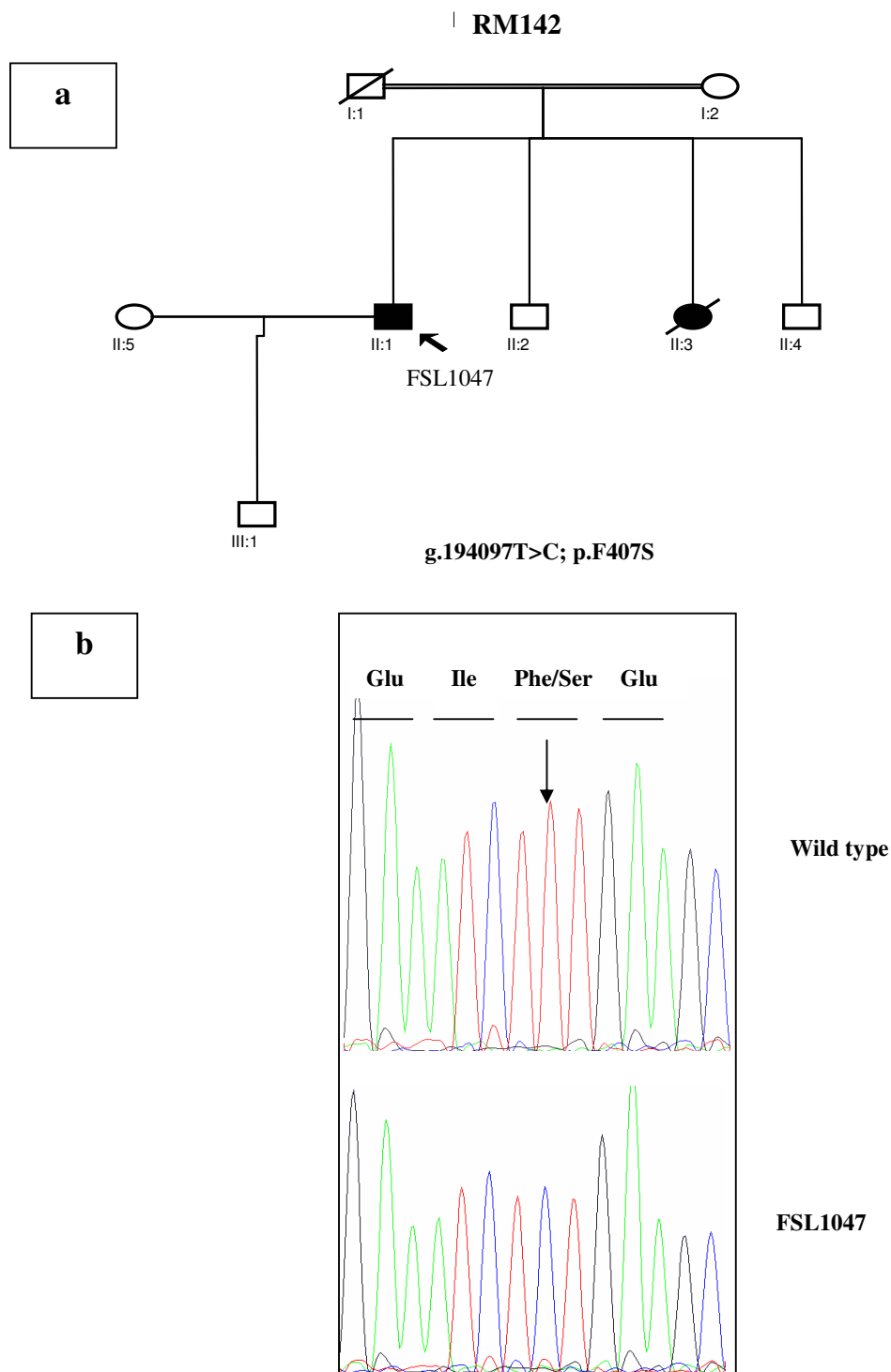


Figura 3.10: albero genealogico della famiglia RM142 (a). Rappresentazione degli elettroferogrammi di un campione *wild-type*, del paziente FSL1047 che mostra la mutazione omozigote (b). g.: DNA genomico T: timina; C: citosina.

Dal punto di vista della proteina, la mutazione provoca la sostituzione della fenilalanina in posizione 407 sostituendola con una serina.

In seguito è stata effettuata una seconda PCR indipendente sui due probandi mutati delle famiglie RM142 e RM109, per confermare le mutazioni identificate.

Inoltre, la segregazione delle mutazioni all'interno delle famiglie è stata verificata o con digestione tramite enzima di restrizione o tramite il sequenziamento diretto di tutti i membri delle due famiglie (Figura 3.11).

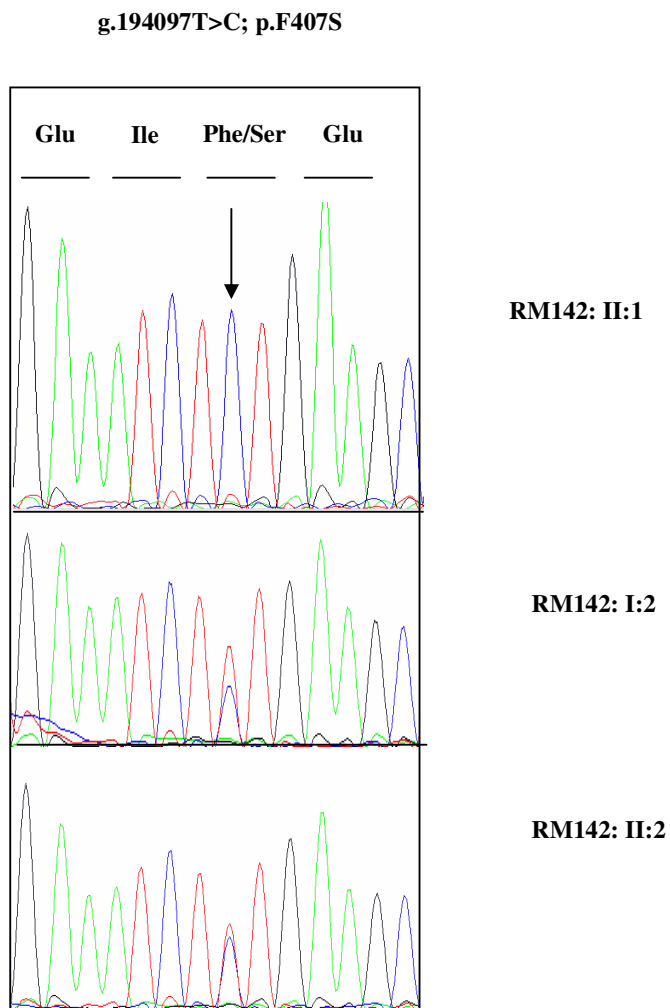


Figura 3.11: elettroferogrammi relativi alla famiglia RM142; la freccia indica il nucleotide mutato. g.: DNA genomico T: timina; C: citosina; Glu: acido glutammico; Ile: isoleucina; Phe/F: fenilalanina; Ser/S: serina.

Infine, l'analisi mediante CSCE di 100 cromosomi di controllo ha dimostrato che le due mutazioni non sono presenti negli individui sani. Quindi questi cambi amminoacidici possono essere considerati mutazioni patogeniche e non polimorfismi.

Capitolo 4-Discussione e Conclusioni

4.1 Discussione

La distribuzione delle mutazioni individuate nel gene *SPG11* riguarda non solo pazienti della popolazione italiana ma anche di origine asiatica. In totale sono state identificate sette mutazioni diverse di cui quattro mutazioni di *frameshift*, una mutazione nonsense e due mutazioni di *splicing*.

Nel caso del campione italiano sono state trovate mutazioni patogenetiche in *SPG11* in pazienti provenienti da tre diverse regioni (Campania, Toscana ed Emilia Romagna). In particolare, nel caso di due delle famiglie italiane (RM123 e RM101) i probandi risultano essere eterozigoti composti da 4 diverse mutazioni di *frameshift* (tabella 3.1). Queste mutazioni, localizzate in diversi esoni del gene, hanno come effetto la formazione di un codone di *stop* che genera una proteina tronca, probabilmente non funzionale. Lo stesso meccanismo patogenetico si ritrova per la mutazione nonsense (tabella 3.1) presente nella famiglia RM110. Questa mutazione presenta una frequenza del 70% nel nord Africa (Stevanin et al., 2008); ma è la prima volta che viene riportata in una famiglia dell'Italia meridionale, questo dato porterebbe ad ipotizzare un evento mutazionale con effetto fondatore esteso al Bacino del Mediterraneo. Infine, le due mutazioni di *splicing* (tabella 3.1), identificate in una famiglia asiatica ed una italiana, sono entrambe omozigoti ed ancora non riportate in letteratura. In particolare, mentre la consanguineità della famiglia TOR102 è accertata, lo stato di omozigosi per la famiglia BO (A) non proviene da una consanguineità certa. Il fatto che i genitori presentino lo stesso aplotipo supporta l'ipotesi che la mutazione sia stata ereditata da un antenato comune. Questa mutazione è la seconda osservata nell'esone 14 dopo la mutazione c.2472insT riportata da Hehr e collaboratori (2007) e conferma l'ampia distribuzione delle mutazioni di *SPG11* per tutta la lunghezza del gene. L'assenza di *hot spots* mutazionali in specifici esoni suggerisce un completo *screening* di *SPG11* (Pippucci et al., 2008).

Mutazioni che alterano il sito di *splicing* sono già state descritte in precedenza (Stevanin et al., 2007; Hehr et al., 2007; Stevanin et al., 2008) insieme ad altri tipi di mutazioni come piccole delezioni ed inserzioni o mutazioni nonsense che generano tutte una proteina tronca. I risultati di questa tesi per il gene *SPG11* confermano ulteriormente la teoria di un meccanismo di perdita di funzione che rappresenta uno dei migliori modelli per spiegare l'insorgenza di una malattia con trasmissione autosomica recessiva.

L'analisi del gene *SPG7* ha evidenziato solo variazioni nucleotidiche (tabella 3.2) che non alterano la funzione della proteina. Tra queste due polimorfismi esonici erano già stati riportati da Wilkinson e collaboratori (2004). L'assenza di mutazioni patogenetiche nel presente studio per il gene *SPG7* non sorprende, poiché in letteratura la frequenza mutazionale della paraplegina è del 4% (Arnoldi ed al., 2008) nonostante sia uno dei primi *loci* ad essere stato identificato per le forme ARHSP. Nel complesso i risultati ottenuti confermano che mutazioni nel gene della paraplegina sono una rara causa di HSP, considerando sia le forme familiari che apparentemente sporadiche.

Per quanto riguarda il gene *SPG5A* sono state trovate 2 mutazioni missenso in stato omozigote, non ancora riportate in letteratura, in due famiglie italiane (RM109 e RM142). Entrambe le mutazioni ricadono nel dominio catalitico P450.

In particolare, il probando FSL205 della famiglia RM109 presenta il cambio nucleotidico g.183598G>A che determina la sostituzione amminoacidica p.Thr297Ala. Questo cambio amminoacidico corrisponde alla sostituzione di un amminoacido polare non carico con un amminoacido apolare, che potrebbe generare una alterazione della proteina a livello strutturale e/o funzionale.

La seconda mutazione, osservata nel probando FSL1047 della famiglia RM142, ricade in posizione 194097 della sequenza genomica di *CYP7B1* e prevede la sostituzione di una fenilalanina con una serina in posizione 407 della proteina. In questo caso un amminoacido

aromatico, con un notevole ingombro sterico, viene sostituito da un amminoacido polare non carico. Dunque, questa sostituzione amminoacidica potrebbe provocare una variazione nella struttura della proteina e quindi un'alterazione della sua funzione.

La sostituzione p.Phe407Ser 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 B et al., 2003). Le molecole di citocromo P450 sono state ritrovate nei neuroni, in particolare sono altamente espresse nelle cellule piramidali delle sezioni ippocampali umane; ciò è compatibile con un importante ruolo nei neuroni di moto, che normalmente degenerano nei pazienti HSP. In questo modo il cambio amminoacidico potrebbe influire a livello regolativo sulla funzione della proteina CYP7B1.

CYP7B1 è un enzima in grado di convertire il DHEA in 7-OH-DHEA, appartiene a un gruppo di neurosteroidi neuroprotettivi (Pringle AK. Et al., 2003a). Per questo motivo la neurodegenerazione osservata in seguito a mutazioni nel gene CYP7B1 potrebbe essere associata alla perdita della funzione neuroprotettiva dei neurosteroidi correlati a DHEA (Pringle AK. Et al., 2003b).

Infine, la presenza di una mutazione patogenetica in *SPG5A* in un individuo che presenta clinicamente l'assottigliamento del corpo calloso dimostra l'eterogeneità genetica della forma ARHSP-TCC.

4.2 Conclusioni

L'analisi dei campioni ARHSP qui riportata dimostra senza dubbio la vasta eterogeneità genetica già sottolineata da diversi autori (Lossos et al., 2006; Stevanin et al., 2006; Schule et al., 2008).

L'identificazione di sette mutazioni (di cui 5 già note) nel gene *SPG11* evidenzia come tale gene sia uno dei geni più diffusi per le forme complicate di ARHSP. In precedenza già Stevanin e collaboratori (2007) avevano riportato mutazioni nel 26% dei casi sporadici HSP con TCC e nel 40% dei casi con forme complicate di ARHSP.

L'analisi delle famiglie ARHSP-TCC per il *locus SPG11* è solo l'inizio di una lunga indagine. Altri *loci*, infatti, sono stati identificati essere responsabili di forme HSP complicate da assottigliamento del corpo calloso. Uno di questi è il gene *ZFYVE26* identificato di recente da Hanein et al., (2008) mappato sul cromosoma 14q22-24 corrispondente al *locus SPG15*.

Inoltre, l'identificazione di nuovi geni per le forme ARHSP ha dimostrato come il gene *SPG7*, il primo gene identificato per queste forme, sia una causa piuttosto rara di HSP sia pure che complicate (McDermott et al., 2007).

Il fatto che la paraplegina sia un gene poco frequente nelle forme ARHSP è dimostrato anche dai risultati di questa tesi in cui sono stati evidenziati solo polimorfismi.

Nel presente studio si è osservata una frequenza del 7,4% di mutazioni patogenetiche nel gene *CYP7B1*; questa frequenza permette di considerare *SPG5A* una delle cause più comuni associata alle forme ARHSP.

Inoltre, il fatto che un paziente con TCC presenti una mutazione patogenetica sul gene *SPG5A* dimostra ulteriormente il carattere eterogeneo delle HSP.

L'identificazione di mutazioni in *CYP7B1* associate a pazienti HSP rappresenta la prima dimostrazione del fatto che anomalie nel metabolismo del colesterolo possono essere associate

alla patogenesi della degenerazione dei neuroni di moto. Le prime evidenze di questo tipo di associazione sono state osservate da Tsaousidou et al. (2008) e recentemente anche da Schüle et al. (2008).

Il ruolo così eterogeneo delle HSP ha reso complicata l'indagine dei campioni ARHSP analizzati in questa tesi. Infatti, uno *screening* iniziale si è basato sulla corretta analisi clinica dei pazienti. Per questo motivo, nonostante l'indagine mutazionale dei geni *SPG5A*, *SPG7* e *SPG11* su un totale di 31 individui non sono state riscontrate mutazioni patogenetiche in 24 pazienti pari ad una frequenza del 77%. Quindi, sulle famiglie ARHSP risultate negative per tali geni sarebbe opportuno effettuare un'analisi di *linkage* per individuare una possibile associazione con altri *loci* ARHSP. Invece, per i casi apparentemente sporadici non caratterizzati finora a livello genetico sarebbe opportuno estendere lo studio mutazionale ai geni più comuni per le ADHSP.

In conclusione, il presente studio ha comunque arricchito lo spettro mutazionale dei geni *SPG11* e *SPG5A* confermando l'eterogeneità sia *intra* che *inter locus* nella genetica delle HSP.

Appendice

Tabella 1.1. Descrizione dei loci HSP finora identificati secondo la nomenclatura HUGO

Gene	Proteina	Locus	Funzione	Bibliografia	Trasmissione genetica	Tipo di HSP
<i>SPG1</i>	L1 cell adhesion molecole (L1CAM)	Xq28	Appartiene alla categoria di molecole che si occupano dell'adesione cellula-cellula. Mutazioni nel gene L1CAM sono responsabili dell'HSP e della sindrome definita MASA	Jouet et al., 1994	X-linked	Complicata
<i>SPG2</i>	PLP	Xq22		Bonneau et al., 1993 Saugier-Weber P et al., 1994	X-linked	Complicata
<i>SPG3A</i>	Atlastina	14q11-q21		Hazan et al., 1993 Rainier et al., 2001	ADHSP	
<i>SPG4</i>	Spastina	2p22	Interagisce con i microtubuli giocando un ruolo fondamentale nella loro dinamica	Durr t al., 1996	ADHSP	Non complicata
<i>SPG5A</i>	-	8q12-q13	-	Hentati et al., 1994	ARHSP	Non complicata
<i>SPG6</i>	NIPA1 (non imprinted gene in Prader-Willi syndrome/Angelman syndrome)	15q11.1	-	Fink et al., 1995	ADHSP	Non complicata
<i>SPG7</i>	Paraplegina	16q24.3	Proteina mitocondriale	Koyama et al., 1993	ARHSP	Complicata o non complicata
<i>SPG8</i>	Strumpellina	8q23.4-q24	-	Hedera et al., 1999	ADHSP	Non complicata
<i>SPG9</i>	-	10q23.3-q24.2	-	Slavotinek et al., 1996	ADHSP	Complicata
<i>SPG10</i>	KIF5A (Kinesin Heavy Chain)	12q13	Coinvolta nel trasporto assonale	Reid et al., 1999	ADHSP	Complicata o non complicata
<i>SPG11</i>	Spatacsina	15q21.1	-	Martinez Murillo et al., 1999	ARHSP	Complicata o non complicata
<i>SPG12</i>	-	19q13	-	Reid et al.,	ADHSP	Complicata o

				2000		non complicata
SPG13	HSP60 (heat shock protein)	2q33.1 (in origine 2q24-34)	Chaperone coinvolta nel folding delle proteine	Hansen et al., 2002	ADHSP	Non complicata
SPG14	-	3q27-28	-	Vazza et al., 2000	ARHSP	Complicata
SPG15	RTN1 (anche se altre analisi mutazionali riportate da Mannan nel 2006 escludono tale gene come causa dell'HSP)	14q22-24	-	Hughes et al., 2001	ARHSP	Complicata
SPG16	-	Xq11.2	-	Steinmuller et al., 1997	X-linked	Complicata o non complicata
SPG17	BSCL2 (seipina)	11q13		Patel et al., 2001	ADHSP	Complicata (Sindrome di Silver)
SPG18						
SPG19	-	9q33-34	-	Valente et al., 2002	ADHSP	Complicata
SPG20	Spartina	13q12.3	Coinvolta nel traffico endosomale e nel movimento dei microtubuli	Cross et al., 1967	ARHSP	Complicata (Sindrome di Troyer)
SPG21	Maspardina	15q21-22	È un regolatore negativo dell'attività di CD4	Cross et al., 1967	ARHSP	Complicata (Sindrome di MAST)
SPG22	-	Xq21	-	Claes et al., 2000	X-linked	
SPG23	-	1q24-q32	-	Blumen et al., 2003	ARHSP	Complicata
SPG24	-	13q14	-	Hodgkinson et al., 2002	ARHSP	Complicata
SPG25	-	6q23.3-24.1	-	Zortea et al., 2002	ARHSP	Complicata
SPG26	-	12q11.1-14	-	Wilkinson et al., 2005	ARHSP	Complicata
SPG27	-	10q22.1-24.1	-	Meijer et al., 2004	ARHSP	Non complicata
SPG28	-	14q21.3-22-3	-	Bousslam et al., 2005	ARHSP	Non complicata
SPG29	-	1p31.1-21.1	-	Orlacchio et al., 2005	ADHSP	Complicata
SPG30	-	2q37.3	-	Klebe et al.,	ARHSP	Complicata

				2006		
<i>SPG31</i>	REEP1	2q11.2	-	Zuchner et al., 2006	ADHSP	Non complicata
<i>SPG32</i>	-	14q12-q21	-	Stevanin et al., 2007	ARHSP	Complicata
<i>SPG33</i>	Protrudina	10q24.2	-	Mannan et al., 2006	ADHSP	Non complicata
<i>SPG34</i>	-	Riservato	-	-	ADHSP	-
<i>SPG35</i>	-	16q21-q23	-	Dick K.J. et al., 2008	ARHSP	Complicata
<i>SPG36</i>	-	12q23-24	-		ADHSP	-
<i>SPG37</i>	-	8p21.1-q13.3	-	Hanein S et al., 2007	ADHSP	-
<i>SPG38</i>	-	4p16-p15	-	Orlacchio et al., 2008	ADHSP	Complicata
<i>SPG39</i>		19p13	Esterase target neuropathy	Rainier S et al., 2008	ARHSP	Complicata
<i>SPG41</i>	-	11p14.1- p11.2	-		ADHSP	-

Famiglia	ID	Sesso	Età del paziente	Età di esordio	Segni piramidali		Alterazione della percezione delle vibrazioni		Grado di disabilità (scala da 1 a 5)	Grado di problemi urinari (EDSS) Scala da 1 a 4	Ritardo mentale	Pes cavus	TCC	Epilessia	Disfunzioni cognitive (Meno o più)	MRI		Altri sintomi
					LL	UL	LL	UL								Area di atrofia (F: regione frontale; FT: regione fronto temporale)	Grado di atrofia(1 normal,2 mild 3 moderate 4 severe)	
RM108	FSL194	M	35	28	+	-	-	-	2	1	-	+	+	-	-	-	-	-
RM112	FSL425	F	42	33	+	-	-	-	2	2	-	+	+	-	-	-	-	-
RM123	FSL579	M	38	35	+	-	-	-	3	2	-	+	+	-	-	-	-	-
RM109	FSL205	M	39	36	+	-	-	-	2	1	-	+	+	-	-	-	-	-
MIL101	FSL224	M	42	39	+	-	-	-	4	3	-	+	+	-	-	-	-	-
RM142	FSL1047	M	60	35	+	-	-	-	4	2	-	-	-	-	-	-	-	Ipoacusia bilaterale
BO(A)	BO101	M	/	/	+	-	-	-	3	1	-	-	+	-	-	-	-	-
BO(B)	BO102	/	/	/	+	-	-	-	2	2	-	-	+	-	-	-	-	-
TOR102	CNRD4383	M	71	51	+	-	+	-	3	2	-	-	+	-	-	-	-	-
TOR103	CNRD4451	M	26	22	+	-	-	-	2	2	-	+	+	-	-	-	-	-
TOR104	CNRD4471	M	56	51	+	-	-	-	2	2	-	+	+	-	-	-	-	-
TOR105	CNRD4811	F	64	60	+	-	-	-	3	3	+	+	+	-	-	-	-	sordità
TOR109	CNRD5736	M	38	33	+	-	-	-	4	2	+	+	+	-	-	-	-	-
TOR109	CNRD5822	M	54	50	+	-	-	-	3	4	+	-	+	-	-	-	-	-
TO110	CNRD4524	F	50	/	-	-	-	-	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-
SIE101	SIE104	F	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	BRA6825	M	/	/	+	-	-	-	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	BRA6828	F	/	/	+	-	-	-	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	BRA6829	F	/	/	+	-	-	-	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	BRA6831	F	/	/	+	-	-	-	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	BRA6836	F	/	/	+	-	-	-	2	2	-	-	+	-	-	-	-	-
	BRA6838	M	/	/	+	-	-	-	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	BRA6841	M	/	/	+	-	-	-	2	1	-	-	+	-	-	-	-	-
	BRA6844	M	/	/	+	-	-	-	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	BRA6842	M	/	/	+	-	-	-	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-
RM110	FSL402	M	55	51	+	-	-	-	2	3	-	+	+	+	+	FT	3	-
	FSL1279	F	64	58	+	-	-	-	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-
	FSL1281	M	71	/	+	-	-	-	4	3	-	-	-	-	-	-	-	-
	FSL1283	M	29	19	+	-	-	-	4	4	-	-	-	-	-	-	-	-
	BO109	F	/	/	+	-	-	-	3	1	-	-	+	-	-	-	-	-
	FSL1294	F	47	20	+	-	-	-	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabella 2.1 Dati clinici dei campioni analizzati. F: femmina; M: maschio; +: presenza dei sintomi; -: assenza dei sintomi; LL: arto inferiore; UL: arto superiore; F: regione frontale; FT: regione frontotemporale; N: normale; Mi: leggero; Mo: moderato; S: grave.

Tabella 2.5. elenco degli oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione degli esoni dei geni *SPG11*, *SPG5A* e *SPG7*.

Esone	<i>SPG11</i> Oligonucleotidi	Temperatura di <i>annealing</i>
1	CCACAGGAAACGAATGGAAT GGTCTGTGAGGAAACCACG	58°C
2	GAGGTCTAGAGCAGTTTATG CAAGTGCTCAATAGCCCAT	60°C
3	CAGGGACATTGTAGGCCATC CCACACTTCCTATATCCCAG	60°C
4	CAGGTTCTTTATTGTGGCATCA CGAGGATATTTTAACTCTTATCA	60°C
5	CAAGGGAGATAAGGAGTTCC GACCTTTAATGAAAGGGTACAG	60°C
6	ATGCTGACGCTGTACCCTTT CAGGCACTGAGCAGAAGTA CTCTATGGGTTCCTCTTGTT	60°C
7	GAGACTCTGTCTCTAAAAAGG CTAAGCAGAGTTAGGGTAATG	60°C
8	CTTGCCCCAGATTGCATAAT TCCAAAAAGTACGTAAAATCCCA	60°C
9	CAGCAAAAGGGTAATAGCAGTG CCCAAATGTAGTAAATGGCG	60°C
10	CCCAGGACTAATCATGAAGGA ATCCCCAAACCGATAAAACC	60°C
11	CGGTGTGTCTTCCACTAGCTC ACCCAGCCATTCTCAGTGTT	60°C
12	TTTGAAGAGCAGAAAGCTATGG TGAAGGGGTGTACACTTTT	60°C
13	TTGTGGCAAAAGAAAATTTGTG GAGAAATGCAGGCTCAGTTCC	60°C
14	ATGTGGAAGTGCAGCCTGCAT CGACTTGCATTTTAAAGAACCCTG	60°C
15	CACAGCGAGATCCTGTCTCA CCTCACTGTAAGATGATGCC	60°C
16	CCTTTAAATACTACAGTGGTGCAGA GTACCAACTGTTGAGATGGAG	60°C
17	TTGTTTCCAGATCATGAAGAATATG TCAGATAGCTGACCACAGCC	60°C
18	GGGGATAGAGTTAAAAATTTATG GGATTACAGGAGTGAGCCAC	60°C
19	GCTAGTTTGTCTTAGAACGAGAACA TTTGGGTTGTCTCACTATCACA	60°C
20	AAGGAACATAGCCAGTTCTGTTTT TGCGAACTATTTTCCCTTGG	60°C
21	TGCAACTTCTCAGGTACACATCT AGGCTAGAGTGCAAGTGGCAT	60°C
22	AGTCAGCTTAAGGGAAGCGG GAAGATAACCATTTTCTCCCCA	60°C
23	TTGTGAGTGTTTGGGGAGAA GGGGATTAGTGA AACACCA	60°C
24	TTTGTGGAGAATACACTGTGCTT CATGTCTACACAACAGAAAGAATGC	60°C
25	AAAAGGCACCATACAGCTTTG GGAAACACATGCTGGAACCT	60°C
26	CTTCTGTCTGCTTCTTGGTCTT TATCATCATTATCTGTGTGG	60°C
27	TTAGGTGATCCCACTGGCTC CCCAGGAGTCAAGGCTGTA	60°C
28	CTGAGGAGGGCTGTTTTTG TCTGTAAGTTGTTACTCCAGTTG	60°C
29	CCACATTAATGTTAAACACG GGCACCTGTAGTCCCAGCTA	60°C
30	TGAGGTGGGAGGATCTCTTG GATGTGTTTCAGAGCAGCCAA TAAGCTGGAGGAGCTGGAGA TTGTTGTCCTTAACTTGG	60°C
31	TTTGAAGTATCCCAGGGTGG CCACCATTCCCCAAAGATAA	60°C
32	TTACCTGGATTGGCTTTGG ACTGCAATCCAGAAACTTGAG	60°C

33	CAATAGGCCAAGGGTTTCAA TATAACTCCTGCTGGAGGGC	60°C
34	GCTACAGCTGCTAAGTTCAG CTCCTTTGGAGCAACCTCTG	60°C
35	GGTAGCCTGGAATTAGCCC TGAACCAGAATCTGAAGCCA	60°C
36	TTCCAACAGGAAAGCACACA CAGCTACTGGGAGGCTGAG	62°C
37	GCATTAGAAGGGGCACTGAA CTCACAACGGTATTCACCCC	60°C
38	TTTTGTCTTGGGCTCTTTC CCTGGTTCTGTACTAGCCC	60°C
39	CTCCTTTGGAGCAACCTCTG GGATTCTTGATACTGCTTTGCC	60°C
40	CAGTGAGCCAAGACTGCTC CAGGTACAGGTATTCTTTAATC	60°C

SPG7		
esone	Oligonucleotidi	Temperatura di <i>annealing</i>
1	CGCGGCTTTCAGGCCAACATG CAGGCGCAGGCTCCCCGCCG	62°C
2	CCTAAAGCTTTGACCTATTGC GCAACAGGGCGAGTCCCGTC	60°C
3	AATCTTATGGATATAAGTAGG TCCAGACTGGTTTCACCTTGC	60°C
4	CCCCTCCCCGTCCAGCTGAGC CCCTATTACAGGAGCCAC	60°C
5	GGTTGCTCGTCTGTCCCTGCG TTCTCAGATTACAAAGCCAAG	54°C
6	CCATTTTAATCTGCGCATCGG CCTGTGTATTACGTATAGC	60°C
7	GGCTGAGCGCTGGCATCGTGC TAGAGGTCACCGCCAACCCAC	58°C
8	GCACTCCAGCCTGCGTGACCC AAAGGAGCCAGGTAGTCAGCC	60°C
9	GAATGGGGCTGGTAGCTTTAG AAGACATCGGAAAACCTCCTC	60°C
10	CCTGTGTCCTGAAGGGGAACC GACCACTCAGAGCGAGTGGGG	60°C
11	CAAACATGCCGCACCTGTGGC GATGCTGTTTGCGCAGGTGAC	60°C
12	TCTCCCTTGAGGGCCCTTCC AAGACATGAGTTACGCAGAAC	60°C
13	ATCACACCTAGCTAATTTTTC ACAGTGGCAGGCTTTCCTCTC	60°C
14	TTAATGACGGAGACCTCTTAG ACACCAGATTCACCCCATGGC	60°C
15	GTGCCAACGTCTCACTGTCC AGCTGAGCTCCGCTGGGGCGG	62°C
16	CAGGAGACCACCTGTCGGCTG GGATAAAAAGTATGGAACACG	58°C
17	CAGGCCCTCAGCCTCTTGCC TGCAGGGACTACTGAGGGCCG	62°C

<i>SPG5A</i>		
esone	Oligonucleotidi	Temperatura di <i>annealing</i>
1	GAAC TTTGTCATT CAGCCT TGCTGCACTGGAAATCATG	56°C
2	AGCAGTGCAATCCATGCAGT GGTTCCTAAGTACCATGAAG	57°C
3	CATGTAGGTACCTTCGAATG TTCAAGGTCGCCATTTTGTG	57°C
4	GGTTCTCATTAGCATGCACTG AATTAGGCAGCTGTGTCCTC	57°C
5	GAGAGCAGTTTT CAGGACCA GGCGCAATGTCCACTTCATT	57°C
6	AGCAACTTTGTGGACTTGAAC CTGGACTGATATCAGATCAAAT	57°C

Figura 2.1a Rappresentazione schematica degli alberi genealogici delle famiglie analizzate

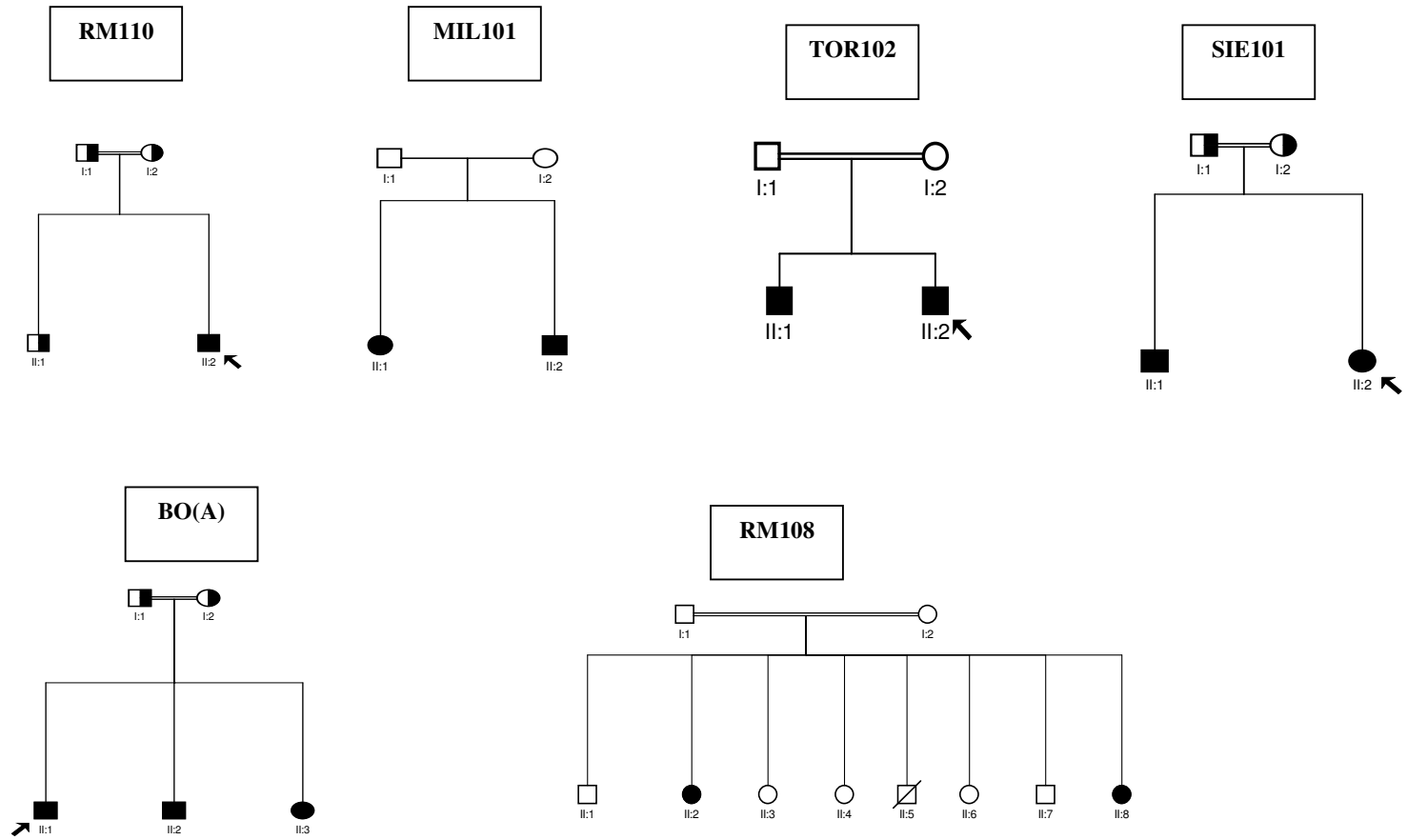


Figura 2.1b rappresentazione schematica degli alberi genealogici delle famiglie analizzate

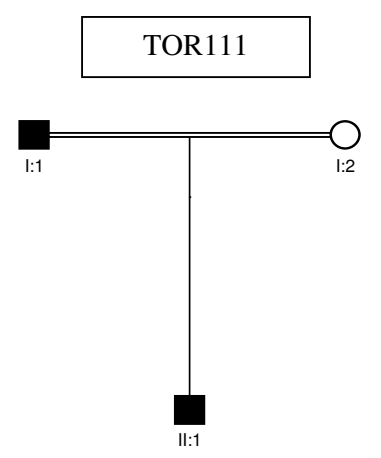
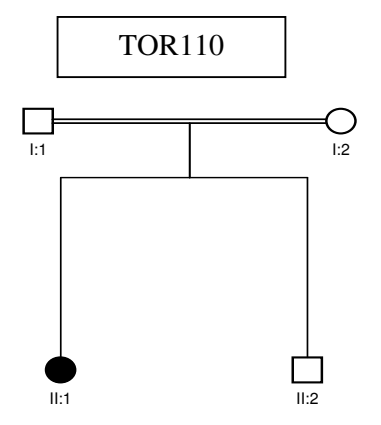
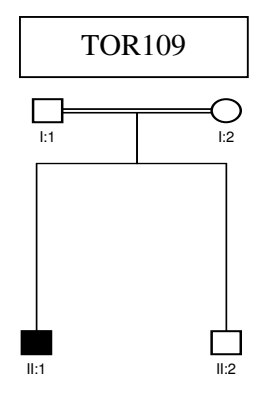
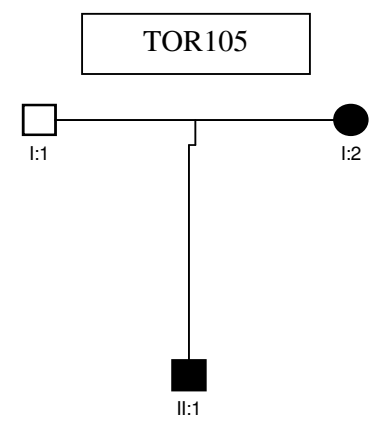
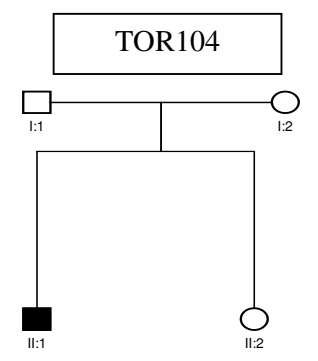
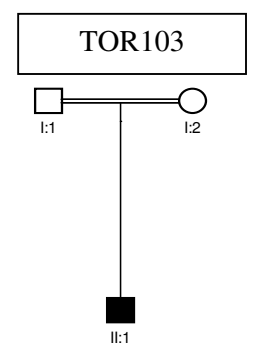
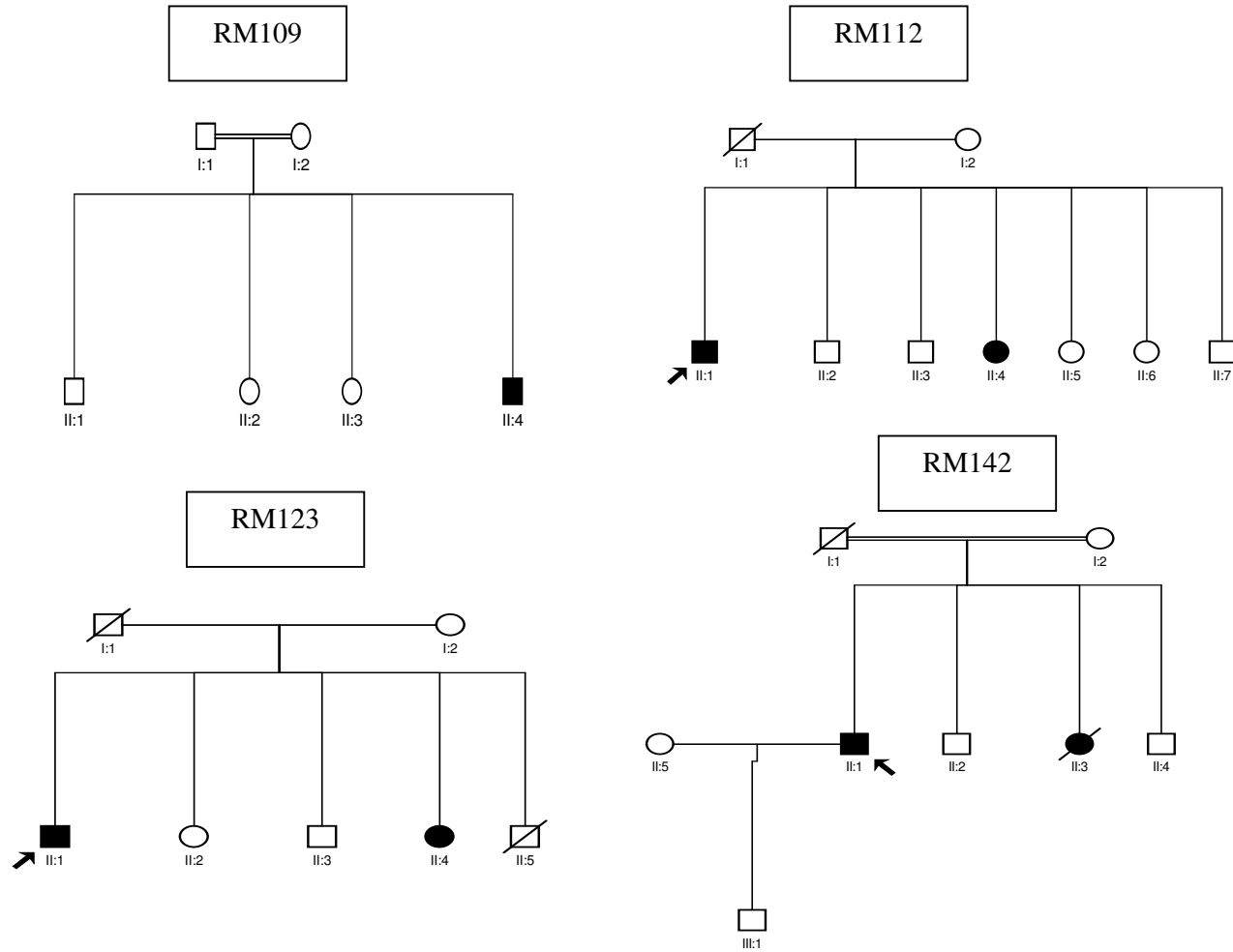


Figura 2.1c rappresentazione schematica degli alberi genealogici delle famiglie analizzate



Bibliografia

- **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.
- **Ashley-Koch A., Bonner E.R., Gaskell P.C., West S.G., Tim R., Wolpert C.M., Jones R., Farrell C.D., Nance M., Svenson I.K., Marchuk D.A., Boustany R.-M. N., Vance J.M., Scott W.K., Pericak-Vance M.A.** Fine mapping and genetic heterogeneity in the pure form of autosomal dominant familial spastic paraplegia. *Neurogenetics* (2001); 3:91-97
- **Bauer P, Winner B, Schüle R, Bauer C, Häfele V, Hehr U, Bonin M, Walter M, Karle K, Ringer TM, Rieß O, Winkler J, Schöls L.** Identification of a heterozygous genomic deletion in the spatacsin gene in SPG11 patients using high-resolution comparative genomic hybridization. *Neurogenetics.* (2008) Sep 12. [Epub ahead of print]
- **Baulieu EE.** Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology.* (1998);23(8):963-87. Review
- **Behan WMH, Maia M.** *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* (1974); 37:8-20.
- **Bickerstaff ER.** Hereditary spastic paraplegia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (1950); 13:134-145.
- **Brockmann K, Simpson MA, Faber A, Bonnemann C, Crosby AH, Gartner J.** Complicated hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum (HSP-TCC) and childhood onset. *Neuropediatrics* (2005);36:274-8
- **Bruyn RPM.** The neuropathology of hereditary spastic paraparesis. *Clinical Neurology and Neurosurgery.* (1992); 94(Suppl.):S16-18.

- **Cambi F, Tartaglino I, Lublin FD., McCarren D.** X-linked pure familial spastic paraparesis: characterization of a large kindred with magnetic resonance imaging studies. *Arch Neurol* (1996);52; 665-669.
- **Casali C, Valente EM, Bertini E, Montagna G, Criscuolo C, De Michele G, Villanova M, Damiano M, Pierallini A, Brancati F, Scarano V, Tessa A, Cricchi F, Grieco GS, Muglia M, Carella M, Martini B, Rossi A, Amabile GA, Nappi G, Filla A, Dallapiccola B, Santorelli FM.** Clinical and genetic studies in hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum. *Neurology* (2004);62:262-8
- **Casari G., De Fusco M., Ciurmatori S., Zeviani M., Mora M., Fernandez P., et al.** Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutation in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell* (1998); 93:973-983.
- **Claes S, Devriendt K, Van Goethem G, Roelen L, Meireleire J, Raeymaekers P, Cassiman JJ, Fryns JP.** Novel syndromic form of X-linked complicated spastic paraplegia. *Am J Med Genet.* (2000); 4;94(1):1-4.
- **Coutinho P, Barros J, Zemmouri R, Guimaraes J, Alves C, Choro R, Lourenco E, Ribeiro P, Loureiro JL, Santos JV, Hamri A, Paternotte C, Hazan J, Silva MC, Prud'homme JF, Grid D.** Clinical heterogeneity of autosomal recessive spastic paraplegias: analysis of 106 patients in 46 families. *Arch Neurol* (1999);56:943-9
- **Compagnone NA, Mellon SH.** Dehydroepiandrosterone: a potential signalling molecule for neocortical organization during development. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1998); 14;95(8):4678-83.
- **Cross, H. E.; McKusick, V. A.** The Mast syndrome: a recessively inherited form of presenile dementia with motor disturbances. *Arch. Neurol.* (1967); 16: 1-13, 1967.

- **De Michele G, De Fusco M, Cavalcanti F, Filla A, Marconi R, Volpe G, Monticelli A, Ballabio A, Casari G, Coccozza S.** A new locus for autosomal recessive hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 16q24.3. *Am J Hum Genet.* (1998);63(1):135-9.
- **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); 22;71(4):248-52.
- **Dürr A, Davoine CS, Paternotte C, von Fellenberg J, Cogilnicean S, Coutinho P, Lamy C, Bourgeois S, Prud'homme JF, Penet C, Mas JL, Burgunder JM, Hazan J, Weissenbach J, Brice A, Fontaine B.** Phenotype of autosomal dominant spastic paraplegia linked to chromosome 2 *Brain.* (1996);119 (Pt 5):1487-96.
- **Dürr A., Camuzat A., Colin E., Tallaksen C., Hannequin D., Coutinho P., et al.** Atlastin mutation are frequent in young-onset autosomal dominant spastic paraplegia. *Arch Neurol* (2004); 61:1867-1872.
- **Fink JK, Wu CT, Jones SM, Sharp GB, Lange BM, Lesicki A, Reinglass T, Varvil T, Otterud B, Leppert M.** Autosomal dominant familial spastic paraplegia: tight linkage to chromosome 15q *Am J Hum Genet.* (1995);56(1):188-92.
- **Fink J.K., Hedera P.** Hereditary spastic paraplegia: genetic heterogeneity and genotype-phenotype correlation. *Semin. Neurol.* (1999);19, 301-310.
- **Fink J.K.** Hereditary spastic paraplegia: nine genes and counting. *Arch Neurol* (2003a); 60:1045-1049.
- **Fink J.K.,** Advanced in the hereditary spastic paraplegias. *Exp Neurol.* 184 (2003b) (Suppl.1), pp.S106-S110.
- **Hanein S, Dürr A, Ribai P, Forlani S, Leutenegger AL, Nelson I, Babron MC, Elleuch N, Depienne C, Charon C, Brice A, Stevanin G.** A novel locus for autosomal

dominant "uncomplicated" hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 8p21.1-q13.3. *Hum Genet.* (2007);122(3-4):261-73.

■ **Hansen JJ, Dürr A, Cournu-Rebeix I, Georgopoulos C, Ang D, Nielsen MN, Davoine CS, Brice A, Fontaine B, Gregersen N, Bross P.** Hereditary spastic paraplegia SPG13 is associated with a mutation in the gene encoding the mitochondrial chaperonin Hsp60. *Am J Hum Genet.* (2002);70(5):1328-32.

■ **Harding AE.** Hereditary pure spastic paraplegia: a clinical and genetic study of 22 families. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (1981); 44:871-873

■ **Harding A.E.** Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet* (1983) 1 (8334):1151-1155

■ **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. *Nat Genet.* (1993);5(2):163-7.

■ **Hedera P, DiMauro S, Bonilla E, Wald J, Eldevik OP, Fink JK.** Phenotypic analysis of autosomal dominant hereditary spastic paraplegia linked to chromosome 8q. *Neurology.* (1999); 13;53(1):44-50.

■ **Hehr U, Bauer P, Winner B, Schule R, Olmez A, Koehler W, Uyanik G, Engel A, Lenz D, Seibel A, Hehr A, Ploetz S, Gamez J, Rolfs A, Weis J, Ringer TM, Bonin M, Schuierer G, Marienhagen J, Bogdahn U, Weber BH, Topaloglu H, Schols L, Riess O, Winkler J.** Long-term course and mutational spectrum of spatacsin-linked spastic paraplegia. *Ann Neurol.* (2007); 62(6):656-65.

■ **Hentati, A.; Pericak-Vance, M. A.; Hung, W.-Y.; Belal, S.; Laing, N.; Boustany, R.-M.; Hentati, F.; Ben Hamida, M.; Siddique, T.** Linkage of 'pure' autosomal recessive familial spastic paraplegia to chromosome 8 markers and evidence of genetic locus heterogeneity. *Hum. Molec. Genet.* (1994); 3: 1263-1267.

- **Hodgkinson CA, Bohlega S, Abu-Amero SN, Cupler E, Kambouris M, Meyer BF, Bharucha VA.** A novel form of autosomal recessive pure hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 13q14. *Neurology.* (2002);59(12):1905-9
- **Holmes GL, Shaywitz BA.** Strumpell's pure familial spastic paraplegia: case study and review of the literature. *J Neurol Neurosurg Psychiatric* (1977); 40:1003-1008.
- **Hughes CA, Byrne PC, Webb S, McMonagle P, Patterson V, Hutchinson M, Parfrey NA.** SPG15, a new locus for autosomal recessive complicated HSP on chromosome 14q. *Neurology.* (2001); 56(9):1230-3.
- **Iwabuchi K, Kubota Y, Hanihara T, Nagatomo H.** Three patients of complicated form of autosomal recessive hereditary spastic paraplegia associated with hypoplasia of the corpus callosum. *No To Shinkei* (1994); 46:941-7
- **Jouet M, Rosenthal A, Armstrong G, MacFarlane J, Stevenson R, Paterson J et al.** X-linked spastic paraplegia, MASA syndrome and X-linked hydrocephalus result from mutations in L1 gene. *Mat Genet* (1994); 7:402-407
- **Kang SY, Lee MH, Lee SK, Sohn YH.** Levodopa-responsive parkinsonism in hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum. *Parkinsonism Relat Disord* (2004);10:425-7
- **Klebe S, Azzedine H, Durr A, Bastien P, Bouslam N, Elleuch N, Forlani S, Charon C, Koenig M, Melki J, Brice A, Stevanin G.** Autosomal recessive spastic paraplegia (SPG30) with mild ataxia and sensory neuropathy maps to chromosome 2q37.3. *Brain.* (2006); 129(Pt 6):1456-62.
- **Koyama K, Emi M, Nakamura Y.** "The cell adhesion regulator (CAR) gene, TaqI and insertion/deletion polymorphisms, and regional assignment to the peritelomeric region of 16q by linkage analysis.". *Genomics* (1993); 16 (1): 264–5.

- **Lee MJ, Cheng TW, Hua MS, Pan MK, Wang J, Stephenson DA, Yang CC.** Mutations of the SPG11 gene in patients with autosomal recessive spastic paraparesis and thin corpus callosum. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* (2008); 79(5):607-9.
- **Liao SS, Shen L, Du J, Zhao GH, Wang XY, Yang Y, Xiao ZQ, Yuan Y, Jiang H, Li N, Sun HD, Wang JL, Wang CY, Zhou YF, Mo XY, Xia K, Tang BS.** Novel mutations of the SPG11 gene in hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum *J Neurol Sci.* (2008); 275(1-2):92-9.
- **Lorrain M.** Contribution a l'étude de la paraplégie spasmodique familiale. Paris: Steinheil, (1898).
- **Lossos A, Stevanin G, Meiner V, Argov Z, Bouslam N, Newman JP, Gomori JM, Klebe S, Lerer I, Elleuch N, Silverstein S, Durr A, Abramsky O, Ben-Nariah Z, Brice A.** Hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum: reduction of the SPG11 interval and evidence for further genetic heterogeneity. *Arch Neurol* (2006); 63:756-60.
- **Mannan AU, Krawen P, Sauter SM, Boehm J, Chronowska A, Paulus W, Neesen J, Engel W.** ZFYVE27 (SPG33), a novel spastin-binding protein, is mutated in hereditary spastic paraplegia. *Am J Hum Genet.* (2006); 79:351-7.
- **Martin KO, Reiss AB, Lathe R, Javitt NB** 7 alpha-hydroxylation of 27-hydroxycholesterol: biologic role in the regulation of cholesterol synthesis. *J Lipid Res.* (1997); 38(5):1053-8.
- **Martinez Murillo F, Kobayashi H, Pegoraro E, Galluzzi G, Creel G, Mariani C, Farina E, Ricci E, Alfonso G, Pauli RM, Hoffman EP.** Genetic localization of a new locus for recessive familial spastic paraparesis to 15q13-15. *Neurology* (1999); 53:50-6
- **McDermott CJ, White K, Bushby K, Shaw PJ.** Hereditary spastic paraparesis: a review of new development. *J. Neurol Neurosurg Psychiatry.* (2000); 69:150-160.

- **McDermott CJ, Shaw PJ.** Hereditary spastic paraparesis. *Handb Clin Neurol.* (2007); 82:327-52.
- **Mc Monagle P., Webb S., Hutchinson M.** The prevalence of “pure” autosomal dominant hereditary spastic paraparesis in the island of Ireland. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* (2002); 72:43-46.
- **Meijer IA, Cossette P, Roussel J, Benard M, Toupin S, Rouleau GA.** A novel locus for pure recessive hereditary spastic paraplegia maps to 10q22.1-10q24.1. *Ann Neurol.* (2004); 56(4):579-82.
- **Mullis K.B. and Faloona F.A.** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* (1987); 155:335-350.
- **Orlacchio A., Kawarai T., Rogaeva E., Song Y.Q., Paterson A.D., Bernardi G., St. Gorge-Hyslop P.H.** Clinical and genetic study of a large Italian family linked to SPG12 locus. *Neurology* (2002); 59:1395-1401.
- **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); 61:849-55.
- **Orlacchio A., Kawarai T., Gaudiello F., St Gorge-Hyslop P.H., Floris R., Bernardi G.** New locus for hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 1p31.1-1p21.1. *Ann Neurol.* (2005); 58:423-429.
- **Orlacchio A., Patrono C., Gaudiello F., Rocchi C., Morchella 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.
- **Osvath K.** Paralysis spinalis spastica familiaris. *Deutsche zeitschrift für Nervenfeilkunde* (1968); 193:287-323.

- **Paisan-Ruiz C, Nath P, Wood NW, Singleton A, Houlden H.** Clinical heterogeneity and genotype-phenotype correlations in hereditary spastic paraplegia because of Spatacsin mutations (SPG11). *Eur J Neurol.* (2008);15(10):1065-70.
- **Polo J.M., Calleja J., Combarros O., Berciano J.** Hereditary ataxias and paraplegias in Cantabria. Spain: an epidemiological and clinical study. *Brain.* (1991); 114:855-866.
- **Patel H, Hart PE, Warner TT, Houlston RS, Patton MA, Jeffery S, Crosby AH.** The Silver syndrome variant of hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 11q12-q14, with evidence for genetic heterogeneity within this subtype. *Am J Hum Genet.* (2001); 69(1):209-15.
- **Patel, H.; Cross, H.; Proukakis, C.; Hershberger, R.; Bork, P.; Ciccarelli, F. D.; Patton, M. A.; McKusick, V. A.; Crosby, A. H.** SPG20 is mutated in Troyer syndrome, an hereditary spastic paraplegia. *Nature Genet.* (2002); 31: 347-348.
- **Pippucci T., Panza E., Pompili E., Donadio V., Borreca A., Babalini C., Patrono C., Zuntini, R., Kawarai T., Bernardi G., Liguori R., Romeo G., Montagna P., Orlacchio A. and Seri M.** Autosomal recessive hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum: a novel mutation in the SPG11 gene and further evidence for genetic heterogeneity *European Journal of Neurology* (2008) [Epub Nov 12].
- **Pirozzi M, Quattrini A, Andolfi G, Dina G, Malaguti MC, Auricchio A, Rugarli EI.** Intramuscular viral delivery of paraplegin rescues peripheral axonopathy in a model of hereditary spastic paraplegia. *J Clin Invest.* (2006); 116(1):202-8.
- **Pratt RTC.** The genetic of neurological disorders. Oxford: Oxford University Press, (1967):44.
- **Pringle AK, Morrison B 3rd, Bradley M, Iannotti F, Sundstrom LE.** (b) Characterisation of a novel class of polyamine-based neuroprotective compounds. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* (2003); 368(3):216-24.

- **Pringle AK, Schmidt W, Deans JK, Wulfert E, Reymann KG, Sundstrom LE.** 7-Hydroxylated epiandrosterone (7-OH-EPIA) reduces ischaemia-induced neuronal damage both in vivo and in vitro. *Eur J Neurosci.* (2003); 18(1):117-24.
- **Rainier S, Hedera P, Alvarado D, Zhao X, Kleopa KA, Heiman-Patterson T, Fink JK** Hereditary spastic paraplegia linked to chromosome 14q11-q21: reduction of the SPG3 locus interval from 5.3 to 2.7 cM. *J Med Genet.* (2001); 38(11):E39.
- **Rainier S, Bui M, Mark E, Thomas D, Tokarz D, Ming L, Delaney C, Richardson RJ, Albers JW, Matsunami N, Stevens J, Coon H, Leppert M, Fink JK.** Neuropathy target esterase gene mutations cause motor neuron disease *Am J Hum Genet.* (2008); 82(3):780-5.
- **Reid E., Dearlove A., Osborn O., Rogers M.T., Rubinsztein D.C.** A locus for autosomal dominant 'pure'hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 19q13. *SAAm.Hum.Genet.* (2000); 66(2):728-32.
- **Reid E., Kloos M., Ashley-Koch A., Hughes L., Bevan S., Svenson I.K.** A kinesin heavy chain (KIF5A) mutation in hereditary spastic paraplegia (SPG10). *Am J Hum Genet* (2002); 71:1189-1194.
- **Robel P, Baulieu EE.** Dehydroepiandrosterone (DHEA) is a neuroactive neurosteroid *Ann N Y Acad Sci.* (1995); 29;774:82-110. Review.
- **Rose KA, Stapleton G, Dott K, Kieny MP, Best R, Schwarz M, Russell DW, Björkhem I, Seckl J, Lathe R.** Cyp7b, a novel brain cytochrome P450, catalyzes the synthesis of neurosteroids 7alpha-hydroxy dehydroepiandrosterone and 7alpha-hydroxy pregnenolone. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1997); 13;94(10):4925-30.
- **Salinas S, Proukakis C, Crosby A., Warner T.T.** Hereditary spastic paraplegia: clinical feature and pathogenetic mechanism. *Lancet Neurol* (2008); 7:1127-38.

- **Samaranch L, Riverol M, Masdeu JC, Lorenzo E, Vidal-Taboada JM, Irigoyen J, Pastor MA, de Castro P, Pastor P.** SPG11 compound mutations in spastic paraparesis with thin corpus callosum. *Neurology.* (2008); 29;71(5):332-6.
- **Saugier-Veber P, Munnich A, Bonneau D, Rozet JM, Le Merrer M, Gil R, Boespflug-Tanguy O.** X-linked spastic paraplegia and Pelizaeus-Merzbacher disease are allelic disorders at the proteolipid protein locus. *Nat Genet.* (1994); 6(3):257-62.
- **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.* (2008) [Epub Oct 15.].
- **Sedel F., fontaine B., Saudubray J.M., Lyon-caen O.** hereditary spastic paraparesis in adults associated with inborn errors of metabolism. A diagnostic approach. *J. Inherit. Metab.Dis.* (2007); 30:855-864.
- **Shibasaki Y, Tanaka H, Iwabuchi K, Kawasaki S, Kondo H, Uekawa K, Ueda M, Kamiya T, Katayama Y, Nakamura A, Takashima H, Nakagawa M, Masuda M, Utsumi H, Nakamuro T, Tada K, Kurohara K, Inoue K, Koike F, Sakai T, Tsuji S, Kobayashi H.** Linkage of autosomal recessive hereditary spastic paraplegia with mental impairment and thin corpus callosum to chromosome 15A13-15. *Ann Neurol* (2000); 48:108-12.
- **Simpson M.A., Cross H., Proukakis C., Pryde A, Hershberger R., Chatonnet A. et al.** Maspardin is mutated in MAST syndrome, a complicated form of hereditary spastic paraplegia associated with dementia. *Am J Hum Genet* (2003); 73:1147-1156.
- **Slavotinek AM, Pike M, Mills K, Hurst JA:** Cataracts, motor system disorder, short stature, learning difficulties, and skeletal abnormalities: a new syndrome? *Am J Med Genet* (1996); 62: 42–47.

- **Sperfeld AD, Kassubek J, Crosby AH, Winner B, Ludolph AC, Uttner I, Hanemann CO.** Complicated hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum: variation of phenotypic expression over time. *J Neurol* (2004); 251:1285-7.
- **Steinmüller R, Lantigua-Cruz A, Garcia-Garcia R, Kostrzewa M, Steinberger D, Müller U** Evidence of a third locus in X-linked recessive spastic paraplegia. *Hum Genet.* (1997); 100(2):287-9.
- **Stevanin G, Montagna G, Azzadine H, et al.** Spastic paraplegia with thin corpus callosum: description of 20 new families, refinement of the SPG11 locus, candidate gene analysis and evidence of genetic heterogeneity. *Neurogenetics* (2006); 7:149-56.
- **Stevanin G., Paternotte C., Coutinho P., Klebe S., Elleuch N., Loureiro J.L., Denis E., Cruz V.T., Durr A., Prud'homme J.-F., Weissenbach J., Brice A., Hazan J.** A new locus for autosomal recessive spastic paraplegia (SPG32) on chromosome 14q12-q21. *Neurology* (2007); 68:1837-1840.
- **Stevanin G, Santorelli FM, Azzedine H, Coutinho P, Chomilier J, Denora PS, Martin E, Ouvrard-Hernandez AM, Tessa A, Bouslam N, Lossos A, Charles P, Loureiro JL, Elleuch N, Confavreux C, Cruz VT, Ruberg M, Leguern E, Grid D, Tazir M, Fontaine B, Filla A, Bertini E, Durr A, Brice A.** Mutations in SPG11, encoding spatascin, are a major cause of spastic paraplegia with thin corpus callosum. *Nat Genet.* (2007); 39(3):366-72.
- **Stevanin G, Azzedine H, Denora P, Boukhris A, Tazir M, Lossos A, Rosa AL, Lerer I, Hamri A, Alegria P, Loureiro J, Tada M, Hannequin D, Anheim M, Goizet C, Gonzalez-Martinez V, Le Ber I, Forlani S, Iwabuchi K, Meiner V, Uyanik G, Erichsen AK, Feki I, Pasquier F, Belarbi S, Cruz VT, Depienne C, Truchetto J, Garrigues G, Tallaksen C, Tranchant C, Nishizawa M, Vale J, Coutinho P, Santorelli FM, Mhiri C, Brice A, Durr A; SPATAX consortium.** Mutations in SPG11 are frequent in autosomal recessive spastic

paraplegia with thin corpus callosum, cognitive decline and lower motor neuron degeneration. *Brain*. (2008);131(Pt 3):772-84.

■ **Strumpell A.** Beiträge zur Pathologie des Rückenmarks. *Arch. Psychiatr. Nervenkr.* (1880); 10:676-717.

■ **Strümpell A.** Ueber die hereditäre spastische Spinalparalyse. *Deutsche zeitschrift für Nervenheilkunde* (1893).

■ **Strumpell A.** *Dtsch Z Nervenheilk.* (1904); 27:291-339.

■ **Sutherland J.M.** Familial spastic paraplegia. In: *Vinken P.J. and Bruyn, G.W.(Eds.) Handbook of Clinical Neurology*, North Holland Publishing Company, Amsterdam, (1975); 421-431.

■ **Tang BS, Chen X, Zhao GH, Shen L, Yan XX, Jiang H, Luo W.** Clinical features of hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum: report of 5 Chinese cases. *Chin Med J* (2004);117:1002-5.

■ **Tedeschi G., Allocca S., Di Costanzo A. et al.** Multisystem involvement of the central nervous system in Strumpell's disease. A neurophysiological and neuropsychological study. *J Neurol Sci* (1991); 103:55-60.

■ **Teive HA, Iwamoto FM, Della Coletta MV, Camargo CH, Bezerra RD, Minguetti G, Werneck LC.** Hereditary spastic paraplegia associated with thin corpus callosum. *Arq Neuropsiquiatr* (2001); 59:790-2.

■ **Trotta N., Orso G., Rossetto M.G., Daga A and Broadie K.** The hereditary spastic paraplegia gene, spastin, regulates microtubule stability to modulate synaptic structure and function. *Curr Biol* (2004); 14:1135-1147.

■ **Tsaousidou MK, Ouahchi K, Warner TT, Yang Y, Simpson MA, Laing NG, Wilkinson PA, Madrid RE, Patel H, Hentati F, Patton MA, Hentati A, Lamont PJ,**

Siddique T, Crosby AH. Sequence alterations within CYP7B1 implicate defective cholesterol homeostasis in motor-neuron degeneration. *Am J Hum Genet.* (2008); 82(2):510-5.

■ **Valente E.M., Brancati F., Caputo V., Bertini E., Patrono C., Costanti D., Dalla piccola B.** Novel locus for autosomal dominant pure hereditary spastic paraplegia (SPG19) maps to chromosome 9q33-q34. *Ann Neurol* (2002); 51:681-685.

■ **Valente E.M., Seri M.** Hereditary spastic paraplegias. *Orphanet* (2004).

■ **Vazza G, Zortea M, Boaretto F, Micaglio GF, Sartori V, Mostacciuolo ML** A new locus for autosomal recessive spastic paraplegia associated with mental retardation and distal motor neuropathy, SPG14, maps to chromosome 3q27-q28 *Am J Hum Genet.* (2000); 67(2):504-9.

■ **Wilkinson PA, Crosby AH, Turner C, Patel H, Wood NW, Schapiro AH, Warner TT.** A clinical and genetic study of SPG5A linked autosomal recessive hereditary spastic paraplegia. *Neurology.* (2003); 61(2):235-8.

■ **Wilkinson PA, Crosby AH, Turner C, Bradley LJ, Ginsberg L, Wood NW, Schapiro AH, Warner TT.** A clinical, genetic and biochemical study of SPG7 mutations in hereditary spastic paraplegia. *Brain.* (2004);127(Pt 5):973-80.

■ **Wilkinson PA, Simpson MA, Bastaki L, Patel H, Reed JA, Kalidas K, Samilchuk E, Khan R, Warner TT, Crosby AH.** A new locus for autosomal recessive complicated hereditary spastic paraplegia (SPG26) maps to chromosome 12p11.1-12q14. *J Med Genet.* (2005); 42(1):80-2.

■ **Winner B, Uyanik G, Gross C, Lange M, Schulte-Mattler W, Schuierer G, Marienhagen J, Hehr U, Winkler J.** Clinical progression and genetic analysis in hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum in spastic gait gene 11 (SPG11). *Arch Neurol* (2004); 61:117-21.

- **Winner B, Gross C, Uyanik G, Schulte-Mattler W, Lurding R, Marienhagen J, Bogdahn U, Windpassinger C, Hehr U, Winkler J.** Thin corpus callosum and amyotrophy in spastic paraplegia-Case report and review of literature. *Clin Neurol Neurosurg.* (2005); 108:692-8.
- **Yang Y., hentati A., Deng H.-X., Dabbagh O., Sasaki T., Hirano M., et al.** The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* (2001); 29:160-165.
- **Zhang SS, Chen Q, Chen XP, Wang JG, Burgunder JM, Shang HF, Burgunder JM, Yang Y** Two novel mutations in the SPG11 gene causing hereditary spastic paraplegia associated with thin corpus callosum. *Mov Disord.* (2008); 23(6):917-9.
- **Zortea M, Vettori A, Trevisan CP, Bellini S, Vazza G, Armani M, Simonati A, Mostacciolo ML.** Genetic mapping of a susceptibility locus for disc herniation and spastic paraplegia on 6q23.3-q24.1. *J Med Genet.* (2002); 39(6):387-90.
- **Zuchner S, Wang G, Tran-Viet KN, Nance MA, Gaskell PC, Vance JM, Ashley-Koch AE, Pericak-Vance MA.** Mutations in the novel mitochondrial protein REEP1 cause hereditary spastic paraplegia type 31. *Am J Hum Genet.* (2006); 79:365-9.
- **Zuchner S.** The genetic of hereditary spastic paraplegia and implication for drug therapy. *Expert Opin Pharmacother.* (2007); 8(10):1433-1439.

Ringraziamenti

Per il conseguimento di questa tesi di dottorato vorrei ringraziare tantissime persone e spero di non dimenticare nessuno.

Un particolare ringraziamento va a tutto l'istituto Fondazione Santa Lucia e quindi al Professore Giorgio Bernardi per avermi dato la possibilità di condurre il mio progetto di ricerca con successo.

Vorrei ringraziare tutto il laboratorio di Neurogenetica, diretto dal Professore Antonio Orlacchio, per la loro grande amicizia e solidarietà;

In particolare vorrei ringraziare: Carla per i suoi preziosi consigli, Clarice per le sue sagge considerazioni, Laura e Lorenza per i loro sorrisi, Pasqua per le sue preziose sedute di "psicoanalisi".

Vorrei ringraziare le mie coinquiline che mi hanno supportato in questo periodo di formazione.

Non posso dimenticarmi dei membri della reception che ogni mattina mi davano il buongiorno con il sorriso.

Ringrazio, inoltre, i membri del bar e della mensa che hanno riempito le nostre giornate con i loro caffè' e i loro cibi squisiti.

Ringrazio, inoltre, Fabrizia che mi ha fatto capire che nella vita esistono ancora persone squisite e per cui vale la pena continuare a sperare in questo mondo.

Infine non posso non ringraziare i miei genitori che da lontano sono riusciti a farmi sentire sempre serena. Mi hanno dato i consigli giusti per poter affrontare ogni momento. Ringrazio anche mio fratello, Checco, che mi ha aiutato nella "PDF".

Infine, ringrazio anche il mio "Pino" che mi e' stato moralmente vicino sempre e comunque.

Per questo motivo vorrei dedicare questa tesi a tutta la mia famiglia e al mio ragazzo che mi sono stati vicini in ogni momento.

Antonella Borreca

**“L’interesse per la malattia è sempre
e soltanto un’altra espressione
dell’interesse per la vita”**

Thomas Mann