

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"**



**DOTTORATO DI RICERCA IN NEUROSCIENZE**

**XIX CICLO**

**TESI DI DOTTORATO**

**SCREENING MUTAZIONALE DI GENI IMPLICATI  
IN VARIE FORME DI ATASSIE RECESSIVE**

**COORDINATORE:**

**Chiar.mo Prof. Lucio Annunziato**

**CANDIDATO:**

**Dr.ssa Chiara Criscuolo**

**TUTORE:**

**Prof. Alessandro Filla**

**Anno Accademico 2006/2007**

## INDICE

<b>Classificazione delle atassie ereditarie.....</b>	<b>1</b>
<b>Le atassie autosomiche recessive e meccanismi patogenetici implicati.....</b>	<b>3</b>
<b>Obiettivo dello studio.....</b>	<b>5</b>
<b>Screening di pazienti atassici sporadici o con trasmissione autosomica recessiva per mutazioni del gene <i>APTX</i> responsabile di aprassia con atassia oculomotoria tipo 1.....</b>	<b>6</b>
- Aspetti genetici e molecolari.....	6
- Aspetti clinici.....	8
- Obiettivi dello screening mutazionale di <i>APTX</i> .....	9
- Pazienti e metodi.....	10
o Pazienti.....	10
o Metodi	
▪ Estrazione di DNA da cellule nucleate del sangue.....	11
▪ Amplificazione di <i>APTX</i> .....	11
▪ Cromatografia denaturante ad alta risoluzione (DHPLC).....	11
▪ Purificazione dei prodotti PCR.....	12
▪ Reazione di sequenza.....	13
- Risultati	
o Risultati molecolari.....	14
o Risultati clinici.....	14
- Discussione	
o Rilevanza epidemiologica di AOA1.....	17
o Caratteristiche cliniche.....	17
o Correlazioni genotipo- fenotipo.....	18

**Screening di pazienti atassici, sporadici o con trasmissione autosomica recessiva, per mutazioni del gene *SETX* responsabile di aprassia con atassia oculomotoria tipo 2.....20**

- Aspetti genetici e molecolari.....20
- Aspetti clinici.....22
- Obiettivi dello screening mutazionale di *SETX*.....25
- Pazienti e metodi
  - o Pazienti.....25
  - o Metodi
    - Screening di *SETX*.....26
    - Analisi di cosegregazione.....27
- Risultati
  - o Risultati molecolari
    - Screening di mutazione.....29
    - Analisi di cosegregazione.....30
  - o Risultati clinici.....31
- Discussione.....34

**Screening di pazienti atassici, sporadici o con trasmissione autosomica recessiva, per mutazioni del gene *SACS* responsabile dell'atassia spastica di Charlevoix-Saguenay.....36**

- Cenni storici.....36
- Aspetti genetici e molecolari.....37
- Aspetti clinici.....41
- Obiettivi dello screening mutazionale di *SACS*.....44
- Pazienti e metodi
  - o Pazienti.....44
  - o Metodi
    - Studio di linkage.....45
    - Screening del gene *SACS*.....47
    - Analisi di mutazione missense in controlli sani.....50

▪ Ricerca della seconda mutazione in un paziente con una sostituzione in eterozigosi.....	50
- Risultati	
○ Risultati molecolari	
▪ Analisi di linkage.....	53
▪ Screening del gene <i>SACS</i> .....	53
○ Risultati clinici.....	59
- Discussione.....	61
<b>Screening di pazienti atassici per le mutazioni A67T e W748S del gene <i>POLG1</i> responsabile della sindrome mitocondriale atassica recessiva.....</b>	<b>64</b>
- Aspetti genetici e molecolari	
○ Il replisoma del mtDNA.....	64
○ Le mutazioni di <i>POLG1</i> responsabili di MIRAS.....	67
- Aspetti clinici.....	68
- Obiettivi dello screening mutazionale di <i>POLG1</i> .....	72
- Pazienti e metodi	
○ Pazienti.....	72
○ Metodi.....	72
- Risultati.....	74
- Discussione e conclusione.....	75
<b>Bibliografia.....</b>	<b>78</b>

## **CLASSIFICAZIONE DELLE ATASSIE EREDITARIE**

Le atassie cerebellari ereditarie sono sindromi piuttosto rare, la cui classificazione ha subito nel tempo diversi cambiamenti. Già nel 1949 Wilson sottolineò come fosse difficile classificare le atassie ereditarie: “il gruppo di patologie degenerative unite dalla caratteristica comune dell’atassia, è l’unico per il quale non è stata ancora concepita una classificazione del tutto adeguata” (Wilson 1949).

Il principale punto di riferimento nello studio di queste malattie è stato per lungo tempo rappresentato dalla classificazione di Anita Harding che ebbe il merito di considerare le caratteristiche genetiche oltre che quelle cliniche, e divise le atassie in quattro categorie: congenite, metaboliche, associate a difetti del DNA e degenerative (Harding 1984).

Tale classificazione avendo come fondamento l’omogeneità del fenotipo è risultata estremamente utile per gli studi di linkage, ma con i progressi della genetica molecolare sono emersi i suoi limiti:

- 1) al clonaggio del gene è seguito un ampliamento del fenotipo, come ad esempio è accaduto per l’atassia di Friedreich;
- 2) una notevole e inattesa eterogeneità genetica è emersa nel corso degli anni per alcune forme, come le atassie spinocerebellari autosomiche dominanti (SCA);
- 3) sono state identificate nuove forme di atassie epidemiologicamente importanti in alcune popolazioni, tra cui l’atassia con aprassia oculomotoria tipo 1 (AOA1) e l’ atassia spastica autosomica recessiva di Charlevoix-Saguenay (ARSACS).

Per questi motivi oggi preferiamo una nuova classificazione delle eredoatassie basata sui meccanismi patogenetici, proposta nel 2004 (De Michele et al 2004, Tabella 1). In essa possono essere distinti cinque diversi gruppi: mitocondriali, metaboliche, associate a deficit del riparo del DNA, associate ad alterato folding delle delle proteine e le canalopatie.

<u><i>Mitocondriali</i></u>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ DNA nucleare (Atassia di Friedreich, MIRAS, IOSCA)</li> <li>▪ DNA mitocondriale (MERFF, NARP, KSS)</li> </ul>
<u><i>Metaboliche</i></u>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Malattie del metabolismo dell'urea</li> <li>▪ Malattie del metabolismo degli aminoacidi</li> <li>▪ Malattie del metabolismo del piruvato</li> <li>▪ Deficit di Vit. E</li> <li>▪ Malattie del metabolismo lipidico</li> <li>▪ Malattie da accumulo</li> <li>▪ Malattie del metabolismo dei perossisomi</li> </ul>
<u><i>Da difetto del DNA repair</i></u>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Atassia telangiectasia (AT)</li> <li>▪ l'atassia teleangiectasia like disorder</li> <li>▪ Atassia con aprassia oculomotoria 1 (AOA1)</li> <li>▪ Atassia con aprassia oculomotoria 2 (AOA2)</li> <li>▪ Atassia spinocerebellare con neuropatia assonale 1 (SCAN 1)</li> <li>▪ Xeroderma pigmentoso</li> <li>▪ Sindrome di Cockayne</li> </ul>
<u><i>Da anomalie dell'assemblaggio e degradazione delle proteine</i></u>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Atassia spastica autosomica recessiva di Charlevoix-Saguenay (ARSACS)</li> <li>▪ Atassie da poliglutammine (SCA 1, 2, 3, 6, 7, 17, DRPLA)</li> <li>▪ Atassie prioniche (GSS)</li> <li>▪ Sindrome di Marinesco-Sjogren</li> </ul>
<u><i>Canalopatie</i></u>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Atassia episodica tipo 1 (AE-1)</li> <li>▪ Atassia episodica tipo 2 (AE-2)</li> </ul>
<u><i>Altre</i></u>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Atassie congenite (Joubert; CAMOS)</li> <li>▪ Atassia cerebellare ad esordio precoce (EOCA)</li> <li>▪ Atassia cerebellare con ipogonadismo</li> <li>▪ Atassia mioclonica progressiva</li> <li>▪ Atassie dominanti con geni identificati (SCA 8, 10, 12, 14)</li> <li>▪ Atassie dominanti con loci identificati (SCA 4, 5, 11, 13, 15, 16, 18, 19, 21, 22, 25)</li> </ul>

**Tabella 1:** Classificazione delle atassie ereditarie (De Michele et al., 2004)

## **Le atassie autosomiche recessive e meccanismi patogenetici implicati**

Le atassie recessive rientrano tra i primi 4 gruppi della precedente classificazione (Tabella 1).

Il primo gruppo è costituito dalle atassie mitocondriali. Queste ultime sono causate da mutazioni a carico di proteine mitocondriali codificate o dal DNA nucleare o mitocondriale (mtDNA). Le mutazioni di geni nucleari che codificano per funzioni mitocondriali possono essere ereditate in maniera autosomica recessiva o dominante. Le mutazioni del DNA mitocondriale (mtDNA), invece, sono trasmesse con eredità materna e generalmente sono mutazioni puntiformi o duplicazioni. Le delezioni infine del mtDNA si verificano generalmente de novo. L'atassia di Friedreich (FRDA), la sindrome con atassia recessiva mitocondriale (MIRAS) e l'atassia spinocerebellare ad esordio infantile (IOSCA) sono dovute a mutazioni del DNA nucleare. Mutazioni nel mtDNA sono, invece, responsabili di diverse atassie sporadiche o a trasmissione matrilineare come rispettivamente la sindrome di Kearns-Sayre e l'atassia con retinite pigmentosa (NARP). È importante sottolineare che le patologie mitocondriali possono esordire a qualunque età e per la maggior parte, si tratta di patologie sistemiche, multiorgano, che spesso si presentano con un imponente danno neurologico e muscolare; pertanto la maggior parte dei soggetti affetti mostra una sintomatologia che si identifica in una sindrome clinica. La sintomatologia che accomuna le sindromi da danno mitocondriale include ptosi, oftalmoplegia esterna, miopia prossimale con intolleranza allo sforzo, cardiomiopia, sordità neurosensoriale, atrofia ottica, retinopatia pigmentosa e diabete mellito. A livello del sistema nervoso centrale sono spesso presenti encefalopatia, crisi epilettiche, demenza, emicrania, episodi simil-stroke, atassia e spasticità.

Le atassie metaboliche possono manifestarsi in maniera intermittente o progressiva, le principali sono enunciate in tabella 1 e non saranno argomento di questa tesi.

Le atassie associate a difetto di riparo del DNA comprendono le atassie causate da mutazioni in proteine che intervengono nel segnalare, trasmettere e riparare il danno al DNA. Nelle cellule umane, i normali processi metabolici, come la produzione di radicali dell'ossigeno, e fattori ambientali come i raggi ultravioletti (UV), le radiazioni ionizzanti (IR) e agenti chemioterapici possono causare un danno al singolo (SS) o al doppio filamento di DNA (DS). Le cellule non possono tollerare questo danno perché compromette l'integrità e l'accessibilità dell'informazione genetica pertanto si sono sviluppati diversi meccanismi di riparo in rapporto al tipo di danno subito e se esso

compromette il SS o il DS. In una cellula metabolicamente attiva ma non in divisione come i neuroni, si può predire che il DNA subisca circa 50,000 eventi dannosi al giorno. Il danno al doppio filamento (DBS) di DNA è dovuto alle IR ad agenti chimici oppure in seguito alla replicazione di un danno al singolo filamento (SSB). Le IR determinano un cross-link intrafilamento e interfilamento eliminando la possibilità di usare uno dei due filamenti come stampo. Il meccanismo di riparo deputato si basa sulla ricombinazione che può essere di due tipi: omologa o non omologa con ricongiunzione delle estremità. L'ataxia associata a compromissione del riparo del DNA a doppio filamento sono l'ataxia teleangiectasia e l'ataxia teleangiectasia like disorder.

I SSB sono le lesioni al DNA più abbondanti e sono quelli più direttamente correlati all'aumento di radicali dell'ossigeno. Esistono tre diversi meccanismi di riparo:

- il base excision repair (BER) che ripara piccoli danni causati dai radicali dell'ossigeno, alchilazione, idrolisi, deamidazione ed raggi X.
- Il mismatch repair che corregge i cattivi appaiamenti di basi come guanina-timina.
- Il nucleotide excision repair riguarda le lesioni che distorcono l'elica del DNA, come i dimeri di pirimidina causati dai raggi UV.

Sono dovute a danno del riparo del SSB le atassie con aprassia oculomotoria (AOA) tipo 1 e tipo 2 e Atassia spinocerebellare con neuropatia assonale tipo 1 (SCAN1).

Alle atassie da anomalie dell'assemblaggio e degradazione delle proteine appartengono forme dominanti come le atassie spinocerebellari e forme recessive come l'ARSACS e la sindrome di Marinesco-Sjogren. Nelle prime forme la mutazione patogenetica, rappresentata dall'espansione Citosina-Adenina-Guanina, è responsabile di uno stretch di poliglutamine esuberante che determina l'aggregazione e la precipitazione delle proteine patologiche. Nel secondo gruppo di malattie recessive il meccanismo patogenetico implicato che potrebbe determinare l'accumulo e la precipitazione di proteine mal ripiegate non è da ascrivere direttamente ad una alterazione delle proteine coinvolte ma ad un alterato funzionamento dei chaperoni.

Gli chaperoni facilitano il corretto ripiegamento delle proteine native, impedendone la loro aggregazione, in un ciclo regolato dall'ATP. Per divenire funzionalmente attive, infatti, le catene proteiche appena sintetizzate devono ripiegarsi nella unica conformazione tridimensionale in base ad informazioni codificate nelle loro sequenze di aminoacidiche. Sebbene in vitro molte proteine possono ripiegarsi al loro stato nativo spontaneamente, senza l'aiuto di componenti addizionali, in vivo le chaperonine risultano essere essenziali affinché il ripiegamento della proteina si realizzi con alta



efficienza (Slavotinek et al., 2001). Le proteine mal ripiegate, infatti, non solo perdono la loro normale funzione ma tendono ad aggregarsi con insorgenza di effetti tossici.

### **Obiettivo dello studio**

Presso l'ambulatorio delle atassie dell'Università Federico II sono seguiti circa 190 pazienti con atassia a trasmissione non dominante, tra questi 80 sono casi familiari con una trasmissione di tipo recessivo e 110 sporadici.

L'obiettivo di questo studio è stato condurre una screening guidato dal fenotipo, dei pazienti atassici seguiti presso il nostro ambulatorio, senza diagnosi molecolare, sporadici e/o con trasmissione autosomica recessiva, per i geni responsabili di AOA1 AOA2 e ARSACS, MIRAS.

## **SCREENING DI PAZIENTI ATASSICI, SPORADICI O CON TRASMISSIONE AUTOSOMICA RECESSIVA, PER MUTAZIONI DEL GENE *APTX* RESPONSABILE DI APRASSIA CON ATASSIA OCULOMOTORIA TIPO 1**

### **Aspetti genetici e molecolari**

Il locus della aprassia con atassia oculomotoria tipo 1 (AOA1) è stato mappato sul cromosoma 9p13 studiando famiglie portoghesi e giapponesi (Moreira et al. 2001a).

Dal sequenziamento dei geni presenti nella regione candidata sono state identificate varie mutazioni a carico del gene *APTX*, che codifica per una proteina chiamata apratassina (Moreira et al. 2001b, Date et al. 2001). Il gene *APTX* è costituito da sette esoni (Figura 1-AOA1), ed è espresso ubiquitariamente in quasi tutti i tessuti umani. L'espressione è ridotta al 57% in linee cellulari linfoblastoidi di pazienti portatori di mutazioni troncanti. Analizzando i database dei cDNA è stata identificata la presenza di diversi possibili mRNA (Moreira et al. 2001a).

La funzione della proteina è ancora sconosciuta, le ricerche di omologia hanno mostrato la presenza di tre domini principali (Figura 1-AOA1). La regione N-terminale dell'apratassina mostra una stretta somiglianza con la parte N-terminale della polinucleotide chinasi-3' fosfatasi (PNKP). Quest'ultima possiede un'attività 5'-chinasi e 3'-fosfatasi, essenziale per processare le estremità libere dei SSBs e per permetterne una corretta riparazione. PNKP interagisce con la polimerasi  $\beta$ , la DNA ligasi III, ed XRCC1, tutte proteine implicate nel 'base excision repair'(BER), il sistema che ripara le basi alterate e le rotture del singolo filamento.

Il meccanismo di escissione come il NER ed il BER si basano su quattro tappe principali:

- 1) riconoscimento e segnalazione del danno;
- 2) escissione della tratto danneggiato del DNA e di una porzione di sequenza adiacente;
- 3) risintesi della porzione escissa, usando come filamento stampo quello non danneggiato;
- 4) legame della porzione neosintetizzata con l'estremità integra.

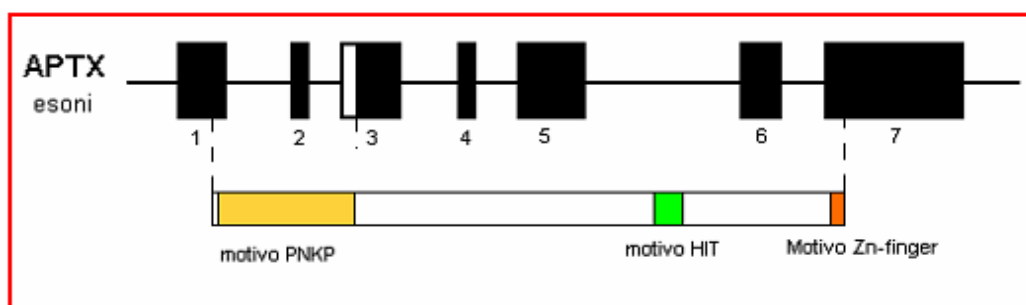
Il BER è probabilmente il meccanismo principale in tutti quegli organismi che dipendono dall'ossigeno per la sopravvivenza. Il processo in cui potrebbe essere implicata l'apratassina è mostrato in figura 2-AOA1.

Il dominio intermedio di apratassina presenta somiglianza con le proteine della famiglia histidine triad (HIT), caratterizzate da una sequenza caratteristica HhHhHhh, dove H è l'istidina e h un aminoacido idrofobico. La funzione di questa famiglia di proteine rimane poco conosciuta, ma molti dati fanno presupporre un ruolo nel regolare il ciclo cellulare in risposta a danni al DNA.

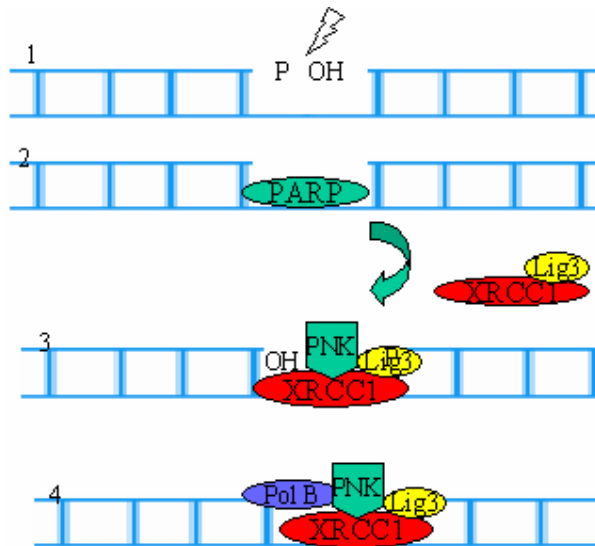
Tra il dominio simil PNKP e il dominio HIT vi è anche una potenziale sequenza di localizzazione nucleare, mentre nella parte terminale della proteina si presenta un dominio carbossi-terminale tipo “zink-finger” con probabile funzione di legame con il DNA.

La presenza di questi tre domini e di un segnale di localizzazione nucleare depongono per un ruolo dell'apratassina nel riparo del DNA. Inoltre recentemente è stato dimostrato che l'estremità N terminale dell'apratassina interagisce con la porzione C terminale di XRCC1 e coimmunoprecipita con PARP1 e p53 (Gueven et al 2004).

La proteina è espressa ubiquitarimente ed in modo particolare nel cervelletto, nei gangli della base, nella corteccia cerebrale e nel midollo spinale (Sano et al, 2004).



**Figura 1-AOA1.** *APTX* ed apratassina.



**Figura 2-AOA1.** Modello semplificato di BER 'long patch'. 1 un SSB costituito da una sola base alterata con un'estremità 5' fosfato e 3'OH, come avviene dopo esposizione ai radicali dell'ossigeno. 2. La polimerasi poli ADP-ribosio tipo 1 (PARP-1) attivata dal SSB lega il singolo filamento e richiama il complesso XRCC1-ligasi 3 che spiazza a sua volta PARP. XRCC1 crea una piattaforma d'ancoraggio per tutte le altre proteine coinvolte nel processo. 3. PNKP (ed eventualmente aprataxina, al suo posto), attivata da XRCC1, rimuove il gruppo fosfato al 3' e fosforica l'estremità 5'. 4. La polimerasi  $\beta$  polimerizza le basi mancanti e la ligasi riunisce le estremità.

### Aspetti clinici

AOA1 è la causa più frequente di atassia recessiva in Giappone (dove non c'è l'FRDA) e la seconda in Portogallo.

Il fenotipo di AOA1 è caratterizzato da atassia ad esordio precoce e neuropatia periferica, seguita da aprassia oculomotoria. L'aprassia oculomotoria (OMA) è presente in più dell'86% dei pazienti con AOA1

Si tratta di un disturbo della motilità oculare che fu descritto inizialmente da Cogan come difficoltà ad iniziare i saccadici: invitando il paziente a guardare lateralmente, egli ruoterà prima la testa fino in posizione di arrivo mantenendo gli occhi nella posizione di partenza, e solo in un secondo momento raggiungerà il bersaglio con gli occhi (Cogan et al 1953). In realtà il disturbo dei movimenti oculari nei pazienti con AOA1 non

corrisponde esattamente alla definizione di Cogan, perché il reperto oculografico è caratterizzato da microframmentazione dei saccadici.

I movimenti oculari presentano ulteriori alterazioni clinicamente rilevanti: saccadi ipometriche, riflesso vestibolo-oculare normoelicitabile ma non sopprimibile dalla fissazione. Altri segni clinici comprendono instabilità nella posizione primaria dello sguardo con onde quadre, nistagmi e frammentazione dei movimenti oculari. Elementi questi che possono aiutare nella diagnosi differenziale con altre forme di atassia.

Spesso si trovano associati segni extrapiramidali, come movimenti coreiformi e distonie. I movimenti coreiformi sono presenti all'esordio nel 79% dei pazienti, e tendono a scomparire nel corso della malattia.

Lo studio neurofisiologico mostra una neuropatia periferica sensitivo-motoria, e le manifestazioni cliniche comprendono atrofie, areflessia ed ipopallestesia. La risonanza magnetica mostra in tutti i pazienti un'atrofia cerebellare più marcata nel verme.

Gli esami di laboratorio mostrano una riduzione dell'albumina nell'83% degli affetti e un aumento del colesterolo nel 75% degli affetti. Tali valori sembrano essere correlati con la durata della malattia. I livelli di creatinichinasi (CK) sono elevati in circa il 50% degli affetti, ma indipendenti dalla durata della malattia. (Le Ber *et al.*, 2003; Moreira *et al.*, In press).

### **Obiettivi dello screening mutazionale di *APT*X**

AOA1 è la più frequente fra le atassie recessive dopo la FRDA (Moreira *et al.*,1999; Barbot *et al.*.,2001). Gli studi giapponesi e portoghesi hanno rivelato che il suo fenotipo è caratterizzato da atassia ad esordio precoce, OMA, seguita da neuropatia periferica.

Gli scopi del presente lavoro di screening di *APT*X sono:

- 1) valutare le rilevanza epidemiologica di AOA1 nella nostra casistica di pazienti con atassia autosomica recessiva o sporadica ad esordio precoce con neuropatia;
- 2) estendere lo studio mutazionale per *APT*X ad un campione di pazienti con ILOCA (idiopathic late onset cerebellar ataxia) e neuropatia periferica per vagliare l'ipotesi di un esordio tardivo in AOA1;
- 3) studiare la correlazione genotipo-fenotipo.

## **Pazienti e metodi**

### *Pazienti*

Per rispondere agli obiettivi del nostro studio, cioè valutare la rilevanza epidemiologica di AOA1, la possibilità di un esordio tardivo e la presenza di nuove mutazioni sono stati studiati 2 gruppi di pazienti provenienti dall'Ambulatorio per le Patologie ereditarie del Dipartimento di Scienze Neurologiche dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II".

Nel primo gruppo sono stati inclusi 28 pazienti con fenotipo compatibile con AOA1 selezionati tra 85 pazienti con atassia cerebellare autosomica recessiva o sporadica con esordio precoce.

La selezione dei pazienti è stata effettuata in base ai seguenti criteri:

- esordio prima dei 25 anni
- presenza di atassia progressiva
- trasmissione autosomica recessiva o insorgenza sporadica
- presenza di segni clinici (riflessi achillei ridotti o assenti ed ipopallestesia) o neurofisiologici di neuropatia periferica;
- test molecolare negativo per FRDA

Nel secondo gruppo sono stati inclusi 13 pazienti con atassia ad esordio tardivo (ILOCA) selezionati tra 90 pazienti con atassia sporadica ad esordio tardivo non FRDA.

La selezione dei pazienti è stata effettuata in base ai seguenti criteri:

- esordio tra i 25 e 50 anni
- presenza di atassia progressiva
- insorgenza sporadica
- presenza di segni clinici o neurofisiologici di neuropatia periferica
- test molecolare negativo per FRDA

Previo consenso informato, tutti i pazienti studiati sono stati sottoposti ad un prelievo di sangue periferico.

## *Metodi*

### Estrazione del DNA dalle cellule nucleate del sangue

L' estrazione del DNA dalle cellule nucleate del sangue è stata effettuata con tecniche convenzionali (Maniatis et al., 1982)

### Amplificazione di APTX

Il DNA gnomico di tutti i pazienti è stato amplificato mediante polymerase chain reaction (PCR).

APTX è stato scomposto in 8 prodotti di PCR amplificanti la regione codificante del gene.

È stata utilizzata una macchina GeneAmp PCR System 9600 Perkin Elmer e la reazione di amplificazione è stata condotta in un volume finale di 50µl contenente:

- 50 ng di DNA gnomico
- 0.2 mM di dNTP
- 20 pM/µl di primer F
- (1x) Buffer AmpliTAQGold
- 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 2.5 U AmpliTAQGold (Pelkin Elmer).

5 µl dei prodotti di amplificazione sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 1,5% contenente etidio bromuro. La corretta lunghezza dei frammenti è stata verificata mediante il confronto con un marcatore di lunghezza nota (100 bp BioLabs) ed è stata esclusa l'assenza di eventuali prodotti aspecifici.

### Cromatografia denaturante ad alta risoluzione (DHPLC)

L'analisi mutazionale dei prodotti di PCR è stata condotta mediante la cromatografia liquida denaturante ad alta risoluzione. La DHPLC è una moderna tecnica di analisi del DNA che consente di separare frammenti di DNA di dimensioni differenti e di identificare l'eventuale presenza di variazioni puntiformi presenti in essi. Tale tecnica si

basa sulla formazione ed individuazione di eteroduplex. Questi ultimi si ottengono mescolando il frammento di DNA di uno standard di controllo con il frammento da analizzare. Questi vengono denaturati e lasciati poi rinaturare a riformare il doppio filamento; le singole eliche possono appaiarsi sia con il filamento complementare (omoduplex) che con quello non perfettamente complementare per la presenza di una variazione di sequenza (eteroduplex) o di una mutazione puntiforme.

I prodotti di PCR dei pazienti analizzati sono stati cimentati in rapporto di 1:1 con i prodotti di PCR di un controllo sano. I frammenti di DNA sono stati denaturati a 95° C per 5 minuti e lasciati rinaturare lentamente per 2 ore fino a raggiungere la temperatura di 25° C. 4 µl del campione sono stati immessi nel flusso del tampone di corsa (tampone A+tampone B) e pompato verso la colonna cromatografica per il processo di separazione. I picchi di assorbimento associati al passaggio delle molecole di DNA sono stati registrati attraverso un rivelatore UV e l'analisi dei picchi è stata condotta tramite il software Wave Maker (Transgenomic). La separazione è stata effettuata mediante un gradiente di concentrazione in buffer A contenente 0,1 M trietilammonio acetato pH 7,0 (TEAA) e 0,025% aceto nitrile pH 7,0 e in buffer B contenente 0,1 M TEAA e 25% aceto nitrile. La velocità di flusso utilizzata è stata di 0,9 ml/minuto ed il gradiente del buffer B è stato aumentato di 2% /minuto.

L'analisi dei risultati si è basata sul confronto dei cromatogrammi dei pazienti con quelli del controllo sano. Nei casi in cui è stata identificata una differenza tra controllo e singolo paziente si è proceduto a sequenziare il prodotto di PCR alla ricerca di eventuali mutazioni.

#### Purificazione dei prodotti PCR

I prodotti di PCR che hanno presentato un profilo anomalo alla DHPLC sono stati sottoposti a sequenziamento diretto. Quindi sono stati sottoposti ad una procedura di purificazione utilizzando l'enzima esonucleasi I e la fosfatasi alcalina (EXOSAP). Il protocollo usato prevede due fasi:

- Attivazione dell'enzima a 37° C per 15 minuti
- Inattivazione dell'enzima a 80° C per 15 minuti

Dopo la procedura di purificazione i campioni sono stati sottoposti direttamente alla reazione di sequenza.



## Reazione di sequenza

Il DNA è stato sequenziato con il metodo di Sanger dei di-deossiribonucleotidi. Questi sono stati resi fluorescenti grazie al legame con uno specifico cromoforo e sono incorporati normalmente nella catena nascente di DNA ma ne impediscono l'allungamento per la mancanza dell'ossidrile in posizione 3' del deossiribosio.

La reazione di sequenza è stata realizzata con il seguente protocollo:

- 2,5 pmol/  $\mu\text{l}$  di oligonucleotidi d'innesco
- 2  $\mu\text{l}$  di una miscela (mix Big dye Terminator-Perkin Elmer) contenente i deossinucleotidi, la Taq polimerasi, il tampone TACS 5X [400 mM Tris-HCL pH 8, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  pH 9], 5  $\mu\text{l}$  di DNA (100ng) e  $\text{H}_2\text{O}$  in un volume finale di 10  $\mu\text{l}$ .

Per la reazione di sequenza sono state utilizzate due procedure.

La prima, a tre passaggi, per gli oligo d'innesco la cui temperatura di appaiamento è minore o uguale ai 57° C:

96° C x 2'30''  
96° C x 10'' ←  
45° C x 5''  
60° C x 4'

La seconda, a due passaggi, è stata utilizzata per gli oligo d'innesco la cui temperatura di appaiamento è uguale o superiore a 58° C e prevede:

96° C x 2'30''  
96° C x 10'' ←  
60° C x 4'

Al termine della reazione di sequenza i campioni sono stati purificati su una membrana Sephadex G50 mediante centrifugazione a 1700 rpm per 2 minuti; 5  $\mu\text{l}$  del purificato così ottenuto sono stati addizionati a 10  $\mu\text{l}$  di formammide deionizzata e denaturati per 10 minuti a 95° C per essere sottoposti ad elettroforesi. L'apparato elettroforetico utilizzato fa parte del sequenziatore automatico ABI PRISM 3100.

## **Risultati**

### *Risultati molecolari*

Lo screening molecolare ha permesso di identificare 4 pazienti con mutazione del gene dell'apratassina.

Il *paziente n° 1* è risultato un eterozigote composto per la sostituzione 617C→T che porta alla sostituzione della prolina in posizione 206 con leucina (P206L) e per la sostituzione 593 C→T, che porta ad una sostituzione da alanina a valina nella posizione 198 (A198V). La mutazione P206L cade nell'esone 5 all'interno del dominio HIT, ed è la seconda mutazione più frequente nella popolazione giapponese (Date *et al.* 2001). A198V è altresì situata nell'esone 5, ed è stata precedentemente identificata in una famiglia francese (Le Ber *et al.* 2003).

Il *paziente n° 2* è risultato omozigote per una nuova mutazione 603T→A, che porta ad una sostituzione della istidina in posizione 201 con glutamina (H201Q). Anche questa mutazione cade nell'esone 5. Trattandosi di una nuova mutazione si è proceduto al sequenziamento di 100 cromosomi di controllo allo scopo di dimostrare che la mutazione era presente in meno dell'1% della popolazione e per distinguerla, quindi, da un eventuale polimorfismo. La mutazione non è stata trovata nei cromosomi di controllo. La *paziente n° 3* è risultata omozigote per la mutazione 617C→T, che porta ad una sostituzione della prolina in posizione 206 con leucina (P206L).

Il *paziente n° 4* è risultato omozigote per una nuova mutazione 668T→C, che porta ad una sostituzione della prolina in posizione 223 con leucina (L223P). Anche questa mutazione cade nell'esone 5. Anche in questo caso la mutazione non è stata trovata in 100 cromosomi di controllo.

Infine un ultimo paziente ha mostrato una sostituzione 431C→A (S144Y), che era già stata descritta precedentemente come un semplice polimorfismo.

### *Risultati clinici*

Il *paziente n° 1* ha avuto un esordio a 8 anni con instabilità alla deambulazione. L'esame clinico, eseguito per la prima volta all'età di 10 anni, mostrava un'atassia moderata degli arti superiori e del tronco, disartria, aprassia oculomotoria, areflessia, ipopallestesia, ed atrofie muscolari e distali. Si evidenziavano inoltre movimenti coreici degli arti superiori, ed un riflesso masseterino vivace. Gli studi neurofisiologici

mostravano una modesta riduzione della velocità di conduzione sensitiva al nervo mediano (37m/s, limite inf 51) e del nervo tibiale posteriore (30 m/s, limite inf. 38) . L'ampiezza degli stessi potenziali risultava lievemente ridotta al polso (5 $\mu$ V, limite inf. 6), mentre era normale al malleolo interno (0.6  $\mu$ V, limite inf. 0,2). La velocità di conduzione motoria era lievemente ridotta al nervo mediano (48.5 m/s, limite inf. 54) e moderatamente ridotta al nervo tibiale posteriore (40 m/s, limite inf 52) . La biopsia del nervo surale confermava una neuropatia assonale con rari aspetti a "bulbo di cipolla".

La risonanza magnetica (RM) mostrava un'atrofia cerebellare più marcata nel verme. All'esame scintigrafico SPET per lo studio del trasportatore della dopamina, eseguito con [123I]FP-CIT, era presente una riduzione delle terminazioni dopaminergiche nigrostriatali con maggiore interessamento del putamen di destra. Il quoziente intellettivo era ai limiti bassi.

Il *paziente n°2*, figlio di genitori consanguinei, ha avuto un esordio a 29 anni con disartria moderata, alla quale si è aggiunta un'instabilità della deambulazione a 32 anni. Dall'età di 38 anni necessita di supporto per la deambulazione. All'esame clinico, eseguito per la prima volta all'età di 45 anni, mostrava parola scandita, atassia della marcia e nistagmo. Erano inoltre presenti areflessia ed amiotrofie a tutti e quattro gli arti ed ipopallestesia e fascicolazioni agli arti inferiori. I potenziali d'azione sensitivi non erano misurabili al polso ed ai malleoli. La velocità di conduzione motoria risultava lievemente ridotta al nervo mediano (50 m/s dal gomito al polso, limite inf. 54) e moderatamente ridotta al nervo tibiale posteriore (35 m/s dal cavo popliteo al malleolo interno, limite inf. 52). Il valore di CK sierico era elevato (462U/L, valori normali 0-192). La risonanza magnetica mostrava un'atrofia cerebellare e numerose aree di iperintensità sopratentoriale della sostanza bianca in T2. all'esame scintigrafico SPET per lo studio del trasportatore della dopamina, eseguito con [123I]FP-CIT, era presente una riduzione delle terminazioni dopaminergiche nigrostriatali con maggiore interessamento del putamen di destra. Non vi erano disturbi cognitivi evidenti.

La *paziente n°3* ha avuto un esordio a 28 anni con instabilità della deambulazione e tendenza a cadere; dall'età di 34 necessita di sedia a rotelle. La prima visita neurologica è stata fatta all'età di 34 anni e mostrava atassia severa della marcia e degli arti, instabilità della fissazione e nistagmo dello sguardo laterale. Mostrava inoltre areflessia, ipopallestesia, ipotrofia distale e piede piatto. Agli esami di laboratorio si evidenziava una leggera ipoalbuminemia (3.5g/dl, limite inf. 3.8 ) e ipercolesterolemia (281 mg/dl, limite sup. 200). Gli esami neurofisiologici riportati in anamnesi indicavano una

neuropatia assonale sensitiva e motoria, ma non si dispone dei dati relativi. La risonanza magnetica mostrava un'atrofia cerebellare più marcata nel verme. L'intelligenza risultava normale.

Il *paziente n°4* ha avuto un esordio a 40 anni con instabilità a dda deambulazione seguita da disartria. L'esame neurologico, eseguito per la prima volta all'età di 56 anni, mostrava andatura lenta, atassia, disartria, disfagia, movimenti oculari normali, fascicolazioni, riflesso mandibolare positivo, areflessia e riduzione della pallesesia ai malleolo esterni.

Gli esami di laboratorio evidenziavano valori normali di CK e albumina, ipocolesterolemia (presente anche negli altri familiari) e ipertrigliceridemia.

Gli studi neurofisiologici mostravano una lieve riduzione della velocità di conduzione sensitiva (43.3 m/s nel segmento polso-gomito, limite inferiore 51) e motoria (47m/s nel segmento gomito-polso; limite inf. 54) al nervo mediano e l'ampiezza degli stessi potenziali d'azione sensitivi risultava notevolmente ridotta al polso (1.8 mV; limite inf. 6).

La risonanza magnetica mostrava un'atrofia cerebellare vermiana (Figura 3-AOA1).

L'elettromiografia evidenziava un pattern neurogeno nel muscolo tibiale anteriore. Dopo venti anni di malattia il paziente è ancora in grado di camminare senza supporto e di lavorare. La disartria è invece significativamente peggiorata.



**Figura 3-AOA1.** RM che mostra atrofia vermiana cerebellare.

## **Discussione**

### *Rilevanza epidemiologica di AOA1*

Nel nostro studio abbiamo selezionato rispettivamente 28 e 13 pazienti da 2 gruppi di pazienti con atassia progressiva e neuropatia, il primo ad esordio precoce ed il secondo ad esordio tardivo, dopo esclusione di FRDA.

La frequenza stimata di AOA1 è dunque del 10% nei pazienti con atassia recessiva e neuropatia ad esordio prima dei 50 anni.

Secondo uno studio condotto prima dell'identificazione del gene *APTX* la frequenza stimata in una popolazione di pazienti portoghesi atassici era del 21% (Barbot et al., 2001)

Uno studio condotto successivamente all'identificazione del gene ha rilevato una frequenza del 7.5% in un gruppo di pazienti con atassia progressiva con esordio precoce (Moreira *et al.*, 2001). In uno studio francese su 227 pazienti con atassia cerebellare progressiva la frequenza è stata stimata pari al 9.1%. Escludendo pazienti con la FRDA la frequenza relativa scendeva al 5.7% (Le Ber et al., 2003).

Nel 2004 uno studio tedesco ha analizzato per mutazione di *APTX* 165 pazienti atassici con esordio prima dei 30 anni e ha identificato 2 pazienti omozigoti per la mutazione non-sense W293X (Habeck *et al.*, 2004).

La frequenza stimata di AOA1 nella nostra casistica è del 10% nei pazienti con atassia recessiva e neuropatia ad esordio prima dei 50 anni.

Quindi AOA1 può essere considerata una diagnosi non infrequente in pazienti con atassia cerebellare e neuropatia periferica ad esordio precoce con o senza storia familiare.

### **Caratteristiche cliniche**

Il fenotipo più frequente di AOA1 è caratterizzato da atassia progressiva, neuropatia assonale sensitivo-motoria e atrofia cerebellare rilevabile alla risonanza magnetica.

I nostri 4 pazienti presentano tutti e tre questi segni.

L'OMA, segno riscontrabile in AOA1 con frequenza pari all'86%, invece nel nostro studio ha mostrato una frequenza inferiore: è presente solo in uno dei nostri quattro pazienti.

Altri sintomi riscontrabili all'esordio sono i movimenti coreici e le distonie. Nel paziente n° 1 sono presenti movimenti coreiformi che non sono scomparsi nel corso della malattia.

Per quanto riguarda le principali alterazioni biochimiche, abbiamo riscontrato ipoalbuminemia nei pazienti n° 3 e 4, ipercolesterolemia nel paziente n° 3, ipocolesterolemia nel paziente n° 4 e aumenti del livello di CK nel paziente n° 2. Il paziente n° 3 è portatore della mutazione P206L, la seconda mutazione più frequente nei pazienti giapponesi che è associata sempre ad ipoalbuminemia (Date et al., 2001).

La caratteristica clinica più rilevante evidenziata dal nostro lavoro è l'età di esordio dei pazienti 2,3 e 4, che è rispettivamente di 29, 28 e 40 anni.

Età che si discosta nettamente dalla media dei casi precedentemente riportati (6,9 anni, range 2-16) mettendo in discussione la definizione finora utilizzata di AOA1 come atassia ad esordio precoce.

Appare pertanto importante considerare la diagnosi di AOA1 anche in presenza di esordio tardivo e non solo nei pazienti ad esordio precoce

### *Correlazioni genotipo-fenotipo*

Le mutazioni finora identificate cadono tutte negli esoni 5,6 e 7, mentre gli esoni 1, 2, 3 e 4 hanno mostrato solo la presenza di polimorfismi irrilevanti nella patogenesi.

Sono quindi gli ultimi 3 esoni ad essere implicati nella patogenesi di AOA1; in essi sono presenti i domini funzionali HIT e zinc-finger coinvolti nel corretto funzionamento dell'apratassina. Invece i primi esoni contengono il dominio amino-terminale PNKP che ha funzione di legame con le proteine che si assemblano al SSB.

Nel nostro studio sono state trovate due mutazioni già descritte : **P206L**, che è la seconda mutazione più frequente nella popolazione giapponese (Date et al., 2001), che è costantemente associata ad ipoalbuminemia, come nel paziente n°1, e deterioramento cognitivo (assente nel paziente n°1); **A198V**, precedentemente identificata in una famiglia francese (Le Ber *et al.*, 2003), che correla con la presenza di movimenti coreici severi e persistenti sin dall'esordio, come osservato nel paziente n°2.

Le altre mutazioni riscontrate sono nuove: **H201Q**, identificata nel paziente n° 2 che colpisce lo stesso aminoacido della mutazione H201R già identificata nella popolazione giapponese. Nel nostro paziente il fenotipo è meno severo rispetto ai pazienti giapponesi, suggerendo così che la sostituzione della istidina con la glutammina alla posizione 201 sia meno deleteria per la funzione della apratassina rispetto a quella della arginina. Altra nuova mutazione riscontrata nel paziente n° 4 è la mutazione missense L223P. Essa sembra correlata con un fenotipo più lieve. Attraverso uno studio di “ Structureer homology modeling” eseguito sull’apratassina e la proteina mutante L223P abbiamo ricostruito la struttura terziaria della proteina per il tratto di sequenza tra H166-F282 (Figura 4-AOA1). Nella costruzione del modello l’ $\alpha$ -elica, nel mezzo del quale cade la mutazione L223P, è conservata, ma la prolina ha una bassa propensione a formare questa struttura secondaria per cui ne può indurre destabilizzazione.

La conservazione della struttura terziaria e secondaria della proteina, seppure destabilizzata dalla mutazione, potrebbe spiegare il fenotipo lieve della paziente n° 4.

Predire il fenotipo di AOA1 partendo dalle mutazioni del gene *APTX* è attualmente difficile. L’unica caratteristica clinica che al momento correla col tipo di mutazione è l’esordio. Infatti si è visto che mutazioni troncanti (nonsense, frameshift ed alteranti lo splicing) correlano con un esordio molto precoce, invece mutazioni missense sono associate ad un esordio più tardivo, con l’eccezione di A198V e R199H. Quest’ultimo dato è confermato dal nostro studio dove l’esordio tardivo dei pazienti 2,3 e 4 correla con mutazioni missense. In particolare la mutazione 668T→C è associata ad esordio a 40 anni e a fenotipo benigno, caratterizzato da atassia e neuropatia lieve che dopo 20 anni di malattia non hanno mostrato importante peggioramento.



Figura 4-AOA1: Sovrapposizione del modello costruito per tratto H166- F282 e del mutante L223P con il software 3D-PSSM. Le alfa eliche sono in grigio, i  $\beta$  strand in nero.

## **SCREENING DI PAZIENTI, SPORADICI O CON TRASMISSIONE AUTOSOMICA RECESSIVA, PER MUTAZIONI DEL GENE *SETX* RESPONSABILE DI APRASSIA CON ATASSIA OCULOMOTORIA TIPO 2**

### **Aspetti genetici e molecolari**

Nel 2000 Nemeth e colleghi e Bomont e colleghi indipendentemente condussero degli studi di linkage su famiglie con atassia recessiva simile clinicamente all'atassia telangiectasia ma senza le caratteristiche extra-neurologiche di quest'ultima. I primi studiarono una grossa famiglia pakistana con aprassia oculomotoria ma con livelli di AFP normali, i secondi una famiglia giapponese con alti livelli di AFP ma senza aprassia oculomotoria. Si localizzò un locus sul cromosoma 9q34 di 17 cM nello studio di Bomont (Bomont et al, 2000), e di 15,9 cM in quello di Nemeth (Nemeth et al, 2000). La successiva identificazione di ricombinazioni distali e prossimali in famiglie con 2 individui affetti, ha permesso di restringere l'intervallo a 1,1 Mb, contenente 13 geni. Il sequenziamento di questi geni ha consentito di individuare il gene responsabile AOA2. Il gene è stato chiamato *SETX* ed è costituito da 26 esoni (Moreira et al, 2004).

Mutazioni di *SETX* sono anche associate con una forma di sclerosi laterale amiotrofica con esordio giovanile e trasmissione autosomica dominante (Chen et al, 2004). *SETX* codifica per la senataxina, una proteina di 2,677 aminoacidi che contiene all'estremità C terminale un dominio tipico della superfamiglia I della DNA/RNA elicasi (Moreira et al, 2004). La funzione della senataxina è a tutt'oggi sconosciuta. Essa ha un'estesa omologia con le proteine Sen1p di *Schizosaccharomyces pombe* che possiedono un'attività elicasica e sono necessarie per il processing dei diversi RNA tra cui RNA transfer, ribosomiale e gli small nuclear RNA (Ursic et al, 1997). Le proteine Sen 1p interagiscono anche con altre DNA/RNA elicasi come Upf1 coinvolte nel non-sense mediated decay e IGHMBP2 mutata in una forma di atrofia muscolare sistemica. Mediante il doppio ibrido con proteine candidate sono state identificate Rpo21p che è una subunità dell'RNA polimerasi II e Rnt1p una endoribonucleasi necessaria per la maturazione dell'RNA fornendo un ulteriore sostegno all'ipotesi di un ruolo di Sen1p nel processing dell'RNA. Recentemente è stato dimostrato anche che la sostituzione di un solo aminoacido compromette la funzione dei Sen1p in *Saccharomyces cerevisiae* alterando la distribuzione dell'RNA polimerasi II in tutto il genoma e indicandone quindi un ruolo anche nella regolazione della trascrizione (Steinmetz et al, 2006). Infine Sen1p



interagisce anche con Rad2p una Dnasi necessaria per il NER (Ursic et al, 2004). Queste osservazioni nell'ortologo di lievito, insieme con il fototipo che si sovrappone con le altre forme di atassie autosomiche recessive da danno del riparo del DNA come AOA1 ed AT, hanno lasciato ipotizzare che anche la senataxina sia coinvolta nei meccanismi di riparo del DNA. Recentemente Suraweera et al, 2007, hanno studiato questo aspetto ed hanno dimostrato che le cellule di AOA2 sono sensibili all'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, alla camptotecina, alla mitomicina C, e non alle IR. Il fenotipo revertiva con il cDNA full length di *SETX*. Il pattern di sensibilità delle cellule di AOA1 e AOA2 è quindi simile (Gueven et al, 2004). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, camptotecina, mitomicina C inducono un danno al SSB, ma Suraweera et al non hanno evidenziato alcun difetto nel riparo del SSB in AOA2 al contrario di quanto descritto in AOA1, quindi le basi di questa sensibilità agli agenti che inducono SSB sono diverse nelle 2 malattie. La tossicità di questi agenti, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, camptotecina, mitomicina C è associata anche al pathway dell'ossidazione (Pagano et al, 2005). L'analisi dei marcatori di stress ossidativo (8-oxo-dG) nelle cellule di AOA2 ha mostrato un livello basale alto di danno ossidativo al DNA suggerendo una ridotta capacità di riparo di questo tipo di lesione. Suraweera et al hanno anche osservato che i foci marcati con  $\gamma$ H2AX (proteina che segnala il danno al DNA) e MDC1 (una proteina che interagisce con  $\gamma$ H2AX e fa da ponte nel legare il macchinario della risposta al danno con il sito leso) erano presenti in ugual misura nei controlli e nelle cellule di AOA2 in risposta al trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tuttavia, la percentuale di scomparsa dei foci di  $\gamma$ H2AX era significativamente ridotta nelle cellule di AOA2 in confronto ai controlli dopo 4-8 ore dal trattamento. La presenza di un alto contenuto costitutivo di 8-oxo-dG non favorisce un aumento delle lesioni indotte dall'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ma è possibile che interferiscano con la percentuale di riparo dei DSB. Il difetto nel riparo di quest'ultimo non è generale poiché le cellule di AOA2 sono efficienti nel riparare le lesioni indotte da IR (i principali inducenti di DSB). Questo suggerisce che la natura delle lesioni indotte da IR è differente da quelle indotte da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Attualmente, pertanto si ipotizza che la senataxina sia coinvolta nel riparo del danno al DNA dovuti allo stress ossidativo. Non è chiaro se la compromissione del riparo riguardi principalmente i danni al singolo o al doppio filamento.

## Aspetti clinici

Tra le forme con deficit del *DNA repair* è stata recentemente inserita l'atassia con aprassia oculomotoria di tipo 2 (AOA2; Moreira et al, 2004).

Il fenotipo di AOA2 è caratterizzato da atassia, neuropatia periferica e aprassia oculomotoria. L'età d'esordio è tra i 10 e i 22 anni (Moreira et al, 2004). Il disturbo è lentamente progressivo. L'atassia cerebellare è generalmente il primo segno della malattia ed è la causa principale della disabilità (Nemeth et al, 2000) (Le Ber et al, 2004). Circa il 90% dei pazienti con AOA2 mostra una neuropatia sensitivo-motoria confermata dall'EMG, con ipo-areflessia osteotendinea, atrofie muscolari e ipopallesesia (Moreira et al, 2004). Alla biopsia del nervo si evidenzia un quadro di neuropatia assonale (Moreira et al, 2004). Nel 47% dei pazienti è presente anche aprassia oculomotoria (Moreira et al, 2004), contro l'86% dei casi nei pazienti con AOA1 (Moreira et al 2001). Alcuni autori, pertanto, hanno proposto di classificare la patologia non col nome di AOA2 ma con quello di SCAN2 (spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy type 2) anche perchè l'associazione atassia-neuropatia sembra essere quella più rappresentativa del quadro clinico (Duquette et al, 2005). Il termine aprassia, che indica l'incapacità da parte del paziente di eseguire i comandi che gli vengono impartiti dall'esaminatore, viene in questo caso usato impropriamente. Infatti nell'aprassia oculomotoria vi è una dissociazione molto specifica tra il movimento della testa e la deviazione degli occhi, dovuta a una difficoltà a iniziare i saccadici. Pertanto, invitando il paziente a guardare lateralmente, egli ruoterà prima la testa fino alla posizione di arrivo, mantenendo gli occhi nella posizione di partenza, in un secondo momento raggiungerà il bersaglio anche con gli occhi (Cogan, 1953). In molti individui è anche stato evidenziato nistagmo nello sguardo laterale e movimenti di inseguimento frammentati. Il riflesso vestibolo oculare (VOR) è normoelicitabile ma non sopprimibile dalla fissazione (Le Ber et al, 2004). Nel 20% dei pazienti sono stati osservati postura distonica delle mani, movimenti coreici, tremore del capo e tremore posturale (Nemeth et al, 2000) (Le Ber et al, 2004). In alcuni pazienti è presente una sindrome disesecutiva, come evidenziato da test neuropsicologici, ma nessuno mostra grave ritardo mentale o demenza (Le Ber et al, 2004). In alcuni pazienti sono anche presenti disfagia e disturbi sfinterici (Le Ber et al, 2004). Gli esami di laboratorio mostrano livelli di alfafetoproteina (AFP) nel sangue elevati in almeno una su tre misurazioni nel 100% dei casi (Moreira et al, 2004). I livelli sono, però, estremamente variabili e si mantengono in

genere su valori più bassi rispetto all'ataxia telangiectasia (Le Ber et al, 2004). Il colesterolo è aumentato nel 50% degli individui (>5,6 mmol/L) e in alcuni di essi sono aumentati anche CK, IgG e IgA (Le Ber et al, 2004). In tutti i pazienti la risonanza magnetica evidenzia atrofia cerebellare, soprattutto del verme. Il tronco cerebrale, invece, è integro (Moreira et al, 2004). La diagnosi differenziale di AOA2 va posta con AOA1, ataxia telangiectasia e ataxia di Friedreich (vedi anche tabella 1-AOA2). Generalmente AOA1 si manifesta prima, essendo l'età d'esordio tra i 2 e i 15 anni, e più rapidamente porta alla perdita della deambulazione, costringendo il paziente alla sedia a rotelle. La corea è più grave e precoce ma tende a scomparire col tempo a differenza di AOA2. I dati di laboratorio evidenziano in AOA1 una bassa concentrazione di albumina e alti livelli di colesterolo (Date et al, 2001) (Moreira et al, 2001). L'ataxia telangiectasia è un disturbo in cui compaiono ataxia, aprassia oculomotoria, alti livelli di AFP ed è causata da mutazioni nel gene ATM (Broeks et al, 2003). AOA2, però, non condivide le caratteristiche extraneurologiche di quest'ultima, come l'immunodeficienza, l'instabilità cromosomica, le telangiectasie (Le Ber et al, 2004). L'ataxia di Friedreich, causata da un'abnorme espansione della tripletta GAA nel gene della frataxina sul cromosoma 9q13 (Pandolfo, 2002), può essere esclusa per l'assenza in questi pazienti di scoliosi, coinvolgimento cardiaco e per la progressione più lenta. Le differenze fenotipiche fra queste forme non permettono, però, una diagnosi di sicurezza, che è garantita solo da test genetici.

**Tabella 1-AOA2.** Repilogo delle principale caratteristiche di alcune delle atassie da difetto nel riparo del DNA.

	AOA1	AOA2	Atassia telangiectasia	SCAN1
Gene coinvolto	APTX	SETX	ATM	TDP1
Meccanismo del DNA repair coinvolto	BER	NER	DSBR	SSBR
Età d'esordio (anni)	2-15	10-22	3-7	13-20
Atassia cerebellare	+	+	+	+
Aprassia oculomotoria	+	+/-	+	-
Disartria	+	+	+	+
Neuropatia periferica	+	+	+	+
Segni extrapiramidali	Precoci ma esauribili	Tardivi ma costanti	+	-
ipostenia	+	+	+	+
Intelligenza	Moderatamente compromessa	Moderatamente compromessa	Normale	Normale
Predisposizione ai tumori	-	-/?	+	-
Telangiectasie	-	Rare o assenti	+	-
Immunodeficienza	-	-	+	-
Immunoglobuline sieriche	Normali	↑ IgG in alcune famiglie	↓ IgA, IgE, IgG2 ↑ IgM	Normali
Livelli di AFP	↑	↑	↑↑	Normali
Livelli di Albumina	↓	Normali	Normali	↓
Livelli di colesterolo	↑	↑	Normali	↑
RM	Atrofia cerebellare e soprattutto vermiana	Atrofia cerebellare soprattutto vermiana	Atrofia cerebellare e cerebrale tardiva	Atrofia cerebellare, lieve atrofia cerebrale

## **Obiettivi dello screening mutazionale di SETX**

Allo stato attuale delle conoscenze la rilevanza epidemiologica di AOA2 non è chiara. Finora esiste un unico studio che ha indicato una frequenza di malattia pari all'8% in una popolazione del Mediterraneo (Le Ber et al, 2004).

Pertanto gli scopi del presente lavoro sono:

- 4) valutare le rilevanza epidemiologica di AOA2 nella nostra casistica di pazienti con atassia autosomica recessiva o sporadica ad esordio precoce con neuropatia;
- 5) studiare la correlazione genotipo-fenotipo.

## **Pazienti e metodi**

### *Pazienti*

Lo studio è stato svolto su 4 famiglie (Figura 1 - AOA2). Le prime due venivano da un gruppo di 35 casi indice selezionati tra 70 pazienti con EOCA provenienti dall'Ambulatorio per le Patologie Ereditarie del Dipartimento di Scienze Neurologiche dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II".

La selezione dei 35 pazienti è stata effettuata in base ai seguenti criteri:

- Presenza di atassia progressiva;
- Trasmissione autosomica recessiva o insorgenza sporadica;
- Presenza di segni clinici (riflessi achillei ridotti o assenti ed ipopallestesia) o neurofisiologici di neuropatia periferica;
- Esclusione di cause note di atassia in particolare test molecolare negativo per l'atassia di Friedreich;

Le famiglie 3 e 4, invece, sono state selezionate da un registro italiano di AT e i criteri di scelta sono stati la clinica suggestiva di AOA2 e normali livelli di proteina AT.

Previo consenso informato, tutti i pazienti studiati sono stati sottoposti ad un prelievo di sangue periferico. I pedigree delle quattro famiglie sono schematizzati in figura 5. Tutti i 10 pazienti provenienti dalle 4 famiglie citate sono stati sottoposti a un accurato e

completo esame neurologico. In tutti sono stati eseguiti gli esami di laboratorio di routine tra cui la misurazione dei livelli di Vitamina E e creatinin chinasi (CK) nel siero. I livelli di AFP sono stati misurati in 6 pazienti. Otto hanno eseguito una RM del cervello. Studi di conduzione dei nervi periferici sono stati effettuati in 8 pazienti, mentre in 2 è stata eseguita una biopsia del nervo surale.

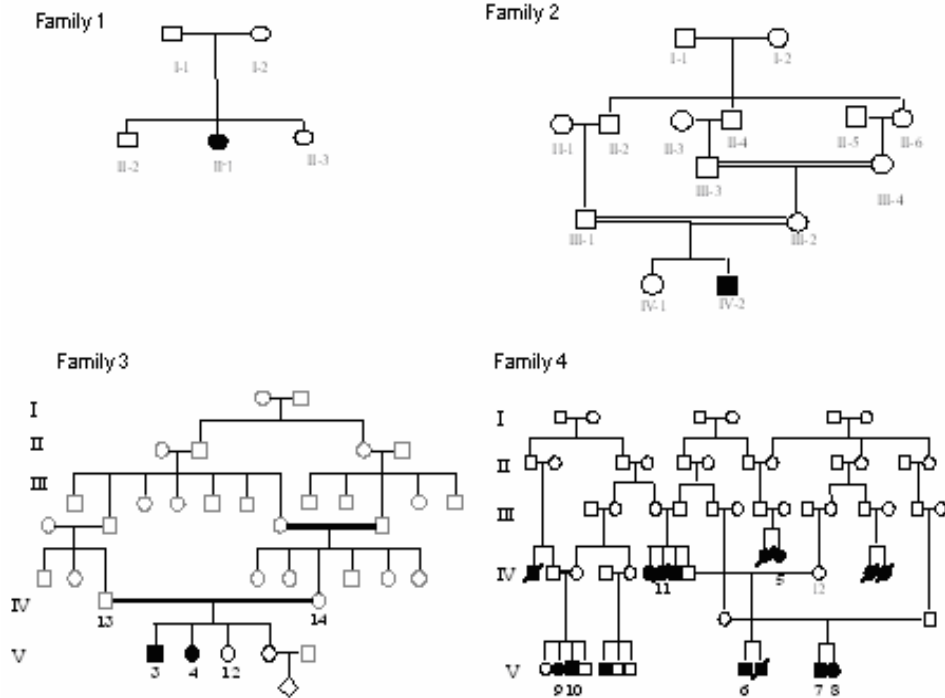


Figura 1 - AOA2: pedigree delle quattro famiglie con AOA2

## Metodi

### Screening di mutazione di SETX

L'estrazione di DNA dalle cellule nucleate del sangue è stata effettuata con tecniche convenzionali (Maniatis et al., 1982). Il DNA genomico di tutti i pazienti è stato amplificato mediante PCR.

E' stata utilizzata una macchina GeneAmp PCR System 9600 Perkin Elmer e la reazione di amplificazione è stata condotta in un volume finale di 50 µl contenente:

- 50 ng di DNA genomico
- 0,2 mM di dNTP

- 20 pM/μl di primer F
- 20 pM/μl di primer R
- (1x) Buffer AmpliTAQGold
- 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> \*
- 2,5 U AmpliTaqGold (Pelkin Elmer).

La reazione di amplificazione è avvenuta secondo lo schema seguente:

1 ciclo di denaturazione del DNA a 95°C della durata di 10 minuti;

35 cicli di amplificazione ciascuno dei quali comprendente 30 secondi di denaturazione a 95°C;

30 secondi di “annealing” alle temperature indicate per le coppie di primers in tabella ;

30 secondi di elongazione a 72°C.

1 ciclo finale di elongazione a 72°C della durata di 10 minuti;

5 μl dell’amplificazione sono stati caricati e corsi per elettroforesi su gel di agarosio 1.5% per verificare la corretta lunghezza dei frammenti mediante il confronto con un marcatore di lunghezza nota (100 bp BioLabs), e per escludere l’assenza di eventuali prodotti aspecifici.

Gli amplificati sono stati analizzati mediante dHPLC ed in caso di profili anomali sono stati sequenziali.

\*per l’esone 1012 F/R è stata utilizzata una concentrazione di MgCl<sub>2</sub> di 1 mM invece che 1,5.

#### Analisi di co-segregazione tra malattia e mutazione

Al fine di valutare l’effetto patogenetico delle mutazioni individuate abbiamo analizzato la loro co-segregazione con la malattia nelle famiglie 1, 3 e 4. E’ stato prelevato un campione di sangue da ciascun componente, previo consenso informato, ed estratto il DNA.

I componenti della famiglia 2 non sono stati analizzati in quanto non disponibili per il prelievo.

Le mutazioni sono state indagate tramite sequenziamento diretto nella famiglia 1, PCR duplex nella famiglia 3 ed enzima di restrizione nella famiglia 4.

- PCR duplex

Per valutare la co-segregazione della mutazione con la malattia nella famiglia 3 è stata praticata un PCR-duplex.

La tecnica della PCR-duplex è analoga a quella appena descritta con la differenza che, come il nome suggerisce, vengono usate non una ma due coppie di primer. Nel caso dei pazienti della famiglia 3, dopo che il sequenziamento aveva evidenziato la presenza di una delezione di circa 20 kb, si è deciso di utilizzare questa tecnica per valutare la presenza del riarrangiamento negli altri pazienti malati della stessa famiglia. È stato usata la coppia di primer Setx15-16C\_F (5'-TCCTCTCTGAGTACAGAGAC-3') e Setx24R (5'-GGTGTTCTCTAACAGTGAT-3') per amplificare solo l'allele deleto e la coppia Setx16F (5'-AGCAGTGTCCCTTATTAGTCC-3') e Setx17R (5'-AACTAGTTCGTATACCTGAG-3') per amplificare solo l'allele wild-type. I frammenti sono poi stati caricati e corsi per elettroforesi su gel di agarosio 1.5% per verificare la lunghezza mediante il confronto con un marcatore di lunghezza nota (100 bp BioLabs ).

- Enzima di restrizione Rsa I

Gli enzimi di restrizione si classificano in eso ed endo nucleasi: le esonucleasi partono dall'estremità della catena polinucleotidica, attaccando il 3' o 5'. Le endonucleasi tagliano solo all'interno della catena.

Sono stati isolati numerosi enzimi di restrizione (I II e III ) e metilasi (associate e non). Gli enzimi di restrizione di tipo I e III sono in grado di legare sequenze specifiche, però tagliano lontano dal sito di riconoscimento. Gli enzimi di tipo II tagliano solamente all'interno del sito di riconoscimento. Tutti riconoscono una sequenza palindromica (che presenta un asse di simmetria binario: se letti da sinistra o da destra hanno stessa sequenza). Il numero di basi riconosciute può variare, in genere 4, 6, 8 o anche di più.

Per confermare la co-segregazione della mutazione in tutti i membri della famiglia 4 è stato utilizzato l'enzima di restrizione *Rsa I*, il quale riconosce in maniera specifica la sequenza 5'-GTAC-3' tagliando tra la timina e l'adenina. La mutazione nella famiglia 4 elimina questo sito di restrizione.



## Risultati

### *Risultati molecolari*

#### Screening di mutazione

Lo screening molecolare ha permesso di identificare nei pazienti provenienti dall'Ambulatorio per le Patologie Ereditarie del Dipartimento di Scienze Neurologiche dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II" le seguenti mutazioni:

nella paziente II-2 della *famiglia 2* (figura 1 – AOA2), è stata identificata la delezione omozigote di una singola base, 3466delG, che causa un frameshift a valle di I1155 con comparsa di un nuovo codone di stop a livello dell'aminoacido 1157. Questa delezione non era mai stata evidenziata in precedenza.

Il paziente IV-2 della *famiglia 2* (figura 1 – AOA2) è risultato essere omozigote, nell'esone 10-1, per la mutazione c.1406A→G, risultante in una sostituzione dell'arginina al posto dell'istidina al residuo 469 (H469R). Tale sostituzione non era mai stata evidenziata prima in letteratura. Trattandosi di una nuova mutazione si è proceduto all'analisi di 200 cromosomi di controllo allo scopo di dimostrare che la mutazione era presente in meno dell'1% della popolazione e distinguerla, dunque, da un eventuale polimorfismo. Il paziente, inoltre, è risultato essere portatore anche del polimorfismo sinonimo, 3147 C→T.

Sono stati anche individuati i due polimorfismi A660G e V1386I già riportati in letteratura, rispettivamente in 2 e 6 pazienti della serie.

I pazienti selezionati nel registro italiano di AT hanno dato invece i seguenti risultati: nella *famiglia 3* (figura 1 – AOA2) si è ipotizzata una delezione su vasta scala dall'esone 16-24 successivamente confermato. È stato identificato un riarrangiamento omozigote misurante circa 20 kb (c.1606+3393\_c.7101-22del20648pb/ins.25pb). La mutazione rimuove le sequenze degli esoni 16-24, ed è affiancata da un tandem repeat di 8 pb (5'-GTAAATTT-3').

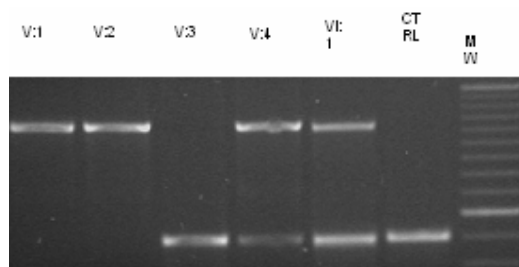
Nella *famiglia 4* (figura 1 – AOA2) è stata evidenziata una mutazione omozigote c.7199+5G→A nel sito di splicing dell'introne 25 di *SETX*.

### Analisi di co-segregazione

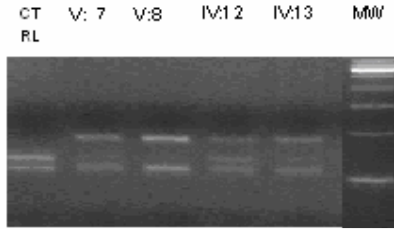
*Famiglia 1*: i soggetti I-1 e I-2 sono eterozigoti per la mutazione. I soggetti II-2 e II-3 sono risultati wild type.

Per la *famiglia 2*, come già detto, non si dispone dell'analisi.

Per la *famiglia 3* la conferma della co-segregazione della mutazione col fenotipo della malattia è avvenuta grazie all'impiego della PCR-duplex. La corsa elettroforetica dei prodotti evidenziava nei soggetti omozigoti per la mutazione la presenza di un amplificato di grosse dimensioni compreso tra i primer Setx15-16C\_F e Setx24R. Al contrario quella dei soggetti sani, evidenziava un amplificato più piccolo compreso tra i primer Setx16F e Setx17R; negli eterozigoti erano presenti entrambi (figura 2 - AOA2). La mutazione nella *famiglia 4* è stata confermata in tutti gli individui con una PCR-RLFP (Restriction Length Fragment Polymorphism) impiegando l'enzima di restrizione *RsaI* (Figura 3 - AOA2).



**Figura 2-AOA2.** CR duplex nella famiglia 3. Un singolo frammento PCR di 505-bp si ottiene negli individui wild-type (V:3 e CTRL). Un frammento di 1144-bp si genera in presenza della delezione (pazienti V:1 e V:2). Gli eterozigoti mostrano entrambi i prodotti di PCR (505 e 1144-bp). Le colonne si riferiscono agli individui come nel pedigree della figura 1 – AOA2. CTRL, DNA di controllo; MW, marker molecolare di grandezza del DNA.



**Figura 3-AOA2.** PCR-RFLP nella famiglia 4. un frammento di 295-bp è stato amplificato usando i primer 25F e 25R. L' amplicone è stato clivato con l' endonucleasi *Rsa1* e corso su gel 2% MetaPhor/1% agarosio ed etidio bromuro. L'amplicone wild-type è frammentato in prodotti della misura di 136-,115-, e 40-bp (non mostrato). La presenza della mutazione omozigote abolisce il sito di taglio per *Rsa1*, generando frammenti di 180 e115 bp. Gli eterozigoti presentano 4 frammenti (180, 136, 115, and 40-bp (non mostrato).; Le colonne si riferiscono agli individui come nel pedigree della figura 1 – AOA2. CTRL,DNA di controllo; MW, marker molecolare di grandezza del DNA.

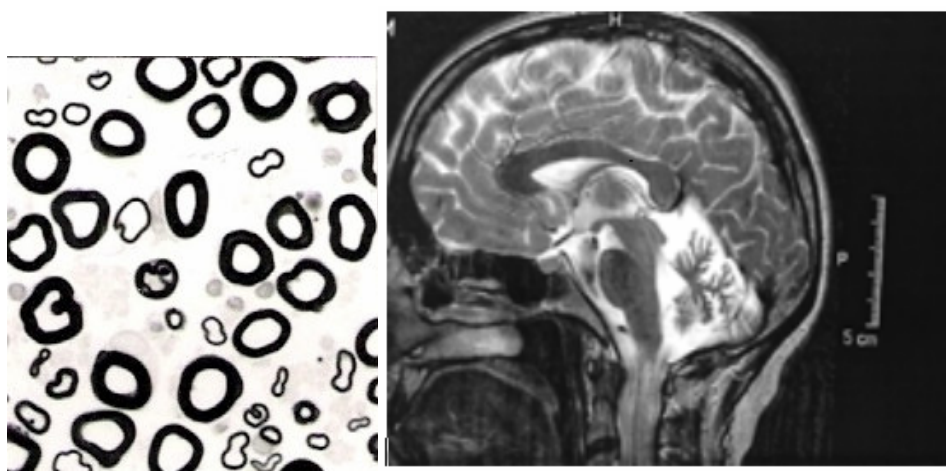
### *Risultati clinici*

Le caratteristiche cliniche sono riassunte in tabella 2 – AOA2.

Nella nostra serie l'età media d'esordio era  $20,3 \pm 8,1$  anni (range 3-30). Il sintomo iniziale era atassia della deambulazione in tutti i pazienti. Nessuno era in grado di camminare autonomamente al momento della visita, nonostante la lenta progressione della malattia. I pazienti erano costretti alla sedia a rotelle in media  $15,8 \pm 7,4$  anni dopo l'esordio della malattia. Tutti mostravano segni di compromissione cerebellare: atassia degli arti e del tronco, parola disartrica. In otto pazienti era presente nistagmo nello sguardo laterale. L'aprassia oculomotoria, o meglio, la dissociazione testa-occhi nei movimenti di lateralità, era presente in due pazienti pur essendoci variabilità durante le varie visite. In tutti erano presenti disfagia, segni di neuropatia periferica (come areflessia e perdita di forza muscolare distale), risposta plantare in flessione, anomalie della colonna vertebrale e deformità dei piedi. In tutti i pazienti, tranne uno, era presente deficit del senso di posizione e vibrazione. Negli stadi avanzati della malattia tre pazienti mostravano deterioramento cognitivo, anche se nessun test neuropsicologico è stato effettuato per dimostrarlo. Un paziente inoltre mostrava anche sintomi extra piramidali, con movimenti coreici della testa e distonia del tronco, ma questi sono scomparsi nel corso della malattia. Un altro paziente ancora presentava tremore del capo.

Le indagini di laboratorio mostravano livelli normali di CK, colesterolo, albumina. I livelli di AFP sono risultati sempre aumentati. In tutti i pazienti che si sono sottoposti a una RM cerebrale, era presente un'evidente atrofia cerebellare (fig. 4 - AOA2).

Nel paziente V-8 della famiglia 4 la biopsia del nervo surale rilevava una marcata deplezione delle fibre mieliniche piccole e grandi mentre nel paziente 1 solo delle fibre grandi (figura 4 - AOA2).



**Figura 4 - AOA2.** Biopsia del nervo surale e RM in un paziente con AOA2

Nel paziente 11 è stato effettuato un esame autoptico. Il decesso era avvenuto all'età di 79 anni per scompenso cardiaco. Macroscopicamente era chiaramente presente una marcata atrofia cerebellare, più evidente nel lobo anteriore, con tronco encefalico, gangli della base, midollo spinale intatti. L'esame al microscopio evidenziava una perdita marcata di cellule del Purkinje del verme del cervelletto e una perdita più moderata di cellule nel nucleo dentato. Un certo grado di atrofia era presente al livello del nucleo dell'oculomotore e, nel midollo spinale, al livello delle colonne del Clarke. Era evidente, infine, un certo grado di demielinizzazione delle colonne posteriori del midollo spinale, mentre i neuroni della corteccia apparivano normali sia per forma che per numero.

**Tabella 2 - AO2. Caratteristiche cliniche dei pazienti con AOA2.**

Famiglia	1	2	3	3	4	4	4	4	4	4
pazienti	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Consanguineità dei genitori	No	Si	Si	Si	P	P	P	P	Si	Si
Sesso / età d'esordio/ età alla visita (aa)	F/15 / 27	M/3/ 32	M/1 5/ 40	F/19 / 38	F/25 / 67	M/18/ 66	M/3 0/54	F/30 /58	F/2 5/6 0	M/23/49
Durata fino alla sedia a rotelle (aa)	17	21	17	17	28	15	5	5	23	10
Segni all'esordio	AC	AC	AC	AC	AC	AC	AC	AC	A C	AC
Atassia della deambulazione	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Disartria	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nistagmo	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Disfagia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Apraxia oculomotoria	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Areflessia	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ipostenia arti inferiori	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
Deficit del senso di posizione/vibrazione	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Declino cognitivo	-	?	-	-	+	+	+	-	-	-
Deformità scheletriche	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Atrofia cerebellare alla RMN	+	+	+	+	NE	NE	+	+	+	+
Neuropatia assonale	+	+	+	+	NE	NE	+	+	+	+
Livelli di AFP aumentati	+	+	+	+	NE	NE	NE	NE	+	+
Mutazione omozigote di SETX	3466 delG	1406 A>G	c.61 06+3 393_ c.71 01- 22de 1206 48bp /ins2 5bp	c.61 06+3 393_ c.71 01- 22de 1206 48bp /ins2 5bp	c.71 99+5 g>a	c.7199 +5g>a	c.71 99+5 g>a	c.71 99+5 g>a	c.7 19 9+ 5g >a	c.7199+5g>a

Presenza e severità delle caratteristiche: + = da lieve a moderato, ++ = grave; - = assente.; P = Possibile. NE = non eseguita; AC = atassia cerebellare

## Discussione

Finora sono state riportate solo due serie di pazienti con AOA2, una multi-etnica ed una franco-canadese. Nella prima sono riportate 6 famiglie, selezionate tra 77 con atassia cerebellare di tipo non Friedreich con un linkage al locus 9q34. In questo studio AOA2 rappresentava l'8% dei casi di atassia cerebellare autosomico-recessiva di tipo non Friedreich in pazienti adulti, con una frequenza superiore pertanto a quella dell' atassia telangiectasia (1,9%) e di AOA1 (5%) (Le Ber et al, 2004). La seconda serie, invece, descriveva un unico cluster di 10 famiglie franco-canadesi con mutazione del gene *SETX* (Duquette et al, 2005). Il lavoro di Moreira e colleghi fino adesso ha riportato 15 diverse mutazioni nel gene della senataxina responsabili di malattia (Moreira et al, 2004). Nello studio franco-canadese, invece, sono state riportate 4 mutazioni, di cui 2 mai riportate in letteratura (Duquette et al, 2005).

Nel nostro studio le famiglie 1 e 2 sono originarie dell'Italia meridionale (Campania e Sicilia), la famiglia 3 è originaria del Lazio, e infine la famiglia 4 proviene dalla valle di Non in Trentino Alto Adige, i cui membri sono discendenti di un piccolo gruppo di origine tedesca con frequenti matrimoni tra consanguinei. La distribuzione dei pazienti su tutto il territorio italiano, unito alla presenza di mutazioni diverse in ogni famiglia, esclude l'ipotesi in Italia di un effetto fondatore, al contrario di quanto evidenziato nella serie franco-canadese, in cui la mutazione L1976R era presente in 17 individui su 20 (85%). Nella nostra serie l'età media d'esordio è leggermente più tardiva rispetto alle serie descritte in precedenza (20,3 anni contro i 15,1 della serie di Le Ber e i 14,8 della serie franco-canadese). Sebbene inserito nell'acronimo, l'aprassia oculomotoria è un segno incostante della malattia: era infatti presente nel 20% dei pazienti analizzati in questo studio, nel 56 % dello studio multi-etnico, assente nella coorte franco-canadese. Mentre nello studio multi-etnico tutti i pazienti mostravano un lieve deterioramento cognitivo, senza mai arrivare però a un quadro di franco ritardo mentale o demenza, e lo studio franco-canadese evidenziava intelligenza normale, nella nostra serie tre pazienti mostravano lieve deterioramento cognitivo. Abbiamo riportato un solo paziente con movimenti coreici e distonici, che tuttavia sono scomparsi dopo tre anni di malattia. La corea era frequente (44%) e persistente nel gruppo multi-etnico, assente nella coorte franco-canadese. In tutti i pazienti finora studiati compresi quelli qui riportati non sono stati riscontrati tumori né aumentata suscettibilità ai tumori, sebbene due pazienti della serie franco-canadese siano morti per cancro. Il fenotipo inter e intra familiare è risultato

essere piuttosto omogeneo, solo la progressione della malattia varia tra i pazienti della famiglia 4. I pazienti V-7 e V-8 della famiglia 4 sono stati costretti alla sedia a rotelle dopo 5 anni di malattia, mentre nei restanti membri della famiglia la progressione era più lenta (range 10-28). È interessante notare che le pazienti II-1 della famiglia 1 e V-9 della famiglia 4 presentavano oligomenorrea come già riportato in 2 pazienti dello studio multi-etnico ed in un caso più recentemente (Lynch et al 2007). È suggestivo pertanto pensare che la senataxina sia coinvolta anche nella sopravvivenza delle cellule germinali e che sue mutazioni possano contribuire a ridurre la fitness riproduttiva. Infine, le mutazioni troncanti nelle famiglie 1, 3, 4 e missense nella famiglia 2 mostrano fenotipi simili, suggerendo che entrambe causino una perdita di funzione della proteina. Degno di nota è il fatto che la mutazione missense H469R non cada nel dominio elicastico, suggerendo che ci sia almeno un altro dominio funzionale nell'esone 10 all' N-terminale di senataxina.

È ragionevole, pertanto, pensare che AOA2 sia la causa più frequente di ARCA (Autosomal Recessive Cerebellar Ataxia), dopo l'ataxia di Friedreich, nella popolazione adulta e che, pertanto, i livelli di AFP dovrebbero sempre essere misurati nei pazienti con ataxia cerebellare esordita prima dei 35 anni.

## **SCREENING DI PAZIENTI ATASSICI, SPORADICI O CON TRASMISSIONE AUTOSOMICA RECESSIVA, PER MUTAZIONI DEL GENE SACS RESPONSABILE DELL'ATASSIA SPASTICA DI CHARLEVOIX-SAGUENAY.**

### **Cenni storici**

La prima descrizione della malattia risale al 1978, quando Bouchard descrisse 40 pazienti residenti nell'area di Charlevoix-Saguenay, nel nord est del Quebec.

Questa regione è storicamente e geograficamente divisa in due parti: la regione di Charlevoix e quella di Saguenay. La prima è una zona montagnosa sulla riva nord del fiume San Lorenzo, cento chilometri a est di Quebec City. Tra il 1665 e il 1725, circa quaranta famiglie migrarono dalla capitale insediandosi in quest'area. Nel corso di oltre un secolo i discendenti di queste famiglie e poche altre nuove venute popolarono l'intera regione. Tra il 1838 e il 1855 alcuni nuclei familiari si trasferirono da Charlevoix nella regione di Saguenay fino a quel momento zona protetta per il commercio delle pellicce. Nel 1851 esse rappresentavano più dell'80% della popolazione di Saguenay che allora era di 5000 abitanti (circa 800 famiglie) (Bouchard et al., 1978).

Ad oltre un secolo di distanza, nel 1993, 270.000 persone popolavano l'area di Saguenay e circa 330.000 quella di Charlevoix.

Grazie alla ridotta dimensione della popolazione che originariamente si insediò a Charlevoix, e a causa delle particolari condizioni che ne hanno determinato l'isolamento geografico, in tale zona sono state individuate numerose altre malattie genetiche quali la tirosinemia (Laberge et al., 1969) e la sindrome di Anderman (Anderman et al., 1976).

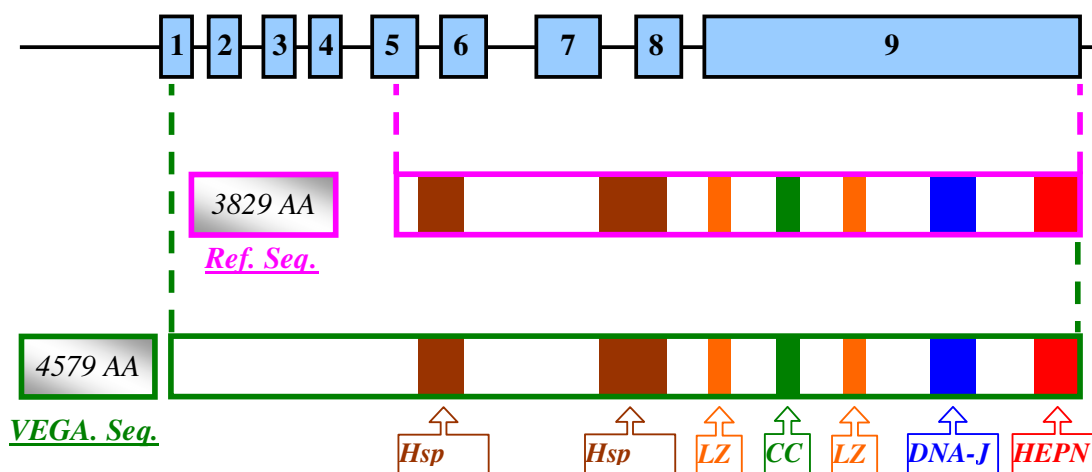
Recenti evidenze dimostrano la presenza dell'ARSACS anche al di fuori del Quebec. In particolare una famiglia tunisina (Mrissa et al., 2000) e due famiglie turche (Güciyener et al., 2001) furono descritte in linkage con il gene dell'ARSACS. La diffusione di questa atassia è inoltre evidenziata dalla recente individuazione di mutazioni di SACS, il gene responsabile dell'ARSACS, in quattro famiglie tunisine (El Euch-Fayache et al., 2003), in quattro famiglie turche (Richter et al., 2004), in quattro famiglie giapponesi (Ogawa et al., 2004; Hara et al., 2005; Shimazaki et al., 2005; Yamamoto et al., 2005) e in due famiglie italiane (Grieco et al., 2004).



## Aspetti genetici e molecolari

Nel 1999 Richter et al. hanno localizzato il locus dell'ARSACS sul cromosoma 13q11-12, nel corso di un genome wide scan (Richter et al., 1999). I ricercatori canadesi individuarono la presenza di due differenti aplotipi ancestrali che lasciavano ipotizzare la presenza di due diverse mutazioni nell'ambito della popolazione di Charlevoix-Saguenay. Lo stesso gruppo di lavoro nel 2000 è riuscito ad isolare il gene responsabile: *SACS*. *SACS* inizialmente comprendeva un unico gigantesco esone di 12794 bp, il più grande mai descritto negli organismi vertebrati, e codificava per una proteina di 3829 aminoacidi chiamata saccina.

Tuttavia i più recenti algoritmi di previsione genica (VEGA; GenBank, AL157766) indicano l'esistenza di altri otto piccoli esoni a monte della ORF originariamente descritta. La nuova ORF sarebbe di 13,74 kb e codificherebbe per una proteina di 4579 aminoacidi (Figura 1 - ARSACS).



**Figura 1 – ARSACS.** Struttura del gene *SACS* e della saccina

Le informazioni relative alla proteina sono ancora molto scarse.

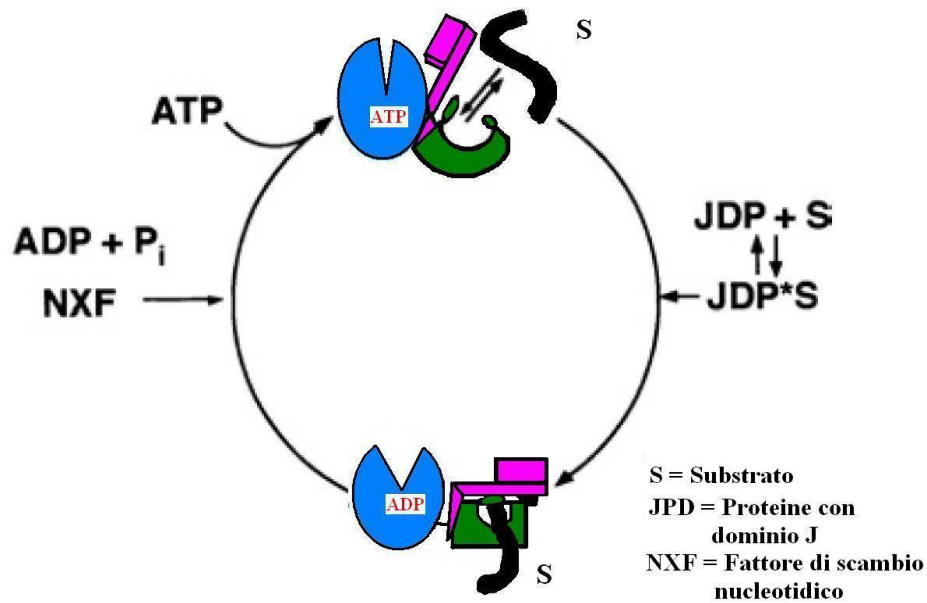
L'espressione della saccina sembra essere ubiquitaria: il Northern blot ha mostrato la presenza di un trascritto di analoga lunghezza nei fibroblasti, nel cervello, nel muscolo scheletrico, cuore, polmone e gonadi; sembra invece essere meno espresso nel pancreas, milza e rene. L'ibridazione in situ in cervello umano ha mostrato un intenso segnale in

tutte le aree del sistema nervoso centrale in particolare nella corteccia cerebrale, nello stato granulare del cervelletto e nell'ippocampo (Engert et al., 2000).

I programmi bioinformatici di predizione di struttura individuano la presenza di due domini leucine zippers, tre domini coiled-coils e sette segnali di localizzazione nucleare. La saccina presenta al dominio N-terminale un'estesa omologia di sequenza con l'Hsp 90. Inoltre, presso la porzione C-terminale, la saccina contiene un motivo "DNA-J", specifico della famiglia di proteine "J-domain-containing-protein family" (J-Proteins), che sembra interagire con Hsp70. Ciò ha permesso di formulare l'ipotesi che la saccina agisca come chaperonina nel "folding" delle proteine, nonostante le sue grandi dimensioni (Engert et al., 2000). Di recente si è dimostrato anche la presenza di un HEPN (higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide-binding domain) al C-terminale, dato che suggerisce un coinvolgimento della saccina nel legame a nucleotidi anche esso coinvolto nel folding proteico (Grynberg et al., 2003).

Le chaperonine evitano il misfolding e realizzano il corretto ripiegamento ed assemblaggio delle proteine attraverso un meccanismo ciclico ATP-dipendente, regolato anche da una gamma di varie co-chaperonine. Le Heat Shock Protein (Hsp) costituiscono un gruppo di proteine (Hsp 100, 90, 70, 60) con funzione di chaperonine, principalmente in condizioni di rialzo termico, ma non solamente (Bose et al., 1996; Craig et al., 1994). Le Hsp70 mostrano una struttura pressochè costante nelle varie isoforme, essendo composte da un dominio ATPasi actino-simile all'estremità N-terminale, da un dominio SBD (substrate binding domain) e da un dominio alla porzione C-terminale che è implicato nel legame ai co-chaperoni e probabilmente ha anche altre funzioni (Flaherty et al., 1991; Zhu et al., 1996).

Il legame dell'ATP al dominio ATPasi di Hsp70, riduce l'affinità del dominio SBD per i suoi substrati. Quindi le Hsp70 passano alternativamente da uno stato ATP-legato, in cui la tasca del dominio SBD sarà aperta, ad uno stato ADP-legato, in cui tale tasca sarà chiusa e sarà bloccato il legame ai substrati (Figura 2-ARSACS). In questo ciclo la tappa limitante è rappresentata dall'idrolisi dell'ATP. Questo passaggio viene fortemente accelerato dalle "J-proteins" grazie alla loro capacità di accoppiare scissione dell'ATP con il legame al substrato (Mayer et al., 1998). A questo livello potrebbe agire la saccina e legare l'ATP con il dominio HEPN.



**Figura 2-ARSACS:** Ciclo funzionale della chaperonina Hsp70

L'analogo del gene *SACS* nel topo mappa sul cromosoma 1 nell'ambito di una regione dove, prima della sua scoperta, era stata individuata tramite linkage una mutazione recessiva detta "tumbler" (Dickie et al., 1965). Il topo "tumbler", la cui linea si è estinta, presentava atassia e tendeva a cadere. Si è ipotizzato che questo topo presentasse una mutazione di *SACS* (Engert et al., 2000).

Nella popolazione canadese sono state individuate due diverse mutazioni come i due aplotipi ancestrali precedentemente descritti lasciavano pensare. La prima mutazione consiste in una delezione di una T in posizione 6594 (6594delT) di *SACS* (Engert et al., 2000) ed è presente nel 94% dei pazienti (Mercier et al., 2001). 6594delT determina un frameshift con l'introduzione precoce di un codone di stop. La seconda, una transizione C in T al nucleotide 5254 (5254 C→T) (Engert et al., 2000) è presente nel 3% dei pazienti, sempre in eterozigosi composta con 6594delT (Mercier et al., 2001). 5254 C→T causa la sostituzione di un'arginina con un codone di stop. Entrambe le mutazioni quindi portano alla formazione di una proteina più corta. Infine il restante 3% della popolazione canadese studiata presenta una mutazione sconosciuta sempre in eterozigosi con 6594delT (Mercier et al., 2001).

A partire dal 2003 mutazioni del gene *SACS* sono state trovate anche in famiglie non canadesi, in particolare in quattro famiglie tunisine (El Euch-Fayache et al., 2003), quattro famiglie turche (Richter et al., 2004), quattro famiglie giapponesi (Ogawa et al.,

2004; Shimazachi et al., 2005; Hara et al., 2005; Yamamoto et al., 2005), in due famiglie italiane (Grieco et al., 2004). Nella tabella 1 sono riportate tutte le mutazioni del gene *SACS* fino ad ora trovate.

**Tabella 1.** Mutazioni in *SACS*

<b>Mutazione</b>	<b>Paese</b>
p.Arg1752X	Quebec
p.Pro2198ProfsX4	Quebec
p.Ala3324Pro	Tunisia
p.Ile360AsnfsX1	Tunisia
p.Ile445MetfsX12	Tunisia
p.Trp1196Arg	Tunisia
p.Gln595ProfsX4	Italia
p.Gln620X	Italia
p.Lys1529LysfsX12	Italia
p.Thr1667ArgfsX11	Italia
p.Phe304Ser	Giappone
p.Glu984GlyfsX2	Giappone
p.Gln1198X	Giappone
p.Ser1308LeufsX18	Giappone
p.Lys2181AsnfsX21	Giappone
p.Trp2498Arg	Giappone
p.R3575X	Giappone
p.4325X	Giappone
p.Cys648Arg	Turchia
p.Thr2683LysfsX26	Turchia
p.Leu3193LeufsX7	Turchia
p.Asn3799Asp	Turchia
p.Phe3306Cys	Spagna

## **Aspetti clinici**

L'ARSACS è un atassia neurodegenerativa autosomica recessiva caratterizzata dal progressivo coinvolgimento del sistema piramidale e cerebellare e da neuropatia periferica. Sono stati descritti più di 300 pazienti nella regione di Charlevoix-Saguenay dove la frequenza al portatore è stimata in 1/22 (De Braekeleer et al., 1993; Bouchard et al., 1998).

Dal punto di vista anatomopatologico la malattia è caratterizzata da degenerazione del cervelletto e in misura minore del midollo spinale. Uno studio post-mortem in un paziente di 21 anni (Richter et al., 1993) mostrò che l'alterazione principale è rappresentata dall'atrofia della porzione superiore del verme cerebellare, in particolare del lobulo centrale e del culmen; qui le cellule del Purkinje sono praticamente assenti e si rinvengono neuroni rigonfi contenenti granuli densi con materiale simile alla lipofusina. Alla precoce compromissione cerebellare segue una lenta progressiva degenerazione assonale dei fasci corticospinali e spinocerebellari del cordone laterale del midollo; presso i neuromeri caudali la degenerazione corticospinale risulta essere meno marcata rispetto a quella spinocerebellare.

Uno studio autoptico di un paziente di 59 anni (Bouchard et al., 2000) ha mostrato anomalie più marcate ed estese all'ippocampo, neocortex, nucleo di Meynert, globo pallido, nucleo dentato e cordoni posteriori del midollo. Alla biopsia del nervo surale si riporta una larga perdita di fibre mieliniche di grosso calibro, con forte variabilità della distanza internodale.

Si ipotizza inoltre un processo di mielinizzazione alterato delle fibre retiniche insieme a quelle del sistema nervoso centrale e periferico (Richter et al., 1993; Richter et al., 1996).

La sintomatologia esordisce nella prima infanzia, generalmente entro 12 –18 mesi; essa coinvolge innanzitutto gli arti inferiori con spasticità accompagnata da instabilità nella deambulazione e frequenti cadute (Bouchard et al., 1978; Richter et al., 1993). Il tono appare aumentato e i riflessi tendinei sono vivaci; sono presenti positività del segno di Babinski e spesso clono della patella e del piede.

L'atassia della marcia è lieve nelle fasi iniziali. La disartia si manifesta di solito con la parola rallentata nella prima infanzia e che diviene scandita ed esplosiva in età adulta. La diadococinesia è un segno precoce mentre la dismetria degli arti superiori compare

tardivamente nel corso della malattia, di solito dopo la perdita della deambulazione (Bouchard et al., 1998).

Altri segni precoci sono nistagmo, rallentamento delle saccadi e la peculiare presenza all'esame del fondo oculare di fibre mieliniche prominenti nella retina che s'irradiano dal disco ottico e coprono parzialmente i vasi retinici, prevalentemente presso l'area papillo-maculare (figura 3-ARSACS). Quest'ultimo reperto, peraltro di incostante rilievo, non sembra compromettere l'acuità visiva.

Cardiomiopatia e cifoscoliosi sono assenti. Nei pazienti canadesi si riscontra frequentemente prolasso della valvola mitrale. Le deformità del piede, caratterizzate da piede cavo o equino, assenti nella fase iniziale della malattia, compaiono entro i vent'anni nella maggior parte dei pazienti.

Le funzioni cognitive non sono significativamente compromesse, anche nella fase avanzata della malattia; vi è però una discrepanza tra QI verbale e QI non verbale, per cui quest'ultimo si presenta inferiore ai limiti della norma.



**Figura 3-ARSACS.** Striature mieliniche all'esame del fondo oculare (Ogawa et al, 2004)

Tremore delle mani, grimaces del volto, posture diafasiche e disfagia sono raramente rilevate.

La progressione della malattia diviene evidente intorno ai 20 anni, quando aumenta il tono muscolare e la deambulazione diviene a forbice. I segni cerebellari, lievi nelle fasi iniziali divengono più marcati a partire dall'adolescenza. Compagno, inoltre, i segni della polineuropatia assonale motoria caratterizzata dalle amiotrofie distali e dalla perdita dei riflessi achillei intorno ai 25 anni. La pallestesia, inizialmente normale, risulta marcatamente ridotta agli arti inferiori intorno ai 30 anni, mentre la sensibilità superficiale non sembra essere compromessa. Minzione imperiosa ed incontinenza compaiono intorno ai 40 anni nel 50% dei casi.

I pazienti sono destinati alla sedia a rotelle intorno ai 40 anni, con un range tra i 17 e i 57 anni. L'attesa di vita è ridotta; alcuni pazienti sopravvivono oltre i 70 anni, ma sono costretti a letto e la morte sopraggiunge per infezioni ricorrenti.

Tranne che per alcune piccole differenze, la sintomatologia e il decorso della malattia sono simili anche per i pazienti non canadesi: solitamente si tratta di forme caratterizzate da un quadro clinico meno marcato, e la variabilità riguarda prevalentemente l'età di esordio e il riscontro delle anomalie retiniche e del deficit cognitivo e l'assenza di spasticità.

L'età di esordio media è più tardiva nelle sei famiglie tunisine, essendo compresa tra 1 e 20 anni (Mrissa et al., 2000; El Euch-Fayache et al., 2003). In due famiglie giapponesi, oltre all'esordio tardivo intorno ai 20 anni, si riscontra assenza di ipertonia spastica e di ipereflessia; ma la presenza del segno di Babinski fa ipotizzare un possibile mascheramento della spasticità ad opera di una severa neuropatia periferica (Shimazaki et al., 2005, 2007). Relativamente alle quattro famiglie descritte da El Euch-Fayache, due pazienti presentavano scoliosi e in tutti la scomparsa dei riflessi achillei era precoce e non tardiva come nelle famiglie canadesi.

Le striature mieliniche della retina sono state ritrovate nei pazienti turchi (Güçüyener et al., 2001; Richter et al., 2004), in due pazienti tunisini (El Euch-Fayache et al., 2003) e in quattro pazienti giapponesi (Ogawa et al., 2004; Shimazaki et al., 2005). Esse erano invece assenti nei pazienti italiani (Grieco et al., 2004) e in quelli tunisini in linkage con il locus di ARSACS (Mrissa et al., 2000).

Deficit cognitivo è stato rilevato nelle famiglie giapponesi e in quelle turche (Ogawa et al., 2004; Shimazaki et al., 2005; Hara et al., 2005; Yamamoto et al., 2005; Richter et al., 2004).

Tra le peculiarità cliniche di riscontro nelle famiglie studiate riportiamo casi di oftalmoplegia esterna (Hara et al., 2005), amenorrea e dislipidemia (Yamamoto et al., 2005),

Dal punto di vista neurofisiologico, lo studio elettromiografico mostra segni di denervazione nei muscoli distali, mentre studi di conduzione nervosa mostrano una riduzione moderata-marcata della velocità di conduzione motoria, un aumento della latenza motoria distale e l'assenza dei potenziali di azione sensitivi ai quattro arti (Peyronnard et al., 1979; Bouchard et al., 1979). I potenziali evocati somatosensoriali, uditivi e visivi sono patologici dimostrando un esteso processo di degenerazione assonale sia nel primo neurone sensitivo che a livello del sistema nervoso centrale.

La risonanza magnetica cerebrale mostra l'atrofia progressiva della porzione superiore del verme cerebellare, mentre la porzione inferiore è risparmiata nel corso della malattia; tardivamente si evidenzia anche atrofia cerebrale. La risonanza magnetica del midollo spinale mostra un'atrofia prevalentemente a livello cervicale e toracico alto (Richter et al., 1993).

### **Obiettivi dello screening mutazionale di SACS**

Ci siamo proposti di sottoporre a screening pazienti EOCA con fenotipo ARSACS-simile per rilevare l'eventuale presenza di mutazioni del gene *SACS*. Scopi del nostro lavoro sono:

- 1) Studiare la correlazione genotipo-fenotipo
- 2) Valutare la rilevanza patogenetica dei nuovi esoni del gene *SACS*, con riferimento alla struttura proposta dai recenti algoritmi di previsione genica (VEGA).
- 3) Definire la diffusione di ARSACS in Europa e in altri paesi del bacino Mediterraneo, e sondare l'ipotesi di una mutazione comune in quest'area.

### **Pazienti e metodi**

#### *Pazienti*

Sono stati inclusi nello studio 15 pazienti con fenotipo simile all'ARSACS, provenienti da altrettante famiglie di diversa origine: 7 famiglie italiane, 1 famiglia spagnola e 7



famiglie originarie del Nord Africa. Nove pazienti discendono da genitori consanguinei (1 italiano, 7 nordafricani, 1 spagnolo).

La selezione dei pazienti è stata effettuata in base ai seguenti criteri:

- selezione di casi indice
- presenza di atassia progressiva
- trasmissione autosomica recessiva o insorgenza sporadica;
- esordio prima dei 25 anni;
- presenza di segni corticospinali (almeno due tra: riflessi osteotendinei vivaci, ipertono e segno di Babinski);
- presenza di segni clinici (riflessi achillei ridotti o assenti ed ipopallestesia) o neurofisiologici di neuropatia periferica;
- test molecolare negativo per l'atassia di Friedreich;

Previo consenso informato, tutti i pazienti studiati sono stati sottoposti ad un prelievo di sangue periferico.

### *Metodi*

#### Studio di linkage

Nei nove pazienti provenienti da famiglie con genitori consanguinei è stato effettuato uno studio di linkage, assumendo che, in presenza di consanguineità, soggetti omozigoti per tutti i markers testati possano essere considerati in possibile linkage con il locus studiato.

Per questo lavoro sono stati utilizzati quattro coppie di microsatelliti fiancheggianti il gene *SACS* (tabella 2 - ARSACS).

**Tabella 2 ARSACS:** Microsatelliti utilizzati per lo studio di linkage

<b>Microsatelliti</b>	<b>Sequenza ( 5' - 3' )</b>	<b>Temp. di annealing</b>
D13S232F	Fam-TGCTCACTGCTCTTGTGATT	56°C
D13S232R	GGCACAGAAATAAATGTTGATG	56°C
D13S1275F	Fam-ATCACTTGAATAAGAAGCCATTTG	58°C
D13S1275R	ATCACTTGAATAAGAAGCCATTTG	58°C
D13S787F	Hex-ATCAGGATTCCAGGAGGAAA	58°C
D13S787R	ACCTGGGAGTCGGAGCTC	58°C
D13S292F	Hex-TAATGGCGGACCATGC	58°C
D13S292R	TTTGACACTTTCCAAGTTGC	58°C

- Amplificazione dei microsatelliti mediante reazione di PCR e elettroforesi su gel di agarosio.

Le coppie degli oligonucleotidi utilizzate per amplificare i microsatelliti sono stati marcati a 5' con cromofori fosforamiditi (6-FAM,HEX) per permettere la rivelazione degli amplificati su sequenziatori automatici ABI PRISM 3100.

È stata utilizzata una macchina GeneAmp PCR System 9600 Perkin Elmer e la reazione di amplificazione è stata condotta in un volume finale di 10 µl contenente:

- 20 ng di DNA genomico
- 200 µM di dNTP
- 0.8 pM/µl di primer F
- 0.8 pM/µl di primer R
- 100 mM Buffer AmpliTAQGold
- 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 1 U AmpliTAQGold (Perkin Elmer).

La reazione di amplificazione è avvenuta secondo lo schema seguente:

1 ciclo di denaturazione del DNA a 95°C della durata di 5 minuti;

30 cicli di amplificazione ciascuno dei quali comprendente:

30 secondi di denaturazione a 95°C;

30 secondi di appaiamento ad una temperatura che varia da 56 a 60°C in dipendenza dei primers utilizzati;

30 secondi di elongazione a 72°C.

1 ciclo finale di elongazione a 72°C della durata di 10 minuti.

2 µl di amplificato sono stati caricati e corsi per elettroforesi su gel di agarosio 1.5%, per controllare la presenza degli amplificati e per escludere la presenza di eventuali prodotti aspecifici.

- Analisi dei microsatelliti

2 µl della reazione di amplificato vengono aggiunti a 12 µl di una miscela contenente:

- 11.5 µl di formamide al 97%
- 0.5 µl di 400HD ROX (blue dextran 50 mg/ml, 25 mM EDTA pH 8.0 e 21 frammenti di DNA di peso molecolare compreso tra 50 e 400 bp, legati ad un fluorocromo di colore differente da quelli usati per marcare i primers di PCR).

La miscela è caricata su di una multiwell a 96 posti e sottoposta ad un ciclo di denaturazione a 95°C per la durata di 5 minuti.

Si procede quindi alla preparazione di una scheda informativa che consenta di associare ciascun campione ad un pozzetto della multiwell.

Attraverso un capillare pescante direttamente nei pozzetti i campioni vengono caricati su un gel di poliacrilammide (5%, urea 6M), parte integrante dei sequenziatori automatici ABI PRISM 3100.

Tali apparecchi registrano i picchi di assorbimento per lo standard interno e per i vari fluorocromi legati ai primer usati nella reazione di amplificazione. I segnali di emissione sono poi registrati dalla CCD (Charge-Coupled Device) camera posta all'interno del sequenziatore e convertiti in segnali elettrici da un fotomoltiplicatore.

- Analisi dei dati

L'analisi dei picchi prodotti dall'ABI PRISM 3100 avviene con l'ausilio del programma "Genescan Analysis Software". Il software assegna valori di lunghezza definiti a ciascun picco dello standard interno creando una curva di calibrazione sulla base della quale è possibile l'identificazione della lunghezza dei microsattelliti.

Gene Scan converte quindi i "dati grezzi" in uscita in un elettroferogramma a cui è associata una tabella dei dati relativi ai vari picchi.

Sulla base dei dati forniti dal sequenziatore si è proceduto alla costruzione degli aplotipi.

### Screening del gene SACS

Per tutti i pazienti è stato amplificato e sequenziato l'intero gene SACS. Quest'ultimo è stato scomposto in vari prodotti di PCR, corrispondenti ai 9 esoni che lo costituiscono, secondo i recenti algoritmi di previsione genica (VEGA). L'esone 9, a causa delle sue grosse dimensioni, è stato scomposto in 15 prodotti di PCR, di circa 800 bp; analogamente l'esone 7 è stato suddiviso in tre frammenti. Nelle tabelle 3 - ARSACS e 4 - ARSACS sono mostrate le sequenze degli oligo utilizzati, le lunghezze degli amplificati e le temperature di appaiamento, rispettivamente per i primi otto esoni e per i 15 frammenti dell'esone nove.

**Tabella 3 – ARSACS.** Coppie di primer utilizzate per l'amplificazione degli esoni da 1 a 8

<b>Oligo</b>	<b>Sequenza ( 5' - 3' )</b>	<b>Dimensioni</b>	<b>Temp. di annealing</b>
1F	TCCAAGAATTTCTGCGACG	501 bp	58°C
1R	GCCTATGTTTCATTTGGGA		
2F	ACTGAGCGTCCCTCTGCTTT	321 bp	58°C
2R	ACAACCTCAGGACAAGCACAG		
3F	GATAAGAAGACTTAACAAGCA	233 bp	50°C
3R	GGTATATACTTCTGGTAAAG		
4F	CTCACTTAAAATGTGCTCCG	196 bp	58°C
4R	ACACTAATAGGACTTTCAAG		
5F	GTAGCCTCACCAGATCT	399 bp	58°C
5R	ACTGGTGGAGACACCTTC		
6F	GTATAGAGGATCTCTTGAGA	222 bp	50°C
6R	TTCTAATACCAAGACCGA		
7aF	CATGTTTCAGAGAATTACAT	639 bp	58°C
7aR	TATGTTACACAGGTGATGT		
7bF	TAGAGTGA CTTCGAGTGAGAG	679 bp	55°C
7bR	ACCTGACCCAGTCACAGCTAAT		
7cF	GCAGACCTCTACCTTTTCTC	583 bp	55°C
7cR	AAGGACTCTCACAGTGAGCA		
8F	TAGTCGGCTTAACTGACTTG	325 bp	56°C
8R	AGACAGCATCTCTTAGATGC		

**Tabella 4 – ARSACS.** Coppie di primer utilizzate per l'amplificazione dell'esone 9

<b>Oligo</b>	<b>Sequenza ( 5' - 3' )</b>	<b>Dimensioni</b>	<b>Temp. di annealing</b>
9aF	CAGGAAGACCATGTACTCAGC	850 bp	58°C
9aR	CACATGAAGAGGTAACACAGCT		
9bF	AGACCACTAGCTGCTTAAAGC	886 bp	58°C
9bR	CCATGGGTTTGGACTGGCAA		
9cF	GCATGATCATCTAAATGAAGG	848 bp	50°C
9cR	GTGAACATAACTAGGTTAGGA		
9dF	GGACCTGCTTTGTGGTCATTC	900 bp	58°C
9dR	TCTTTGAAATGGCTAAGTCTGG		
9eF	CCAGACTTAGCCATTTCAAAGA	897 bp	58°C
9eR	GTTGATGAGTTCTCGGGAGTT		
9fF	GAAATTGAAGCAGAACTTAGAG	855 bp	50°C
9fR	GCTTCATTCTAGTTGAGAATG		
9gF	AAGCCTTGATGCAAAATGAAATC	888 bp	58°C
9gR	GGAAATCCTTATAAACTGGACA		
9hF	GATGATGTTAGAGGAATTCAG	862 bp	55°C

9hR	CCATTTTCATGTGAATGGCCA		
9jF	CTGCCTGCATTACTCACAAC	898 bp	55°C
9jR	GAGATTGAAGTTGAGGGATTG		
9iF	TCGTCTGCAGCAGACTAATC	897 bp	55°C
9iR	TGCTATAAATCCATCAGTGGC		
9kF	AATCATTTGATGTCCCAAGATG	871 bp	55°C
9kR	CTTATAAAGTTCAATGGAGCAC		
9lF	CGGAATTCATTAGATTTTCATCC	859 bp	55°C
9lR	CAAATGTTAGTTGATCTCAGC		
9mF	TCAAGCATCTTAGTGTTTGAC	885 bp	55°C
9mR	GTACAAGAAGTTGAAAGAGAAG		
9nF	GATATCTATGGATCATACCAG	630 bp	50°C
9nR	CAGAGATTCTATACTTCATGGA		
9oF	ACGAACATTTTCAACCTCAGC	658 bp	55°C
9oR	CTTGAATGTGTTGTAGCACGA		

- Amplificazione del gene *SACS* mediante reazione di PCR e elettroforesi su gel di agarosio.

E' stata utilizzata una macchina GeneAmp PCR System 9600 Perkin Elmer e le reazioni di amplificazione sono state condotte in un volume finale di 25µl contenente:

- 100 ng di DNA genomico
- 2.5 mM di dNTP
- 20 pM/µl di primer F
- 20 pM/µl di primer R
- 250 mM Buffer AmpliTAQGold
- 15 mM MgCl<sub>2</sub>
- 1 U AmpliTAQGold (Perkin Elmer).

La reazione di amplificazione è avvenuta secondo lo schema seguente:

1 ciclo di denaturazione del DNA a 95°C della durata di 5 minuti;

30 cicli di amplificazione ciascuno dei quali comprendente 30 secondi di denaturazione a 95°C;

30 secondi di "annealing" ad una temperatura di variabile a seconda della coppia di primers (tabelle 4 e 5);

30 secondi di elongazione a 72°C.

1 ciclo finale di elongazione a 72°C della durata di 10 minuti.

2 µl prelevati dai prodotti di amplificazione sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di agarosio 1.5% per verificare la corretta lunghezza dei frammenti, mediante il confronto con un marcatore di lunghezza nota (100 bp BioLabs), ed escludere la presenza di eventuali prodotti aspecifici.

I prodotti di PCR sono stati poi purificati e sottoposti a sequenza come descritto in precedenza.

#### Analisi delle mutazioni missense in controlli sani

Nel nostro lavoro abbiamo trovato due nuove mutazioni missense; per poter escludere l'ipotesi di un polimorfismo, 100 controlli sani sono stati screenati per tali mutazioni missense tramite DHPLC.

Sequenze di DNA genomico dei 100 controlli sani sono state amplificate mediante Polymerase Chain Reaction (PCR), condotta in un volume finale di 25 µl contenente la stessa miscela e seguendo lo stesso programma degli amplificati destinati alla reazione di sequenza.

Per la reazione di amplificazione sono state utilizzate le coppie di oligonucleotidi (Exa F e R) corrispondenti alle porzioni esoniche al livello delle quali si è trovata la mutazione missense.

2 µl dell'amplificato sono stati caricati e corsi per elettroforesi su gel di agarosio 1.5% per controllare la presenza degli amplificati e per escludere la presenza di eventuali prodotti aspecifici.

#### Ricerca della seconda mutazione in un paziente con una sostituzione in eterozigosi

In un paziente italiano il sequenziamento diretto del gene ha consentito l'individuazione di una mutazione in eterozigosi e una sostituzione della sesta base del sito donatore di splicing per l'esone 2; la valutazione più approfondita di questo caso ha richiesto la sintesi e l'analisi del cDNA del paziente.

- Coltura di fibroblasti umani

I fibroblasti derivati da un espianto cutaneo del paziente italiano con mutazione singola eterozigote sono stati messi in coltura a 37°C e in un'atmosfera contenente CO<sub>2</sub> al 5% in terreno DMEM con siero fetale bovino al 20%, penicillina 100 U/ml e streptomicina 100 mg/ml.

- Estrazione di mRNA dai fibroblasti

Dopo aver trasferito le cellule in coltura in una RNase-free Microfuge Tubes è stato aggiunto Trizol in quantità di 500 µl e si è proceduto alla centrifugazione per circa 15 minuti. E' poi stato aggiunto cloroformio in quantità di 100 µl e, dopo aver agitato le provette vigorosamente con le mani per 15 secondi e lasciato a RT per 2-3 minuti, si è passato alla centrifugazione a 4°C per 15 minuti a 12000rcf. La fase superiore acquosa contenente l'RNA, separata da quella inferiore fenolo-cloroformica, è stata recuperata tramite aspirazione con un pasteur di plastica e trasferita in un altro RNase-free Microfuge Tube. A questo punto è stato aggiunto isopropanolo, con lo scopo di far precipitare l'RNA e, dopo un'ulteriore centrifugazione a 12000rcf per 10 minuti, le provette sono state conservate in ghiaccio. Una volta rimosso il soprannatante si è lavato il pellet con 0,5ml di etanolo al 75%. Per quest'ultimo lavaggio si è proceduto a centrifugazione a 12000rcf a 4°C per 5 minuti; successivamente si è lasciato asciugare il pellet facendo evaporare l'etanolo in una cappa sterile per circa 20 minuti. Quando l'etanolo era ormai evaporato è stata aggiunta, al pellet di RNA, una soluzione "Nuclease free water", per poi risospendere e conservare nel -20°C. L'RNA estratto è stato poi analizzato allo spettrofotometro per determinarne la concentrazione ed evidenziarne eventuali contaminazioni da fenolo o proteine. Il rapporto di OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> vicino a 2 ha indicato che l'RNA estratto avesse un grado di purezza accettabile.

- Sintesi di cDNA

In una prima fase a 2 µg di RNA estratto sono stati aggiunti oligo dT promotor primer e dNTP, e la soluzione è stata incubata a 65 °C per 5 min, poi messa a riposare in ghiaccio.

Dopo aver aggiunto una miscela contenente inibitori di RNase, dNTPs e primers si è incubato per circa 2 minuti a 25°C; a questo punto è stato aggiunto 1µl di trascrittasi inversa “Superscript II RT” e si è proceduto ad un’incubazione di circa 50 min a 42 °C, con fase terminale di 15minuti a 70°C. La successiva aggiunta di 1µl di RNase H ha permesso di rimuovere l’RNA dalla soluzione. Con questa prima fase si è ottenuto un singolo filamento di cDNA, che è stato amplificato con reazione di PCR. La seconda fase prevede la sintesi della doppia catena a partire dal cDNA con conseguente formazione del "double strand DNA" (dsDNA): in questa fase successiva il cDNA è stato ulteriormente amplificato con l'aggiunta di una miscela contenente dNTPs, enzimi “2nd strand”, T4 DNA polimerase, inibitori di Rnase I, che è stata incubata a 37 per 30 minuti. La purificazione del dsDNA si è ottenuta mediante l’uso di soluzione contenente Beta mercaptoetanolo ed etanolo seguito da lavaggi ed eluizione su colonne cromatografiche.

- PCR su cDNA

Sequenze di cDNA sono state amplificate mediante Polymerase Chain Reaction (PCR), condotta in un volume finale di 25 µl contenente la stessa miscela e seguendo lo stesso programma degli amplificati destinati alla reazione di sequenza, con temperatura di annealing di 57,5°C.

E’ stata utilizzata una coppia di primer disegnata in modo da cadere a cavallo del sito donatore di splicing per l’esone 2:

- 1-5 F (5<sup>1</sup>-CCAGGAGAAGTGATCATGGAG-3<sup>1</sup>),
- 1-5 R (5<sup>1</sup>-CCCAGCATCTTCTGCATTCT-3<sup>1</sup>).

In questo modo si è voluto valutare se la sostituzione della sesta base del sito donatore di splicing dava origine ad un fenomeno di “exon-skipping” per l’esone 2.

2 µl dell’amplificazione sono stati caricati e corsi per elettroforesi su gel di agarosio 1.5% per avere una stima delle loro dimensioni.



## Risultati

### *Risultati molecolari*

#### Analisi di linkage

Un possibile linkage al locus di ARSACS è stato trovato per otto (TUN 1, TUN 2, ALG 1, ALG 2, MAR 1, MAR 2, ITA 1, SPA 1) delle nove famiglie con consanguineità studiate (figura 3 - ARSACS). In una famiglia tunisina (TUN 3) i valori di lod-score hanno escluso la possibilità di linkage al locus di ARSACS.

#### Screening del gene

Lo screening del gene *SACS* nei 15 pazienti analizzati ha portato all'individuazione di 5 mutazioni in omozigosi di *SACS* in cinque pazienti e di una singola mutazione in eterozigosi nel paziente n° 12. Per i pazienti n° 5 e 10 si è proseguito con l'analisi mutazionale dei fratelli affetti (pazienti n° 6 e 11), per valutare la cosegregazione delle mutazioni con la malattia.

La mutazione trovata nel paziente n° 8 è stata già descritta in letteratura (El Euch Fayache et al., 2003). Delle nuove mutazioni trovate tre cadono nell'esone 9 e altre due sono state individuate al livello dell'esone 7; inoltre tre hanno effetto troncante la proteina, mentre due sono mutazioni missense (tabella 5-ARSACS).

La *paziente n° 3* appartiene ad una famiglia tunisina (fam. TUN 2) in cui l'analisi di linkage ha dato esito favorevole (Figura 4-ARSACS). Essa è risultata omozigote per la sostituzione 2881C→T nell'esone 9 del gene *SACS* (Figura 5.A-ARSACS), che porta a sostituire la tripletta codificante per un' Arginina in una codificante per un segnale di stop (R961X). L'effetto di tale nuova mutazione è la formazione di una proteina tronca con conseguente perdita di funzione.

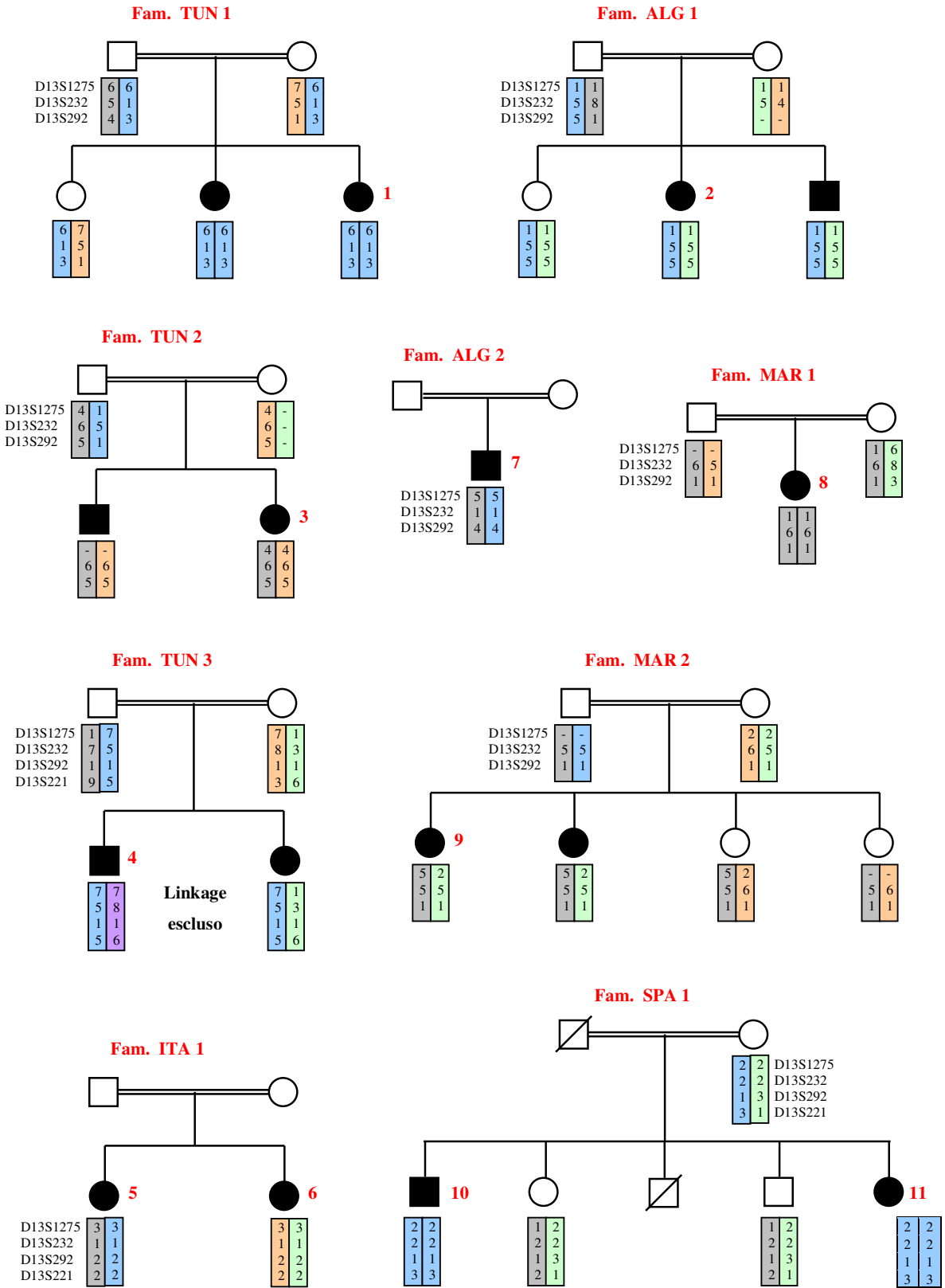


Figura 4-ARSACS. Pedigree e aptotipi delle famiglie consanguinee

La *paziente n° 5* (fam. ITA 1) discende da genitori consanguinei e l'analisi di linkage in questa famiglia ha dato esito favorevole (Figura 4-ARSACS). In tale paziente è stata individuata una nuova mutazione in omozigosi, caratterizzata da un'inserzione di una citosina in posizione 1859 dell'esone 9 (Figura 5.B-ARSACS) avente un effetto frameshift con precoce introduzione di un codone di stop in posizione 599 (FsX599), che porta alla sintesi di una proteina tronca. Si è poi proceduto all'analisi mutazionale della paziente n° 6, sorella della precedente, per poter valutare la cosegregazione delle mutazioni con la malattia e tale analisi ha dato esito positivo confermando che entrambe le sorelle affette di questa famiglia, con fenotipo clinico patologico, presentano la stessa mutazione del gene *SACS*.

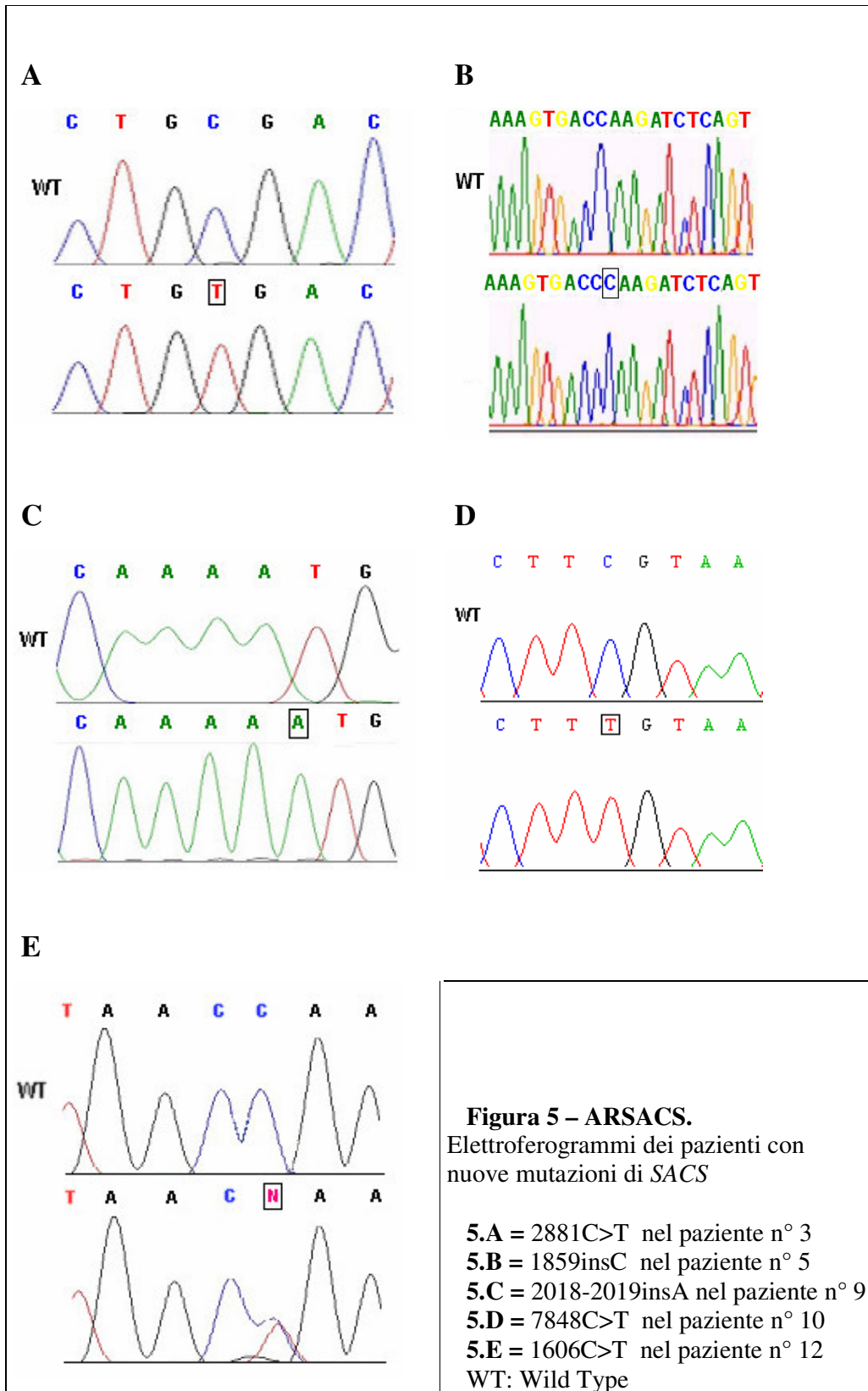
La *paziente n° 8* appartiene ad una famiglia del Marocco (fam. MAR 1), per la quale è stato rilevato un possibile linkage al locus di ARSACS (Figura 4-ARSACS). La paziente è risultata omozigote per una sostituzione 12220G→C, che porta alla sostituzione di un'Alanina con una Prolina in posizione 4074 della sequenza aminoacidica della saccina (A4074P); tuttavia tale mutazione missense, che risiede sempre al livello dell'esone 9 del gene *SACS*, corrisponde ad una mutazione già descritta in letteratura in una famiglia tunisina (El Euch Fayache et al., 2003).

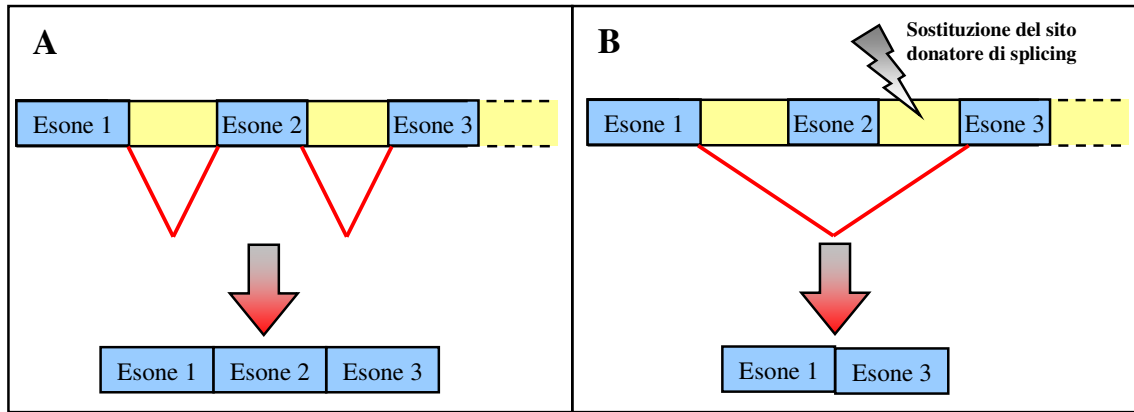
Anche la *paziente n° 9* discende da una famiglia del Marocco (fam. MAR 2) con genitori consanguinei e con possibile linkage al locus di ARSACS (Figura 4-ARSACS); in essa è stata individuata una nuova mutazione in omozigosi nell'esone 7, caratterizzata dall'inserzione di una adenina in posizione 2018-2019 (Figura 5.C-ARSACS) nell'ambito di una quadrupletta di adenine; anche questa mutazione porta alla sintesi di una proteina tronca, in quanto crea un frameshift con precoce introduzione di un segnale di stop in posizione 704 della sequenza aminoacidica (FsX704).

Il *paziente n° 10* (fam. SPA 1) è risultato omozigote per la sostituzione 7848C→T nell'esone 9 (Figura 5.D-ARSACS), la prima mutazione riscontrata in una famiglia spagnola con possibile linkage al locus di ARSACS (Figura 4-ARSACS), con effetto missense di sostituzione di un'Arginina con una Cisteina in posizione 2556 (R2556C). Alla stessa famiglia appartiene anche la paziente n° 11, che è risultata anch'essa omozigote per la stessa mutazione, confermando così la cosegregazione della mutazione con la malattia. Essendo questa una nuova mutazione missense si è poi proceduto all'analisi di 100 controlli sani allo scopo di dimostrare che la mutazione era presente in meno dell'1% della popolazione e per distinguerla, quindi, da un eventuale polimorfismo. Lo screening non ha riscontrato la mutazione nei controlli sani.

Per il *paziente italiano n° 12* (fam. ITA 2) non è stata eseguita un'analisi di linkage, tuttavia egli è risultato eterozigote per una singola mutazione con effetto missense: la sostituzione 1606C→T (figura 5.E-ARSACS) cade al livello del settimo esone della sequenza codificante e porta ad una sostituzione di una Prolina con una Serina in posizione 536 (P536S). Anche in questo caso, trattandosi di una nuova mutazione missense, si è analizzata una popolazione di 100 controlli sani per escludere l'ipotesi di polimorfismo, con l'esito di mancato riscontro della mutazione nei controlli.

Inoltre, al sequenziamento diretto del gene *SACS* si è individuata una sostituzione al livello di una sequenza intronica, e in particolare a livello della sesta base del sito donatore di splicing per l'esone 2 del gene *SACS*. L'ipotesi per cui tale sostituzione possa dare origine ad un processo di "exon-skipping" (figura 6-ARSACS), costituendo così la seconda mutazione in eterozigosi composta con 1606C→T, è stata da noi vagliata tramite sintesi ed analisi di un frammento di cDNA comprendente il sito donatore di splicing imputato. Nel caso in cui la variazione in sesta base non avesse alterato il sito di splicing l'amplificato atteso di tale frammento di cDNA sarebbe stato di 393 bp; un eventuale skipping dell'esone 2 avrebbe invece determinato la formazione di un amplificato di 242 bp. La corsa per elettroforesi su gel di agarosio 1.5% ha mostrato un unico frammento di 393 bp, indicando un normale processo di splicing.





**Figura 6-ARSACS.** Splicing di mRNA: **A)** meccanismo normale; **B)** meccanismo di skipping dell'esone 2.

**Tabella 5 – ARSACS.** Caratteristiche molecolari e cliniche dei pazienti con mutazioni del gene *SACS*

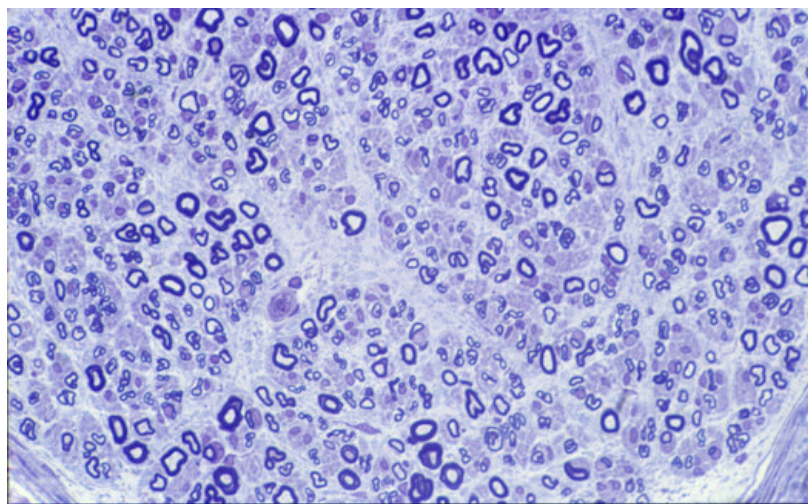
Paziente	3	5	6	8	9	10	11	12
Famiglia	TUN 2	ITA 1	ITA 1	MAR 1	MAR 2	SPA 1	SPA 1	ITA 2
<b>Caratteristiche genetiche</b>								
Mutazione	2881C>T	1859insC	1859insC	12220G>C	2018-2019insA	7848C>T	7848C>T	1606C>T
Effetto sulla proteina	R961X	FsX599	FsX599	A4074P	FsX704	R2556C	R2556C	P536S
Stato	omozigote	omozigote	omozigote	omozigote	omozigote	omozigote	omozigote	eterozigote
Esone	9	9	9	9	7	9	9	7
Linkage	possibile	possibile	possibile	possibile	possibile	possibile	possibile	-
<b>Caratteristiche cliniche</b>								
Età esordio	1,8	2	2	4	4,5	3	4	1
Segno d'esordio	spasticità	atassia	atassia	atassia	atassia	atassia	atassia	atassia
Atassia	+	+	+	+	+	+	+	+
Disartria	+	+	+	+	+	+	+	+
Nistagmo	-	+	-	-	nd	+	+	+
Spasticità arti inferiori	+	+	+	+	+	+	+	+
Segno di Babinski	+	+	+	+	+	+	+	+
ROT rotulei vivaci	+	+	+	+	+	+	+	+
ROT achillei assenti	+	+	+	+	+	-	-	+
Neuropatia periferica	+	+	+	+	+	+	+	+
Ipotrofia distale arti inferiori	-	+	-	-	-	+	+	+
Strie retiniche ipermielinizzate	-	nd	nd	-	-	-	-	-
Deficit cognitivo	nd	-	+	+	nd	-	-	-
Atrofia cerebellare alla RMN	+	+	+	+	+	+	+	+

+ = Presente; - = Assente; nd = Non descritto

### *Risultati clinici*

Le principali caratteristiche cliniche dei pazienti con mutazione del gene *SACS* sono riassunte nella tabella 5 - ARSACS.

L'età media di esordio è  $2.7 \pm 1.8$  anni. I sintomi iniziali sono rappresentati da atassia della marcia in tutti i pazienti tranne uno, dove la sintomatologia esordiva con segni di spasticità. L'atassia spastica, così come la disartria, sono reperti costanti. Un deficit cognitivo è presente in due pazienti. In nessun paziente sono state ritrovate strie retiniche all'esame del fondo oculare. Nei pazienti spagnoli (n° 10 e 11) si riscontra la persistenza dei riflessi achillei, la cui perdita è solitamente correlata al grado di neuropatia periferica. Lo studio neurofisiologico mostra una neuropatia assonale sensitivo-motoria in tutti i pazienti, e segni di demielinizzazione in due. La biopsia del nervo surale, effettuata nel paziente italiano n° 5, mostra una larga perdita di fibre mieliniche di grosso calibro ( $>11 \mu\text{m}$ ), nell'ambito di un numero totale di fibre mieliniche quasi normale (Figura 7-ARSACS).



**Figura 7-ARSACS.** Biopsia del nervo surale del paziente n° 5

Alla RM cerebrale per tutti i pazienti è presente atrofia cerebellare (Figura 8-ARSACS), in sette di questi il verme risulta più coinvolto rispetto agli emisferi; nel paziente n° 10,

oltre all'atrofia cerebellare, la RM midollare ha mostrato un certo grado di atrofia cervicale (Figura 9-ARSACS).



**Figura 8-ARSACS.** RM cerebrale del paziente n° 10: marcata atrofia cerebellare



**Figura 9-ARSACS.** RM midollare del paziente n° 10: lieve atrofia cervicale



## Discussione

ARSACS che un tempo si riteneva confinata nell'isolato geografico di Charlevoix-Saguenay è stata descritta più recentemente fuori dal Canada grazie all'individuazione del gene. Fino ad oggi sono state descritte 33 diverse mutazioni per il gene *SACS*, comprese quelle da noi trovate; la maggior parte di queste sono troncanti, lasciando ipotizzare che lo sviluppo della malattia sia da associare ad una perdita di funzione della proteina, come è consueto per le malattie a trasmissione recessiva.

Per il nostro lavoro abbiamo selezionato 15 pazienti di diversa provenienza, in quanto aventi caratteristiche cliniche compatibili con il fenotipo ARSACS. Per 9 di questi è stata eseguita un'analisi di linkage con esito favorevole in tutti tranne uno. Lo screening del gene *SACS* nei 15 pazienti analizzati ha portato all'individuazione di 5 mutazioni in omozigosi del gene *SACS*, delle quali una è stata già descritta in letteratura (El Euch-Fayache et al., 2003), e una singola mutazione in eterozigosi. Nel paziente italiano con singola mutazione eterozigote abbiamo tentato un diverso approccio per ricercarne la seconda, che porterebbe a definire questo come il quarto tipo di mutazione in eterozigosi composta per il gene *SACS*, dopo quello di Charlevoix-Saguenay (Engert et al., 2000), quello italiano (Grieco et al., 2004) e quello giapponese (Yamamoto et al., 2005). Delle nuove mutazioni trovate tre cadono nell'esone 9, corrispondente all'ORF originariamente descritta da Richter, come per tutte le mutazioni riportate in letteratura fino ad oggi; le altre due sono state individuate al livello dell'esone 7, e sono le prime mutazioni descritte a monte dell'ORF originale, confermando così l'importanza di tale esone nella costituzione del gene.

Le mutazioni ritrovate in questo lavoro sono tre troncanti (2881C→T; 2018-2019insA; 1859insC) e due missense (1606C→T; 7848C→T). Il fenotipo dei nostri pazienti risulta quasi sovrapponibile a quello dei pazienti canadesi, eccetto per la presenza di ritardo mentale in cinque pazienti, per l'incostante riscontro di strie retiniche ipermielinizzate e per un esordio lievemente più tardivo e comunque caratterizzato da un range di variabilità più ampio. Tuttavia tale variabilità clinica è stata riscontrata anche in altri pazienti non canadesi, il cui fenotipo è comunque simile a quello descritto in origine sebbene le mutazioni siano diverse e distribuite in tutta la lunghezza della proteina. Questo suggerisce come le varie mutazioni, siano esse troncanti o missense, diano un fenotipo alquanto omogeneo e che, sebbene sia prematuro affermarlo, non sembra esservi alcuna caratteristica correlazione tra genotipo e fenotipo.

L'assenza di mutazioni in pazienti con fenotipo ARSACS-simile indica una eterogeneità genetica nell'ambito delle atassie spastiche autosomiche recessive. D'altra parte il mancato riscontro di mutazioni in pazienti con linkage positivo al locus di ARSACS e l'impossibilità di trovare una seconda mutazione che accompagni quella singola eterozigote in un paziente italiano, suggeriscono la possibilità di mutazioni cadenti in regioni non codificanti o in nuovi ipotetici esoni. Ciò porta a richiedere la necessità di ridefinire l'ORF di ARSACS, giustificata anche dal fatto che due delle mutazioni da noi trovate (2018-2019insC; 1606C→T) sarebbero le prime descritte in letteratura che cadono a monte dell'ORF originale.

Analizzando le caratteristiche cliniche dei nostri pazienti e dei casi descritti in letteratura, possiamo definire come segni costanti dell'ARSACS l'esordio precoce, l'atassia spastica, la presenza di altri segni cerebellari e corticospinali e segni di neuropatia periferica.

In più risulta essere di costante riscontro, alla RM cerebrale dei nostri pazienti, un'atrofia cerebellare più marcata a livello della porzione superiore del verme; quest'ultimo reperto potrebbe quindi rientrare, insieme ai segni elettrofisiologici di neuropatia periferica, tra i quadri strumentali caratteristici della malattia.

Il nostro lavoro conferma l'estensione dell'ARSACS oltre i confini del Quebec e ne definisce la diffusione nel Sud Europa e nel bacino Mediterraneo; per tale motivo potrebbe essere necessario riconsiderare l'acronimo che caratterizza la patologia. Non abbiamo riscontrato nella nostra casistica la presenza delle mutazioni franco-canadesi che non sembrano avere un ruolo patogenetico significativo nel Mediterraneo, mentre è probabile che queste mutazioni siano caratteristiche di Charlevoix-Saguenay dove è stato individuato un effetto fondatore. La presenza di già cinque diverse mutazioni in Italia e di sei diverse mutazioni nelle famiglie di origine nordafricana esclude la possibilità di un'unica mutazione comune al bacino del Mediterraneo. È probabile inoltre che, trattandosi di differenti mutazioni a carattere privato, sarà difficile individuare un hot spot di mutazione, ossia una zona con un'alta concentrazione di mutazioni. Questo comporterà notevoli difficoltà nell'analisi mutazionale che sarà probabilmente riservata a pochi centri di ricerca.

Ormai la diagnosi di ARSACS dovrebbe essere presa in considerazione nei pazienti con atassia cerebellare autosomico recessiva, segni piramidali e neuropatia periferica. I risultati del nostro lavoro definiscono la necessità, nell'ambito di una diagnosi molecolare, di estendere lo screening per il gene SACS non solo all'esone 9,

corrispondente all'ORF originariamente descritta e a cui si è fatto riferimento fino ad oggi, ma anche agli esoni a monte; infatti la nostra scoperta di due nuove mutazioni a livello dell'esone 7 ne conferma un possibile ruolo patogenetico per l'ARSACS. D'altra parte lo screening del gene, date le sue grandi dimensioni, potrebbe risultare troppo oneroso sia dal punto di vista economico che in termini di risorse umane. Una possibile soluzione è pertanto l'analisi di linkage, limitatamente alle famiglie sufficientemente ampie o nei casi da matrimonio consanguineo. Inoltre, in base ai risultati del Northern blot, la saccina viene espressa in diversi tessuti tra cui i fibroblasti (Engert et al., 2000), per cui in futuro potrebbe essere possibile un dosaggio semiquantitativo della proteina tramite Western blot. Lo screening di tutto il gene potrebbe quindi essere limitato ai soli casi di linkage con il locus dell'ARSACS e/o nei casi in cui si osserva una variazione della concentrazione della proteina nei fibroblasti.

## **SCREENING DI PAZIENTI ATASSICI PER LE MUTAZIONI A467T E W748S DEL GENE *POLG1* RESPONSABILE DELLA SINDROME MITOCONDRIALE ATASSICA RECESSIVA.**

### **Aspetti genetici e molecolari**

#### *Il replisoma del mtDNA*

Dati sperimentali hanno dimostrato che mutazioni primarie del mtDNA sono la principale causa di patologie mitocondriali nell'uomo (Thorburn D.R. e Dahl H.H.M., 2001; Schaefer A.M. et al., 2004), in particolare quelle ad esordio in età adulta (Chinnery P.F. et al., 2000). Tuttavia è stata individuata una classe emergente di patologie mitocondriali dovute a mutazioni di geni nucleari che causano malattia attraverso un effetto secondario sul mtDNA, appartengono a questa classe le malattie dovute a mutazioni del gene nucleare *POLG1* che codifica per la subunità catalitica della DNA Polimerasi  $\gamma$ .

La produzione di adenosina trifosfato (ATP) da parte della fosforilazione ossidativa mitocondriale dipende in maniera critica dall'integrità della struttura del genoma mitocondriale. Il mtDNA codifica, infatti, per 13 subunità polipeptidiche essenziali della catena respiratoria che contribuiscono, insieme a più di 70 subunità codificate dal genoma nucleare, a generare la via finale comune del metabolismo energetico (Di Mauro S. e Schon E.A., 2003; Smeitink J. et al., 2001; Taylor R.W. e Turnbull D.M., 2005).

Diversamente dal DNA nucleare, che si replica solo una volta durante la divisione cellulare, il mtDNA viene replicato continuamente, in maniera indipendente dalla mitosi, per venire incontro alle esigenze energetiche della cellula (Bogenhagen D. e Clayton D.A., 1977; Birky C.W., 1994).

Mutazioni patogeniche del mtDNA determinano, quindi, una relativa deplezione di ATP, una disfunzione cellulare e/o la morte della cellula.

Il replisoma è una struttura multiproteica che si assembla sulla forcella di replicazione per effettuare la sintesi del DNA. La replicazione del mtDNA è realizzata da varie proteine codificate dal genoma nucleare e tra queste la DNA Polimerasi  $\gamma$  (Pol  $\gamma$ ) svolge un ruolo cruciale nella sintesi e nel riparo del mtDNA (Kaguni L.S., 2004) (Figura 1-

MIRAS). La polimerasi mitocondriale mostra una particolare abilità nell'utilizzare diversi substrati. Infatti, si ritiene che nei mitocondri Pol  $\gamma$  sia responsabile delle reazioni di replicazione, riparo e ricombinazione del DNA, mentre nel nucleo ogni DNA polimerasi possiede uno specifico ruolo all'interno di ogni singolo processo. Questo enzima è un eterotrimerico di 195 kDa, costituito da una subunità catalitica (p140) e due subunità accessorie identiche (p55, codificate da *POLG2* posizionato sul cromosoma 17q21) (Longley M.J. et al., 1998). P140, codificata da *POLG1* posizionato sul cromosoma 15q25, costituisce il core catalitico dell'enzima, contiene le attività funzionali polimerasica ed esonucleasica separate da una regione linker chiamata anche "spacer" (Figura 2-MIRAS). L'attività polimerasica C-terminale ha la funzione di sintetizzare un nuovo filamento di DNA sotto la direzione di un filamento stampo, mentre la regione N-terminale possiede un'attività 3'->5' esonucleasica che procede in direzione opposta rispetto alla sintesi di DNA e che fornisce la funzione di correzione delle bozze. La regione "spacer", infine, gioca un ruolo chiave nel posizionamento del template e nella sua interazione con la subunità  $\beta$  di Pol  $\gamma$  (Kaguni L.S., 2004).

Gli altri due componenti finora noti del replisoma del mtDNA sono la proteina mitocondriale che lega il singolo filamento (mtSSB) e l'elicasi Twinkle. La proteina mtSSB probabilmente, ha la funzione di stabilizzare una regione del DNA a singolo filamento a livello della forcella di replicazione, aumentando, così, l'attività di Pol  $\gamma$  (Zeviani M. et al., 1995) (Figura 1-MIRAS). Twinkle, invece è una 5'->3' elicasi che srotola il doppio filamento di mtDNA a livello della forcella di replicazione, facilitando la sintesi del DNA (Korhonen J.A. et al., 2003). Mutazioni di Twinkle sono responsabili di IOSCA. Il comune meccanismo patogenetico implicato potrebbe spiegare la somiglianza dei fenotipi di MIRAS e IOSCA.

Le proteine trascrizionali che regolano l'espressione dei geni coinvolti nel replisoma non ancora sono ben note. Tra queste si ritrova il fattore respiratorio nucleare 1 (NRF-1), un fattore di trascrizione nucleare che regola l'espressione di molte proteine mitocondriali (Scarpulla R.C., 2006). NRF-1 si lega ad una regione del promotore di *POLG1* e *POLG2* e la sua espressione è correlata ai livelli cellulari di ATP (Scarpulla R.C., 2006).

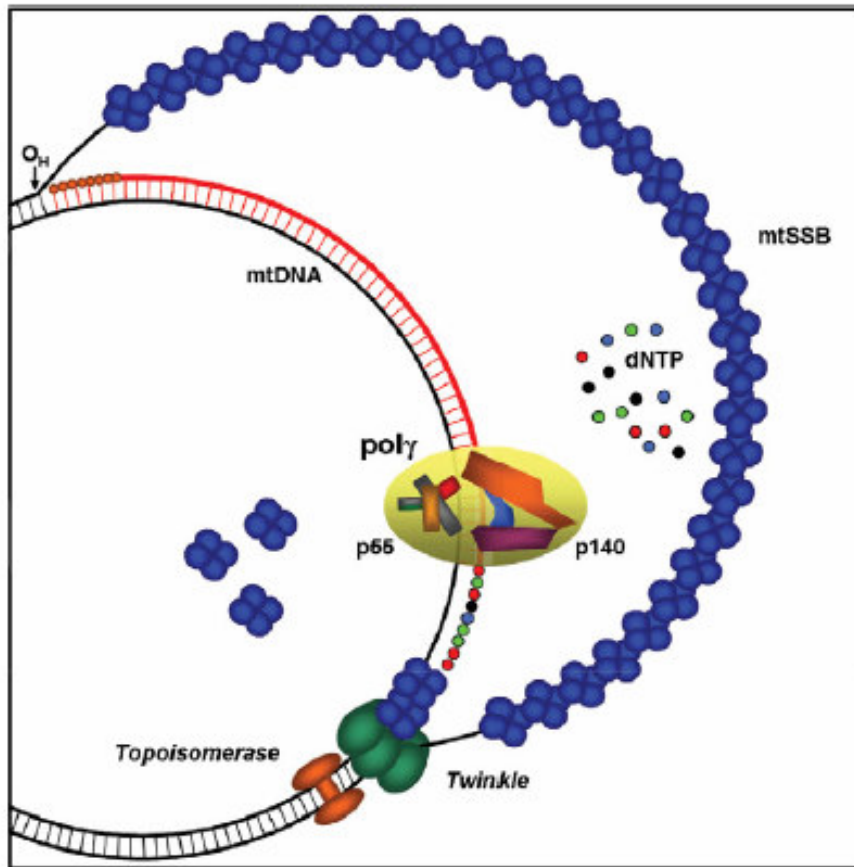


Figura 1-MIRAS. Componenti del replisoma del mtDNA

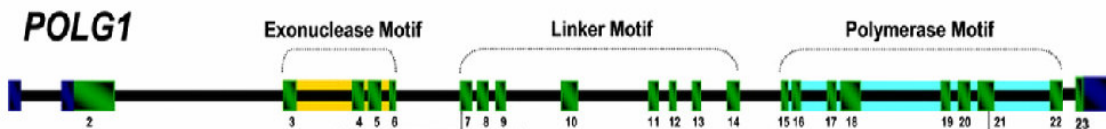


Figura 2 – MIRAS. *POLG1* e sub catalitica della polimerasi  $\gamma$

### *Le mutazioni di POLG1 responsabili di MIRAS*

Le mutazioni A467T e W748S sono le principali responsabili della sindrome atossico autosomica recessiva (MIRAS). Tra le circa 80 mutazioni che coinvolgono *POLG1*, la mutazione più frequente è la sostituzione di una guanina con una adenina (c.1399 G>A) all'interno dell'esone 7, che determina a livello amminoacidico la sostituzione di un'alanina con una treonina (A467T). A467T è stata ritrovata nello 0,6% della popolazione sana belga (Van Goethem G. et al., 2003a). Essa è causa della Sindrome di Alpers in omozigosi mentre in eterozigosi determina MIRAS. L'enzima mutato A467T possiede solo il 4% dell'attività wild-type della DNA polimerasi: mentre l'attività catalitica risulta infatti ridotta, l'effetto sulla funzione esonucleasica è invece minimo. Pol  $\gamma$  A467T non riesce ad interagire con la subunità accessoria né viene da essa stimolata e questo rappresenta il primo esempio di una mutazione di *POLG1* nella quale l'associazione tra le subunità della Pol  $\gamma$  risulta compromessa. Alcuni autori suggeriscono che la ridotta attività polimerasica e la perdita dell'interazione con la subunità accessoria siano responsabili della deplezione e delezione del mtDNA osservata in pazienti con mutazioni di *POLG1* (Chan S.S. et al., 2005).

La mutazione più frequentemente descritta in pazienti affetti da MIRAS è W748S in omozigosi o in eterozigosi con A467T. La sostituzione amminoacidica di un triptofano con una serina (W748S), nella regione linker dell'esone 13, dovuta ad una sostituzione a livello del DNA di una guanina con una citosina (c.2243 G>C), determina una bassa attività polimerasica, una bassa processività ed un severo difetto di legame al DNA. In questo caso le interazioni tra le subunità catalitica e accessoria dell'enzima sono normali ma l'attività globale dell'enzima mutato non raggiunge, comunque, quella del wild-type (Chan S.S. et al., 2006). Un recente studio ha analizzato in 306 pazienti principalmente finlandesi, con fenotipi atassici ma senza diagnosi genetica, la frequenza di questo allele (Hakonen A.H. et al., 2005). Sono stati identificati 27 pazienti finlandesi tutti omozigoti per la mutazione W748S e provenienti da 15 famiglie diverse, 2 pazienti belgi eterozigoti composti per le mutazioni A467T e W748S, 10 pazienti norvegesi di cui 4 eterozigoti composti per le suddette mutazioni ed il resto omozigoti per W748S e 1 paziente inglese eterozigote composto per A467T e W748S. Nei pazienti non finlandesi W748S è, spesso, eterozigote composto con A467T. Nella popolazione belga questa variante compare con una frequenza allelica dello 0,6% (Van Goethem G. et al., 2003a) ma di meno dello 0,2% nella popolazione finlandese (Luoma P. et al., 2005). Questi

risultati dimostrano che in Finlandia mutazioni di Pol  $\gamma$  sono una comune causa di atassia recessiva con una frequenza al portatore di 1:125 e che in questa nazione l'allele mutato W748S ha un chiaro effetto fondatore. Nei pazienti omozigoti per W748S è stata effettuata l'analisi dell'aplotipo che ha rivelato che tutti i cromosomi contenenti la mutazione W748S di pazienti finlandesi, svedesi, norvegesi, belgi e britannici originano da un antico fondatore comune (Hakonen A.H. et al., 2005).

### **Aspetti clinici**

Le mutazioni nel gene *POLG1* possono presentarsi sia in singola che in doppia dose genica ed a seconda dei casi pertanto sono responsabili di diversi quadri clinici: l'oftalmoplegia esterna progressiva autosomica dominante A1 (PEOA1, Van Goethem G. 2001), la sindrome di Alpers (una severa encefalopatia progressiva, (Davidzon G. et al., 2005 e 2006; Naviaux R.K. et al., 2004; Nguyen K.V. et al., 2005 e 2006; Ferrari G. et al., 2005), MIRAS, (Winterthun S. et al., 2005; Hakonen A.H. et al., 2005) e recentemente sono stati riportati anche parkinsonismo e neuropatia periferica (Luoma et al., 2004), (Tabella 1-MIRAS).

In particolare MIRAS è una patologia neurodegenerativa ad esordio generalmente precoce (5-50 anni) caratterizzata da atassia della marcia, disartria, areflessia degli arti inferiori, declino cognitivo, epilessia, cefalea e mioclono. La neuropatia sensitiva sembra essere un reperto costante, al contrario dell'oftalmoplegia che se presente compare evento tardivo. Nell'ambito di MIRAS rientrano oggi realtà cliniche che prima erano considerate come entità nosologiche separate, quali SANDO (Neuropatia sensoriale atassica con disartria e oftalmparesi) e SCAE (Atassia spinocerebellare con epilessia, mioclono e cefalea).

La RM evidenzia lesioni caratteristiche iperintense in corrispondenza della sostanza grigia. Le lesioni sono localizzate nel cervelletto a livello del nucleo dentato, nel tronco encefalico a livello dei nuclei olivari inferiori e nella porzione posteriore del talamo (Figura 3-MIRAS).

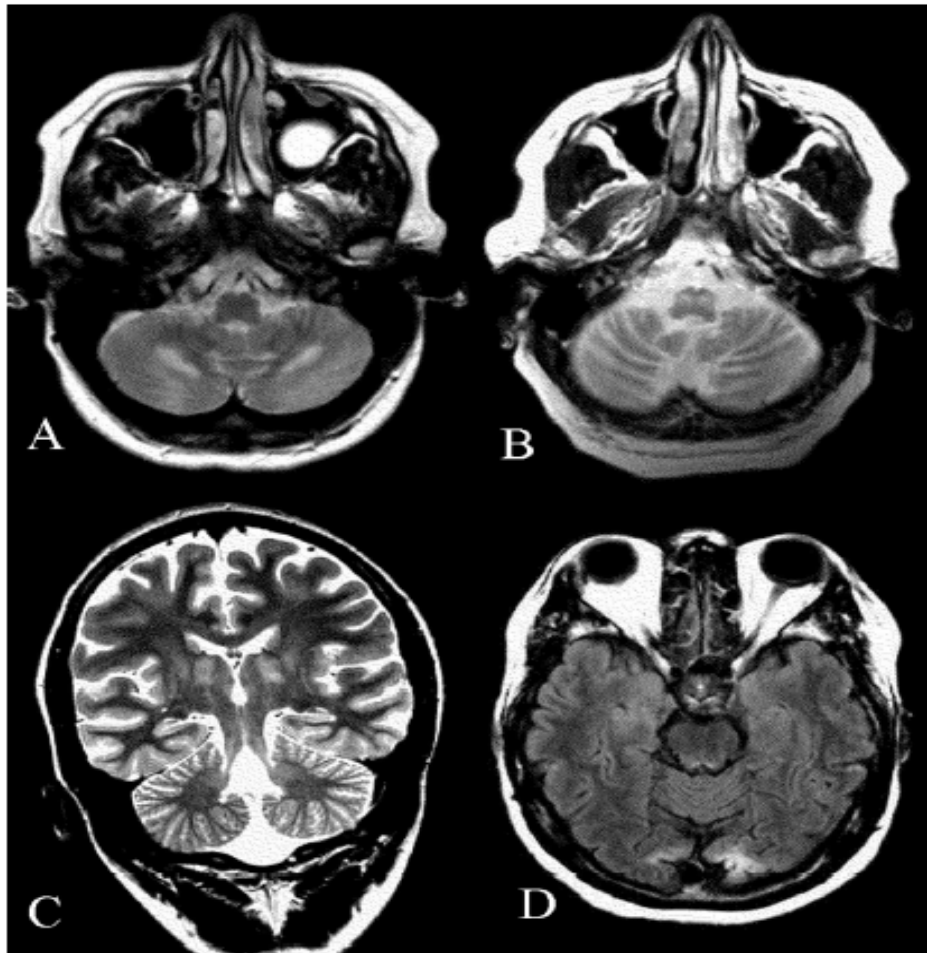
Queste lesioni rappresentano una perdita neuronale con gliosi secondaria, ma perché proprio queste aree cerebrali siano colpite rimane ancora un aspetto da chiarire (Winterthun S. et al., 2005). I risultati di un'unica autopsia effettuata su un paziente con mutazioni di *POLG1* dimostrano che i nuclei grigi si presentano ipocromici, in particolare la sostanza nera e il locus coeruleus. Inoltre, una discreta perdita neuronale è



osservata nel talamo ma soprattutto nei nuclei dentato e subtalamico (Van Goethem G. et al., 2004).

MIRAS si può porre in diagnosi differenziale con altre due atassie mitocondriali ad ereditarietà recessiva: atassia di Friedreich (AF) e atassia spinocerebellare ad esordio infantile (IOSCA).

AF è determinata da un difetto della fratassina, una proteina mitocondriale coinvolta nell'omeostasi del ferro, mentre IOSCA è una severa atassia ereditaria infantile che recentemente è stata associata a mutazioni dell'elicasi mitocondriale Twinkle, che collabora con la polimerasi  $\gamma$  nella replicazione del DNA.



**Figura 3-MIRAS.** Immagini di risonanza magnetica mostrano lesioni iperintense in diverse aree cerebrali. A. porzione centrale del cervelletto in corrispondenza del nucleo dentato; B. regione dei nuclei olivari inferiori nel tronco encefalico; C. talamo; D. regione occipitale.

**Tabella 1 - MIRAS. Fenotipi associati a mutazioni di *POLG1***

Patologia	Ereditarietà	Caratteristiche cliniche
PEOA1	AD/AR	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Oftalmoplegia esterna</li> <li>• Debolezza muscolare</li> <li>• Disturbi psichiatrici</li> <li>• Atassia sensitiva</li> <li>• Neuropatia</li> <li>• Menopausa precoce</li> <li>• Miopatia prossimale</li> <li>• Ptosi bilaterale</li> </ul>
SINDROME DI ALPERS	AR	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Insufficienza epatica</li> <li>• Epilessia</li> <li>• Mioclono</li> <li>• Demenza</li> </ul>
MIRAS	AR	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atassia</li> <li>• Epilessia occipitale</li> <li>• Emicrania</li> <li>• Neuropatia</li> <li>• SANDO:</li> <li>• Atassia</li> <li>• Neuropatia sensitiva</li> <li>• Disartria</li> <li>• Oftalmoparesi</li> <li>• SCAE:</li> <li>• Atassia spinocerebel.</li> </ul>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Epilessia</li> </ul>
<b>PARKINSONISMO</b>	AD/AR	<p><b>CON PEO:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Parkinsonismo</li> <li>• Tremore a riposo</li> <li>• Menopausa</li> <li>• Miopatia</li> <li>• Ptosi</li> <li>• Cataratta</li> <li>• Atassia</li> <li>• Disturbi dell'umore</li> <li>• Neuropatia</li> </ul> <p><b>SENZA PEO:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Parkinsonismo</li> <li>• Neuropatia sensitiva periferica</li> <li>• Disturbi d'ansia</li> <li>• Tremore d'azione</li> <li>• Distonia</li> </ul>
	AR	

PEO: Oftalmoplegia esterna progressiva; MIRAS: Sindrome mitocondriale atassica ad ereditarietà recessiva; SANDO: Neuropatia sensoriale atassica con disartria ed oftalmoparesi; SCAE: Atassia spinocerebellare con epilessia, mioclono e cefalea; AD: autosomica dominante; AR: autosomica recessiva.

## **Obiettivo dello screening di *POLG1***

Dati di letteratura mostrano una prevalenza delle mutazioni c.1399 G>A (A467T) e c.2243 G>C (W748S) come causa di MIRAS in popolazioni dell'Europa centrale e dell'Europa del nord.

Per valutare la prevalenza di queste due mutazioni nella popolazione dell'Italia meridionale è stata condotta un'analisi genetica in 66 pazienti atassici.

## **Pazienti e metodi**

### *Pazienti*

Presso l'Ambulatorio di Atassie Ereditarie del Dipartimento di Neurologia dell'Università Federico II di Napoli sono stati selezionati 66 pazienti con atassia.

I criteri di selezione sono stati:

1. segni neurofisiologici o clinici di neuropatia periferica (assenza di riflessi osteotendinei distali degli arti inferiori e riduzione della pallestesia);
2. età d'esordio  $\leq$  50 anni;
3. atassia associata a sintomi caratteristici frequentemente presenti in MIRAS o in altre patologie mitocondriali come mioclono, epilessia, ipogonadismo ed oftalmoplegia.

18 pazienti sono casi indice provenienti da famiglie con possibile trasmissione autosomica recessiva e 48 sono casi sporadici.

In tutti i pazienti l'analisi molecolare per Atassia di Friedreich, AOA1 ed AOA2 è risultata negativa.

### *Metodi*

I primers sono stati disegnati a monte e a valle delle mutazioni A467T nell'esone 7 e W748S nell'esone 13 in modo da determinare due prodotti di PCR (Polymerase Chain Reaction) lunghi 500 bp ciascuno. La PCR è stata effettuata con un apparecchio GeneAmp PCR System 9600 Perkin Elmer (Tabella 2-MIRAS).

Tabella 2-MIRAS. Sequenze degli oligonucleotidi, temperature utilizzate per l'amplificazione degli esoni 7 e 13 di *POLGI* e lunghezza dell'amplificato.

ESONE	MUTAZIONE	PRIMER	SEQUENZA	AMPLIFICA TO	Tm
7	<b>A467T</b>	7F	gcttgctaaaccagctcag g	388 pb	60
		7R	GAGCCAGGGGT CTTCTTTGT		
13	<b>W748S</b>	13F	ATTTCCCAGCTG ATGACGAC	406 bp	60
		13R	gccaccegacttcattag a		

La reazione di amplificazione è stata condotta in un volume finale di 50 µl contenente:

- 50 ng di DNA genomico
- 0,2 mM dNTP
- 20 µM primer F
- 20 µM primer R
- (1x) Buffer AmpliTAQ Gold
- 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 2,5 U AmpliTAQ Gold (Pelkin Elmer)

La reazione di amplificazione è avvenuta nelle condizioni riportate nello schema seguente:

<b>CICLI</b>	<b>TEMPERATURA</b>	<b>TEMPO</b>
1	95° C	10 minuti
35	95° C	30 secondi
	60° C	30 secondi
	72° C	30 secondi
1	72° C	10 minuti

5 µl dei prodotti di amplificazione sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 1,5% contenente etidio bromuro. La corretta lunghezza dei frammenti è stata verificata mediante il confronto con un marcatore di lunghezza nota (100 bp BioLabs) ed è stata esclusa l'assenza di eventuali prodotti aspecifici.

L'analisi dei prodotti di PCR è stata condotta mediante dHPLC.

## **Risultati**

L'analisi genetica delle mutazioni A467T e W748S descritta in questa tesi è stata condotta su 66 pazienti che presentano atassia e neuropatia periferica.

L'età media di esordio  $\pm 2$  deviazioni standard (DS) è tra  $21 \pm 15$  anni (range 2-50 anni).

I pazienti sono stati inquadrati in due gruppi clinici. Quelli appartenenti al primo gruppo (38 soggetti) sono caratterizzati da atassia cerebellare isolata, invece quelli del secondo gruppo (28 soggetti) presentano atassia associata a sintomi frequentemente presenti in MIRAS o in altre patologie mitocondriali quali mioclono, epilessia, ipogonadismo ed oftalmoplegia. In questi ultimi l'atassia è associata a mioclono in 17 pazienti (6 dei quali presentano anche epilessia), ad ipogonadismo o menopausa precoce in 6 ed ad oftalmoplegia in 5 (Tabella 3-MIRAS).

I risultati hanno dimostrato che nessuno dei 66 pazienti analizzati in questo studio presenta le mutazioni A467T e W748S né in omozigosi né in eterozigosi.

**Tabella 3 - MIRAS. Caratteristiche cliniche dei pazienti studiati.**

<b>GRUPPO</b> (età d'esordio: 21±15 anni ± 2 DS)	<b>N° PAZIENTI</b>	<b>SINTOMATOLOGIA</b>
I	38	Atassia cerebellare isolata
II	11	Atassia+Mioclono
	6	Atassia+Mioclono+Epilessia
	6	Atassia+Ipogonadismo/Menopausa precoce
	5	Atassia+Oftalmoplegia

### **Discussione e conclusioni**

Negli ultimi anni molti studi hanno dimostrato che mutazioni di *POLG1* sono tra le maggiori cause di patologia mitocondriale nell'uomo. Le mutazioni che coinvolgono questo gene sono circa 80; quella più frequente è A467T, responsabile della Sindrome di Alpers in omozigosi e di MIRAS in eterozigosi. La mutazione più frequentemente descritta in pazienti affetti da MIRAS è, invece, W748S in omozigosi od in eterozigosi con A467T.

La mutazione W748S è riportata come la causa genetica di atassia più comune in Finlandia con una frequenza del carrier nella popolazione generale di 1:125, ma pazienti MIRAS con mutazione W746S sono stati individuati anche in Norvegia, Gran Bretagna e Belgio (Hakonen A.H. et al., 2005). Dati di letteratura recenti mostrano, inoltre, che le mutazioni A467T e W748S sono condivise anche da pazienti di origine europea provenienti da Nuova Zelanda, Australia e Stati Uniti confortando l'ipotesi di un aplotipo ancestrale comune europeo (Hakonen A.H. et al., 2007).

A467T è la mutazione più comune in *POLG1* e risulta essere presente con una frequenza allelica dello 0,6% nella popolazione sana belga (Van Goethem G. et al., 2003a) e dello 0,9% nella popolazione sana britannica suggerendo l'ipotesi che si tratti di un reservoir per una patologia recessiva. A467T è stata riscontrata in meno dello 0,2% della

popolazione finlandese (Luoma P. et al., 2005), nello 0,19% dei 1066 alleli di controllo tedeschi ma non nei 674 cromosomi di controllo italiani, dimostrando differenze geografiche nella frequenza del carrier in Europa (Horvalth R. et al., 2006).

Queste osservazioni ci hanno indotto alla ricerca delle mutazioni A467T e W748S in una popolazione di pazienti atassici dell'Italia meridionale.

L'analisi condotta su 66 pazienti atassici non ha dimostrato la presenza delle mutazioni A467T e W748S nei soggetti esaminati, suggerendo che in Italia queste non sono una causa frequente di atassia. Non si può comunque escludere la possibilità che alcuni dei pazienti analizzati presentino una mutazione in altre sequenze codificanti di *POLG1* da noi non screenate.

Questo studio rappresenta il primo screening su *POLG1* ad essere stato condotto in un paese dell'Europa del Sud su un'ampia casistica di pazienti MIRAS.

Nella popolazione italiana di pazienti con fenotipi caratteristici di patologie ad ereditarietà mitocondriale sono stati, infatti, condotti solo pochi studi sull'analisi molecolare di sequenze codificanti di *POLG1*. Tra le varie mutazioni A467T è stata ritrovata in omozigosi in un bambino affetto da Sindrome di Alpers (Ferrari G. et al., 2005) ed in eterozigosi in un paziente con PEO (Agostino A. et al., 2003). In uno studio condotto su bambini affetti da questa patologia la mutazione W748S è stata ritrovata in eterozigosi in due coppie di fratelli (Ferrari G. et al., 2005).

Altre mutazioni del core catalitico di Pol  $\gamma$  sono state ritrovate nella popolazione italiana. La mutazione T251I (c.752 C>T), nell'esone 3, si ritrova in famiglie affette da PEO (Agostino A. et al., 2003; Del Bo R. et al., 2003) ed in un paziente con Sindrome di Alpers (Ferrari G. et al., 2005). G268A (c.1085 G>C) è stata, invece, ritrovata in due pazienti con PEO (Di Fonzo A. et al., 2003); in uno di questi la mutazione si presenta in omozigosi e nell'altro in eterozigosi con altre mutazioni. Inoltre, W312R (c.934 T>C) è stata identificata in due soggetti affetti da PEO (Agostino A. et al., 2003; Del Bo R. et al., 2003), dei quali in uno la mutazione è in omozigosi (Del Bo R. et al., 2003). In altri gruppi di soggetti con PEO sono state ritrovate le mutazioni S1104C (c.3311 C>G) in un paziente (Agostino A. et al., 2003); R227W (c.679 C>T), nell'esone 10, in un paziente (Agostino A. et al., 2003) ed in una famiglia (Lamantea E. e Zeviani M., 2004) e G763R (c.2287 G>C) nell'esone 14 (Santoro L. et al., 2006).

Sono necessari ulteriori studi su gruppi più numerosi di pazienti con fenotipi differenti per definire la frequenza e la distribuzione geografica delle mutazioni A467T e W748S. Vista la grande varietà di quadri clinici associati a mutazioni di *POLG1*, l'individuazione



di mutazioni più frequentemente associate a specifici fenotipi potrà facilitare la selezione di pazienti candidati per l'analisi mutazionale.

## Bibliografia

- Aicardi J Barbosa C Andermann E et al., (1988 )Ataxia oculo-motor 24; 497-502.
- Agostino A., Valletta L., Chinnery P.F., Ferrari G., Carrara F., Taylor R.W., Schaefer A.M., Turnbull D.M., Tiranti V. and Zeviani M., (2003). Mutations of ANT1, Twinkle and *POLG1* in sporadic progressive external ophtalmoplegia (PEO). *Neurology*, 60: 1354-1356.
- Andermann E., Andermann F., Carpenter S., Karpati G., Eisen A., Melancon D., Bergeron J. (1976) Familiar Agenesis of the Corpus Callosum with Sensorimotor Neuropathy: A new autosomal recessiva Sindrome originatine in Charleviox contro. *Can. J. Neurol. Sci.* 3,155
- Anttonen AK, Mahjneh I, Hamalainen RH, et al., (2005). The gene disrupted in Marinesco-Sjogren syndrome encodes SIL1, an HSPA5 cochaperone. *Nat Genet.* 37(12):1309-11.
- Birky C.W., (1994). Relaxed and stringent genomes: Why cytoplasmic genes don't obey Mendel's Laws. *J. Hered.*, 85: 355-365.
- Bogenhagen D. and Clayton D.A., (1977). Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. *Cell*, 11: 719-727.
- Bolden A., Noy G.P., Weissbach A.,( 1977). DNA polymerase of mitochondria is a gamma-polymerase. *J. Biol. Chem.*, 252: 3351-56.
- Bomont Watanabe M Gershoni R.,(2000) HomozygositY mapping o of spinocerebellar ataxia with cerebellar atrophy and peripheral neuropathy to 9q33-34, and with hearing impairment and optic atrophy to 6p21-23. *Eur J Hum Genet.* Dec;8(12):986-990.
- Bose S., Weikl T., Bugl H. (1996). Chaperone function of Hsp90-associated proteins. *Science* 274, 1715-17.
- Bouchard J.P., Barbeau A., Bouchard R., Bouchard R.W. (1978). Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Can. J. Neurol. Sci.* 5, 61-69.

- Bouchard J.P., Barbeau A., Bouchard R., Bouchard R.W. (1979). Electromyography and nerve conduction studies in Friedreich's ataxia and autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS). *Can J Neurol Sci.* 6, 185-9.
- Bouchard J.P., Richter A., Mathieu J. et al. (1998). Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Neuromuscul disord* 8, 474-79.
- Brown KD Ziv Y Sadanandan SN et al. (1997). The ataxia-telangiectasia gene product, a constitutively expressed nuclear protein that is not up-regulated following genome damage. *Proc Nat Acad Sci*; 94: 1840-1845.
- Bukau B., Deuerling E., Pfund C., Sraig E.A., (2000). Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell (Cambridge, Mass.)* 101, 119-122.
- Campuzano V., Montermini L., Molto M.D., Pianese L., Cossee M., Cavalcanti F., Monros E. et al., (1996). Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science*, 271: 1423-1427.
- Carrodeguas J.A., Theis K., Bogenhagen D.F., Kisker C., (2001). Crystal structure and deletion analysis show that the accessory subunit of mammalian DNA polymerase gamma, Pol gamma B, functions as a homodimer. *Mol. Cell. Biol.*, 19: 4039-46.
- Casari G., De Fusco M., Ciarmatori S. et al. (1998). Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell*. 93, 973-83.
- Chan S.S., Longley M.J. and Copeland W.C., (2005). The common A467T mutation in the human mitochondrial DNA Polymerase (*POLG*) compromises catalytic efficiency and interaction with the accessory subunit. *J. Biol. Chem.*, 280: 31341-31346.
- Chan S.S., Longley M.J., Copeland W.C., (2006). Modulation of the W748S mutation in DNA Polymerase  $\gamma$  by the E1143G polymorphism in mitochondrial disorders. *Hum. Mol. Genet.*, 15(23): 3473-3483.
- Chen YZ Bennett CL Huynh HM, et al. (2004) DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). *Am J Hum Genet*; 74:1128-1135

- Chinnery P.F., Johnson M.A., Wardell T.M., Singh-Kler R., Hayes C., Brown D.T., Taylor R.W., Bindoff L.A. and Turnbull D.M., (2000). Epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Ann. Neurol.*, 48: 188-193.
- Craig E.A., Weissman J.S., Horwich A.L. (1994). Heat shock proteins and molecular chaperones: mediators of protein conformation and turnover in the cell. *Cell*.
- Date H Onodera O Tanaka H et al. Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia is caused by mutations in a new HIT superfamily gene. *Nat Genet* 2001;29:1
- Davidzon G., Greene P., Mancuso M., Klos K.J., Ahlskog J.E., Hirano M. and Di Mauro S., (2006). Early-onset familial parkinsonism due to *POLG* mutations. *Ann. Neurol.*, 59: 859-862.
- Davidzon G., Mancuso M., Ferraris S., Quinzii C., Hirano M., Peters H.L., Kirby D., Thornburn D.R. and Di Mauro S., (2005) *POLG* mutations and Alpers syndrome. *Ann. Neurol.*, 57: 921-923.
- De Braekeleer M., Gasson F., Mathieu J., Roy M., Bouchard J.P., Morgan K. (1993). Genetic Epidemiology of Autosomal Recessive Spastic Ataxia of Charlevoix-Saguenay in Northeastern Quebec. *Gent. Epidemiol.* 10, 17-25
- Del Bo R., Bordoni B.S., Sciacco M., Di Fonzo A., Galbiati S., Crimi M., Bresolin N. and Comi G.P., (2003). Remarkable infidelity of polymerase  $\gamma$ A associated with mutations in *POLG1* exonuclease domain. *Neurology*, 61: 903-908.
- De Michele G., Coppola G., Coccozza S., Filla A. (2004). A pathogenic classification of hereditary ataxias: is the time ripe? *J Neurol.* 251, 913-922.
- Dickie, M.M. Tumbler, (1965).tb. *Mouse News Lett.*32
- Di Fonzo A., Bordoni A., Crimi M., Sara G., Del Bo R., Bresolin N. and Comi G.P., (2003). *POLG* mutations in sporadic mitochondrial disorders with multiple mtDNA deletions. *Hum. Mutat.*, 22(6): 498-499.
- Di Mauro S. and Schon E.A., (2003). Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N. Engl. J. Med.*, 348: 2656-2668.

- Di Mauro S., Davidzon G., Hirano M., (2006) A polymorphic polymerase. *Brain*, 129: 1637-1639.
- Duquette A Roddier K McNabb-Baltar J et al. Mutations in senataxin responsible for Quebec cluster of ataxia with neuropathy. *Ann Neurol* 2005;53:408-414.
- El Euch-Fayache G., Lalami I., Amori R., Turki I., Ouahchi K., Hung W., Belal S., Siddique T., Hentati F. (2003). Phenotypic Features and Genetic Findings in Sacsin-Related Autosomal Recessive Ataxia in Tunisia. *Arch. Neurol.* 60, 982-988.
- El-Khamisy SF Saifi GM Weinfeld M et al. Defective DNA single-strand break repair in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy-1. *Nature* 2005;434:108-113.
- Engert J.C., Dore C., Mercier J. et al. (2000). ARSACS, a spastic ataxia common in northeastern Quebec, is caused by mutations in a new gene encoding an 11.5-kb ORF. *Nature Genet* 24, 120-125.
- Engert J.C., Dore C., Mercier J. et al. (1999). Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS): high resolution physical and transcript map of the candidate region in chromosome region 13q11. *Genomics* 62, 156-164.
- Ferrari G., Lamantea E., Donati A., Filosto M., Briem E., Carrara F., Parini R., Simonati A., Santer R. and Zeviani M., (2005). Infantile hepatocerebral syndromes associated with mutations in the mitochondrial DNA polymerase  $\gamma$ A. *Brain*, 128: 723-731.
- Flaherty K.M., McKay D.B., Kabsc W., at al., (1991). Similarity of the three-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 5041-5045.
- Foury F., Cazzalini O., (1997). Deletion of the yeast homologue of the human gene associated with Friedreich's ataxia elicits iron accumulation in mitochondria. *FEBS Lett.*, 411: 373-377.

- Fridlender B., Fry M., Bolden A., Weissbach A., (1972). A new synthetic RNA-dependent DNA polymerase from human tissue culture cells (HeLa fibroblast synthetic oligonucleotides template purified enzymes). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 69: 452-55.
- Frydman J., (2001). Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 603-647.
- Gelb D.J., Olivier E., Gilman S., (1999). Diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Arch. Neurol.*, 56:33-39.
- Gueven N, Becherel OJ, Kijas AW, Chen P, Howe O, Rudolph JH, Gatti R, Date H, Onodera O, Taucher-Scholz G, Lavin MF (2004). Aprataxin, a novel protein that protects against genotoxic stress. *Hum Mol Genet* 13: 1081-1093.
- Greco G.S., Malandrini A., Comanducci G., et al.,(2004). Novel SACS mutations in autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay type. *Neurology* 13; 62; 103-106.
- Grynberg M., Erlandsen H., Godzik A., (2003). HEPN: a common domain in bacterial drug resistance and human neurodegenerative proteins. *Trends Biochem Sci.* 28(5):224-6.
- Gucuyener K., Ozgul K., Paternotte C. (2001). Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay in two unrelated Turkish families. *Neuropediatrics* 32, 142-146.
- Gusev NB, Bogatcheva NV, Marston SB (2002). Structure and properties of small heat shock proteins (sHsp) and their interaction with cytoskeleton proteins. *Biochemistry* 67, 511-9.
- Hakonen A.H., Davidzon G., Salemi R., Bindoff L.A., Van Goethem G., Di Mauro S., Thornburn D.R. and Suomalainen A., (2007). Abundance of the *POLG* disease mutations in Europe, Australia, New Zealand, and the United States explained by single ancient European founders. *Eur. J. Hum. Genet.*, 1-5.
- Hansen J.J., Durr A., Cournu-Rebeix I. et al. (2002). Hereditary spastic paraplegia SPG13 is associated with a mutation in the gene encoding the mitochondrial chaperonin Hsp60. *Am. J. Hum. Genet.* 70, 1328-32.
- Hakonen A.H., Heiskanen S., Juvonen V., Lappalainen I., Luoma P.T., Rantamaki M., Goethem G.V., Logfren A., Hackman P., Paetau A. et al., (2005). Mitochondrial DNA

polymerase W748S mutation: a common cause of autosomal recessive ataxia with ancient European origin. *Am. J. Hum. Genet.*, 77: 430-441.

- Hara K., Onodera o., Endo m., et al.,(2005). Sacsin-related autosomal recessive ataxia without prominent retinal myelinated fibers in Japan. *Mov Disord* 20, 380-382.
- Harding AE (1981). Friedreich's ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features. *Brain* 104, 589-620.
- Harding AE (1984). *The hereditary ataxias and related disorders*. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Hartl F.U., Hayer-Hartl M., (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295, 1852-1858.
- Kathrin Saar, Lhadh et al. Homozygosity mapping in families with Joubert syndrome identifies a locus on chromosome 9q34.3 and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 1999 65:1666-1671
- Horvath R., Hudson G., Ferrari G., Futterer N., Ahola S., Lamantea E., Prokisch H., Lochmuller H., McFarland R., Ramesh V., Klopstock T., Freisinger P., Salvi F., Mayr J.A., Santer R., Tesarova M., Zeman J., Udd B., Taylor R.W., Turnbull D., Hanna M., Fialho D., Suomalainen A., Zeviani M., Chinnery P.F., (2006). Phenotypic spectrum associated with mutations of the mitochondrial polymerase gamma gene. *Brain*, 129: 1674-84.
- Hudson G. and Chinnery P.F., (2006). Mitochondrial DNA polymerase  $\gamma$  and human disease. *Hum. Mol. Genet.*, 15: 244-252.
- Ito J., Braithwaite D.K., (1990). Yeast mitochondrial DNA polymerase is related to the family A DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.*, 18: 6716.
- Kaguni L.S., (2004). DNA polymerase  $\gamma$ , the mitochondrial replicase. *Annu. Rev. Biochem.*, 73: 293-320.
- Korhonen J.A., Gaspari M. and Falkenberg M., (2003). TWINKLE has 5'->3' DNA helicase activity and is specifically stimulated by mitochondrial single-stranded DNA-binding protein. *J. Biol. Chem.*, 278: 48627-48632.

- Kunkel T.A. and Soni A., (1988). Exonucleolytic proofreading enhances the fidelity of DNA synthesis by chick embryo DNA polymerase  $\gamma$ . *J. Biol. Chem.*, 263: 4450-4459.
- Laberge C. (1969). Hereditary Tyrosinemia in a French Canadian Isolate. *Am. J. Hum. Genet.* 21, 36-45.
- Lamantea E. and Zeviani M., (2004). Sequence analysis of familial PEO shows additional mutations associated with the 752C>T and 3527C>T changes in the *POLG1* gene. *Ann. Neurol.*, 56: 454-55.
- Lamantea E., Tiranti V., Bordoni A., Toscano A., Bono F., et al. (2002). Mutations of mitochondrial DNA polymerase  $\gamma$ A are a frequent cause of autosomal dominant or recessive progressive external ophthalmoplegia. *Ann. Neurol.*, 52: 211-19.
- Laufen T., Mayer M.P., Beisel C., et al.,(1999). Mechanism of regulation of hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 5452-5457.
- Le Ber I Bouslam N Rivaud-Pechoux S et al. Frequency and phenotypic spectrum of ataxia with oculomotor apraxia 2: a clinical and genetic study in 18 patients. *Brain.* 2004;127:759-767.
- Lestienne P., Nelson J., Riederer P., Jellinger K. and Reichmann H., (1990). Normal mitochondrial genome in brain from patients with Parkinson's disease and complexe I defect. *J. Neurochem.*, 55: 1810-12.
- Lewin B.,( 2006). *Il gene.* Edizione Zanichelli.
- Liang P., MacRoe T.H. (1997). Molecular chaperones and cytoskeleton. *J of Cell Science* 110, 1431-40.
- Lim S.E., Longley M.J. and Copeland W.C., (1999). The mitochondrial p55 accessory subunit of human DNA polymerase  $\gamma$  enhances DNA binding, promotes processive DNA synthesis and confers N-ethylmaleimide resistance. *J. Biol. Chem.*, 274: 38197- 38203.
- Longley M.J, Prasad R., Srivastava D.K, Wilson S.H., Copeland W.C.,( 1998). Identification of 5'-deoxyribose phosphate lyase activity in human DNA polymerase  $\gamma$  and



its role in mitochondrial base excision repair in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 95: 12244-48.

- Longley M.J., Ropp P.A., Lim S.E. and Copeland W.C., (1998). Characterization of the native and recombinant catalytic subunit of human DNA polymerase  $\gamma$  identification of residues critical for exonuclease activity and dideoxynucleotide sensitivity. Biochemistry, 37: 10529-10539.
- Luoma P., Luo N., Loscher W.N., Farr C.L., Horvath R., Wanschitz J., Kiechl S., Kaguni L.S. and Suomalainen A., (2005). Functional defects due to spacer-region mutations of human mitochondrial DNA polymerase in a family with an ataxia-miopathy syndrome. Hum. Mol. Gen., 14:1907-1920.
- Luoma P., Melberg A., Rinne J.O., Kaukonen J.A., Nupponen N.N., Chalmers R.M., Oldfords A., Rautakorpi I., Peltonen L., Majamaa K., Somer H., Suomalainen A., (2004). Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase  $\gamma$  mutations: clinical and molecular genetic study. Lancet, 364: 875-882.
- Mancuso M., Filosto M., Oh S.J. and Di Mauro S., (2004). A novel polymerase gamma mutation in a family with ophthalmoplegia, neuropathy, and parkinsonism. Arch. Neurol., 61: 1177-1179.
- Maniatis T., Fritsch E.F. et al. (1982). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold spring harbor, NY 250-253.
- Marquat (1995) When cels stop making sense: effects of non sense codons on RNA metabolism in vertebrate cells. RNA; 453-465.
- Mayer M., Bukau B., (1998). Hsp70 chaperone systems: diversity of cellular functions and mechanism of action. Biol. Chem. 379, 261-268
- Mercier J., Prèvoost C., Engert J.C. et al. (2001). Rapid detection of the saccin mutation causing autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. Genet Test 5, 255-259.

- Moreira, M.C., S. Klur, M. Watanabe, A.H. Nemeth, I. Le Ber, J.C. Moniz, C. Tranchant, P. Aubourg, M. Tazir, L. Schols, et al. (2004). Senataxin, the ortholog of a yeast RNA helicase, is mutant in ataxia-ocular apraxia 2. *Nat. Genet.* 36:225–227.
- Moreira MC Barbot C Tachi et al. (2001) The gene mutated in ataxia-oculomotor apraxia 1 encodes the new HIT/Zn-finger protein aprataxin. *Nature Gene.* 29: 189-193.
- Moreira MC Klur S Watanabe M et al. (2004) Senataxin, the ortholog of a yeast RNA helicase, is mutant in ataxia-ocular apraxia 2. *Nat Genet*;36:225-7.
- Mounier N, Arrigo AP (2002). Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: how do they interact? *Cell Stress Chaperones.* 7,167-76
- Mrissa N., Belal S., Ben Hamida C. et al. (2000). Linkage to chromosome 13q11-12 of an autosomal recessive cerebellar ataxia in a Tunisian family. *Neurology* 54, 1408-14.
- Murakami E., Feng J.Y., Lee H., Hanes J., Johnson K.A., Anderson K.S., (2003). Characterization of novel reverse transcriptase and other RNA-associated catalytic activities by human DNA polymerase gamma: importance in mitochondrial DNA replication. *J. Biol. Chem.*, 278: 36403-36409.
- Naviaux R.K., Nguyen K.V., (2004). *POLG* mutations associated with Alpers' Syndrome and mitochondrial DNA depletion. *Ann. Neurol.*, 55: 706-712.
- Nemeth AH Bochukova E Dunne E et al. (2000). Autosomal recessive cerebellar ataxia with oculomotor apraxia (ataxia-telangiectasia-like syndrome) is linked to chromosome 9q34. *Am J Hum Genet*; 67:1320-6.
- Nguyen K.V., Ostergaard E., Ravn S.H., Balslev T., Danielsen E.R., Vardag A., McKiernan P.J., Gray G. and Naviaux R.K., (2005). *POLG* mutations in Alpers syndrome. *Neurology*, 65: 1493-1495.

- Nguyen K.V., Sharief F.S., Chan S.S., Copeland W.C. and Naviaux R.K., (2006). Molecular diagnosis of Alpers syndrome. *J. Hepatol.*, 45: 108-116..
- Ogawa T., Takiyama Y., Sakoe K., et al.,(2004). Identification of a SACS gene missense mutation in ARSACS. *Neurology* 62, 107-109
- Orth M. and Shapira A.H., (2001). Mitochondria and degenerative disorders. *Am. J. Med. Genet.*, 106:27-36.
- Ozawa T., Tanaka M., Ikebe S., Ohno K., Kondo T. and Mizuno Y., (1990). Quantitative determination of deleted mitochondrial DNA relative to normal DNA in parkinsonian striatum by a kinetic PCR analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 172:483-489.
- Pagano, G., A. Zatterale, P. Degan, M. d'Ischia, F.J. Kelly, F.V. Pallardo, and S. Kodama. (2005). Multiple involvement of oxidative stress in Werner syndrome phenotype. *Biogerontology*. 6:233–243.
- Pagnamenta A.T., Taanman J.W., Wilson C.J., Anderson N.E., Marotta R., Duncan A.J., Bitner-Glindzicz M., Taylor R.W., Laskowski A., Thorburn D.R. et al., (2006). Dominant inheritance of premature ovarian failure associated with mutant mitochondrial DNA polymerase  $\gamma$ . *Hum. Reprod.*, 21:2467-2473.
- Pandolfo M. (2002) The molecular basis of Friedreich ataxia *Adv Exp Med Biol*; 516: 99- 118.
- Peyronnard J.M., Charron L., Barbeau A., (1979). The neuropathy of Charlevoix-Saguenay ataxia: an electrophysiological and pathological study. *Can J Neurol Sci.* 6(2):199-203.
- Pulst S.M., Filla A. (2000). Ataxias on the march from Quebec to Tunisia. *Neurology* 54, 1400-1401.
- Richter A., Morgan K., Bouchard J.P. et al. (1993). Clinical and molecular genetic studies on autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS). *Adv. Neurol.* 61, 97-103.
- Richter A., Morgan K., Bouchard J.P. et al. (1996). ARSACS: possibly a lysosomal storage disease? [abstr]. *Am. J. Hum. Gen.* 59,A379.

- Richter A., Rioux J.D., Bouchard J.P., (1999). Location score and haplotype analyses of the locus for autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay, in chromosome region 13q11. *Am J Hum Genet.* 64(3):768-75.
- Richter A., Ozgul R.K., Poisson V.C., Topaloglu H. (2004). Private SACS mutation in autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS) families of Turkey. *Neurogenetics* 5, 165-170.
- Ropp P.A. and Copeland W.C., (1996). Cloning and characterization of the human mitochondrial DNA Polymerase, DNA Polymerase gamma. *Genomics*, 36: 449-458.
- Santoro L., Manganeli F., Lanzillo R., Tessa A., Barbieri F., Pierelli F., Di Giacinto G., Nigro V. and Santorelli F.M., (2006). A new *POLG1* mutation with PEO and severe axonal and demyelinating sensory-motor neuropathy. *J. Neurol.*, 253: 869-874.
- Scarpulla R.C., (2006)., Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J. Cell. Biochem.*, 97: 673-683.
- Schaefer A.M., Taylor R.W., Turnbull D.M. and Chinnery P.F., (2004). The epidemiology of mitochondrial disorders-past, present and future. *Biochim. Biophys. Acta*, 1659: 115-120.
- Schon E.A., Bonilla E., Di Mauro S., (1997). Mitochondrial DNA mutations and pathogenesis. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 29:131-149.
- Senderek J, Krieger M, Stendel C, et al., (2005). Mutations in *SIL1* cause Marinesco-Sjogren syndrome, a cerebellar ataxia with cataract and myopathy. *Nat Genet.* 37(12):1312-1314.
- S., Ferrari G., He L., Taylor R.W., Zeviani M., Turnbull D.M., Engelsen B.A., Moen G. and Bindoff L.A., (2005). Autosomal recessive mitochondrial ataxic syndrome due to mitochondrial polymerase  $\gamma$  mutations. *Neurology*, 64: 1204-1208
- Shimazaki H., Takiyama Y., Sakoe K., et al., (2005). A phenotype without spasticity in saccin-related ataxia. *Neurology* 64, 2129-2131.
- Shoubridge E.A., (2001). Cytochrome c oxidase deficiency. *Am. J. Med. Genet.*, 106:46-52.
- Shutt T.E. and Gray M.W., (2006). Twinkle, the mitochondrial replicative DNA helicase, is widespread in the eukaryotic radiation and may also be the mitochondrial DNA primase in most eukaryotes. *J. Mol. Evol.*, 62: 588-599.

- Slavotinek AM, Biesecker LG (2001). Unfolding the role of chaperones and chaperonins in human disease. *Trends Genet.* 17, 528-35.
- Smeitink J., Van Den Heuvel L., Di Mauro S., (2001). The genetics and the pathology of oxidative phosphorylation. *Nat. Rev. Genet.*, 2: 342-352,
- Steinmetz, E.J., C.L. Warren, J.N. Kuehner, B. Panbehi, A.Z. Ansari, and D.A. Brow. (2006). Genome-wide distribution of yeast RNA polymerase II and its control by Sen1 helicase. *Mol. Cell.* 24:735–746.
- Stewart, GS Maser RS Stankovic T et al., (199). The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell* 99: 577-587.
- Suomalainen A., Majander A., Wallin M., Setala K., Kontula K., Leinonen H., Salami T., Paetau A., Haltia M., Valanne L. et al., (1997). Autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia with multiple deletions of mtDNA: clinical, biochemical and molecular genetic features of the 100q-linked disease. *Neurology*, 48: 1244-1253.
- Suraweera A, Becherel OJ, Chen P, Rundle N, Woods R, Nakamura J, Gatei M, Criscuolo C, Filla A, Chessa L, Fusser M, Epe B, Gueven N, Lavin MF. (2007) Senataxin, defective in ataxia oculomotor apraxia type 2, is involved in the defense against oxidative DNA damage. *J Cell Biol.* Jun 18;177(6):969-79. Epub 2007 Jun 11.
- Taylor R.W. and Turnbull D.M., (2005). Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat. Rev. Genet.*, 6: 389-402.
- Theyssen H., Schuster H.P., Bukau B., Reinstein J., (1996). The second step of ATP binding to DnaK induces peptide release. *J. Mol. Biol.* 263, 657-670.
- Thornburn D.R. and Dahl H.H.M., (2001). Mitochondrial disorders: genetics, counseling, prenatal diagnosis and reproductive options. *Am. J. Med. Genet.*, 106: 102-114.

- Tyynismaa H., Sembongi H., Bokori-Brown M., Granycome C., Ashley N., Poulton J., Jalanko A., Spelbrink J.N., Holt I.J. and Suomalainen A., (2004). Twinkle helicase is essential for mtDNA maintenance and regulates mtDNA copy number. *Hum. Mol. Genet.*, 13: 3219-3227.
- Ursic, D., K.L. Himmel, K.A. Gurley, F. Webb, and M.R. Culbertson. (1997). The yeast *SEN1* gene is required for the processing of diverse RNA classes. *Nucleic Acids Res.* 25:4778–4785.
- protein/protein and protein/RNA interactions suggest roles for yeast DNA/RNA helicase Sen1p in transcription, transcription-coupled DNA repair and RNA processing. *Nucleic Acids Res.* 32:2441–2452.
- Valente EM, Brancati F, Caputo V et al., (2002) Novel locus for autosomal dominant pure hereditary spastic paraplegia (SPG19) maps to chromosome 9q33-34 *Ann Neurol* Jun;51(6):681-5.
- Van Goethem G., Luoma P., Rantamaki M., Al Memar A., Kaakkola S., Hackman P., Krahe R., Lofgren A., Martin J.J., De Jonghe P. et al., (2004). *POLG* mutations in neurodegenerative disorders with ataxia but no muscle involvement. *Neurology*, 63: 1251-1257.
- Van Goethem G., Dermaut B., Lofgren A., Martin J.J., Van Broeckhoven C., (2001). Mutation of *POLG* is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nat. Genet.*, 28: 211-212.
- Van Goethem G., Martin J.J., Dermaut B., Lofgren A., Wibail A., Ververken D., Tack P., Dehaene I., Van Zandijcke M., Moonen M., Ceuterick C., De Jonghe P., Van Broeckhoven C., (2003)<sup>a</sup>. Recessive *POLG* mutations presenting with sensory and ataxic neuropathy in compound heterozygote patients with progressive external ophthalmoplegia. *Neuromuscul. Disord.*, 13: 133-142.

- Wallace D.C., (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*, 283:1482-1488.
- Wang Y., Farr C.L., Kaguni L.S., (1997). Accessory subunit of mitochondrial DNA Polymerase from *Drosophila* embryos. Cloning, molecular analysis and association in the native enzyme. *J. Biol. Chem.*, 272: 13640-13646.
- Watanabe M Sugai Y Concannon P et al. (1998) Familiar spinocerebellar ataxia with cerebellar atrophy, peripheral neuropathy, and elevated level of serum creatine kinase, gamma-globulin, and alpha-fetoprotein. *Ann Neurol*; 44:265-269.
- Yakubovskaya E., Chen Z., Carrodeguas J.A., Kisker C., Bogenhagen D.F., (2006). Functional human mitochondrial polymerase  $\gamma$  forms a heterotrimer. *J. Biol. Chem.*, 281: 374-382.
- Yamamoto Y., Hiraoka K., Araki M., et al., (2005). Novel compound heterozygous mutations in saccin-related ataxia. *J Neurol* 239, 101-104.
- Zeviani M., Amati P., Comi G., Fratta G., Mariotti C. and Tiranti V., (1995). Searching for genes affecting the structural integrity of the mitochondrial genome. *Biochim. Biophys. Acta*, 1271: 153-158.
- Zeviani M., Servidei S., Gellera C., Bertini E., Di Mauro S., Di Donato S. (1989). An autosomal dominant disorder with multiple deletions apraxia: a syndrome mymicking ataxia telangiectasia *Ann Neurol*
- Zhu X., Zhao X., Burkholder W.F., et al., (1996). Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* 272, 1606-1614.

