



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Biologia

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: BIOSCIENZE
INDIRIZZO: GENETICA E BIOLOGIA MOLECOLARE DELLO SVILUPPO
CICLO XXI

INDIVIDUAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI GENI IMPLICATI NELLE PARAPARESI SPASTICHE EREDITARIE

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. T. Pozzan

Supervisore: Ch.ma Prof. ssa M.L. Mostacciolo

Dottorando: Francesca Boaretto

gennaio 2009

INDICE

INDICE	3
1 INTRODUZIONE	5
1.1 Premessa	5
1.2 Aspetti neuropatologici e classificazione clinico-molecolare	5
1.3 Ipotesi eziopatologiche e geni coinvolti nelle forme di paraparesi a trasmissione autosomica	7
1.4 Ipotesi eziopatologiche e geni coinvolti nelle forme di paraparesi a trasmissione X- <i>linked</i>	10
1.5 Tecniche di indagine	11
2 SCOPO	13
3 RISULTATI	15
3.1 Sezione A: Ricerca di mutazioni in un gene noto (L1CAM) causativo per HSP complicata legata al cromosoma X (SPG1)	15
3.1.1 Sequenziamento del gene L1CAM	15
3.1.2 Analisi delle varianti individuate mediante SSCP o restrizione enzimatica	15
3.1.3 Ricerca di riarrangiamenti cromosomici mediante MLPA	16
3.1.4 Ricerca di duplicazione genica mediante qPCR	17
3.2 Sezione B: Analisi di esclusione in una famiglia con HSP complicata a trasmissione autosomica recessiva	18
3.2.1 Risultati del calcolo del LOD <i>score</i> ed analisi di esclusione	18
3.2.2 Selezione di geni candidati	21
3.2.3 Sequenziamento del gene SNCG	23
3.2.4 <i>Fine mapping</i> della regione critica	23
3.2.5 Sequenziamento del gene GLUD1	23
3.3 Sezione C: Ricerca del gene causativo in una famiglia con HSP complicata a trasmissione autosomica recessiva	24
3.3.1 Ricostruzione degli aplotipi	24
3.3.2 Individuazione della mutazione nel gene SPG11	25
3.4 Sezione D: Validazione del gene STCH causativo per una forma di HSP complicata a trasmissione autosomica recessiva	26
3.4.1 Espressione dei costrutti Luciferasi/3'UTR-STCH in cellule NSC34	26
3.4.2 MicroRNA candidati a legarsi al 3'UTR mutato	27
3.4.3 Rilevazione di microRNA candidati in cellule NSC-34	28
4 DISCUSSIONE	29
5 MATERIALI E METODI	35
5.1 Il campione indagato	35
5.1.1 Raccolta e descrizione del campione analizzato in sezione A	35
5.1.2 Descrizione del campione analizzato in sezione B: famiglia 1	36
5.1.3 Descrizione del campione analizzato in sezione C: famiglia 2	37
5.1.4 Descrizione del campione analizzato in sezione D: famiglia 3	37
5.2 Estrazione del DNA	38

5.3 Valutazione spettrofotometrica della concentrazione degli acidi nucleici	38
5.4 Amplificazione di DNA tramite reazione di PCR	39
5.5 Controllo in gel d'agarosio	39
5.6 Progettazione <i>primers</i>	39
5.7 Sequenziamento e <i>primers</i> utilizzati	40
5.8 Analisi delle varianti di DNA individuate con il sequenziamento genico	41
5.8.1 SSCP	41
5.8.2 Saggio di restrizione	42
5.9 MLPA	43
5.10 PCR quantitativa (qPCR)	43
5.11 Elettroforesi in gel di poliacrilammide	44
5.12 Lettura di microsatelliti non fluorescenti mediante colorazione argintica	44
5.13 Lettura di marcatori microsatelliti in fluorescenza	45
5.14 Analisi di <i>clusters</i> di SNPs	45
5.15 Analisi di <i>linkage</i>	45
5.16 Studi di espressione della mutazione sul 3'UTR di STCH in vitro	46
5.16.1 Costruzione dei plasmidi	46
5.16.2 Colture cellulari: linea NSC-34	46
5.16.3 Trasfezione e saggio con luciferasi	46
5.16.4 Analisi statistica	47
5.17 Analisi di microRNA	47
5.17.1 Selezione di microRNA candidati	47
5.17.2 Estrazione di RNA a basso peso molecolare da cellule NSC-34	48
5.17.3 Poliadenilazione di RNA totale estratto da cellule NSC-34	48
5.17.4 Retrotrascrizione di RNA totale estratto da cellule NSC-34	48
5.17.5 Rilevazione di microRNA candidati mediante PCR	50
6 BIBLIOGRAFIA	51
7 APPENDICE	55
APPENDICE A	55
APPENDICE B	58
APPENDICE C	64
APPENDICE D	64
APPENDICE E	65
APPENDICE F	66
8 RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA	67

1 INTRODUZIONE

1.1 Premessa

La malattia di Strümpell, una patologia ereditaria dovuta ad una degenerazione delle fibre dei neuroni motori, prende il nome dal neurologo tedesco Adolf Strümpell che la identificò agli inizi del 1900 (Strümpell, 1880; Strümpell, 1904). Successivamente, un medico francese, Lorrain, fornì una descrizione più approfondita dei sintomi da cui il nome completo: malattia di Strümpell- Lorrain (Lorrain, 1898).

Oggi esistono varie sigle per indicare questo eterogeneo gruppo di disordini genetici neurodegenerativi, tra cui le più usate sono FSP (Familial Spastic Paraparesis) e HSP (Hereditary Spastic Paraplegia).

Nella pratica neurologica la paraplegia spastica in giovani pazienti è uno dei problemi frequentemente riscontrati, pertanto molti sono stati gli sforzi tesi ad individuare delle linee guida che permettessero di inquadrare la patologia; tali sforzi sono sottolineati dall'elevata documentazione presente in letteratura e sono un valido strumento per effettuare una diagnosi di HSP sempre più sicura sia dal punto di vista clinico che molecolare.

1.2 Aspetti neuropatologici e classificazione clinico molecolare

Le HSP sono accomunate da una progressiva debolezza e da una spasticità a livello degli arti inferiori, che possono portare alla perdita dell'uso degli stessi. Tali manifestazioni si devono alla degenerazione retrograda dei motoneuroni superiori, appartenenti ai tratti corticospinali discendenti ed alle fibre ascendenti della corda spinale. In particolare, questi neuroni evidenziano un graduale deterioramento che inizia all'estremità dell'assone e procede in senso retrogrado verso il soma cellulare, in un processo che è stato denominato *dying back axonal degeneration* (Schwarz et al., 1956, Coleman et al., 2005). Da un punto di vista clinico-diagnostico i segni distintivi di HSP sono ipostenia simmetrica e/o ipertonìa muscolare; iperreflessia alle estremità inferiori, di solito associata a risposta estensoria plantare; inoltre vi è spesso un lieve interessamento della sensibilità vibratoria delle dita dei piedi.

Secondo la classificazione proposta nel 1981 dalla neurologa A.E. Harding, e tuttora osservata, un simile quadro clinico descrive le forme "pure" di paraparesi spastica compatibili con le difficoltà di deambulazione e l'andatura spastica osservata nei pazienti. Occasionalmente si riscontrano sintomi secondari quali incontinenza urinaria, alterazione della sensibilità e piede cavo. Nelle forme "complicate", che costituiscono la maggior parte dei casi, si osservano i sintomi appena elencati associati ad una serie di altri disturbi quali neuropatia periferica, epilessia, amiotrofia, atassia, atrofia ottica, retinopatia, ittiosi, demenza, sordità, ritardo mentale.

La distinzione tra forme "pure" e "complicate", non rende bene conto della marcata eterogeneità clinica che caratterizza le HSP (Coutinho et al., 1999). Per classificare con chiarezza le diverse forme di paraparesi è quindi necessario considerare gli studi genetici effettuati ed i dati molecolari ottenuti. Infatti sia le forme pure che quelle complicate possono essere trasmesse con modalità *X-linked*, autosomica dominante o autosomica recessiva. Sono stati identificati, fino ad oggi, ben 39 diversi loci di associazione con le HSP e solo per 18 di questi è stato identificato il gene la cui mutazione è responsabile della malattia. La tabella qui di seguito riportata riassume le attuali conoscenze sulle diverse forme genetiche di paraparesi descrivendone il modello di trasmissione, il locus, la proteina che viene prodotta dal gene qualora questo sia noto, le caratteristiche cliniche principali e la frequenza con cui le mutazioni causative la malattia sono state osservate.

Tale tabella è estrapolata da un recente articolo (Salinas et al., 2008).

	Trasmissione	Locus	Proteina	Caratteristiche cliniche	Frequenza
LICAM(SPG1)	X-linked	Xq28	L1 cell adhesion molecule	Ritardo mentale ipoplasia del corpo calloso, pollici addotti, idrocefalo	Più di 100 casi familiari
PLP1(SPG2)	X-linked	Xq21	Proteolipoprotein 1	Quadriplegia, nistagno, ritardo mentale, ictus	<100 casi familiari
SPG3A	AD	14q12-q21	Atlantin	Esordio precoce, HSP pura a lenta progressione	<10% HSP AD
SPAST(SPG4)	AD	2p22	Spastin	Esordio variabile, principalmente HSP pura	40% di HSP AD pure
CYP7B1(SPG5A)	AR	8p	Cytochrome P450-7B1	Esordio variabile, HSP pura	~20 famiglie
NIPA1(SPG6)	AD	15q11.2-q12	Non-imprinted in Prader-Willi/ Angelman syndrome region protein 1	Esordio tardivo, HSP pura	~10 famiglie
SPG7	AR	16q	Paraplegin	Esordio variabile, segni cerebellari, atrofia ottica, neuropatia	~30 famiglie
KLAA0196(SPG8)	AD	8q24	Strumpellin	Esordio tardivo, HSP pura, marcata spasticità	<10 famiglie
SPG9	AD	10q23.3-q24.2	..	Cataratta, neuropatia motoria, anomalie scheletriche, reflusso gastro-esofageo	1 famiglia
KIF5A(SPG10)	AD	12q13	Kinesin family member 5A	Esordio precoce, HSP pura, può essere complicate da amiotrofia distale	<10 famiglie
SPG11	AR	15q21.2	Spatacsin	Esordio precoce, assottigliamento del corpo calloso, deficit cognitivo neuropatia	Più famiglie
SPG12	AD	19q13	..	Esordio precoce, HSP pura	<10 famiglie
HSPD1(SPG13)	AD	2q24-q34	Heat shock protein 60	Esordio tardivo, HSP pura	<10 famiglie
SPG14	AR	3q27-q38	..	Esordio variabile, neuropatia motoria, ritardo mentale	1 famiglia
ZFYVE26(SPG15)	AR	14q	Spastizin	Sindrome di Kjellin: Esordio tardivo, retinopatia pigmentata, segni cerebellari, ritardo mentale	<10 famiglie
SPG16	X-linked	Xq11.2	..	HSP ad esordio nell'infanzia, afasia, disturbi alla sfintere, ritardo mentale	1 famiglia
BSC12(SPG17)	AD	11q12-q14	Seipin	Sindrome di Silver esordio variabile, amiotrofia distale nelle mani più che nei piedi	<20 famiglie
SPG18	AD	Reserved	..		
SPG19	AD	9q33-q34	..	Esordio tardivo, HSP pura	1 famiglia
SPG20	AR	13q	Spartin	Sindrome di Troyer: esordio precoce, amiotrofia, segni cerebellari, ritardo nello sviluppo	Founder mutation nella comunità Amish
SPG21	AR	15q	Masparidin	Sindrome di Mast: esordio tardivo, assottigliamento del corpo calloso, impoverimento cognitivo, segni extrapiramidali e cerebellari	Founder mutation nella comunità Amish
SPG23	AR	1q24-q32	..	Sindrome di Lison: esordio precoce, anomalie della pigmentazione, dismorfismi facciali e dello scheletro, impoverimento cognitivo, tremore	1 famiglia
SPG24	AR	13q14	..	HSP pura ad esordio precoce, segni pseudobulbari	1 famiglia
SPG25	AR	6q23-q24	..	Esordio tardivo, cataratta, prolasso del disco intervertebrale	1 famiglia
SPG26	AR	12p11.1-q14	..	Esordio tardivo, neuropatia e debolezza distale, deficit intellettivo	2 famiglie
SPG27	AR	10q22.1-q24.1	..	Esordio variabile, segni cerebellari neuropatia ritardo mentale, microcefalia	2 famiglie
SPG28	AR	14q21.3-q22.3	..	HSP ad esordio precoce	1 famiglia
SPG29	AD	1p31-p21	..	Sordità, ernia iatale, pes cavus, iperbilirubinemia	1 famiglia
SPG30	AR	2q37	..	HSP pura ad esordio nell'adolescenza, neuropatia sensoria	1 famiglia
REEP1(SPG31)	AD	2p12	Receptor expression-enhancing protein 1	HSP pura ad esordio variabile	8% di HSP AD pure
SPG32	AR	14q12-q21	..	Esordio precoce, ritardo mentale, assottigliamento del corpo calloso,	1 famiglia
SPG34	AD/ X-linked	Xq25	Xq25	..	1 famiglia
SPG35	AR	16q21-q23	..	Esordio precoce, deficit cognitivo, ictus	1 famiglia
SPG36	AD	12q23-q24
SPG37	AD	8p21.1-q13.3
SPG38	AD	4p16-p15	..	Amiotrofia distale (Sindrome di Silver)	1 famiglia
SPG39	AR	19p13	Neuropathy target esterase	Esordio precoce, marcata debolezza ai quattro arti	2 famiglie
SPG41	AD	11p14.1-p11.2

Tab. 1.1: Loci noti per le HSP a trasmissione autosomica dominante (AD) recessiva (AR) e associate al cromosoma X (*X-linked*). Vengono riportati: la localizzazione cromosomica, il gene coinvolto se noto, le principali caratteristiche cliniche e la frequenza con cui sono state osservate le mutazioni a carico dei geni coinvolti in ciascuna forma (Salinas et al, 2008).

A questa tabella va però aggiunto, per una forma dominante di paraparesi, un ulteriore locus (SPG42), riportato da Lin e colleghi che lo hanno individuato sul cromosoma 3, in 3q24-26,

ed anche il gene SLC33A1 (trasportatore di acetil-CoA) che se mutato rende conto del fenotipo malattia per tale locus (Lin et al., 2008).

Come emerge da questo elenco le varianti a trasmissione autosomica dominante rappresentano circa il 70% dei casi di HSP, mentre le forme autosomiche recessive, che in genere presentano un'insorgenza più precoce e un decorso più grave, sono meno frequenti e coprono circa il 29% dei casi; il restante 1% è rappresentato da varianti legate al cromosoma X (Reid et al., 1999, Fink et al., 2003). Inoltre la maggior parte dei casi di HSP pure sono a trasmissione autosomica dominante mentre le forme complicate sono principalmente forme autosomiche recessive (Salinas et al., 2008). Nella tabella 1.1 sono inoltre riportati i caratteri distintivi che contraddistinguono le diverse varianti come: l'età di insorgenza della malattia, il grado di progressione della spasticità o la presenza di sintomi aggiuntivi. Data l'esistenza di una notevole eterogeneità clinica sia interfamiliare che intrafamiliare, non è facile per il clinico inquadrare il tipo di HSP presente in un paziente, pertanto di sicuro aiuto può risultare la storia familiare di questo.

1.3 Ipotesi eziopatologiche e geni coinvolti nelle forme di paraparesi a trasmissione autosomica

Nelle forme di HSP, indipendentemente dal tipo di trasmissione e dalla gravità del fenotipo, la degenerazione neuronale coinvolge esclusivamente gli assoni, senza compromettere la vitalità dei corpi cellulari (Pelosi et al., 1991; Schady et al., 1991). Pertanto un'ipotesi eziopatologica dovrebbe spiegare perché la malattia causi questo particolare tipo di danno neuronale.

Considerando l'unicità della loro morfologia neuronale ed il tipo particolare di funzione che svolgono, in questo tipo di cellula il sistema di trasporto deve essere estremamente efficiente. Il flusso assonale, da e verso il corpo cellulare, è regolato sia in direzione anterograda che retrograda da specifici meccanismi (Almenar et al., 2001). Fondamentali in questo tipo di trasporto sono il ruolo del citoscheletro e quello di alcune proteine motrici come le chinesine e la dineina (Apodaca et al., 2001). Oltre al trasporto a lunga distanza dal pirenoforo verso le zone sinaptiche del neurone, il citoscheletro media anche il traffico degli endosomi che si occupano del sorting proteico, dei meccanismi di endo ed esocitosi e del trasporto di molecole da un organulo cellulare all'altro, durante le vie biosintetiche e degradative (Matteoni et al., 1987).

L'importanza del mantenimento in funzione di questo efficiente trasporto cellulare, spiega il fatto che mutazioni che causano HSP in geni espressi ubiquitariamente portino alla degenerazione soltanto di questo tipo particolare di cellule.

Riassumendo e tenendo in considerazione i geni che causano le HSP, ad oggi sono state formulate almeno due ipotesi, di seguito illustrate, atte a spiegare quali siano le funzioni cellulari alterate che provocano il deterioramento del motoneurone nelle HSP (Depienne et al., 2007).

ALTERAZIONE DEL *TRAFFICKING* DI MEMBRANA E DEL TRASPORTO ASSONALE

Difetti nel *trafficking* di membrana, nel trasporto microtubuli-associato e disorganizzazione del citoscheletro si traducono in una inappropriata distribuzione di organelli o di macromolecole che nel neurone coinvolgono principalmente l'assone a partire dalle sue estremità terminale; inoltre la mancanza di mitocondri nella regione sinaptica equivale ad un ridotto apporto energetico, che può contribuire alla progressiva degenerazione cellulare.

Particolarmente attive nel processo di trasporto vescicolare intracellulare sono la famiglia di proteine Rab (piccole GTPasi) e le proteine associate ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*). Mentre nel trasporto propriamente assonale sono coinvolte le dineine e la famiglia delle kinesine. Le prime, responsabili del trasporto retrogrado, agiscono da

motore citoplasmatico ubiquitario della famiglia delle proteine AAA (*ATPase-associated with various cellular activities*). Tra i numerosi processi cellulari in cui sono coinvolte viene ricordato il trasporto di neurotrofine mediante vescicole endosomiali e di mitocondri e proteine associate ad RNA. La famiglia delle kinesine promuove il trasporto anterogrado e quindi la distribuzione di materiale ai terminali nervosi (Salinas et al., 2008). In questo modo si spiega il ruolo di 9 delle 18 proteine che, se alterate, generano HSP nei pazienti portatori di mutazione: KIF5A, SPAST, SPG3A, SPG11, SPG20, SPG21, ZFYVE26, NIPA1 e l'ultimo arrivato SLC33A1.

KIF5A (SPG10) le cui mutazioni sono responsabili di una forma di paraparesi pura autosomica dominante ad esordio precoce (locus SPG10) è la più diretta evidenza di tale ipotesi: il gene è espresso esclusivamente nei neuroni e codifica per un tipo di catena pesante della Kinesina-I (Reid et al., 2002). Le mutazioni fino ad ora identificate, colpiscono il dominio motorio della proteina danneggiando l'attività ATPasica che è necessaria per l'associazione con i microtubuli.

SPAST (SPG4) ed SPG3A sono trovati mutati in più del 50% dei casi di HSP a trasmissione autosomica dominante. Il gene SPAST che rende conto della variante SPG4, è espresso in maniera ubiquitaria, con una leggera prevalenza nel cervello fetale (Hazan et al., 1999). La spastina che appartiene alla famiglia di proteine AAA, a livello citoplasmatico interagisce in maniera dinamica con i microtubuli tramite la sua porzione N-terminale e ne regola il turnover promuovendone la depolimerizzazione (Errico et al., 2002).

La variante SPG3A è una forma di HSP a trasmissione autosomica dominante come la SPG4, correlata però ad un'età di insorgenza molto precoce (5-10 anni). Atlastina è espressa in maniera ubiquitaria, ma maggiormente presente in cervello ed appartiene alla classe delle dinamine (GTPasi). Questa classe di proteine svolge un ruolo essenziale nei processi di endocitosi e nelle vie di secrezione in quanto sono coinvolte nella formazione delle vescicole che mediano il trasporto delle molecole; nei neuroni, inoltre, mediano il riciclo delle vescicole sinaptiche ed il mantenimento della morfologia delle membrane sinaptiche (Ochoa et al., 2000).

Nelle forme recessive di HSP invece, uno dei gene trovato maggiormente mutato (40%) è SPG11 che genera nei pazienti un fenotipo HSP complicato da assottigliamento del corpo calloso (Stevanin et al., 2008). Questo gene è espresso nel sistema nervoso centrale e la localizzazione è citoplasmatica; esperimenti di immunofluorescenza hanno evidenziato una co-localizzazione con mitocondri e reticolo endoplasmatico. Viene inserito in questo gruppo di proteine HSP in seguito all'analisi di materiale bioptico (nervo surale) riportata dal gruppo di Hehr e colleghi che ha rivelato alterazioni compatibili con un disturbo del trasporto assonale (Hehr et al., 2007).

SPG20 e SPG21 sono due geni trovati mutati nella popolazione Amish che rendono conto di due forme di HSP a trasmissione autosomica recessiva complicate: rispettivamente la sindrome di Troyer e di Mast. Per entrambe queste proteine esistono poche informazioni. La funzione precisa di spartina non è attualmente nota, tuttavia il fatto che essa presenti omologie di sequenza con la porzione N-terminale della spastina suggerisce che questa proteina possa avere un ruolo importante nella dinamica dei microtubuli e nella regolazione del traffico intracellulare di proteine mediato da endosomi (Robay et al., 2006). Studi effettuati per individuare la localizzazione subcellulare di *maspardin*, hanno rivelato che la proteina si ripartisce tra il citosol e le vescicole endosomiali del trans-Golgi-network, suggerendo un ruolo nel sorting proteico e nel traffico intracellulare mediato da vescicole (Zeitlmann et al., 2001).

ZFYVE26 (SPG15) invece è stato trovato mutato in una rara forma di HSP complicata da deficit mentale, degenerazione retinica, disartria, segni cerebellari ed amiotrofia anche chiamata sindrome di Kjellin. Tale gene, scoperto di recente, codifica per una *zinc finger*

protein con dominio FYVE ubiquitariamente espresso. Studi di espressione su cervello di roditore adulto mostrano un profilo che assomiglia a quello di SPG11; inoltre nell'analisi di cellule in coltura spastizin co-localizza parzialmente con i marcatori specifici del reticolo endoplasmatico ed endosomiali. Questi risultati suggeriscono per ZFIVE26 un ruolo nel trafficking intracellulare (Hanein et al., 2008).

NIPA1 è stato identificato come responsabile della variante autosomica recessiva SPG6 (Rainier et al., 2003). Il gene è espresso ubiquitariamente, ma ad un livello più elevato nei tessuti nervosi. Si pensa che codifichi per un trasportatore di ioni Mg^{2+} a livello di endosomi e superficie cellulare.

L'ultima scoperta è il gene SLC33A1 responsabile di una HSP a trasmissione autosomica dominante (variante SPG42). L'unica mutazione fino ad ora trovata comporta la sostituzione di un aminoacido altamente conservato nella proteina trasportatore di Acetil CoA (p.S113R) che distrugge il secondo dominio transmembrana e inverte l'orientamento degli altri domini. Studi *Knockdown* sull'organismo modello zebrafish di *Slc33a1* mostrano un fenotipo riconducibile ad una crescita assonale anomala a livello della corda spinale sottolineando un ruolo cruciale del trasportatore di Acetil CoA nello sviluppo e nella funzione dei motoneuroni (Lin et al., 2008).

DISFUNZIONE MITOCONDRIALE

Una ridotta attività mitocondriale comporta un minor apporto energetico e provoca di conseguenza danni al trasporto assonale, che sarebbe solo un evento successivo e non la causa prima in questa ipotesi eziopatologica per le HSP; in posizione distale rispetto al soma del neurone inizierebbero ad accumularsi polipeptidi non ripiegati, mitocondri danneggiati, diminuendo maggiormente le funzioni sinaptiche fino ad arrivare al rigonfiamento dell'assone e alla sua degenerazione (Rugarli et al., 2006).

La degenerazione pertanto comincerebbe a livello sinaptico dove l'apporto energetico dei mitocondri è essenziale ed una sua diminuzione causerebbe danni ingenti che poi progredirebbero verso il corpo cellulare. Analogamente alla precedente ipotesi alcuni dei geni che se mutati causano HSP, sostengono l'idea che un'anomala funzionalità mitocondriale sia causa di HSP; tali geni sono: SPG7, HSPD1 e REEP1.

Mutazioni a carico del gene SPG7 sono state riportate in individui affetti da forme di HSP sia pure che complicate. La paraplegina è una proteina con localizzazione mitocondriale appartenente alla famiglia AAA. Tali proteine a livello mitocondriale partecipano al corretto ripiegamento e assemblaggio delle proteine della catena respiratoria, svolgendo una funzione di chaperone molecolare. Gli studi svolti da Ferreira nel 2004 hanno dimostrato che in topi transgenici che non esprimono la paraplegina, gli assoni si rigonfiano e si riempiono di mitocondri aberranti, organelli e neurofilamenti accumulati. Il meccanismo patogenetico ipotizzato per SPG7 è che una paraplegina strutturalmente alterata non sia più in grado di svolgere la sua funzione di *chaperonne* molecolare; i peptidi aberranti, in mancanza di un controllo di qualità e di una proteolisi specifica, andrebbero a formare degli aggregati che lentamente intasano il mitocondrio compromettendone l'attività e portando, quindi, ad un deficit energetico della cellula con conseguente degenerazione assonale.

La paraplegina è espressa ubiquitariamente tuttavia è probabile che i neuroni, dato il loro elevato bisogno di energia per la trasmissione del segnale elettrico e per il mantenimento del flusso assonale, siano il tipo cellulare che maggiormente viene danneggiato dal deficit energetico.

Mutazione nel gene HSPD1 causano la variante pura a trasmissione autosomica dominante di HSP, definita SPG13. *Heat shock protein 60* è una chaperonina con localizzazione mitocondriale dove svolge una funzione di assistenza al ripiegamento di un subset di proteine (Hasnsen et al., 2002). Da recenti studi su cellule di paziente portatore di mutazione nel gene HSPD1 (p.Val98Ile) è emersa una riduzione nell'attività degradativa del sistema di controllo

mitocondriale in grado di causare una disfunzione a carico di questo organello (Hasnsen et al., 2008).

Minori informazioni si hanno per il gene REEP1 che sembra essere frequentemente mutato (8.2%) in pazienti con HSP pura a trasmissione autosomica dominante (Beetz et al., 2008). La proteina codificata da questo gene è ubiquitariamente espressa e localizza nei mitocondri, sottolineando l'importanza della funzionalità mitocondriale nelle malattie neurodegenerative (Zuchner et al., 2006). Inoltre, per la prima volta, nel loro lavoro di *screening* mutazionale Züchner e colleghi hanno rilevato due mutazioni a livello del 3'UTR di tale gene senza tuttavia darne un'evidenza sperimentale. Le due mutazioni, c.606+43G_T e c.606+50G_A, sono sostituzioni nucleotidiche e sembrano riguardare il putativo sito di interazione per miR-140, dedotto mediante predizione bioinformatica. In entrambi i casi, la sostituzione elimina un appaiamento G:U, che è stato dimostrato avere un effetto inibitorio verso la repressione della traduzione mediata da miRNA. Quindi gli autori hanno ipotizzato che tali sostituzioni promuovano la stabilizzazione dell'appaiamento di miR-140 al 3'UTR del messaggero e, di conseguenza, una soppressione della traduzione del mRNA superiore alla norma. La mancata traduzione del mRNA determina l'assenza della proteina *receptor expression-enhancing protein 1* e la manifestazione del fenotipo SPG31.

Più difficile ricondurre ad una di queste due ipotesi gli altri geni 4 trovati mutati in pazienti affetti da HSP: CYP7B1, SPG39, BSCL2 e KIAA0196.

I primi 2 sono stati trovati mutati in pazienti in cui la malattia segregava con modalità autosomica recessiva: rispettivamente varianti SPG5A e SPG39. CYP7B1 (cytochrome P450-7B1) ha un ruolo cruciale nella vie metaboliche dei neurosteroidi, garantendo l'omeostasi del colesterolo a livello del sistema nervoso centrale. Mutazioni nel gene CYP7B1 causerebbero anomalie nel metabolismo del colesterolo inducendo la degenerazione del neurone (Tsaousidou et al., 2008). SPG39, scoperto nell'ultimo anno codifica per la proteina: *neuropathy target esterase*, una fosfolipasi B normalmente implicata nel metabolismo della fosfatidilcolina. Questo enzima interagisce con una particolare classe di molecole: i composti organo fosforici; la perdita della funzionalità sembra essere il meccanismo alla base di SPG39 (Rainier et al., 2008).

KIAA0196 e BSCL2 sono geni HSP le cui mutazioni rendono conto di forme a trasmissione autosomica dominante. Il primo è il gene causativo della forma SPG8 ad esordio tardivo e codifica per la proteina *strumpellin*, ubiquitaria, spesso sovraespressa in cellule tumorali ma di funzione sconosciuta (Valdmanis et al., 2007). Il gene BSCL2 (SPG17) codifica per *sepein* una proteina di membrana situata nel reticolo endoplasmatico, in stato glicosilato la cui funzione è tuttora sconosciuta. La proteina mutata forma degli aggregati che inducono la degenerazione del neurone (Windpassinger et al., 2004).

1.4 Ipotesi eziopatologiche e geni coinvolti nelle forme di paraparesi a trasmissione X-linked

Le forme di HSP pure legate alla trasmissione del cromosoma X sono molto rare nella popolazione. Vengono descritte due forme di cui si ignora il gene causativo: SPG16, caratterizzata da un esordio precoce e la forma SPG34 solo recentemente rivalutata come HSP X-linked (Macedo-Souza et al., 2008).

Le forme di HSP complicate sono due e si caratterizzano per una insorgenza precoce (prima decade di vita), per entrambe è stato identificato il gene causativo: LICAM (SPG1) e PLP (SPG2).

Il meccanismo patogenetico che sta alla base della patologia in queste forme sembra riguardare un danno nelle prime fasi dello sviluppo del sistema nervoso, più che una degenerazione assonale.

L1CAM è stato il primo gene malattia identificato per le HSP (Jouet et al., 1994). E' espresso sulla superficie degli assoni nel sistema nervoso centrale e sui coni di crescita dei neuroni, durante lo sviluppo embrionale, giocando un ruolo di primaria importanza nello sviluppo dell'intero sistema nervoso, nella migrazione neuronale, nell'allestimento dell'assone e nella sinaptogenesi. Tale gene codifica una glicoproteina transmembrana caratterizzata, nella porzione extracellulare, da 6 domini immunoglobulinici e 5 domini omologhi alla fibronectina III.

Le mutazioni identificate a carico di L1CAM sono numerose e colpiscono maggiormente i domini immunoglobulinici e fibronectina simili nella porzione extracellulare. In realtà, le mutazioni di L1CAM sono responsabili, oltre che per la HSP (SPG1), anche di altre patologie quali idrocefalo congenito da stenosi dell'acquedotto di Silvio (HSAS), sindrome MASA (ritardo mentale, afasia, andatura trascinata, pollici addotti) e agenesia del corpo calloso (ACC). Tutte queste patologie neurologiche sono correlate a tal punto da essere riunite e riassunte nell'acronimo CRASH (ipoplasia del corpo calloso, ritardo mentale, pollici addotti, paraplegia spastica ed idrocefalo) o nel termine generico di sindrome L1 (Fransen et al., 1995; Fink et al., 2000).

Il gene PLP codifica per due diverse proteine, *protolipoprotein 1* e DM20 che derivano da eventi di *splicing* alternativo del gene e costituiscono una delle maggiori componenti della mielina. Anche le mutazioni del gene PLP1 possono produrre patologie diverse: la SPG2 e la malattia di Pelizaeus-Merzbacher (PMD). Il ruolo preciso di PLP nello sviluppo di queste patologie non è ancora ben definito. Recenti lavori, effettuati con l'utilizzo di topi Knock-out, riportano che PLP e le proteine che codifica potrebbe avere un ruolo nella maturazione degli oligodendrociti e nel mantenimento degli strati mielinici (Griffiths et al., 1998).

Nella patogenesi della forma SPG2 sembrano, tuttavia, entrare in gioco anche altri fattori, infatti nelle fibre degenerate di pazienti affetti da SPG2, si osserva un accumulo di corpi membranosi e mitocondri, il che suggerisce anche un non corretto funzionamento di qualche meccanismo di trasporto assonale (Garbern et al., 2002).

1.5 Tecniche di indagine

Gli strumenti oggi più usati per mappare i geni malattia in disordini mendeliani sfruttano da una parte la divulgazione scientifica e la creazione di grandi *database* che concentrano i dati relativi al genoma umano e non in quantità sempre maggiori e dettagliate e dall'altra si basano sulle tecnologie sviluppate nell'ultimo trentennio come la reazione a catena della polimerasi (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) ed il sequenziamento genico. L'approccio del clonaggio *positional-candidate* ha permesso di aumentare esponenzialmente il numero di geni malattia identificati e di conseguenza di individuare le mutazioni che li interessano. Il comune percorso per l'identificazione del gene causativo parte dall'individuazione di una regione critica sul genoma umano, mediante analisi di *linkage*; procede con la scelta di geni candidati all'interno di tale regione sulla base di criteri acquisiti dallo studio della patologia e, nei casi più fortunati, termina con l'identificazione delle mutazioni causative della malattia mediante sequenziamento diretto del gene scelto come candidato.

Le nuove frontiere in questo approccio devono tenere conto che la ricerca delle mutazioni, per lo più limitata allo studio delle regioni codificanti, non è sufficiente a spiegare le basi molecolari dei fenomeni complessi, come eterogeneità genetica o penetranza incompleta, che si riscontrano nella maggior parte delle patologie ereditarie umane. Inoltre è recente la segnalazione della patogenicità di alcune sostituzioni sinonimo che fanno porre una particolare attenzione dal momento che gli SNPs (*Single Nucleotide Polimorphisms*) sinonimo sono circa il 30-45% del totale di SNP trovati nelle regioni esoniche.

L'attenzione deve quindi essere focalizzata non solo sull'identificazione della mutazione, ma anche sull'azione operata dalla mutazione stessa. La maggior parte delle mutazioni descritte

finora riguardano la sola componente codificante, in quanto le ripercussioni delle stesse sul prodotto proteico sono relativamente facili da dimostrare. Al contrario, mutazioni a carico di altri elementi non codificanti, come introni, *enhancer* o sequenze UTR, vengono spesso sottovalutate (e, di conseguenza, sottostimate), perché presuppongono la modificazione di *pathways* regolativi delle attività cellulari che tuttora non sono ancora stati completamente caratterizzati.

2 SCOPO

In questa tesi di dottorato sono stati presi in considerazione casi isolati e familiari che presentavano diagnosi di Paraparesi Spastica Ereditaria (HSP) complicata. Data l'ampia eterogeneità sia clinica che genetica che caratterizza questa patologia, prima di procedere con l'analisi molecolare dei soggetti affetti, appare strategico individuare un percorso operativo che possa aiutare a discriminare tra le diverse varianti. L'approccio sperimentale pertanto deve tener conto sia delle informazioni cliniche raccolte che della familiarità o meno presente nei casi indice, ma anche dei dati presenti in letteratura relativi alle HSP e delle tecniche di indagine disponibili. Lo scopo è quello di individuare il locus e/o il gene coinvolto nei diversi pazienti, ma a fronte di 39 loci descritti e 18 geni individuati permane ancora il rischio che la variante genetica che caratterizza quella specifica famiglia o quello specifico affetto, non sia riconducibile ad una entità nota o a una mutazione che interessi una regione codificante di un gene. Questa premessa risulta essenziale per chiarire che per lo studio intrapreso si è cercato di suddividere il campione oggetto di studio in più sezioni, in quanto andava individuata una scelta operativa che potesse meglio rispondere alla soluzione del problema.

Sezione A

In un campione di 10 individui affetti dalla rara forma di HSP associata a ipoplasia del corpo calloso, ritardo mentale, pollici addotti, ed idrocefalo (sindrome di CRASH), si è voluto analizzare il gene LICAM mediante sequenziamento automatico. Si fa presente che delle quasi 200 mutazioni riportate in letteratura solo 15, sparse lungo l'intero gene, sono riconducibili a questo fenotipo.

Sezione B

In una famiglia con HSP associato a deficit cognitivo (Fam.1), per cui è stata chiaramente definita una trasmissione autosomica recessiva, verrà operata l'esclusione dei loci descritti per le paraparesi spastiche con analogha modalità di trasmissione e valutati possibili geni candidati in regioni di *linkage*.

Sezione C

Per un nucleo familiare (Fam. 2) a cui è stata diagnosticata in due fratelli una forma di HSP complicata da sospetto assottigliamento del corpo calloso si procederà con l'esclusione dei geni noti delle varianti più comuni e con la caratterizzazione della regione 15q21.1 dove mappa il gene SPG11 che codifica per la proteina spatacsina, responsabile della variante SPG11.

Sezione D

Le indagini in questa famiglia (Fam. 3) per la quale sono già state eseguite analisi di *linkage* su tutto il genoma (*genome-wide search*) e ricerca di un gene candidato, si concentreranno sul ruolo funzionale di STCH il cui 3'UTR sembra interagire con specifici microRNA

3 RISULTATI

3.1 Sezione A: Ricerca di mutazioni in un gene noto (L1CAM) causativo per HSP complicata legata al cromosoma X (SPG1)

Premessa

Sono stati raccolti i DNA di 10 individui di sesso maschile che presentavano paraparesi spastica, ritardo mentale, idrocefalo, pollici addotti e in alcuni casi ipoplasia o agenesia del corpo calloso. Un tale fenotipo è riconducibile ad una particolare forma di paraparesi spastica: la rara sindrome di CRASH che mappa sul cromosoma X, in posizione Xq28. La diagnosi clinica di sindrome di CRASH può essere confermata dalla diagnosi molecolare, mediante ricerca di mutazioni nel gene L1CAM, identificato come causativo per questa variante di HSP complicata. Si è pertanto proceduto con la ricerca di mutazioni puntiformi.

Come emerso da dati di letteratura (Van Camp et al., 1993; Van Esch et al., 2005; Villard, 2007) esistono casi patologici dovuti a duplicazione dell'intero gene L1CAM. Un difetto di dosaggio genico in tal senso può non essere visto con il sequenziamento automatico pertanto i pazienti risultati negativi per la ricerca di mutazioni puntiformi nel gene L1CAM sono stati analizzati con due diverse metodiche: MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*) e PCR quantitativa.

3.1.1 Sequenziamento del gene L1CAM

La ricerca di mutazioni puntiformi nel gene L1CAM ha portato all'identificazione di 5 nuove varianti di sequenza e di una mutazione nota, riportata nel 1998 da Saugier-Veber e colleghi, descritte nella seguente tabella:

	esone	dominio	cDNA	proteina	
Pz 7421	18	Fn2	c.2308G>A	p.D770N	Non nota
Pz 9107	6	Ig like2	c.670_671delC	p.I225LfsX11	Non nota
Pz 9156	18	Fn2	c.2410_2411insA	p.I804NfsX14	Non nota
Pz 9227	1	Peptide segnale	c.25T>A	p.T9W	Non nota
Pz 9408	12	Ig like5	c.1417C>T	p.R473C	nota (Saugier-Veber et al.;1998)
Pz 9659	19	Fn3	c.2470_2474del	p.N825KfsX63	Non nota

Tab. 3.1: Per ciascun paziente (Pz) viene riportato l'esone nel quale è stata trovata la variazione di sequenza ed il dominio coinvolto del gene L1CAM. La posizione nel cDNA e nella proteina vengono riportate rispetto alle sequenze di riferimento NM_000425.2 ed NP_000416.1 depositate all'NCBI.

3.1.2 Analisi delle varianti individuate mediante SSCP o restrizione enzimatica

Per escludere che le 5 nuove varianti di sequenza identificate fossero riconducibili a polimorfismi presenti nella popolazione sono state condotte delle analisi su un campione di controllo di almeno 200 cromosomi; per le sostituzioni di un singolo nucleotide si è preferito aumentare a 300 il numero dei cromosomi di controllo indagati. L'assenza di tutte e 5 le varianti nella popolazione di controllo ha permesso di assumere che siano state individuate 5 nuove mutazioni causative per la Sindrome di CRASH. Nella tabella successiva vengono riportati i metodi con cui è stata condotta la ricerca sul campione di controllo.

Variante	Tipologia di Screening
c.2308G>A	SSCP
c.670delC	SSCP
c.2410insA	SSCP
c.25T>A	Saggio di Restrizione con AflIII
c.2470_2474del	SSCP

Tab. 3.2: Per ciascuna variante viene riportato il metodo con cui è stato effettuato lo screening sulla popolazione di controllo.

Successivamente sono stati analizzati anche i familiari dei pazienti di cui era disponibile il DNA (paragrafo 5.1 in materiali e metodi). Tale analisi ha reso possibile l'individuazione delle portatrici sane come evidenziato negli alberi di seguito riportati relativi ai familiari di Pz 7241, di Pz 9107 e di Pz 9569.

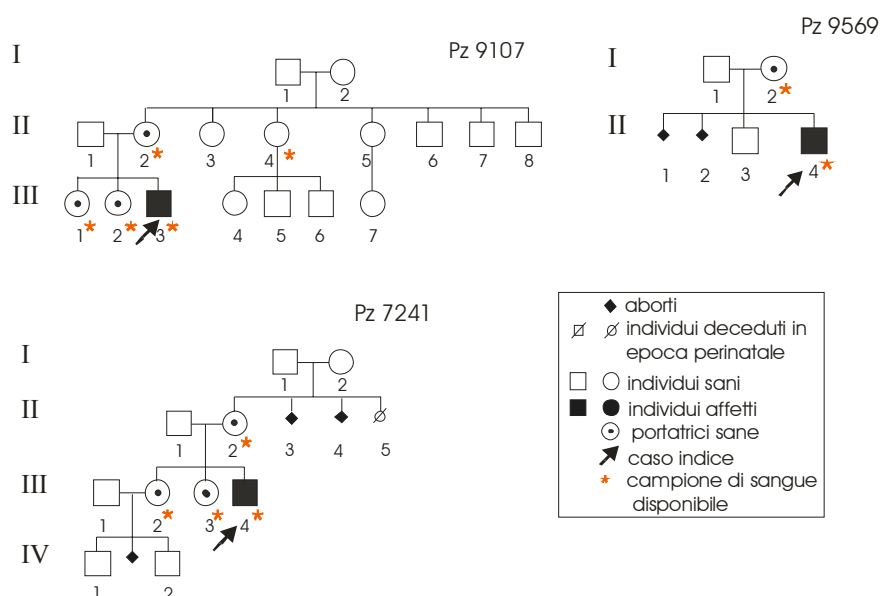


Fig. 3.1: Alberi genealogici relativi ai familiari dei pazienti Pz724, Pz9107 e di Pz9569. Sono stati riportati solo gli alberi in cui in seguito ad analisi molecolare per il gene L1CAM è emersa la presenza di portatrici sane.

3.1.3 Ricerca di riarrangiamenti cromosomici mediante MLPA

I 4 campioni: Pz8083, Pz9123, Pz9165, Pz9178 risultati negativi allo screening per mutazioni puntiformi sono stati analizzati mediante la metodica MLPA al fine di identificare la presenza di eventuali duplicazioni all'interno e nell'intorno del gene L1CAM. A tale scopo è stata utilizzato un kit commercialmente venduto per analizzare il gene responsabile della sindrome di Rett, ma contenente una sonda specifica per L1CAM e per altri geni che mappano nella stessa regione citogenetica Xq28.

Per tale analisi sono stati adoperati come controlli 10 campioni di DNA di soggetti normali di ambo i sessi. In figura 3.2 è mostrato l'output ottenuto dopo corsa al sequenziatore analizzato mediante il software Genotyper[®].

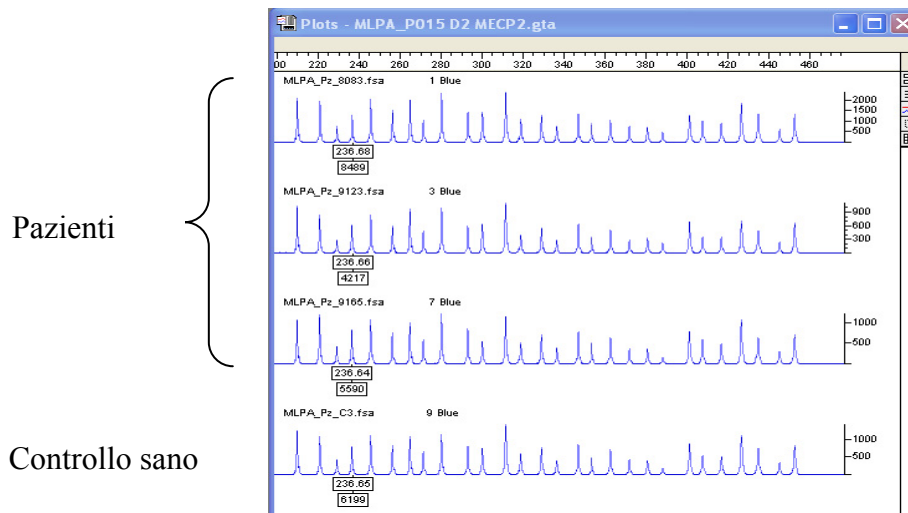


Fig.3.2: Lettura delle sonde con il software Genotyper[®] su tre dei pazienti analizzati ed un controllo sano. A titolo esemplificativo solo la sonda relativa al gene L1CAM è stata etichettata per posizione (paia di basi) e per area del picco sotteso (intensità di fluorescenza).

L'analisi dei risultati è stata effettuata esportando la tabella, ottenuta con il software Genotyper[®], contenente i valori delle aree e delle altezze dei picchi nei fogli di lavoro Excel come illustrato nel paragrafo 5.9.

Non si sono osservate duplicazioni all'interno della banda citogenetica Xq28 nei quattro pazienti analizzati.

3.1.4 Ricerca di duplicazione genica mediante qPCR

Gli stessi 4 campioni (Pz8083, Pz9123, Pz9165, Pz9178), risultati negativi per la ricerca di mutazioni puntiformi nel gene L1CAM, sono stati analizzati mediante qPCR a livello degli esoni 4, 25 e 28 per sondare l'eventuale presenza di duplicazioni dell'intero gene. Come si può evidenziare in figura 3.3 i soggetti affetti, mostrano una quantità di DNA simile ai maschi sani, attestandosi attorno a valori di 0,5. Si può pertanto escludere la presenza di duplicazione dell'intero gene.

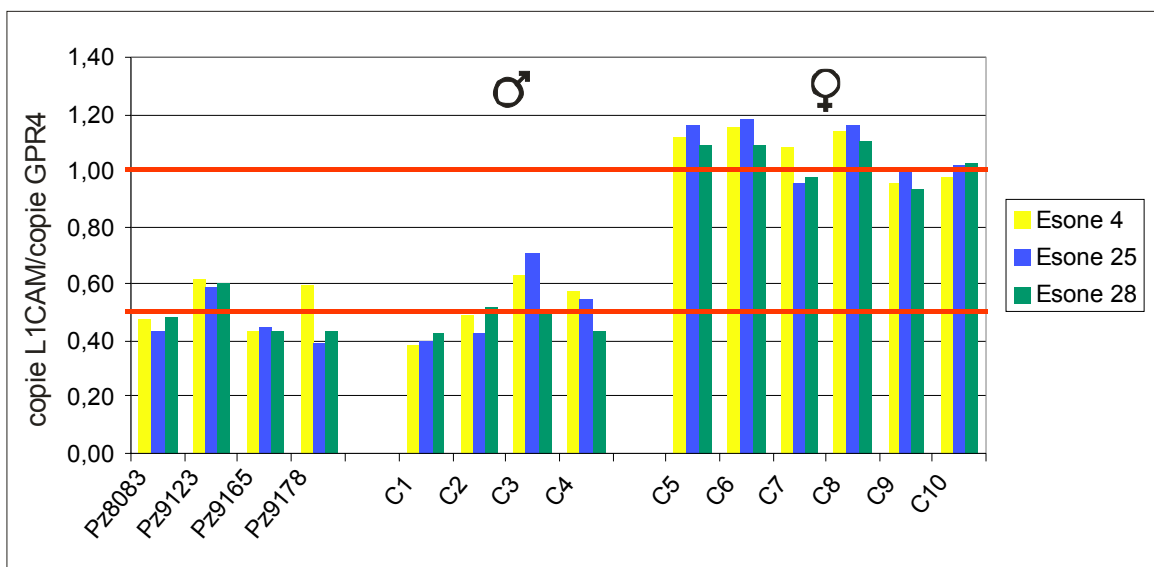


Fig.3.3: Grafico che riporta il risultato dell'analisi quantitativa su 4 pazienti e 9 controlli (di cui 4 maschi e 5 femmine) svolta per gli esoni 4, 25 e 28 del gene L1CAM. Le linee rosse rappresentano il valore ideale atteso per i due gruppi di controllo: rispettivamente 0,5 per i maschi e 1,0 per le femmine.

3.2 Sezione B: Analisi di esclusione in una famiglia con HSP complicata a trasmissione autosomica recessiva

Premessa

La famiglia 1 (paragrafo 5.1.2) presenta una forma di paraparesi spastica a trasmissione autosomica recessiva, complicata da deficit cognitivo ad esordio tardivo. Al momento sono stati individuati 17 distinti loci che identificano 17 diverse forme di HSP a trasmissione autosomica recessiva e solamente per 7 di queste è già stato scoperto il gene causativo.

In tali loci, è stata effettuata la genotipizzazione per gli individui appartenenti alla quarta generazione della famiglia 1 di cui possedevamo il DNA (2 affetti e 4 soggetti sani), mediante l'utilizzo di marcatori VNTR selezionati in numero congruo all'ampiezza fisica del locus in esame. È stata, dunque, compiuta l'analisi di *linkage* parametrica con l'ausilio del programma MERLIN, con il quale è stato calcolato il LOD *score* relativo a ciascun marcatore.

Data la consanguineità dei genitori degli affetti, è stata fatta anche una valutazione degli aplotipi ricercando regioni di omozigotità (autozigoti) condivise dai pazienti.

3.2.1 Risultati del Calcolo del LOD *score* ed analisi di esclusione

SPG5A, 8q21.3, posizione 65,67-65,88 Mb,
gene causativo CYP7B1

Marcatore	Posizione (Mb)	2 points LOD score
D8S285	57,22	-6.736
D8S260	61,98	-6.950
D8S543	70,17	-11.191

SPG7, 16q24.3, posizione 88,10-88,16 Mb,
gene causativo SPG7

Marcatore	Posizione (Mb)	2 points LOD score
N16S88.03	88,03	-3.275
SPG7int	88,11	0.000
N16S88.4	88,40	-3.027

SPG11, 15q21.2.3, posizione 42,64-42,75 Mb,
gene causativo SPG11

Marcatore	Posizione (Mb)	2 points LOD score
D15S537	42,60	-16.876
SPG11INT	42,72	-21.708
N15S428	42,80	-6.922

SPG14, 3q27 – q28, posizione 190,43-193,98 Mb

Marcatore	Posizione (Mb)	2 points LOD score
D3S3530	190,63	-12.178
D3S2747	191,76	-12.178
D3S1601	193,16	-12.479

SPG15, 14q24.1, posizione 67,28-67,36 Mb,
gene causativo ZFYVE26 (di recente identificazione)

Marcatore	Posizione (Mb)	2 points LOD score
D14S125	65,44	-11.191
D14S1069	67,45	-3.931
D14S258	69,65	-11.191

SPG20, 13q13.3, posizione 35,76-35,82 Mb,
gene causativo SPG20

Marcatore	Posizione (Mb)	2 points LOD score
N13S35.62	35,62	-11.191
SPG20int	35,80	0.347
N13S35.99	35,99	-7.876

SPG21, 15q22.31, posizione 63,04-63,07 Mb,
gene causativo SPG21

Marcatore	Posizione (Mb)	2 points LOD score
N15S62.95	62,95	-6.736
N15S63.1	63,10	-12.178

SPG23, 1q24 – q32, posizione 187,6-208,1 Mb

Marcatore	Posizione (Mb)	2 points LOD score
D1S2877	187,60	-16.947
D1S413	196,90	-10.400
D1S2622	198,38	-16.947
D1S249	203,98	-11.191

SPG24, 13q14, posizione 50,38-52,20 Mb

Marcatore	Posizione (Mb)	2 points LOD score
D13S153	47,78	-6.922
D13S268	50,78	-6.922
N13S52.23	52,23	-6.922

SPG25, 6q23 – q24.1, posizione 139,45-140,05 Mb

Marcatore	Posizione (Mb)	2 points LOD score
D6S304	119,47	-3.701
D6S1696	119,61	-12.479
D6S1620	129,98	-16.876
D6S292	136,35	-3.275
D6S314	140,10	0.737
D6S1684	140,22	1.208
D6S308	141,29	0.737
D6S310	142,10	-3.047

SPG26, 12p11.1 – q14, posizione 33,8-66,49 Mb

Marcatore	Posizione (Mb)	2 points LOD score
D12S59	33,88	-6.147
D12S85	45,62	-6.922
D12S368	50,91	-11.191
D12S83	59,17	-12.479
D12S313	66,78	-21.708

SPG27, 10q22.1, posizione 73,03-111,20 Mb

Marcatore	Posizione (Mb)	2 points LOD score
D10S537	72,06	0.347
N10S73.723	73,72	-3.931
N10S76.920	76,92	-3.047
N10S77.158	77,15	-3.047
D10S201	80,69	-2.800
D10S1696	83,22	-3.702
D10S1686	85,55	-2.800
N10S86.505	86,50	-3.275

N10S87.395	87,39	-2.853
N10S88.118	88,11	-0.007
D10S1744	88,32	1.040
D10S608	88,71	1.397
N10S88.71	88,72	1.046
N10S89.453	89,45	1.397
D10S1765	89,59	-2.782
N10S91.14	91,14	-3.078
D10S1419	92,25	1.040
N10S93.16	93,16	-3.131
D10S583	94,35	-2.800
D10S185	95,17	-2.782
D10S571	97,12	-2.800
N10S101.26	101,26	-2.846
D10S192	102,42	1.397
N10S103.45	103,45	1.040
D10S1267	104,36	-2.800
D10S467	106,49	-0.007

SPG28, 14q21.3 – q22.3, posizione 49,2-55,57 Mb

Marcatore	Posizione (Mb)	2 points LOD score
D14S984	49,16	-11.191
D14S989	52,77	-6.922
D14S276	54,75	-12.245
D14S980	56,22	-12.479

SPG30, 2q37.3, posizione 238,51-242,58 Mb

Marcatore	Posizione (Mb)	2 points LOD score
D2S338	236,90	-3.047
N2S238.358	238,35	-3.389
D2S125	240,81	-3.275
D2S140	241,38	-3.275

SPG32, 14q12 - q21, posizione 24,32-50,98 Mb

Marcatore	Posizione (Mb)	2 points LOD score
D14S275	25,76	-6.147
D14S1040	31,28	-6.922
D14S70	33,52	-11.191
D14S1048	38,49	-12.479
D14S79	40,92	-21.708
D14S288	43,17	-12.479
D14S976	47,15	-6.922
D14S984	49,16	-11.191
D14S989	52,77	-6.922

SPG35, 16q21 23, posizione 57,22-77,66 Mb

Marcatore	Posizione (Mb)	2 points LOD score
D16S415	52,22	-11.191
D16S320	56,56	-11.191
D16S265	62,07	-16.511
D16S503	62,15	-21.708
D16S515	75,07	-11.191
D16S516	77,68	-16.876
D16S289	78,47	-3.701

SPG39, 19p13.2, posizione 7,50-7,54 Mb,
gene causativo PNPLA6

Marcatore	Posizione (Mb)	2 points LOD score
D19S406	7,32	-6.922
D19S884	8,05	0.347

Tab. 3.3: analisi di *linkage* sui loci di HSP a trasmissione autosomica recessiva; in grassetto sono indicati i valori di LOD score maggiori di 1; i marcatori non informativi sono stati omessi.

I marcatori per i quali è stato ottenuto un LOD score inferiore al valore soglia -2 escludono il *linkage*, pertanto nei loci SPG5A, SPG7, SPG11, SPG14, SPG15, SPG20, SPG21, SPG23, SPG23, SPG24, SPG26, SPG28, SPG30, SPG32, SPG35e SPG39 si può ritenere che non sia presente il gene causativo della forma di HSP di tale famiglia.

Sono state individuate, invece, tre regioni in cui i marcatori potrebbero essere associati al locus malattia: la prima di 5,7 Mb tra i marcatori D6S292 e D6S310 del locus SPG25 e la seconda e la terza tra i marcatori N10S87.395 e D10S1765 (2,2 Mb) e tra i marcatori N10S101.26 e D10S1267 (3,1 Mb) incluse entrambe nel locus SPG27.

In tali regioni, gli individui affetti mostrano lo stesso aplotipo, omozigosità dei marcatori e possibile autozigosità per discendenza degli stessi.

In aggiunta ai loci noti, si è ritenuto opportuno valutare anche la regione 21p13 –q21.1, dove, sulla base delle analisi effettuate per la famiglia 3 (paragrafo 5.1.4) è stato rilevato un dato di *linkage*.

locus 21p13 – q21.1, posizione 0-22,16 Mb,

Marcatore	Posizione (Mb)	2 points LOD score
D21S258	14,5	-16.687
D21S1256	18,2	-6.736
D21S1899	19,0	-16.549
D21S1905	19,9	-16.549

Tab 3.4: analisi di *linkage* sul locus 21p13 – q21.1 evidenziando nella famiglia 2.

Anche in questo caso, i valori di LOD score inferiori a -2 hanno portato all'esclusione dell'ipotesi di *linkage*.

3.2.2 Selezione di geni candidati

La regione di 2,2 megabasi, compresa tra i marcatori N10S87.395 e D10S1765 e relativa al locus SPG27, è stata ritenuta più promettente per le successive indagini. In tale intervallo sono presenti 15 geni e 4 di questi sono stati selezionati in quanto buoni candidati: SNCG, GRID1, ATAD1 e GLUD1. La selezione è stata operata sulla base dei seguenti criteri: espressione in sistema nervoso centrale, possibile coinvolgimento in meccanismi patogenetici delle HSP, presenza di domini funzionali omologhi a quelli individuati nei geni causativi noti delle HSP. Di seguito vengono elencate le caratteristiche di ogni gene:

SNCG (88,70 – 88,71 Mb)

Synuclein-gamma è un membro sinucleine, una famiglia di proteine che si pensa sia coinvolta nella patogenesi delle malattie neurodegenerative. La funzione delle sinucleine non è ancora stata chiarita ma sembra che queste proteine contribuiscano al mantenimento dell'integrità

della rete di neurofilamenti nel neurone e risultino importanti nel processo di esocitosi delle vescicole sinaptiche. Studi di espressione hanno evidenziato che la sinucleina-gamma viene prodotta a livello di diverse popolazioni neuronali, specialmente dai neuroni sensoriali primari e dai motoneuroni, in particolare durante lo sviluppo del sistema nervoso in età pre- e post-natale.

GRID1 (87,34 – 88,11 Mb)

Il gene codifica per una subunità del recettore canale per il glutammato, attivo a livello del sistema nervoso centrale. Questo recettore canale, oltre a mediare la trasmissione sinaptica di segnali eccitatori, sembra anche implicato nello sviluppo e nella plasticità delle sinapsi. È stato dimostrato che il malfunzionamento del recettore causa neurodegenerazione in topo. Il gene GRID1 è altamente espresso sia in cervello, sia lungo il midollo spinale.

ATAD1 (88,50 – 88,56 Mb)

È un gene membro della famiglia AAA (*Adenosine triphosphatases Associated with a variety of cellular Activities*), come anche spastina della forma SPG4 e paraplegina della SPG7. Nonostante non si conosca la funzione della proteina prodotta, molti membri della famiglia AAA agiscono da chaperonine o proteasi che sono implicati in svariate attività cellulari, ad esempio trasporto vescicolare e riarrangiamento dei microtubuli. ATAD1 è espresso a livello del sistema nervoso centrale.

GLUD1 (88,80 – 88,84 Mb)

Codifica per l'enzima glutammato deidrogenasi che opera un ruolo chiave nel metabolismo e nel catabolismo del glutammato a livello del sistema nervoso centrale. Nella cellula, l'enzima si localizza all'interno del mitocondrio, nella matrice; ci sono inoltre evidenze che correlano la mancanza di funzionalità dell'enzima a degenerazione spinocerebellare.

In figura 3.4 vengono riportati i geni candidati sopradescritti secondo i dati disponibili nel database *Genome Browser* (paragrafo 5.6) ;

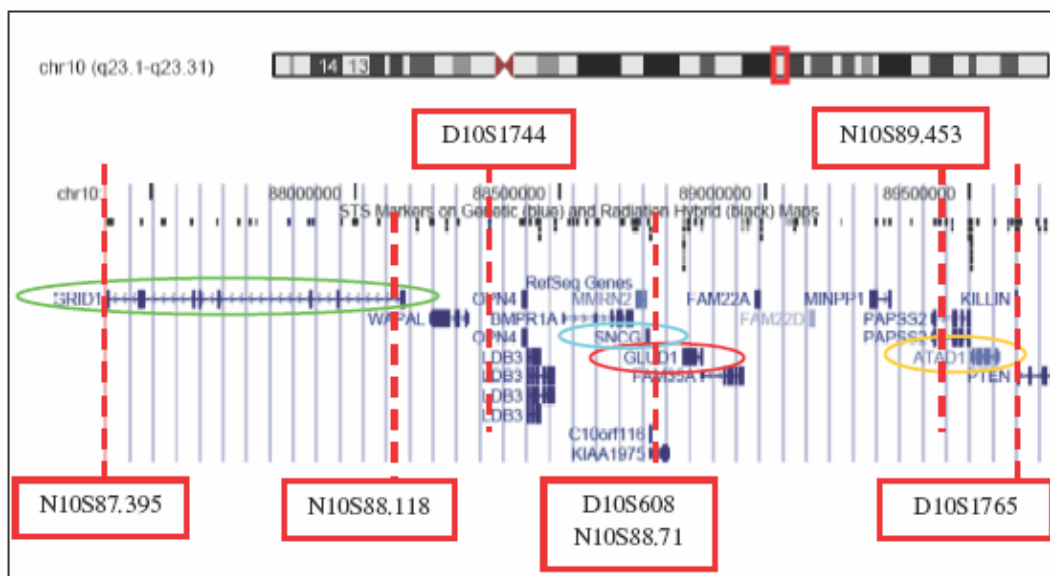


Fig. 3.4: rappresentazione analitica della regione critica: in evidenza i geni candidati e i marcatori VNTR che definiscono la regione.

3.2.3 Sequenziamento del gene SNCG

Il sequenziamento del gene SNCG ha portato all'individuazione di 3 varianti di sequenza descritte in tabella 3.5 rispettivamente sul 5'UTR del gene, nell'introne 2 e nell'introne 4. In un caso si tratta di uno SNP già incluso nel database *Genome Browser* (rs1800373); le altre due sostituzioni non sono, invece, mai state rilevate.

Sostituzione Nucleotidica	Posizione nel gene (NM_003087)	Denominazione
A/C	g.24 (5'UTR)	rs1800373
T/A	g.1104 (Introne 2)	Non nota (VAR1)
T/G	g.4061 (Introne 4)	Non nota (VAR2)

Tab. 3.5: variazioni nucleotidiche rilevate nel gene SNCG.

Poiché nella regione critica si suppone che variazioni di sequenza debbano trovarsi in uno stato di omozigosi (tenendo presente la condizione di autozigosi ricercata), lo stato di eterozigosi osservato consente da un lato la ridefinizione della regione critica e, dall'altro, l'esclusione del coinvolgimento di tale gene nella patologia.

3.2.4 Fine Mapping della regione critica

Le sostituzioni nucleotidiche rilevate durante il sequenziamento del gene SNCG hanno permesso di implementare le informazioni relative alla regione critica compresa tra i marcatori N10S87.395 e D10S1765. Inoltre, sono stati analizzati *clusters* di SNPs all'interno dei geni ATAD1 e GLUD1 (paragrafo 5.14).

Effettivamente, il sequenziamento del *cluster* relativo al gene ATAD1 ha indicato la presenza di un doppio picco (C/T) a livello dello SNP rs2067661. Il sequenziamento del *cluster* in GLUD1 non ha invece mostrato alcuna variazione nucleotidica.

Marcatore	Posizione (Mb)	2 points LOD score
D10S1744	88,32	1.040
rs1800373	88,70	-3.950
VAR1	88,70	-3.877
VAR2	88,71	-3.950
D10S608	88,71	1.397
N10S88.71	88,72	1.046
N10S89.453	89,45	1.397
Rs2067661	89,56	-3.822
D10S1765	89,59	-2.782

Tab.3.6: ridefinizione della regione compresa tra i marcatori N10S87.395 e D10S1765 del locus SPG27; in grassetto i valori di LOD score positivi; su sfondo grigio i nuovi dati inseriti. I marcatori non informativi sono stati omessi

I risultati ottenuti permettono di restringere la regione critica a 0,85 Mb, compresa tra i marcatori VAR2 e Rs2067661. La ricostruzione degli aplotipi per il locus SPG27, comprensiva di tutti i marcatori utilizzati è riportato in Appendice E.

3.2.5 Sequenziamento del gene GLUD1

Per quanto riguarda il gene GLUD1 tutti i 13 esoni sono stati sequenziati. Dall'analisi diretta delle sequenze, non è emersa alcuna mutazione sia nelle regioni codificanti che nei siti di *splicing* e non sono stati riscontrati SNPs in condizione di eterozigosità. Il gene GLUD1 non sembra pertanto coinvolto nella patogenesi della forma di HSP presente nella famiglia 1.

3.3 Sezione C: Ricerca del gene causativo in una famiglia con HSP complicata a trasmissione autosomica recessiva

Premessa

La diagnosi di questa famiglia (paragrafo 5.1.3) riferisce per l'individuo II-2 e per la sorella un irrigidimento della muscolatura della coscia, difficoltà nella deambulazione e sospetto assottigliamento del corpo calloso per cui si è pensato ad una forma di HSP complicata con probabile trasmissione autosomica recessiva. Gli affetti hanno manifestato i primi sintomi nella seconda decade di vita. Analisi dirette sul DNA del probando hanno escluso i geni più comunemente mutati nelle HSP: SPG4, per le forme dominanti, ed SPG7, per le forme recessive. Data l'esigua struttura della famiglia e la non consanguineità non era indicato, in questo caso, applicare il precedente approccio e condurre un'analisi di *linkage*, esaminando tutti i loci noti di HSP per le forme a trasmissione autosomica recessiva. Si è pertanto pensato di approfondire l'indagine del solo locus SPG11 data l'affinità del fenotipo e gli incoraggianti dati di letteratura che propongono SPG11 come gene più frequentemente mutato nelle HSP recessive con assottigliamento del corpo calloso (Stevanin et al., 2008).

3.2.1 Ricostruzione degli aplotipi

A partire dai risultati dei gel in poliaccrilammide denaturante è stato possibile ricostruire per ciascun marcatore microsatellite analizzato il genotipo dei quattro individui di cui era disponibile il DNA e quindi ricostruire gli aplotipi, individuandone la fase. Infine, è stato possibile risalire all'aplotipo dell'individuo II-3 grazie ai dati ottenuti per i figli di questa, gli individui III-1 e III-2.

Nella figura 3.5 è rappresentato l'albero della famiglia con gli aplotipi dei soggetti; in figura 3.6 è riportato un esempio di gel in poliaccrilammide con la corsa degli amplificati del marcatore "SPG11int" localizzato all'interno del gene SPG11.

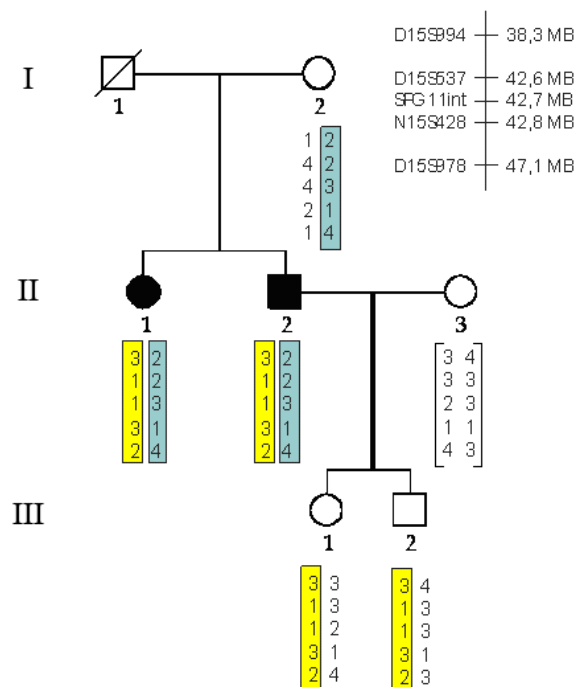


Fig. 3.5: Albero della famiglia 2 con riportati gli aplotipi ottenuti dall'analisi dei microsatelliti.

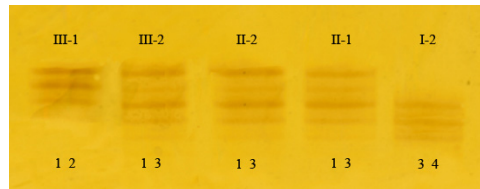


Fig. 3.6: Esempio di gel di poliacrilamide denaturante per la separazione degli alleli dei microsatelliti; in alto sono indicati gli individui, in basso gli alleli.

Data l'alta informatività dei microsatelliti utilizzati, è possibile supporre, grazie a questa analisi, che i due fratelli affetti (II-1 e II-2) siano identici per discendenza oltre che identici per stato in corrispondenza del locus SPG11.

3.2.2 Individuazione della mutazione nel gene SPG11

In collaborazione con la Dott. ssa MT Bassi (laboratorio di Biologia Molecolare, Istituto Scientifico E. Medea, Bosisio Parini) è stato effettuato quindi il sequenziamento del gene SPG11 (APPENDICE F). Apparentemente i due individui affetti (II-1, II-2) risultavano omozigoti per un'inserzione di tre paia di basi a livello del sito di *splicing* dell'esone 39 del gene *spatacsin* (c.7000-3_-4insAGG; NM_025137). La perdita di segregazione dell'allele mutato nei figli di II-2 ha suggerito la possibile esistenza di una seconda mutazione, una delezione nell'altro allele paterno. Infatti II-1 e II-2 sono risultati portatori di due mutazioni diverse, la mutazione descritta inizialmente ed una delezione di 2,76 kb tra gli introni 36 e 39 (c.6754_7152del1397).

I figli di II-2 (III-1 e III-2) hanno ereditato l'allele deleto dal padre.

3.4 Sezione D: Validazione del gene STCH causativo per una forma di HSP complicata a trasmissione autosomica recessiva

Premessa

Su tale famiglia (fam. 3, paragrafo 5.1.4) erano già state eseguite una serie di indagini molecolari. In particolare sul DNA di tutti gli individui della quarta generazione è stato compiuto un primo *Genome Wide Search* con cui era stato evidenziato un *linkage* nella regione 3q27 - q28, definito come “locus SPG14” (Vazza et al. 2000). In tale regione non sono state rilevate mutazioni nei geni candidati analizzati. Nel 2004, in una tesi di Laurea, di cui risulterà correlatrice, è stata dimostrata l'esistenza di una seconda regione di *linkage* in posizione 21q13 - q21.1. Sono stati analogamente sequenziati i geni candidati e, tra questi, nel gene STCH, è stata evidenziata la sostituzione nucleotidica in posizione c.1416+377 T>C, a livello della sequenza del 3'UTR (NM_006948.4).

In questo caso si è proceduto con uno studio molecolare finalizzato alla comprensione del possibile coinvolgimento del gene STCH ritenuto responsabile di questa forma di paraparesi spastica. Per questa mutazione è stato ipotizzato un possibile effetto patogeno dovuto al coinvolgimento di un microRNA ed al suo effetto regolativo sull'espressione di tale gene.

3.4.1 Espressione dei costrutti Luciferasi/3'UTR-STCH in cellule NSC34

Per valutare l'effetto della mutazione c.1416+377T>C sull'espressione del gene STCH, due costrutti sono stati trasfettati in maniera transiente nella linea cellulare NSC-34 (paragrafo 5.16). In tali costrutti la sequenza del gene *reporter* luciferasi è posta sotto controllo di un promotore costitutivo CMV associata al 3'UTR del gene STCH *wild-type* e mutato.

Come è possibile vedere in figura 3.7, la mutazione nel 3'UTR induce una diminuzione del 32% dell'espressione del gene reporter ($p=0,00001$).

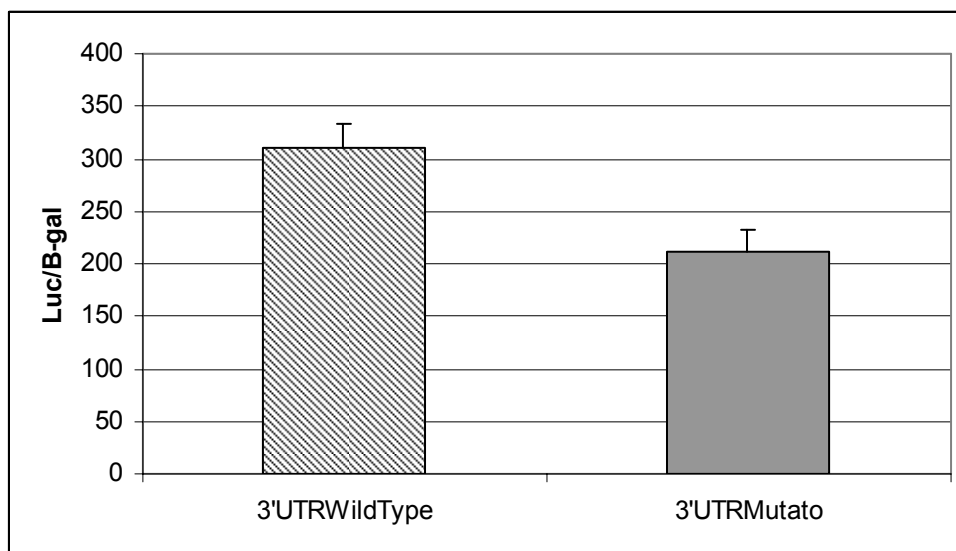


Fig. 3.7: effetto della mutazione nel 3'UTR del gene STCH sull'espressione del gene *reporter* luciferasi nelle cellule NSC34.

Questo dato conferma che tale sostituzione possa essere implicata nella patogenesi della HSP per i tre affetti della famiglia 2. Una simile riduzione dell'espressione potrebbe essere compatibile con il coinvolgimento di un microRNA che eserciti il suo effetto regolativo a livello del 3'UTR di tale gene (Kuhn DE et al.; 2008).

3.4.2 MicroRNA candidati a legarsi al 3'UTR mutato

Una selezione di 10 miRNA umani che potenzialmente interagiscono con la mutazione studiata è stata quindi attuata tra i 678 miRNA umani, sulla base delle predizioni del *software* RNAhybrid e di dati presenti in letteratura.

Nella tabella 3.7, per ognuno dei 10 miRNA vengono riportati: la sequenza, i nucleotidi facenti parte del *seed* di appaiamento con la sequenza *target* relativa al 3'UTR del gene STCH mutato (seconda colonna) e l'estensione dell'appaiamento perfetto del *seed* (terza colonna).

microRNA	Sequenza del miRNA (nt)	Seed del miRNA (nt)
hsa-miR-127-3p	UCGGAUCCGUCUGAGCUUGGCU	3 – 7
hsa-miR-134	UGUGACUGGUUGACCAGAGGGG	1 – 10
hsa-miR-142-3p	UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGG	1 – 7
hsa-miR-194	UGUAACAGCAACUCCAUGUGGA	1 – 6
hsa-miR-578	CUUCUUGUGCUCUAGGAUUGU	3 – 9
hsa-miR-581	UCUUGUGUUCUCUAGAUCAGU	1 – 7
hsa-miR-637	ACUGGGGGCUUUCGGCUCUGCGU	2 – 8
hsa-miR-643	ACUUGUAUGCAGCUCAGGUAG	2 – 7
hsa-miR-758	UUUGUGACCUGGUCCACUAACC	1 – 8
hsa-miR-924	AGAGUCUUGUGAUGUCUUGC	2 – 13

Tab. 3.7: sequenza dei miRNA candidati e caratteristiche del *seed* di appaiamento; in rosso il *seed* di appaiamento; evidenziato in grigio il nucleotide che appaia con la sostituzione di STCH.

Le predizioni del *software* RNAhybrid determinano anche la variazione di energia libera (ΔG) tra lo stato di non appaiamento e lo stato di appaiamento del miRNA con le sequenze *target wild-type* e mutata, riportate nella tabella 3.8 (seconda e terza colonna). Tanto più negativo è il valore in quarta colonna ($\Delta G_{mut} - \Delta G_{wt}$) tanto più stabile sarà considerato il sistema che prevede l'appaiamento del miRNA con la sequenza *target* mutata rispetto a quella *wild-type*. In tabella vengono inoltre riportati i dati di espressione dei miRNA a livello del sistema nervoso centrale se presenti in letteratura (SNC in quinta colonna della tabella 3.8).

microRNA	ΔG_{wt} di Appaiamento (Kcal/mol)	ΔG_{mut} di Appaiamento (Kcal/mol)	$\Delta G_{mut} - \Delta G_{wt}$ (Kcal/mol)	Espressione in SNC
hsa-miR-127-3p	-18.3	-19.8	-1,5	SNC
hsa-miR-134	-18.3	-20.4	-2,1	SNC specifico
hsa-miR-142-3p	-10.3	-12.2	-1,9	SNC
hsa-miR-194	-11.9	-14.0	-2,1	SNC
hsa-miR-578	-12.3	-14.8	-2,5	-
hsa-miR-581	-10.5	-13.0	-2,5	-
hsa-miR-637	-29.9	-30.3	-0,4	SNC
hsa-miR-643	-13.7	-16.2	-2,5	-
hsa-miR-758	-18.3	-20.8	-2,5	-
hsa-miR-924	-18.3	-20.8	-2,5	-

Tab. 3.8: studio delle energie di appaiamento dei miRNA candidati e dati di espressione.

3.4.3 Rilevazione di microRNA candidati in cellule NSC-34

La rilevazione dei miRNA candidati è stata effettuata mediante reazione di PCR e successiva visualizzazione in gel d'agarosio. La figura sottostante mostra alcuni dei risultati ottenuti:

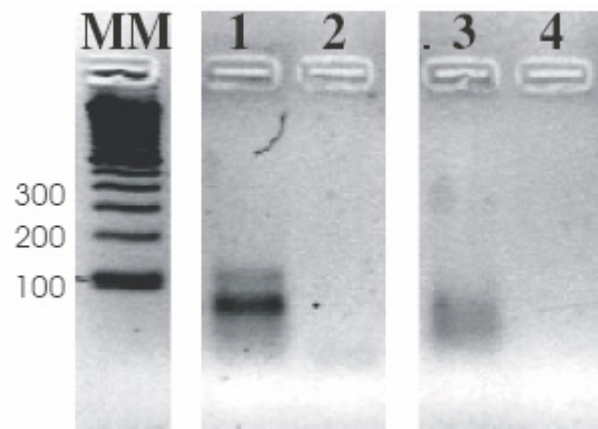


Fig. 3.8. miRNA hsa-miR-134 e hsa-miR-643 in gel d'agarosio al 3%: MM. *Molecular marker* 100 bp DNA ladder invitrogenTM; 1. PCR di hsa-miR-134; 2. relativo controllo negativo, in assenza di DNA retrotrascritto; 3. PCR di hsa-miR-643; 4. relativo controllo negativo.

Mediante la procedura di amplificazione utilizzata, è stato possibile determinare che i miRNA hsa-miR-134, hsa-miR-194, hsa-miR-637, hsa-miR-758 e hsa-miR-924 vengono espressi nelle cellule NSC-34. Questi miRNA verranno impiegati nei successivi esperimenti per determinare se, effettivamente, sono capaci di interagire con il messaggero di STCH e di *down*regolare la traduzione di questo.

4 DISCUSSIONE

Le informazioni presenti in letteratura sulle Paraparesi Spastiche Ereditarie (HSP) ammontano ad una quantità considerevole di dati e pubblicazioni relativi alla scoperta di loci associati alla patologia, all'individuazione e caratterizzazione di geni causativi, ad esperimenti finalizzati alla comprensione dei meccanismi eziopatologici. I loci individuati per questo gruppo di disordini neurodegenerativi sono 39. Alcuni sono sovrapponibili per fenotipo, come nel caso delle forme pure, in cui l'unico sintomo è la lenta progressione della spasticità agli arti inferiori, ma spesso sono presenti anche altri sintomi, di natura neurologica e non che contraddistinguono le specifiche varianti. A complicare l'individuazione della forma di HSP di interesse nella diagnosi clinica contribuisce anche la notevole variabilità non solo interfamiliare, ma anche intrafamiliare riportata in letteratura. Inoltre per il carattere mendeliano HSP sono note forme a trasmissione sia autosomica dominante che recessiva e forme con una trasmissione *X-linked*. In questo complesso quadro ad elevata eterogeneità genetica e fenotipica, ancora pochi, solo 18, sono i geni causativi individuati che, mediante analisi molecolare e rilevazione della mutazione, possono confermare la diagnosi clinica. I geni per le HSP individuati finora sono soprattutto implicati nelle forme autosomiche dominanti, mentre per le varianti recessive, la cui maggioranza presenta un fenotipo di paraparesi complicata, restano ancora molte questioni irrisolte.

In un tale scenario in cui la quantità di informazioni raccolte sono molte e complesse, e per le quali non è possibile fornire una univoca ipotesi eziopatologica, non è facile scegliere quale strada intraprendere per determinare di quale forma di HSP un paziente risulti affetto, né tanto meno accrescere, con dati di rilievo, le conoscenze generali.

Per tale motivo i risultati che sono stati prodotti, con questa tesi, hanno riguardato, "sottoclassi" di pazienti HSP in quanto si è cercato di finalizzare lo studio molecolare con le informazioni disponibili sia in ambito clinico che genetico. Lo scopo primario è stato quello di voler correlare ad un determinato fenotipo un determinato genotipo, ma questo non è sempre possibile farlo in quanto in molte famiglie, soprattutto a trasmissione autosomica recessiva, sono ancora poche le informazioni sui geni causativi e pertanto bisogna necessariamente ricorrere ad analisi di *linkage* per individuare la variante di HSP interessata. Nello specifico, nella **sezione A** di questa tesi, è stato illustrato come in presenza di un fenotipo chiaramente riconducibile ad una variante nota di HSP complicata con supposte modalità di trasmissione *X-linked*, sia possibile procedere in maniera più adeguata e focalizzarsi su un unico gene causativo. Il campione di affetti in questo caso consisteva di 10 maschi (casi indice) nei quali la HSP era complicata da ritardo mentale, pollici addotti, afasia, idrocefalo e agenesia o ipoplasia del corpo calloso (sindrome di CRASH). Per questi pazienti si è ritenuto di procedere con lo *screening* del gene L1CAM che mappa in Xq28.

E' da ricordare che ad oggi sono note quasi 200 mutazioni in L1CAM che tuttavia sono per lo più riconducibili al più comune dei fenotipi ad esso associato quale l' Idrocefalo *X-linked* (HSAS), mentre le mutazioni pubblicate che determinano un fenotipo CRASH sono solamente 15. Come la maggior parte delle mutazioni a carico di questo gene, la natura e la distribuzione sono estremamente eterogenee, ma l'effetto finale è quello di impedire la comunicazione intercellulare mediata da interazioni omofiliche ed eterofiliche svolta dalla proteina di adesione cellulare L1 nei neuroni e nelle cellule di Schwann.

Lo *screening* di mutazioni puntiformi da me condotto mediante sequenziamento diretto, ha portato all'individuazione di 6 mutazioni, di cui una già nota, tutte distribuite lungo il gene (esoni 1, 6, 18, 19), ed in grado di ridurre completamente (*Nonsense-mediated mRNA Decay*) o alterare (proteine tronche, prive dei domini funzionali) l'espressione della proteina L1.

In questo caso un simile approccio è risultato vincente tanto che per quei casi per cui non è stata identificata la mutazione si è postulato che il meccanismo coinvolto fosse diverso da una mutazione puntiforme nelle regioni codificanti o a carico dei siti di *splicing* di L1CAM e si è voluto indagare anche la possibilità di una duplicazione dell'intero gene o della regione cromosomica in cui il gene mappa, non ottenendo però dati che supportino questa ipotesi.

Un altro importante risultato ottenuto con questo *screening* genico, è stata la possibilità offerta ai parenti (soprattutto madri e sorelle) degli individui affetti di valutare la possibilità che fossero portatori della mutazione causativa, in quanto si ricorda che questo gene si comporta come un recessivo e pertanto donne sane possono risultare portatrici.

In altri casi, dove il fenotipo non risultava così esclusivo ed indicativo per una sola delle varianti note di HSP, non è stato possibile adottare una simile strategia. Ad esempio, per generare i risultati riportati nella **sezione B**, relativi all'analisi svolta su 6 fratelli di cui 2 affetti da HSP complicata da deficit cognitivo a trasmissione autosomica recessiva (Famiglia 1), si è pensato di analizzare tutti i 17 loci implicati nelle forme recessive. Per questa famiglia è stato riportato un legame di consanguineità nei genitori dei due individui affetti, pertanto nell'affrontare l'analisi di *linkage*, mediante l'impiego di marcatori microsatelliti fluorescenti e non, si è pensato di valutare, tramite ricostruzione degli aplotipi, anche la presenza di omozigosità nei genotipi dei soli affetti, in corrispondenza del locus malattia (mappaggio per autozigosi). In questo caso quindi non è stato possibile esimersi dal valutare tutti i loci di HSP noti almeno per le forme recessive, data la mancanza di esclusività del fenotipo presentato dagli affetti della famiglia.

Tuttavia in famiglie non troppo ampie, come questa appena descritta, con poche meiosi informative, il LOD *score* potenziale difficilmente raggiunge il valore di +3, necessario per accettare un'ipotesi di *linkage*, quindi l'analisi che può essere proposta è principalmente quella di esclusione dei loci noti. Grazie all'elevato numero di marcatori utilizzati e all'informatività degli stessi è stato possibile escludere la maggior parte dei loci avendo ottenuto valori di LOD *score* inferiori a -2. Per quanto riguarda invece le tre regioni risultate positive, la prima in corrispondenza della variante SPG25 (Zortea et al. 2002) e le altre due contenute nell'intervallo critico individuato per la SPG27 (Meijer et al. 2004, Ribai et al. 2006), è necessario fare singolarmente delle considerazioni.

Per la variante SPG25 è stato ottenuto un valore di LOD *score* di 1,208 per il marcatore D6S1684, affiancato da altri due marcatori con valore positivo ma molto più basso. Tali marcatori descrivono una regione in *linkage* di 5,7 Mb. Tuttavia, poiché il fenotipo associato alla forma SPG25 risulta essere profondamente diverso da quello manifestato dagli affetti della famiglia 1 si è ritenuto più indicato approfondire le altre due regioni positive.

Per la variante SPG27 sono stati rilevati valori di LOD *score* positivi ($Z=1,397$) in 2 regioni, rispettivamente di 2,2 Mb, compresa tra i marcatori N10S87.395 e D10S1765 e di 3,1 Mb, definita dai marcatori N10S101.26 e D10S1267. In questi due intervalli, appartenenti alla stessa regione critica, gli individui affetti risultavano omozigoti per i marcatori analizzati. L'analisi dei geni candidati, ha evidenziato la presenza di 4 buoni candidati (SNCG, GLUD1, GRID1, ATAD) nella regione di 2,2 Mb che è pertanto apparsa molto interessante. Lo *screening* genico condotto a livello delle sequenze codificanti e regolative dei geni scelti ha messo in luce però la presenza all'interno di questa regione di polimorfismi e variazioni di sequenza non prima riportate in eterozigosi negli affetti. La presenza di tali SNPs ha consentito di restringere ulteriormente la regione critica ma ha anche sollevato il dubbio che

l'omozigotità dei marcatori potrebbe essere dovuta a casualità e non alla discendenza di entrambi gli aplotipi da uno stesso antenato. In definitiva lo studio riportato non può essere considerato conclusivo, ma è uno studio preposto alla esclusione della maggior parte dei loci noti in attesa di altri strumenti che permettano di identificare il gene causativo.

Diversamente dalla famiglia 1, gli affetti della seconda famiglia esaminata (**sezione C**), una coppia di fratelli, presentavano una diagnosi di HSP complicata da sospetto assottigliamento del corpo calloso e inoltre i genitori di questi non presentavano consanguineità. La mancanza di un numero adeguato di soggetti da valutare ha portato in questo caso alla scelta di non utilizzare l'approccio dell'analisi di esclusione perché i dati di *linkage* ottenuti, difficilmente avrebbero raggiunto valori di significatività statistica. Un passaggio quasi obbligatorio, nei casi in cui si hanno famiglie poco informative, è l'esclusione delle forme ritenute più frequentemente mutate nei pazienti affetti da HSP sia dominanti che recessive, quali: SPG4 ed SPG7. Tali geni apparivano non mutati, confermando che si trattasse di una variante genetica diversa.

Nel contesto dei geni causativi le HSP, la scoperta del gene SPG11 è relativamente recente (Stevanin, et al. 2007). Nell'ultimo anno inoltre sono stati pubblicati più lavori in cui viene confermato che mutazioni in questo gene causano paraparesi spastica familiare ed inoltre appare rilevante la percentuale di casi nella quale si dimostra che i soggetti che portano tali mutazioni presentano una HSP con assottigliamento del corpo calloso (Stevanin et al. 2008).

Sulla base di queste considerazioni si è ritenuto di analizzare anche il locus per la variante SPG11. In questo caso tuttavia sugli individui per i quali era disponibile il DNA, si è proceduto con una ricostruzione degli aplotipi a rischio, utilizzando marcatori fiancheggiati ed interni al locus SPG11. Nell'eventualità di risultati incoraggianti, a favore di un coinvolgimento di tale locus, si sarebbe poi proceduto con il sequenziamento del gene SPG11 che consta di 40 esoni. L'informatività dei marcatori analizzati ha permesso di ricostruire la fase dei genotipi ottenuti e di comprendere che i due fratelli affetti condividessero i medesimi alleli in prossimità del gene. Il sequenziamento del gene ha portato all'individuazione di una nuova mutazione (c.7000-3_-4insAGG) che si riteneva essere in omozigosi. L'assenza tuttavia di tale inserzione nei figli di uno degli affetti ha fatto supporre che la mutazione non fosse in omozigosi, ma interessasse un solo cromosoma, mentre sull'altro cromosoma risultava plausibile la presenza di una ampia delezione: condizione di eterozigote composto. Analisi successive hanno confermato la presenza della delezione di tre esoni: 37, 38 e 39 (c.6754_7152del1397) negli affetti e nei figli di questi. Lo studio così svolto ha permesso individuare due nuove mutazioni a carico del gene SPG11 confermando inoltre l'importanza che può avere lo *screening* di questo gene in pazienti HSP con assottigliamento del corpo calloso.

Nell'ultima parte del lavoro svolto, (**sezione D**) viene presentata l'analisi effettuata su una famiglia (Famiglia 3) che da tempo è oggetto di indagini nel laboratorio dove ho svolto la mia tesi di dottorato. Questa famiglia che presenta una forma di HSP recessiva complicata da ritardo mentale e neuropatia è stata, in passato, analizzata mediante una serie di indagini molecolari (*genome-wide search* e *fine mapping*) che avevano portato all'individuazione di due regioni di *linkage* dovute ad una probabile condizione di autozigosi, data la consanguineità dei genitori dei tre individui affetti. La prima regione, in posizione 3q27.3-q28, è stata pubblicata e classificata come locus SPG14 (Vazza et al, 2000) la seconda, identificata solo successivamente, mappa in posizione 21q13-q21.1 (dati non pubblicati).

In ambedue le regioni è stato eseguito lo screening di mutazioni per i geni candidati che non ha portato all'identificazione di mutazioni nelle regioni codificanti dei geni analizzati.

Tra i geni scelti come candidati nella regione sul cromosoma 21 era indicato anche il gene STCH, un buon candidato in quanto espresso ad alti livelli nel sistema nervoso centrale e codificante per una proteina appartenente alla famiglia delle *Heat Shock Protein 70*, con localizzazione endosomiale. A seguito di sequenziamento diretto nel gene STCH, unicamente negli individui affetti della famiglia, è stata rilevata la sostituzione in omozigosi T>C in posizione c.1416+377, a livello del 3'UTR. Per comprendere se tale sostituzione potesse effettivamente avere un effetto patologico, come primo passo sono stati sequenziati 300 individui sani, ma la sostituzione non è mai stata rilevata, nemmeno in eterozigosi.

Data la particolarità della mutazione trovata, per validare questo gene come causativo della patologia, si è dovuto intraprendere uno studio funzionale per comprendere se gli effetti della mutazione avessero una ricaduta sull'espressione del gene. Sono stati costruiti due differenti plasmidi (STCH-wt e STCH-mut) in cui al gene della luciferasi, sotto controllo di un promotore costitutivo, venivano aggiunti il 3'UTR del gene STCH con l'allele *wild-type* e quello con la mutazione T>C in posizione c.1416+377. Le trasfezioni realizzate su una linea cellulare particolarmente adeguata per lo studio di malattie del primo motoneurone (NSC-34) hanno mostrato una differenza statisticamente significativa sull'attività della luciferasi. Questo esperimento ha confermato l'idea che la mutazione trovata nel 3'UTR del gene STCH alteri effettivamente il suo funzionamento in quanto ha un effetto di *down-regolazione* a livello trascrizionale.

Questo risultato preliminare, ha fatto supporre che la sostituzione nucleotidica T>C rilevata potesse attivare un target criptico di appaiamento per un miRNA.

Alterazioni dei *pathways* regolativi dei miRNA sono molto studiati relativamente all'insorgenza di patologie umane quali cancro e malattie cardiache. Negli ultimi anni è stata affrontata anche l'implicazione di questa specifica classe nelle malattie neurodegenerative, dimostrandone il coinvolgimento in processi neuronali. Ad esempio, è stato dimostrato che il miR-124 regola la formazione dell'assone e ne promuove la crescita durante il differenziamento neuronale; invece, l'aumento della concentrazione del miR-134 nei dendriti provoca la riduzione delle dimensioni delle spine dendritiche, dando credito all'ipotesi che tale miRNA possa regolare maturazione e plasticità neuronale. Il miR-133b è espresso specificatamente dai neuroni dopaminergici, ma non lo è nei neuroni dei pazienti affetti da Parkinson, suggerendo che il miRNA possa contribuire nella sopravvivenza neuronale nell'adulto (Hébert and De Strooper, 2007).

Per quanto riguarda le HSP in un solo lavoro di *screening* mutazionale compiuto nel 2006, Züchner ha rilevato due mutazioni (c.606+43G_T e c.606+50G_A) a livello del 3'UTR del gene REEP1, causativo per la forma SPG31. Le due mutazioni sembrano riguardare il putativo sito di interazione per miR-140, dedotto mediante predizione bioinformatica, senza tuttavia darne un'evidenza sperimentale. In entrambi i casi, la sostituzione promuoverebbe la stabilizzazione dell'appaiamento di miR-140 al 3'UTR del messaggero e, di conseguenza, una soppressione della traduzione del mRNA superiore alla norma. La mancata traduzione del mRNA determinerebbe l'assenza della proteina REEP1 e la manifestazione del fenotipo SPG31 (Züchner *et al.* 2006).

Sulla base di tali precedenti si è voluto valutare se e quale microRNA, potesse essere coinvolto nella regolazione del gene STCH. Si è proceduto parallelamente considerando da un lato che il miRNA che interagisce con il target attivato sul 3'UTR del gene STCH mutato deve essere presente nel *pool* di miRNA specifici della linea cellulare NSC-34 in cui è stato condotto l'esperimento di trasfezione; dall'altro selezionando tra tutti i miRNA umani un campione ridotto (10 miRNA) che potenzialmente potesse interagire con la mutazione. La selezione dei miRNA è avvenuta considerando principalmente tre parametri: l'appaiamento

del *seed*, la variazione di energia libera (ΔG) e le informazioni sulla tessuto specificità. I primi due parametri dovevano logicamente risultare a favore del riconoscimento del 3'UTR mutato. Mediante una reazione di PCR è stata verificata la presenza dei miRNA selezionati nelle cellule NSC-34 e come primo risultato è stata accertata l'espressione per questi 5 miRNA: hsa-miR-134, hsa-miR-194, hsa-miR-637, hsa-miR-758 e hsa-miR-924.

Il primo miRNA che al momento appare maggiormente candidato è hsa-miR-134, in quanto è già stato dimostrato un importante ruolo nel controllo dello sviluppo delle spine dendritiche (Schratt et al. 2006), mentre degli altri miRNA candidati non sono ancora disponibili molte informazioni.

Come si deduce da questa discussione l'individuazione di mutazioni patologiche in geni causativi per varianti di HSP e la comprensione della ricaduta sulle ipotesi eziopatologiche richiedono indagini complesse ed articolate, secondo percorsi diversi. La formulazione di diagnosi di HSP dal punto di vista molecolare risulta difficile data l'elevata eterogeneità genetica destinata ancora ad aumentare, considerando la presenza di casi familiari per cui non è stata trovata l'associazione con nessuno dei 39 loci mappati, così come il numero di mutazioni da ricercare, al momento ancora sottostimate per scarsità di conoscenza. L'aiuto di clinici competenti che permettano mediante la loro diagnosi una prima scrematura circa le varianti di HSP da considerare, può essere essenziale nello snellire la procedura che porta all'identificazione della variante di interesse in un caso familiare. La ricerca dei loci/geni causativi deve comunque procedere di pari passo con l'evoluzione delle tecniche metodologiche e l'avanzamento delle conoscenze.

5 MATERIALI E METODI

5.1 Il campione indagato

5.1.1 Raccolta e descrizione del campione analizzato in sezione A

Sono stati raccolti 10 casi indice riferiti dalle strutture di provenienza come affetti da sindrome di CRASH (tab. 5.1). In quasi tutti i pazienti era accertata la presenza di un ritardo cognitivo di grado più o meno marcato, di una progressiva spasticità agli arti inferiori, della presenza di pollici addotti, di afasia e della presenza di idrocefalo. Per qualcuno era stata valutata la presenza di agenesia del corpo calloso mediante risonanza magnetica.

	Fascia d'età	Idrocefalo	Ritardo Mentale	Pollici addotti	Agenesia del corpo calloso	Paraplegia spastica	Altro
Pz 7421	adolescente	+	+	+	+	+	dismorsfia auricolare
Pz 8083	bambino	+	+++	+	+++	+	-
Pz 9107	adolescente	idrocefalo congenito	+++	+	+++	+	lievi dismorfismi
Pz 9123	bambino	+	+++	+	++	+	-
Pz 9156	adolescente	idrocefalo derivato	+++	+	?	+	-
Pz 9165	adulto	?	+	+	?	+	-
Pz 9178	adulto	?	+	+	?	ritardo nello sviluppo psicomotorio	-
Pz 9227	neonato	macrocefalo macrocranio	++	+	?	andatura spastica	-
Pz 9408	adolescente	+	+	+	?	+	-
Pz 9659	noenato	+++	+++	+	+	non valutabile	-

Tab. 5.1: Per ciascun paziente (Pz N° identificativo) viene riportato con il simbolo [+] la presenza del sintomo descritto nell'intestazione della colonna. Quando specificata viene riportata anche la severità (+++) o moderazione (++) del sintomo. Il simbolo [?] indica mancanza di dato.

Nella figura successiva (fig. 5.1) sono stati riportati gli alberi genealogici relativi ai dieci casi indice presentati. Con un asterisco rosso sono indicati per ciascuna famiglia gli individui di cui è stato raccolto un campione di sangue e di cui è quindi disponibile un campione di DNA.

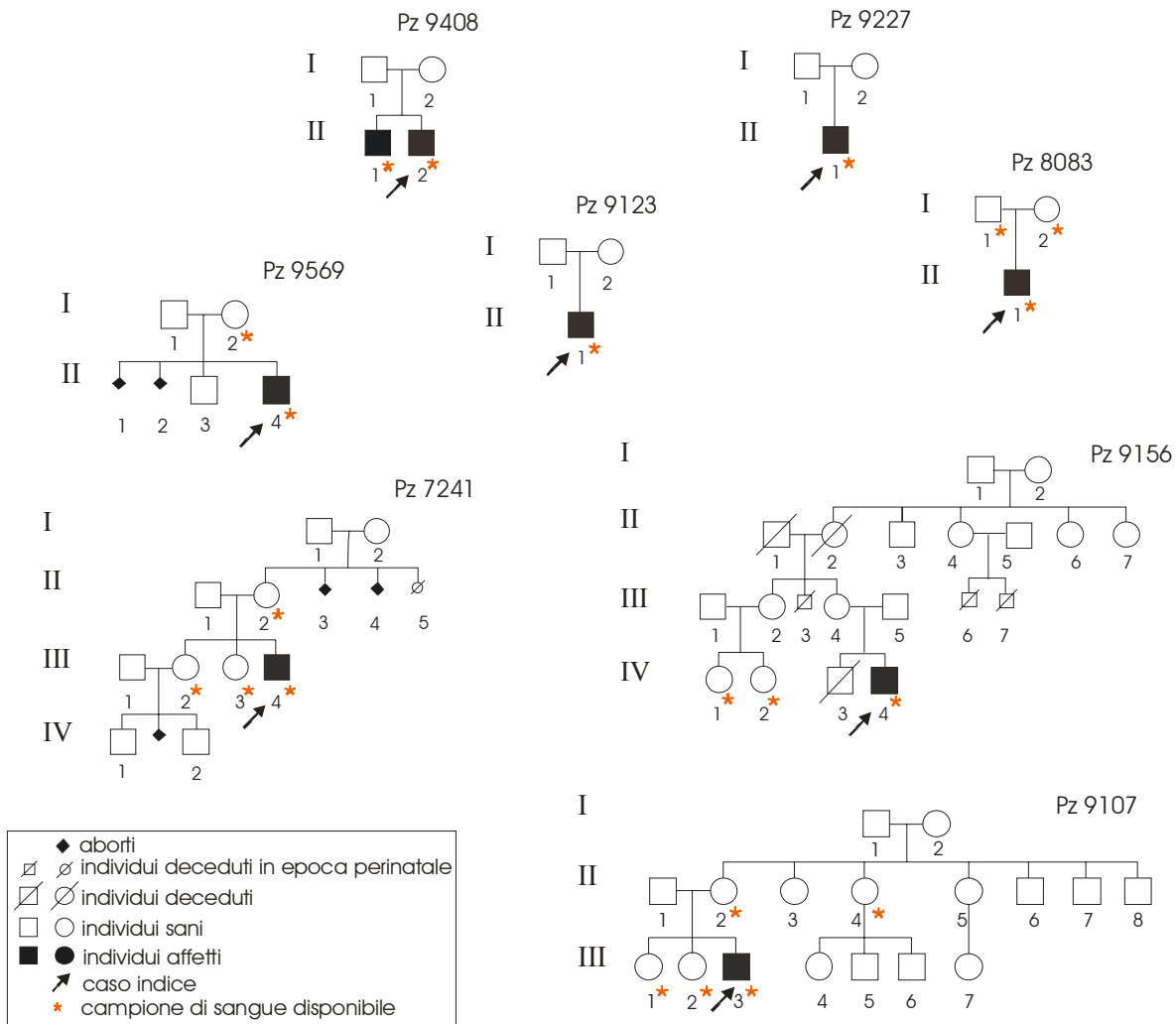


Fig. 5.1: alberi genealogici del campione analizzato nella sezione A. In alto a sinistra per ciascun albero viene riportato l'identificativo del caso indice.

5.1.2 Descrizione del campione analizzato in sezione B: famiglia 1

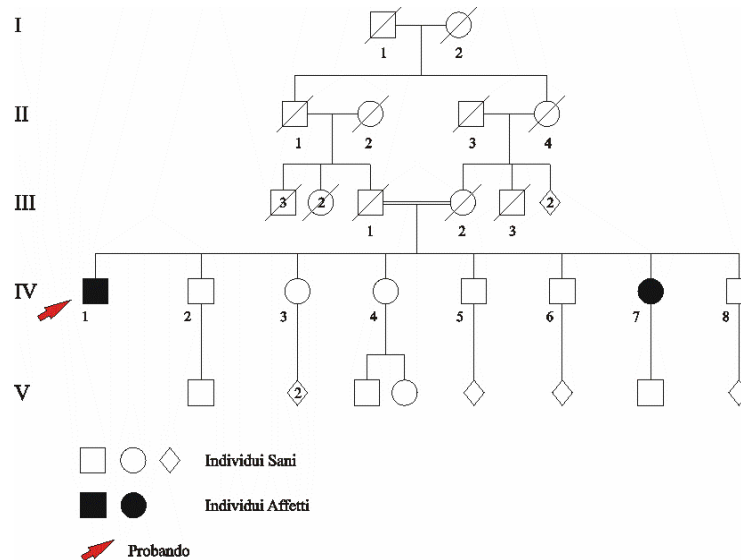


Fig. 5.2: albero genealogico della famiglia 1.

I due individui affetti presentano entrambi deambulazione con paraparesi spastica bilaterale, insorta tra la terza e la quarta decade ed aggravata da decadimento cognitivo e deficit mentale. L'individuo IV-1, presenta anche discinesia buccale e disturbi del linguaggio. Sempre lo stesso soggetto è stato sottoposto a risonanza magnetica, che ha evidenziato lievi alterazioni a livello del sistema nervoso centrale, in particolare del Corpo Calloso. Attualmente le condizioni di salute di entrambi i fratelli affetti sono stazionarie da alcuni anni. Sull'individuo IV-1 presso l'Istituto Nazionale Neurologico C. Besta di Milano è stato eseguito lo screening di mutazioni dei geni SPG7 e SPG4 risultato negativo.

5.1.3 Descrizione del campione analizzato in sezione C: famiglia 2

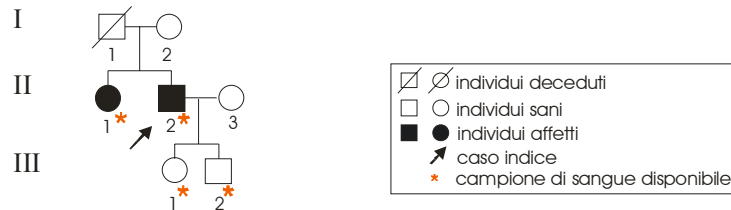


Fig. 5.3: albero genealogico della famiglia 2

La diagnosi di questa famiglia, pervenuta dall' U.O. di Neuropsichiatria infantile di Fano (PU) riferisce per l'individuo II-2 un irrigidimento della muscolatura della coscia, difficoltà nella deambulazione e sospetto assottigliamento del corpo calloso; in seguito è stata anche rilevata la presenza di Babinski bilaterale. La sorella presentava inoltre segni depressivi e cecità. Gli affetti hanno manifestato i primi sintomi nella seconda decade di vita. Analisi dirette sul DNA del probando hanno escluso le forme SPG4 e SPG7.

5.1.4 Descrizione del campione analizzato in sezione D: famiglia 3

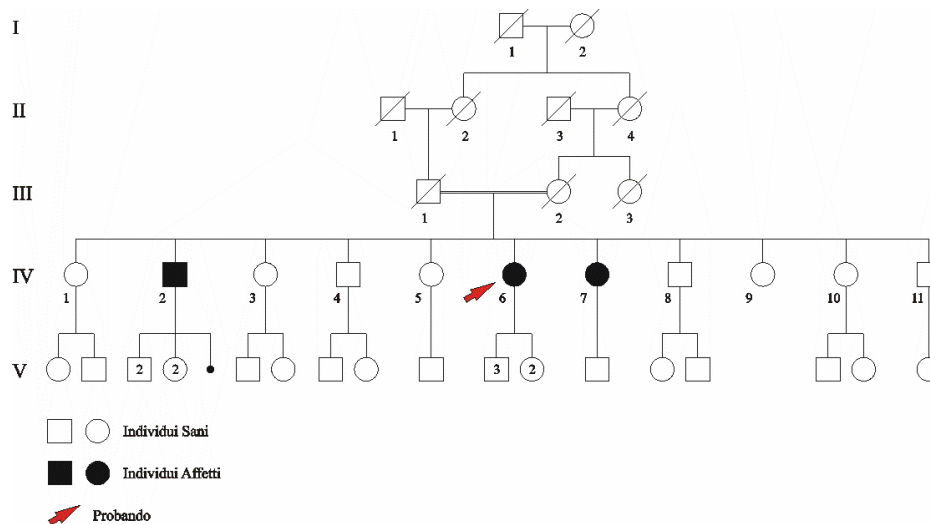


Fig. 5.4: albero genealogico della famiglia 3.

Per i tre soggetti affetti (IV-2, IV-6, IV-7), che hanno manifestato i primi sintomi della malattia mediamente intorno ai trent'anni, il quadro clinico è caratterizzato da marcia paraparetica, forza muscolare globalmente ridotta e marcata vivacità dei riflessi profondi per entrambi gli arti inferiori, oltre a piede cavo bilaterale. Da studi elettromiografici (EMG) è emersa una neuropatia motoria distale, con una velocità di conduzione motoria rallentata (MCV=37-38m/s) compatibile con una sofferenza del II neurone motorio. La risonanza

magnetica non ha evidenziato alterazioni cerebrali. L'esame neuropsichiatrico ha accertato, nei soggetti affetti, un lieve ritardo mentale, con livelli intellettivi inferiori alla norma, difficoltà di comprensione e ridotta fluency verbale. Le funzioni mnestiche, inoltre, appaiono confuse a causa di un grave deficit della memoria, sia a breve che a lungo termine.

Tutti gli individui della quarta generazione sono stati sottoposti ad esame neurologico dal Dr. G.F. Micaglio presso la Divisione Neurologica dell'Ospedale di Montebelluna.

5.2 Estrazione di DNA

Per tutti i campioni raccolti è stato impiegato un protocollo di estrazione di DNA in EDTA da sangue intero. Partendo da un volume di 5-10 ml di sangue intero si procede nel seguente modo:

- diluizione 1:5 del sangue intero in soluzione N-N (NaCl 0,9%; Nonidet 0,1%);
- prima centrifugazione a 6.000 rpm (rounds per minute) a 4°C per 30';
- eliminazione del supernatante e risospensione del pellet in 50 ml di soluzione N-N;
- seconda centrifugazione a 6.000 rpm a 4°C per 30';
- eliminazione del supernatante e risospensione del pellet in 4 ml di soluzione TEN (Tris HCl 10 mM; EDTA 2 mM; NaCl 0,4 M; pH 8);
- aggiunta di 0,3 ml di SDS 20% w/v, che causa la destabilizzazione e la rottura delle membrane leucocitarie;
- incubazione per 3 ore a 80°C in agitazione;
- aggiunta di 1 ml di NaCl saturo;
- centrifugazione a 6.000 rpm per 10';
- recupero del supernatante e aggiunta di cloroformio in rapporto 1:1; mescolamento per inversione;
- centrifugazione a 6.000 rpm per 10'; si ottiene la separazione in due fasi divise da una sottile membrana di interfase (proteine e lipidi residui);
- recupero della fase superiore (acquosa) e aggiunta di isopropanolo in rapporto 1:1; ottenimento del "flocculo" di DNA;
- centrifugazione a 6.000 rpm per 20', che causa la precipitazione del flocculo;
- eliminazione del supernatante e lavaggio in 1 ml di etanolo 70%;
- centrifugazione a 6.000 rpm per 10';
- eliminazione del supernatante e lavaggio in 1 ml di etanolo 70%;
- eliminazione del supernatante e asciugatura del pellet all'aria;
- risospensione del *pellet*/DNA in 0,3-0,5 ml di soluzione TE (Tris HCl 10 mM; EDTA 2 mM; pH 8) di mantenimento.

Si ottiene una soluzione il cui contenuto in DNA deve essere misurato allo spettrofotometro.

5.3 Valutazione spettrofotometrica della concentrazione degli acidi nucleici

Sia il DNA che l'RNA (paragrafo 5.17.2) dopo essere stati estratti dal sangue intero o dalle cellule (come sarà descritto in seguito), possono essere analizzati allo spettrofotometro ottenendo informazioni riguardo alla concentrazione dell'acido nucleico in soluzione e alla sua qualità.

Lo spettrofotometro utilizzato è il DU® 530 UV/visible Beckman Coulter (Biocompare®, www.biocompare.com).

5.4 Amplificazione di DNA tramite reazione di PCR

Salvo diversa indicazione, tutte le reazioni di PCR (*Polimerase chain reaction*) in seguito descritte, sono state effettuate utilizzando le miscela di reazione ed il protocollo di amplificazione riportati nelle successive tabelle:

Mix AmpliTaq Gold [®]		Mix ExperTaq	
Buffer 10X	1,2 µl	Buffer 10X	1,25 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,2 µl	MgCl ₂ (15 mM)	
dNTPs (1 mM)	2,4 µl	dNTPs (1mM)	1,25 µl
Primer F (10 µl)	0,4 µl	Primer F (10 µl)	0,5 µl
Primer R (10 µl)	0,4 µl	Primer R (10 µl)	0,5 µl
Taq (5U/µl)	0,08 µl	Taq (5U/µl)	0,3 µl
DNA (50 ng/µl)	1 µl	DNA (50 ng/µl)	2 µl
H ₂ O milliq	5,32 µl	H ₂ O milliq	6,7 µl
Volume totale	12 µl	Volume totale	12,5 µl

Tab. 5.2: a destra nella tabella vengono elencati i reagenti utilizzati nella miscela di amplificazione e i relativi volumi con l'impiego della AmpliTaq Gold[®] (*hot start*), mentre a sinistra quelli che prevedono l'impiego della ExperTaq.

Protocollo di PCR standard			Per 33-37 cicli
Fase	Temperatura	Tempo	
Pre-denaturazione	94-95°C	12' Taq Gold [®] ; 3' Expertaq	
Fase di Denaturazione	94-95°C	30''	
Fase di <i>Annealing</i>	50-70°C Temperatura specifica dei <i>Primers</i>	30''	
Fase di Elongazione	72°C	30''	
Elongazione Finale	72°C	10'	
<i>Storage</i>	15°C	5'	

Tab. 5.3: viene riportato un programma di amplificazione standard in cui per ogni fase vengono specificati temperatura e durata. La temperatura di *melting* (T_m) utilizzata non viene specificata poiché dipende dalla sequenza dei primers.

5.5 Controllo in gel d'agarosio

Per controllare la riuscita e la resa delle reazioni di PCR, un'aliquota del prodotto di amplificazione è stata sottoposta ad elettroforesi orizzontale in gel di agarosio al 2% p/v, unitamente ad un appropriato marcatore di peso molecolare. Il gel viene preparato mescolando l'agarosio in polvere, TAE1X (Tris-Acetato 0.04mM, EDTA 10mM pH=8) e bromuro d'etidio alla concentrazione finale di 0,5 µg/ml. Le bande nel gel sono state visualizzate ai raggi UV mediante l'utilizzo di un transilluminatore al fine di verificare la presenza dei frammenti di DNA amplificato ed il loro corretto peso molecolare.

5.6 Progettazione primers

Tutti i *primers* utilizzati in questa tesi, non già disponibili in laboratorio, sono stati costruiti utilizzando 3 programmi informatici: *Genome Browser*, *Primer3* e *Oligo Analyzer* qui di seguito descritti:

UCSC Human Genome Browser
(<http://www.genome.ucsc.edu>)

Database fornito dalla *suite* di UCSC Genome Bioinformatics. Permette di analizzare porzioni genomiche, in qualsiasi scala, e di visualizzare moltissime informazioni di tali sequenze, tra le quali la presenza di geni noti e predetti con relativa suddivisione in esoni ed introni, ESTs e mRNA, grado di conservazione, ecc. Inoltre vengono riportati tutti gli SNPs e marcatori microsatelliti noti, con la loro localizzazione non solo fisica ma anche genetica secondo le mappe DeCode, Rutgers e Marshfield. Tra i vari strumenti messi a disposizione dell'utente inoltre, molto sfruttato è il programma *Blat*, che permette una ricerca della sequenza indagata, la cui posizione è visualizzata nella mappa fisica del genoma. Un altro utile strumento è In-Silico PCR, che simulala reazione di PCR a partire da una coppia di *primers* selezionata dall'operatore. Il programma permette di vedere quanti e quali sono gli amplificati relativi alla coppia di *primers*. L'appaiamento dei *primers* deve essere specifico e nella posizione attesa. Inoltre, l'appaiamento non deve avvenire su elementi interspersi del genoma, quali LINE e SINE, e non deve essere interessato dalla presenza di SNPs sulle basi riconosciute dal 3' del *primer*.

PRIMER 3

(<http://frodo.wi.mit.edu/>)

Programma gestito e distribuito dalla WI/MIT che consente, inserendo la sequenza di interesse, di progettare una o più coppie di *primers* specifici con le caratteristiche necessarie e specificate dall'operatore. Diversi parametri possono essere infatti liberamente modificati ad esempio: lunghezza dell'amplificato, lunghezza dei *primers*, e temperatura di *annealing* ottimale dei *primers*).

OLIGO ANALYZER 1.0.2

Oligo Analyzer 1.0.2 (*on line* sul sito http://www.bmr-genomics.it/seq_index.html) è un programma in grado di valutare l'esistenza di regioni di auto-*annealing* e la formazione di dimeri tra *primers*, la cui presenza può precludere il funzionamento della reazione di PCR. Parallelamente, il programma consente di rilevare eventuali siti secondari di *annealing* dei *primers* interni alla sequenza *target*, che possono portare alla produzione di sequenze inattese durante l'amplificazione.

In **appendice A** sono stati riportati i *primers* relativi alle indagini i cui risultati sono riferiti in sezione A: *primers* di sequenziamento (tab. A), per SSCP (4 mutazioni; tab. A) e per qPCR (tab. B) del gene L1CAM, inoltre *primers* impiegati nel saggio di restrizione per verificare la mutazione trovata sull'esone 1 (tab. A) del gene L1CAM.

In **appendice B** sono riportati i *primers* (di nuova sintesi e già presenti in laboratorio) necessari all'analisi di esclusione nella famiglia 1 (tab. C1; tab. C2), al sequenziamento dei geni SNCG (tab. D) e GLUD1 (tab. E) ed alla valutazione delle variazioni osservate rispetto alla sequenza di riferimento (nel caso del gene SNCG) ed al sequenziamento di due *clusters* di SNPs costruiti nella regione dove mappano i geni ATAD1 e GLUD1 (tab. F)

In **appendice C** vengono riportati i *primers* utilizzati per produrre i risultati della sezione C: microsatelliti interni e fiancheggianti il locus SPG11 (tab. G).

Infine in **appendice D** sono elencati i *primers* utili alla preparazione dei costrutti (tab. H).

5.7 Sequenziamento

Il sequenziamento dei frammenti di DNA amplificati è affidato al centro BMR Genomics (<http://www.bmrgenomics.com/>). Il prodotto di PCR deve essere prima purificato. A tale scopo viene impiegata la soluzione ExoSAP della ditta usb® (<http://www.usbweb.com>).

A 2,5 µl di amplificato viene aggiunto 1 µl di soluzione ExoSAP (contenente 5U di esonucleasi e 1U di fosfatasi) e l'intera soluzione viene posta in un termociclatore secondo un protocollo suggerito dalla ditta.

- 37°C per 15': attivazione e temperatura ottimale per l'attività enzimatica;
- 80°C per 15': inattivazione di entrambi gli enzimi.

Il BMR Genomics rende disponibile sul proprio sito il risultato del sequenziamento in forma di *file* di *download*.

Per la lettura e l'analisi delle sequenze ottenute, si è utilizzato il programma SeqMan v 2.0 (<http://www.dnastar.com/>) che consente la lettura delle sequenze ed il loro allineamento a sequenze di riferimento.

5.8 Analisi delle varianti di DNA individuate con il sequenziamento genico

5.8.1 SSCP (*Single Strand Conformation Polimorfism*)

Questa tecnica viene normalmente utilizzata per l'identificazione di mutazioni geniche e polimorfismi, e si basa sul fatto che differenze nella sequenza primaria comportano una diversa capacità di migrazione dei frammenti di DNA (conformeri). In questa tesi l'SSCP è stato utilizzato per valutare la presenza delle variazioni di sequenza (cap. 3, tab. 3.1.) individuate con il sequenziamento del gene L1CAM, nella popolazione di controllo. Infatti con questa tecnica sono ben distinguibili i conformeri generati da tali cambiamenti rispetto agli alleli *wild-type*.

Si tratta di un'elettroforesi in gel di poliacrilammide in cui la corsa viene effettuata in condizioni non denaturanti, inoltre come miglior condizione per visualizzare le varianti analizzate sono stati scelti come parametri: l'assenza di glicerolo nella composizione del gel ed una corsa a T ambiente.

Il gel di poliacrilammide per SSCP viene preparato secondo la ricetta descritta nella successiva tabella:

Componente	Volume
Acrilammide/bisacrilammide 29:1, 40%	12.5 ml
TBE5X (Tris base 54gr, EDTA 0.5M pH 8, acido ortoborico 27.5gr, H ₂ O fino a volume di 1lt)	10.0 ml
H ₂ O milliQ	27.5 ml
APS (Ammonio persolfato) 10% p/v	400 µl
TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiammina)	40 µl

Tab. 5.4: reagenti e volumi per la preparazione di un gel 29:1 (40%) di acrilammide per SSCP

Gli amplificati da caricare si preparano mescolando 1-4µl di DNA con una quantità doppia di *denaturing loading buffer 2X* (formammide 95% p/v pH=8, Xylen-cyanol blue 0.05% p/v, blu di bromofenolo 0.05% p/v, EDTA 0.5M 1.9% v/v).

I campioni vengono denaturati a 95°C per 10 minuti e trasferiti subito in ghiaccio; a questo punto si caricano i campioni nei pozzetti e si applica al gel una differenza di potenziale di 150-250V per un tempo che, in genere, varia tra le 16-20 ore.

La posizione di migrazione assunta dai conformeri viene evidenziata mediante colorazione argentica con la stessa procedura descritta nel paragrafo 5.12.

5.8.2 Saggio di restrizione

La sostituzione nucleotidica identificata nell'individuo Pz 9227 (cap. 3, tab. 3.1) nell'esone 1 del gene L1CAM porta alla perdita di un sito di riconoscimento per l'enzima di restrizione AflIII. Pertanto la ricerca della cancellazione del sito è stata utilizzata come metodo di screening sulla popolazione per valutarne la frequenza, tipizzando le varianti alleliche del gene in esame. La sequenza di riconoscimento dell'enzima è:

5'....A*CRYGT....3'

3'....TGYRC*A....5'

La reazione di restrizione è stata condotta, come suggerito dalla scheda tecnica dell'enzima secondo il seguente schema:

Reagenti	Volume
DNA amplificato	5 µl
BSA 1µg/µl	0,1 µl
Buffer B 10X	1 µl
H ₂ O milliq	3.7 µl
Enzima HinfI 10U/ µl	0.2 µl
Volume finale	10 µl

37° C per 3 ore	Optimum attività enzima
80° C per 20 minuti	Inattivazione enzima

Tab. 5.5: condizioni di reazione per la digestione con AflIII (NEW ENGLAND, BioLabs Inc).

La visualizzazione dei frammenti prodotti viene fatta in gel d'agarosio al 2% p/v e permette di valutare se sia avvenuto il taglio enzimatico per presenza della variante di sequenza indagata. Il *pattern* di restrizione prevede infatti solo nel caso dell'allele *wild-type* un taglio che genera due frammenti rispettivamente di peso pari a 146 e 210 paia di basi.

Anche la sostituzione nucleotidica g.1104T>A trovata in eterozigosi nell'individuo IV-1 della famiglia 1 nel secondo introne del gene SNCG è stata analizzata mediante restrizione. Questa analisi ha permesso di ricostruire il genotipo di tutti gli individui indagati molecularmente della famiglia 1. La presenza del nucleotide T crea un secondo sito di taglio per l'enzima HinfI.

La sequenza di riconoscimento dell'enzima è:

5'....G*ANTC....3'

3'....CTNA*G....5'

La reazione di restrizione è stata condotta, come suggerito dalla scheda tecnica dell'enzima secondo il seguente schema:

Reagenti	Volume
DNA amplificato	4 µl
BSA 1µg/µl	1 µl
Buffer e 10X	1 µl
H ₂ O milliq	3.9 µl
Enzima AflIII 5U/ µl	0.1 µl
Volume finale	10 µl

37° C per 1 ore	Optimum attività enzima
80° C per 20 minuti	Inattivazione enzima

Tab. 5.6 condizioni di reazione per la digestione con HinfI (Promega).

La visualizzazione dei frammenti prodotti viene fatta in gel d'agarosio al 2% p/v ed il *pattern*

di restrizione prevede nel caso del genotipo AA, due soli frammenti (360 e 6 paia di basi), mentre 3 bande individuano l'omozigote TT (249, 111 e 6 paia di basi), negli eterozigoti sono invece presenti quattro bande: 360, 249, 111 e 6 paia di basi.

5.9 MLPA (*Multiple Ligation-dependent Probe Amplification*)

La metodica MLPA si basa su una quantificazione comparativa di sonde che si legano in maniera specifica al DNA genomico e che vengono amplificate mediante una reazione di PCR che utilizza *primers* universali. L'MLPA è una metodica che permette di amplificare in multiplex fino a 45 sequenze nucleotidiche specifiche utilizzando una singola coppia di *primers*.

L'analisi MLPA è stata effettuata utilizzando il kit di 43 sonde normalmente impiegato per studiare la sindrome di Rett (P015-D2 MECP2, MRC Holland, Amsterdam, Holland). Il kit contiene una sonda interna al gene L1CAM (esone 22, NM_000425.2) e altre relative ai geni: GDI1, NTNG1, ARX, SLC6A8, IRAK1, FVIII, MECP2, CDKL5, DKC1, IDH3G, FLNA che mappano nella stessa banda cromosomica Xq28.

Fondamentale risulta utilizzare uguali quantità dei campioni indagati pertanto è necessaria una accurata quantificazione prima di procedere all'analisi (100ng di DNA genomico sono stati diluiti in 5ul di Tris-EDTA per ogni campione).

Una volta compiute ibridazione, ligazione e PCR, 1 ul di prodotto viene analizzato al sequenziatore automatico con una corsa su capillare affidata al centro BMR Genomics, che dispone dei sequenziatori ABI 3730XL e ABI 3100. Il BMR Genomics restituisce il risultato in forma di *file* scaricabile. L'utilizzo del software Genotyper® (Applera, <http://press.appliedbiosystems.com/>) consente la lettura del *file* e, quindi, visione ed interpretazione dei picchi ottenuti per ciascuna sonda.

L'analisi dei dati ottenuti è stata effettuata mediante foglio di lavoro Excel esportando le aree dei picchi ottenuti per ciascuna sonda. L'area di ciascun picco è stata divisa per la sommatoria delle aree di tutti i picchi dei prodotti di amplificazione. L'eventuale presenza di eventi di duplicazione è stata valutata mediante il confronto dei risultati ottenuti per i pazienti analizzati con quelli di un gruppo di 10 individui sani.

5.10 PCR quantitativa (qPCR)

Si è voluto utilizzare anche questa metodica di quantificazione per analizzare alcuni campioni di DNA (Pz8083, Pz9123, Pz9165, Pz9178) allo scopo di verificare la presenza di regioni duplicate all'interno del gene L1CAM, che per dimensioni potrebbero essere sfuggite all'analisi effettuata con sequenziamento diretto.

Per la quantificazione del DNA che si forma durante la reazione di amplificazione all'interno della miscela di reazione è presente SYBR®Green, che emette fluorescenza ad una specifica lunghezza d'onda rilevabile dallo strumento quando è legato al DNA in doppio filamento. Data l'elevata sensibilità di questa metodica è importante ridurre il più possibile tutte le eventuali fonti di variabilità casuale legate per esempio al pipettamento. Per questa ragione, per ogni singolo campione oltre al gene di interesse è stato valutato un altro locus su un cromosoma differente (GPR4, cromosoma 19) per cui si possano ragionevolmente escludere eventi di delezione/duplicazione.

Per la preparazione delle miscele di reazione è stata utilizzata la Power SYBR®Green PCR Master Mix, (Applied Biosystems), fornita ad una concentrazione 2X. In un volume finale di reazione di 25 µl si è utilizzata una quantità di DNA genomico di 5 ng, mentre le concentrazioni dei *primers* sono state stabilite sperimentalmente a 300 nM ciascuno. Per la sequenza dei *primers* si veda appendice A. Per ogni locus analizzato è stata costruita una retta standard a 5 punti utilizzando DNA genomico di controllo (50ng, 10ng, 2ng, 9,4ng, 0,08ng). I campioni e i punti standard sono stati analizzati in doppio. Il ciclo di amplificazione prevede una prima fase di 10' a 95°C e successivi 40 cicli, costituiti da 15" a 95°C e 1' a 60°C.

Utilizzando questa metodica un valore di 0,5 e di 1 è atteso rispettivamente nei maschi e nelle femmine controllo. Essendo gli affetti necessariamente maschi la presenza di eventuali duplicazioni del gene L1CAM si evidenzerebbe con valori di 1 simili cioè a quelle delle femmine sane.

5.11 Elettroforesi in gel di poliacrilammide

L'elettroforesi in gel di poliacrilammide denaturante è il metodo d'elezione per la visualizzazione delle varianti alleliche delle VNTR, in quanto garantisce una definizione in bande così risolutiva da permettere di distinguere amplificati di DNA la cui lunghezza differisca di una sola base. In questa tesi è stata utilizzata per analizzare marcatori microsatelliti sulla famiglia 1 in cui è stata condotta una analisi di esclusione sui loci noti, che sulla famiglia 2 in cui è stato indagato il locus SPG11.

L'allestimento di un gel di poliacrilammide richiede la preparazione di una delle soluzioni indicate in tabella:

	Gel al 9% di Poliacrilammide	Gel al 10% di poliacrilammide
Urea 8 M	17,5 ml	15 ml
Acrilammide/Bisacrilammide 29:1 o 19:1 20%, urea 6 M	22,5 ml	25 ml
TBE 10X (1M Tris, 1M acido borico, 20mM EDTA, pH 8.3)	5 ml	5 ml
H ₂ O milliq	5 ml	5 ml
APS (ammonio persolfato) 10% p/v	400 µl	400 µl
TEMED (N,N,N',N'-tetraetilendiammina)	40 µl	40 µl

Tab 5.7: composizione del gel denaturante di poliacrilammide.

Gli amplificati delle VNTR vengono diluiti (1:2) in una loading solution denaturante (formammide 95% p/v, xilen-cyanol blu 0.05% p/v, blu di bromofenolo 0.05% p/v, EDTA 0.5 M 1.9% p/v) e mantenuti per 10 minuti alla temperatura di 95°C per favorirne la denaturazione.

Come è visibile nella tabella 5.7, concentrazione di poliacrilammide e rapporto acrilammide:bis-acrilammide possono essere modificate in funzione del *range* degli amplificati in analisi: in linea di massima, il rapporto 29:1 è indicato per amplificati di lunghezza maggiore a 200 basi, il 19:1 per amplificati anche inferiori alle 100 basi.

5.12 Lettura di microsatelliti non fluorescenti mediante colorazione argantica

Terminata la corsa elettroforetica, il gel viene trasferito in una vaschetta e sottoposto ad una serie di passaggi in diverse soluzioni:

- due lavaggi, di cinque minuti ciascuno, in una soluzione contenente il 10% di etanolo 70%, e lo 0.5% di acido acetico
- colorazione in una soluzione allo 0.17% di AgNO₃ (nitrato d'argento) per 25 minuti. In questa fase il contenitore che alloggia il gel deve essere coperto per evitare la riduzione dello ione argento da parte delle radiazioni luminose
- lavaggio per due minuti in acqua bidistillata per rimuovere l'argento che si è legato in eccesso
- sviluppo (i sali precipitano a livello delle bande di DNA) in una soluzione di NaOH al 3% p/v e formaldeide allo 0.27% v/v. La durata di questa fase (in genere 8-20 minuti) dipende dalla quantità di amplificato caricato

- fissaggio (neutralizzazione dell'NaOH utilizzato nel passaggio precedente) in una soluzione di acido acetico al 5% v/v
- essiccazione del gel adagiato su carta e ricoperto con una pellicola trasparente plasticata, in un *gel-dryer* (BioRad modello 583).

I precipitati causano la variazione verso il colore giallo dell'intero gel e la formazione di sottili bande di colore marrone scuro in corrispondenza delle bande del DNA migrato, permettendo la lettura del marcatore micro satellite.

5.13 Lettura di marcatori microsatelliti in fluorescenza

Per alcuni VNTR necessari all'analisi di esclusione nella famiglia 1 ed allo studio del locus SPG11 nella famiglia 2 è stata compiuta la lettura dei marcatori microsatelliti in fluorescenza. Vengono utilizzate coppie di *primers* per amplificare la sequenza relativa ad una VNTR a cui è stato coniugato un fluoroforo, molecola in grado di assorbire una radiazione ad una certa lunghezza d'onda per poi restituire una seconda radiazione a lunghezza d'onda maggiore. In questa procedura vengono analizzati contemporaneamente per uno stesso soggetto più marcatori microsatelliti (*pooling*), che devono però differire o in peso o in fluoro foro associato.

L'analisi del dato richiede l'utilizzo di apparecchiature specializzate, in cui avviene la migrazione in capillare e che, contemporaneamente, rilevano il segnale emesso dai fluorofori. Per questo motivo questa fase viene affidata al centro BMR Genomics, che dispone dei sequenziatori ABI 3730XL e ABI 3100.

Il BMR genomics restituisce il risultato in forma di *file* scaricabile. L'utilizzo del software Genotyper® (Applied Biosystems, <http://press.appliedbiosystems.com/>) consente la lettura del *file* e, quindi, visione e interpretazione delle varianti alleliche.

5.14 Analisi di *clusters* di SNPs

Nel *fine mapping* esercitato sul cromosoma 10, data l'assenza di marcatori microsatelliti utili all'analisi di *linkage* all'interno della regione critica si è proceduto con l'analisi di SNPs. In corrispondenza di due dei possibili geni candidati (ATAD1 e GLUD1) sono stati ricercati *clusters* di SNPs ad elevata eterozigosità (0,33 frequenza minima dell'eterozigote). Individuati i *clusters*, sono state progettate due distinte coppie di *primers* (Appendice B) che li contenessero. Le regioni sono state dunque amplificate e sequenziate come precedentemente descritto (paragrafo 5.7). Il *cluster* del gene GLUD1 comprende gli SNPs *rs2296061* e *rs1923939*. Il *cluster* del gene ATAD1 contiene gli SNPs *rs2067661*, *rs12763018*, *rs12763019*, *rs12763033*, *rs12785229*, *rs12779667*, e *rs444398*.

5.15 Analisi di *linkage*

Per l'analisi di *linkage* è stato utilizzato il programma MERLIN, sviluppato da G. Abecasis e colleghi nel 2002 presso l'Università del Michigan (Abecasis *et al.* 2002). Mediante questo programma, per la famiglia 1 è stata effettuata un'analisi parametrica a due punti assumendo un modello a trasmissione autosomica recessiva, con penetranza completa (100%), frequenza dell'allele malattia 1/10000. Il *software* richiede la preparazione di 3 *files* per ogni locus analizzato: il *pedigree file*, il *dataset file* e il *map file*. Il *pedigree file* si divide in due parti: la prima descrive l'albero genealogico della famiglia in esame, la seconda il fenotipo ed il genotipo di ogni individuo della famiglia. Il genotipo, ovviamente, è l'insieme di dati derivati dall'analisi delle varianti alleliche. Il *pedigree file* necessita di un *dataset file*, che descrive quali siano i marcatori analizzati nella famiglia. Il *map file*, infine, è una mappa genetica che indica la localizzazione cromosomica di ciascun marcatore e, in conseguenza, le distanze tra i marcatori utilizzati. Una volta fornite al programma queste informazioni, MERLIN calcola il LOD *score* relativo ad ogni marcatore, che indica la correlazione tra marcatore genetico e

allele malattia. Inoltre, il *software* ricostruisce gli aplotipi degli individui analizzati e dei loro familiari ed evidenzia possibili errori avvenuti durante la fase di lettura dei marcatori.

5.16 Studi di espressione della mutazione sul 3'UTR di STCH in vitro

5.16.1 Costruzione dei plasmidi

Per studiare il ruolo patogeno della mutazione c.1416+377T>C nel 3'UTR del gene STCH sono stati creati 2 costrutti contenenti il 3'UTR con allele *wild-type* (STCH-wt) o mutato (STCH-mut) del gene.

Il frammento da inserire (2,6 Kb) è stato ottenuto amplificando il DNA di un individuo della famiglia 3 già accertato come eterozigote con una coppia di *primers* costruiti in modo da contenere in coda un sito di restrizione (rispettivamente XbaI e HpaI).

Il prodotto di PCR digerito con XbaI e HpaI è stato inserito nel vettore pGL3 Enhancer Vector (Promega) al posto del sito di poliadenilazione di SV40 normalmente in coda al gene *reporter* luciferasi. Il vettore utilizzato pGL3 nasce per lo studio di promotori pertanto, nel sito di policlonaggio che precede il gene luciferasi, è stato inserito il promotore costitutivo di citomegalovirus (CMV).

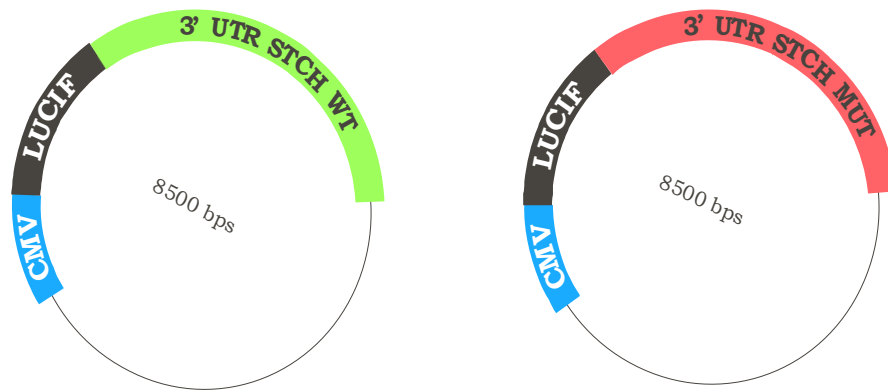


Fig. 5.5: rappresentazione schematica dei due costrutti STCH-wt e STCH-mut ottenuti modificando il vettore pGL3.

5.16.2 Colture cellulari: linea NSC-34

Per gentile concessione del Dr. N. Cashman (University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada) è stata utilizzata la linea cellulare NSC-34, un "ibridoma" derivato dalla fusione di motoneuroni del midollo spinale di embrione di topo e cellule di neuroblastoma murino. Tali cellule mantengono capacità, struttura e morfologia affini e paragonabili alle cellule neuronali e, tuttavia, la fusione al neuroblastoma conferisce loro la capacità di dividersi e moltiplicarsi in maniera illimitata; (Casham et al., 1992).

Le cellule sono state coltivate in terreno di coltura DMEM con 5% FBS e Pen-Strep Solution 1x. Le cellule vengono incubate a 37°C e CO₂ al 5%.

5.16.3 Trasfezione e saggio con luciferasi

Le cellule NSC-34 sono state trasfettate in maniera transiente mediante *Lipofectamine Plus Reagent* (Invitrogen) seguendo la scheda tecnica del prodotto. Gli esperimenti sono stati ripetuti due volte utilizzando 6 repliche per ciascuna condizione.

Per ogni pozzetto sono stati cotrasfettati:

- 0,1 µg di STCHmut/STCH-wt
- 0,1 µg di plasmide (pCMVβ) che esprime il gene della β-galattosidasi (β-Gal) per la normalizzare i dati in base alla quantità di cellule
- 0,03 µg di un plasmide (pEGFP-N1) che esprime la GFP che ci ha permesso di seguire

- nel tempo (l'efficienza della trasfezione).
- 2 μ l di transferrina per agevolare la trasfezione
- 1,25 μ l di lipofectamine

Il medium di trasfezione è stato lasciato a contatto con le cellule per 6-8 ore e quindi le cellule sono state lavate mediante PBS e messe in terreno di coltura. Dopo 24 ore le cellule sono state lisate mediante un Buffer di lisi contenuto all'interno del *Luciferase Assay kit* (Promega) e l'attività della luciferasi è stata misurata mediante il Wallac 1450 MicroBeta TriLux (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). I valori così ottenuti sono stati normalizzati sui valori di attività di β -Gal misurato mediante lettore di piastre alla lunghezza d'onda di 420 nm Wallac 1450 MicroBeta TriLux; Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

5.16.4 Analisi statistica

L'omogeneità delle varianze nei vari esperimenti è stata determinata mediante test F, mentre il test t è stato utilizzato per il confronto fra gruppi. Valori di $p < 0,01$ sono stati considerati statisticamente significativi.

5.17 Analisi di microRNA

5.17.1 Selezione di microRNA candidati

Nel database miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/>) sono elencati tutti i miRNA finora identificati appartenenti a uomo, topo e ad altri organismi modello. Ogni microRNA possiede una dettagliata scheda informativa, che descrive sequenza e struttura del *pre-miRNA* e sequenza del prodotto maturo. Nelle schede vi sono anche i riferimenti bibliografici relativi al miRNA indagato, permettendo così il rapido reperimento di informazioni aggiuntive che riguardano, ad esempio, tessuto specificità e profilo di espressione. Da questo database, sono state estrapolate le sequenze di tutti i 678 miRNA umani maturi in formato FASTA.

Il processamento di tali dati è stato operato poi per mezzo del *software on-line* RNAhybrid (<http://bibiserv.techfak.unibielefeld.de/rnahybrid/>; Krüger and Rehmsmeier 2006) che simula le possibili interazioni del singolo miRNA con una sequenza *target* e seleziona l'appaiamento più favorevole energeticamente. Nel caso specifico, sono state utilizzate 2 sequenze *target*, le versioni *wild-type* e mutata del 3'UTR del gene STCH, e precisamente 31 nucleotidi contenenti la sostituzione, 15 nucleotidi a valle della stessa e 15 nucleotidi a monte.

Si sono ottenuti 2 distinti *output files*, ognuno relativo ad una sequenza *target*, il confronto dei quali ha permesso di evidenziare le differenti condizioni di appaiamento del singolo miRNA con le 2 sequenze *target* e di selezionare i miRNA candidati. La selezione è stata operata sulla base dei seguenti criteri:

- 1) appaiamento perfetto del *seed* (2-7 nt) del miRNA alla sequenza *target* recante la sostituzione (è preferibile l'appaiamento di uno dei nucleotidi del *seed* con la base sostituita);
- 2) valore di energia libera di appaiamento (ΔG) molto negativo;
- 3) energia libera di appaiamento inferiore per la sequenza *target* con la sostituzione rispetto alla sequenza *wt*;
- 4) espressione del miRNA in sistema nervoso centrale (se presenti informazioni in Letteratura).

Sono stati così selezionati 10 miRNA come possibili candidati ad interagire con il l'RNA messaggero del gene STCH illustrati nel capitolo risultati sezione D (paragrafo 3.4.2).

5.17.2 Estrazione di RNA a basso peso molecolare da cellule NSC 34

Il protocollo di estrazione di RNA con il reagente TRIzol è stato leggermente modificato per ottenere un *pool* di RNA arricchito in trascritti a basso peso molecolare. Il protocollo utilizzato è il seguente:

- eliminazione del terreno di crescita contenuto nel *dish* e aggiunta del reagente TRIzol in volume di 1 ml per 10 cm² di superficie della piastra;
- aggiungere 0,2 ml di cloroformio per ogni millilitro di TRIzol utilizzato; agitare vigorosamente per alcuni secondi;
- centrifugare a 6.000 rpm per 10' alla temperatura di 4°C;
- recupero della fase superiore (acquosa) e aggiunta di 1 ml di isopropanolo per ogni millilitro di TRIzol utilizzato inizialmente; delicata agitazione per inversione;
- incubazione per 10' a 30°C;
- centrifugare a 6.000 rpm per 10' alla temperatura di 4°C; il pellet risulta visibile sul fondo della provetta;
- eliminazione del surnatante e lavaggio in 1 ml di etanolo 75% preparata con acqua RNase-free, per ogni millilitro di reagente TRIzol utilizzato;
- centrifugare a 6.000 rpm per 10' alla temperatura di 4°C;
- eliminazione del supernatante e asciugatura del pellet all'aria;
- risospensione del pellet/RNA in volume opportuno di acqua RNase-free.

Concentrazione e purezza del RNA sono state poi misurate allo spettrofotometro.

5.17.3 PoliAdenilazione di RNA totale estratto da cellule NSC-34

Al fine di rilevare la presenza dei miRNA candidati nell'RNA estratto dalle cellule NSC-34, deve essere attuata una procedura di poliadenilazione. I miRNA processati sono, infatti, naturalmente privi della coda poliadenilica che verrà richiesta per il compimento della successiva fase di retro trascrizione. In questo caso è stato utilizzato il *Poly(A) Tailing Kit* della ditta Ambion[®] Applied Biosystems, che propone il seguente protocollo:

- 1) preparazione della mix di poliadenilazione (Tab. 5.8);

Mix di poliadenilazione	
Buffer Buffer 5X	20 µl
MnCl ₂ (25 mM)	10 µl
ATP (90 mM)	1,2 µl
PAPpolymerase (2 U/µl)	2 µl
RNA	Volume ≡ a 10 µg
H ₂ O <i>RNase free</i>	Porto a 100 µl
Volume Totale	100 µl

Tab. 5.8: mix di poliadenilazione

- 2) incubazione di un'ora a 37°C.

L'enzima poly(A)polymerasi (PAP) arricchisce il 3' degli RNA di un filamento adenilico di circa 150-200 residui.

5.17.4 Retrotrascrizione di RNA totale estratto da cellule NSC-34

Durante la retrotrascrizione, l'informazione contenuta nell'RNA estratto dalle cellule viene trascritta in cDNA. La reazione, catalizzata dall'enzima DNA polimerasi-RNA dipendente, più comunemente detto retrotrascrittasi, necessita di un innesco in DNA per legare l'RNA e polimerizzare il nuovo filamento di DNA. In questo caso è stato utilizzato il *primer* di sintesi denominato PoliTadaptor, di sequenza 5'-**GCGAGCACAGAATTAATACGAC TCACTATAGGTTTTTTTTTTVN-3'**. Il *PoliTadaptor* può essere suddiviso in 2 componenti: la Sequenza di Selezione (in rosso) e l'Oligo dT (in blu). L'Oligo dT, al 3' del

primer, appaia alla coda di poliA e presenta all'estremità a 3' due nucleotidi degenerati (V e N), che impongono allo stesso *PoliTadaptor* di appaiare solamente a cavallo della giunzione trascritto-poliA. La Sequenza di Selezione, al termine 5', è una semplice sequenza di DNA sintetizzata in modo da non interagire con alcun trascritto umano. Risulterà successivamente utile nella amplificazione dei microRNA (Martello et al., 2007).

Per la retrotrascrizione è stato utilizzato il *ImProm-IITM Reverse Transcription System* (Promega) con il seguente protocollo:

- 1) preparazione di una soluzione contenente 12,5 µl di RNA poliadenilato alla concentrazione di 0,4 µg/µl e 3 µl di PoliTadaptor alla concentrazione di 10 pmoli/µl; incubazione a 70°C per 5' e successivo mantenimento in ghiaccio;
- 2) allestimento della mix di retrotrascrizione:

Mix RT	
Buffer 5X	6 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3,6 µl
dNTPs (10 mM)	1,5 µl
rRNasin [®] inibitore delle ribonucleasi (40 U/µl)	1,5 µl
RT ImProm-II TM	1,5 µl
H ₂ O <i>RNase free</i>	0,8 µl
Volume Totale	14,5 µl

Tab. 5.9: mix di retro trascrizione

- 3) A 15,5 µl di RNA + PoliTadaptor vengono aggiunti 14,5 µl di mix RT;
- 4) il termociclatore viene impostato con il seguente programma:

Protocollo di Trascrizione Inversa		
Fase	Temperatura	Tempo
Attivazione dell'Enzima	25°C	5'
Fase di Retrotrascrizione	42°C	60'
Inattivazione Termica dell'Enzima	70°C	10'
Storage	8 °C	2'

Tab. 5.10: protocollo di retrotrascrizione

L'enzima retrotrascrive l'intero RNA poliadenilato, compresi i miRNA a cui è stata aggiunta la coda poliadenilica, e da origine ad un DNA duplex in cui in un filamento è compresa la sequenza del miRNA e nel complementare è presente la Sequenza di Selezione come si vede nella seguente immagine:

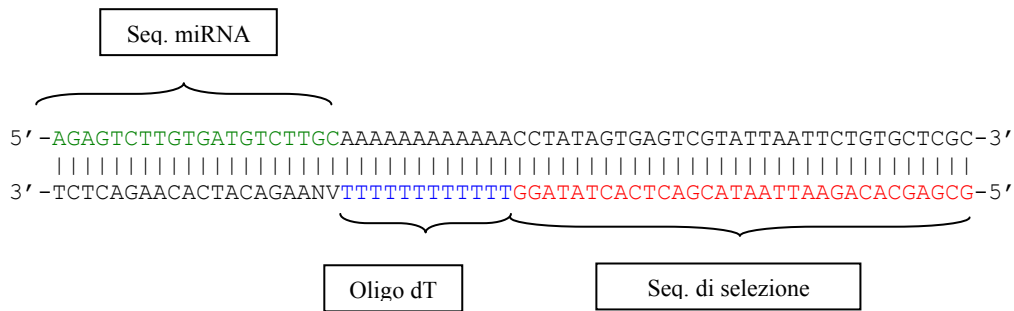


Fig. 5.6: DNA duplex di hsa-miR-924

5.17.5 Rilevazione di microRNA candidati mediante PCR

L'individuazione dei miRNA candidati espressi dalle cellule NSC-34, è stata attuata mediante reazione di PCR. Sono stati sintetizzati i seguenti *primers*:

<i>Primer A</i>	Sequenza <i>Primer 5' → 3'</i>	T° <i>Annealing</i>
UniRev1	GCGAGCACAGAATTAATACGACTCAC	64,3°C
UniRev2	GCACAGAATTAATACGACTCAC	54,2°C

Tab. 5.11: *primer A*

<i>Primer B</i>	Sequenza <i>Primer 5' → 3'</i>	T° <i>Annealing</i>	UniRev Utilizzato
hsa-miR-127-3p	TCGGATCCGCTCTGAGCTTGGCT	69,7°C	UniRev 1
hsa-miR-134	TGTGACTGGTTGACCAGAGGG	63,5°C	UniRev1
hsa-miR-142-3p	TGTAGTGTTCCTACTTTATGG	51,5°C	UniRev2
hsa-miR-194	TGTAACAGCAACTCCATGTGGA	61,5°C	UniRev2
hsa-miR-578	CTTCTGTGCTCTAGGATTGT	53,9°C	UniRev2
hsa-miR-581	TCTTGTGTTCTCTAGATCAGT	48,8°C	UniRev2
hsa-miR-637	ACTGGGGGCTTTCGGGCTCTGCGT	76,6°C	UniRev1
hsa-miR-643	ACTTGTATGCTAGCTCAGGTAG	53,4°C	UniRev2
hsa-miR-758	TTGTGACCTGGTCCACTAACC	61,2°C	UniRev1
hsa-miR-924	AGAGTCTTGTGATGTCTTGC	52,7°C	UniRev2

Tab. 5.12: *primer B*

La sequenza dei *primers A* (tabella 5.11) riprende la Sequenza di Selezione del PoliAdaptor, mentre il *primer B* (tabella 5.12) possiede la sequenza in DNA del corrispettivo miRNA. Sono stati sintetizzati 2 *primers A* differenti con 2 temperature di *annealing* diverse, così da poter selezionare il più consono in rapporto alla temperatura di appaiamento dei *primers B* (ultima colonna, tabella 5.12).

6 BIBLIOGRAFIA

- Abecasis GR, Cherny SS, Cookson WO, et al. (2002).
Merlin--rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees.
Nat Genet.; 30(1):97-101.
- Almenar-Queralt A, Goldstein LS. (2001)
Linkers, packages and pathways: new concepts in axonal transport.
Curr Opin Neurobiol.; 11(5):550-7.
- Apodaca G. (2001)
Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton.
Traffic.; 2(3):149-59.
- Beetz C, Schüle R, Deconinck T, et al. (2008)
REEP1 mutation spectrum and genotype/phenotype correlation in hereditary spastic paraplegia type 31.
Brain. 131(Pt 4):1078-86.
- Cashman NR, Durham HD, Blusztajn JK, et al., 1992.
Neuroblastoma x spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons.
Dev. Dyn. 194, 209–221.
- Coleman M. (2005)
Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity
Nature Reviews Neuroscience 6, 889-898
- Coutinho P, Barros J, Zemmouri R, et al. (1999)
Clinical heterogeneity of autosomal recessive spastic paraplegias: analysis of 106 patients in 46 families.
Arch Neurol. 56(8):943-9.
- Depienne C, Stevanin G, Brice A, et al. (2007)
Hereditary spastic paraplegias: an update.
Curr Opin Neurol. 20(6):674-80.
- Errico A, Ballabio A, Rugarli EI. (2002)
Spastin, the protein mutated in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia, is involved in microtubule dynamics.
Hum Mol Genet. 15;11(2):153-63.
- Ferreirinha F, Quattrini A, Pirozzi M, et al. (2004)
Axonal degeneration in paraplegin-deficient mice is associated with abnormal mitochondria and impairment of axonal transport.
J Clin Invest. 113(2):231-42.
- Finckh U, Schröder J, Ressler B, et al. (2000)
Spectrum and detection rate of L1CAM mutations in isolated and familial cases with clinically suspected L1-disease.
Am J Med Genet 1;92(1):40-6.
- Fink JK. (2003)
Advances in the hereditary spastic paraplegias.
Exp Neurol; 184 (suppl 1): S106–10.
- Fransen E, Lemmon V, Van Camp G, et al. (1995)
CRASH syndrome: clinical spectrum of corpus callosum hypoplasia, retardation, adducted thumbs, spastic paraparesis and hydrocephalus due to mutations in one single gene, L1.
Eur J Hum Genet 3(5):273-84
- Garbern JY, Yool DA, Moore GJ, et al. (2002)
Patients lacking the major CNS myelin protein, proteolipid protein 1, develop length dependent axonal degeneration in the absence of demyelination or inflammation.
Brain 125: 551–61.

- Griffiths I, Klugmann M, Anderson T et al. (1998)
Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin.
Science 5;280(5369):1610-3.
- Hanein S, Martin E, Boukhris A, et al. (2008)
Identification of the *SPG15* gene, encoding spastizin, as a frequent cause of complicated autosomal recessive spastic paraplegia, including Kjellin syndrome.
Am J Hum Genet. 82: 992–1002.
- Hansen JJ, 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(5):1328-32.
- Hansen J, Coryden TJ, Palmfeldt J, et al. (2008)
Decreased expression of mitochondrial matrix proteases Lon and ClpP in cells from patient with hereditary spastic paraplegia (SPG13).
Neuroscience 153: 474–82.
- Harding AE. (1981)
Hereditary "pure" spastic paraplegia: a clinical and genetic study of 22 families.
J Neurol Neurosurg Psychiatry. 44(10):871-83.
- Hazan J, Fonknechten N, Mavel D, et al. (1999)
Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia.
Nat Genet. 23(3):296-303
- Hehr U, Bauer P, Winner B, et al. (2007)
Long term course and mutation spectrum of spatacsin-linked spastic paraplegia.
Ann Neurol; 62: 656–65.
- Hébert SS, De Strooper B. (2007)
Molecular biology. miRNAs in neurodegeneration.
Science; 317(5842):1179-80.
- Jouet M, Rosenthal A, Armstrong G, et al. (1994)
X-linked spastic paraplegia (SPG1), MASA syndrome and X-linked hydrocephalus result from mutations in the L1 gene.
Nat Genet. 7(3):402-7.
- Kuhn DE, Martin MM, Feldman DS, et al. (2008)
Experimental validation of miRNA targets.
Methods; 44(1):47-54.
- Lin P, Li J, Liu Q et al. (2008)
A missense mutation in *SLC33A1*, which encodes the acetyl-CoA transporter, causes autosomal-dominant spastic paraplegia (SPG42).
Am J Hum Genet. 83(6):752-9.
- Lorrain M. (1898)
Contribution à l'étude de la paraplégie spasmodique familiale.
Paris: Steinheil,
- Martello G, Zacchigna L, Inui M, et al. (2007)
MicroRNA control of Nodal signalling.
Nature. 13;449(7159):183-8.
- Matteoni R, Kreis TE. (1987)
Translocation and clustering of endosomes and lysosomes depends on microtubules.
*J Cell Biol.;*105(3):1253-65.

- Meijer IA, Cossette P, Roussel J, et al. (2004)
A novel locus for pure recessive hereditary spastic paraplegia maps to 10q22.1-10q24.1.
Ann Neurol. 56(4):579-82.
- Ochoa GC, Slepnev VI, Neff L et al. (2000)
A functional link between dynamin and the actin cytoskeleton at podosomes.
J Cell Biol Jul 24;150(2):377-89.
- Rainier S, Bui M, Mark E, et al. (2008)
Neuropathy target esterase gene mutations cause motor neuron disease.
Am J Hum Genet 82: 780–85.
- Reid E. (1999)
The hereditary spastic paraplegias.
J Neurol. 246(11):995-1003.
- Reid E, Kloos M, Ashley-Koch A et al. (2002)
A kinesin heavy chain (KIF5A) mutation in hereditary spastic paraplegia (SPG10).
Am J Hum Genet. 71(5):1189-94.
- Ribai P, Stevanin G, Bouslam N, et al. (2006)
Charon C, Durr A, Brice A. A new phenotype linked to SPG27 and refinement of the critical region on chromosome.
J Neurol. 253(6):714-9.
- Robay D, Patel H, Simpson M, et al. (2006)
Endogenous spartin, mutated in hereditary spastic paraplegia, has a complex subcellular localisation suggesting diverse roles in neurons.
Exp Cell Res. 312: 2764–77.
- Rugarli E.I., Langer T. (2006)
Translating *m*-AAA protease function in mitochondria to hereditary spastic paraplegia.
Trends Mol. Med.; 12:262-9
- Salinas S, Proukakis C, Crosby A, Warner TT.(2008)
Hereditary spastic paraplegia: clinical features and pathogenetic mechanisms.
Lancet Neurol.;7(12):1127-38.
- Saugier-Verber P, Martin C, Le Meur N, et al. (1998)
Identification of novel L1CAM mutations using fluorescence-assisted mismatch analysis.
Hum Mutat. 12(4):259-66.
- Schwarz G., Liu C.N., (1956)
Hereditary (familial) spastic paraplegia: further clinical and pathological observations.
Arch. Neurol. Psychiatry; 75: 144-62.
- Schratt GM, Tuebing F, Nigh EA, et al. (2006)
ME. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development.
Nature. 19;439(7074):283-9.
- Stevanin G, Azzedine H, Denora P, et al. (2008)
Mutations in SPG11 are frequent in autosomal recessive spastic paraplegia with thin corpus callosum, cognitive decline and lower motor neuron degeneration.
Brain. 131(Pt 3):772-84.
- Strümpell A. (1880)
Beiträge zur pathologie des rückenmarks
Arch.Psychiatr. Nervenkrankheiten, 10: 217-238
- Strümpell A. (1904)
Die primäre seitenstrangsklerose (spastische spinalparalyse)
Dtsch Z. Nervenheilk, 27: 291-339

- Tsaousidou M, Ouahchi K, Warner TT, et al. (2008)
Sequence alterations within *CYP7B1* implicate defective cholesterol homeostasis in motor-neuron degeneration.
Am J Hum Genet 82: 510–15.
- Valdmanis PN, Meijer IA, Reynolds A, et al. (2007)
Mutations in the *KIAA0196* gene at the *SPG8* locus cause hereditary spastic paraplegia.
Am J Hum Genet 80: 152–61.
- Windpassinger C, Auer-Grumbach M, Irobi J, et al (2004)
Heterozygous missense mutations in *BSCL2* are associated with distal hereditary motor neuropathy and Silver syndrome.
Nat Genet. 36(3):271-6.
- Van Camp G, Vits L, Coucke P, et al. (1993)
A duplication in the *L1CAM* gene associated with X-linked hydrocephalus.
Nat Genet. 4(4):421-5.
- Van Esch H, Bauters M, Ignatius J, et al (2005)
Duplication of the complete *MECP2* gene was identified as the cause of severe mental retardation with progressive spasticity in some males
Am. J. Hum. Genet. 77, 442-453.
- Vazza G, Zorzea M, Boaretto F, et al. (2000)
A new locus for autosomal recessive spastic paraplegia associated with mental retardation and distal motor neuropathy, *SPG14*, maps to chromosome 3q27-q28.
Am J Hum Genet. 67(2):504-9.
- Villard L. (2007)
MECP2 mutations in males
J Med Genet; 44: 417-423.
- Zorzea M, Vettori A, Trevisan CP, et al. (2002)
Mostacciolo ML. Genetic mapping of a susceptibility locus for disc herniation and spastic paraplegia on 6q23.3-q24.1.
J Med Genet. 2002 Jun;39(6):387-90.
- Zuchner S, Wang G, Tran-Viet KN, et al. (2006)
Mutations in the novel mitochondrial protein *REEP1* cause hereditary spastic paraplegia type 31.
Am J Hum Genet 79: 365–69.

Ulteriori fonti:

- Tesi di Laurea Dott.ssa Boaretto F. anno accademico 1998-1999.
Relatore Prof. ssa ML Mostacciolo
- Tesi di Laurea Dott.ssa Daidone V. anno accademico 2004-2005.
Relatore Prof. ssa ML Mostacciolo, Correlatore Dott. ssa F. Boaretto
- Elaborato di Laurea Dott.ssa Barbieri E. anno accademico 2006-2007.
Tutor Prof. ssa ML Mostacciolo, Co-Tutor Dott. ssa F. Boaretto
- Elaborato di Laurea Dott.ssa Federici F. anno accademico 2006-2005.
Tutor Prof. ssa ML Mostacciolo, Co-Tutor Dott. ssa F. Boaretto
- Tesi di Laurea Dott.ssa Barbon G. anno accademico 2007-2008.
Relatore Prof. ssa ML Mostacciolo, Correlatore Dott. ssa F. Boaretto

7 APPENDICE

APPENDICE A

Primers utilizzati nell'analisi del gene L1CAM

Esone	Primers 5'→ 3'		Taq	T° Annealing	Dimensioni Amplificato
1a	F	CCTTCTCCCCTCTCCCAG	EXT	63°C	249bp
	R	CCACATTGCGGCGAAGGTAG			
2	F	TTCTCTCCATTCCCTCCCTT	EXT	60°C	90bp
	R	TCTGGGAAACACTCTCACCC			
3	F	CCTCACCACCGCTCTCTC	EXT	62°C	123bp
	R	AGGCAACAGGGGCTGAGA			
4	F	AGGCCTCTGGGCCTTTTT	EXT	61°C	288 bp
	R	CACAATCCCACACGAACTCC			
5	F	AGGAGAGTGTGAGCCCCT	EXT	60°C	197 bp
	R	CTAACACCCCGACCCAC			
6	F	GTCATGACTTCGGCCTCC	EXT	60°C	233 bp
	R	AGGGAGAGAGTGCAGAGCCT			
7	F	CACCCACCCACTTTCTCC	EXT	60°C	198 bp
	R	GCTCCCTGCTAGGGCTCC			
8	F	TTCTGCTCTTCCCTTT	EXT	59°C	247bp
	R	ATCACAGGCCACTGTCCC			
9	F	CCTGTGATGCCCACTGTCAT	EXT	60°C	265 bp
	R	CCCACTCCCACTCCTG			
10	F	GCCTCAACGCAGAAT	EXT	60°C	190bp
	R	GGAGTTAGGAGGTAAGGAAGG			
11	F	CTGTCTCCTGAGGCTGTT	EXT	55°C	173 bp
	R	CGCACTCACCCTACCAGG			
12	F	CCAGCCAGTCAGAGCCAG	EXT	61°C	230 bp
	R	AGCCATGTGGCAAGGGTT			
13	F	AACAGAGTGACTTCCCCACG	EXT	60°C	225 bp
	R	ACTCTGCCCCCTTTCACC			
14	F	AGATGGCAGGAAAGACAGACA	EXT	59°C	195 bp
	R	CCTTCTGGAGTGGAGGCTT			
15	F	TTCAAGCACCGACCCTTC	EXT	59°C	257bp
	R	CAGAAGTGACGGTGGGGT			

16	F	CTGATCACTCCATTGTCGGTT	EXT	61°C	269bp
	R	TCCAGGTGGCATGGGAGT			
17	F	AGAGGCTGCAGCATTGATGT	EXT	61°C	133bp
	R	AGCTCAGCCCAGGGACTC			
18	F	GCCAACCAACTCCTCTTC	EXT	57°C	306bp
	R	GGAAGCAGGCGAGCTCAA			
19	F	GCCTATGGCTCTATCCAAGTC	EXT	58°C	196bp
	R	CCTCAGTGATCACCCCTCTG			
20	F	CCTGCGAGGTCTCCTGTT	EXT	60°C	269bp
	R	AGGAGGGCAGGGGATGAG			
21	F	CTACCTGCCACTCGGTTCTG	EXT	60°C	189bp
	R	CTCCACCTCCCTTCCCTG			
22	F	CAGCCAACCCCTGTCTGT	EXT	60°C	189bp
	R	TCCCTGTTGGCAGGTCAT			
23	F	CTGCCACACTCTCCTCGTTC	EXT	60°C	231bp
	R	CAGGGGTGAGTCGGAGTC			
24	F	CTGCTGCCACCCTCTCTC	EXT	60°C	239bp
	R	GAATTGTGCAGCCCCCAT			
25	F	CAGGTCGGGTTCTGGCTT	EXT	60°C	246bp
	R	CGAGGTGCTCCTCTCTGC			
26	F	GGGAGAAGAAGCTGTCCC	EXT	60°C	149bp
	R	AGGGTGGAGCTGAGTGCC			
27	F	TTCACATCTCACCCCTCTC	EXT	60°C	107bp
	R	TAGGGAGACCTTGCTGTTGG			
28a	F	CTCGGCAGTGCTCTCACT	EXT	60°C	300bp
	R	CACAGCATCTCCTGTCCTGG			
28b	F	ACTCCCCATCAACCCT	EXT	59°C	299bp
	R	AGCCTCTCTGCCCAAATG			
28c	F	CAGATCTCCACATGCCA	EXT	60°C	337bp
	R	CTCTCCAGATGGCCTCCC			
28d	F	TGCTGTCTTTTCTTTGCCATC	EXT	60°C	319bp
	R	CTGCTAAGGGGTCCTGGG			

Tab. A: *Primers* utilizzati nell'analisi del gene LICAM mediante sequenziamento, SSCP e saggio di restrizione; il protocollo di amplificazione viene descritto nelle tabelle 5.2 e 5.3 a pag. 39. Questi *primers* sono stati amplificati mediante l'enzima ExpeTaq RTB (EXT)

Primers utilizzati nella qPCR per il gene L1CAM

<i>Primers 5' → 3'</i>		
qex4f	F	GCAAAGCAGCGGTAGATG
qex4r	R	GTGTGACCGTGTACCAGT
qex25f	F	TCAGAGGCTACCTGAGTATTG
qex25r	R	CTGGTTCATCGGCTTTGTG
qex28f	F	CGCCTCCTTCTCCTTCTTG
qex28r	R	GCGTGGATGTTTCAGTTCA

Tab. B: *Primers* utilizzati nell'analisi del gene L1CAM mediante qPCR; il protocollo di amplificazione viene descritto nel paragrafo 5.10 a pag. 43.

APPENDICE B

Marcatori VNTR analizzati mediante lettura dopo colorazione argentica

Marcatore	Chr	Posizione in Mb	Primers 5'→3'		T° Annealing
D1S2622	1	198,38	F	AAACTGGTAGGCCATTGATAGA	60°C
			R	CTGCAACATAAGAACCTAGTGTAAC	
D1S249	1	203,98	F	PE	55°C
			R	PE	
D2S338	2	236,90	F	PE	55°C
			R	PE	
N2S238.358	2	238,358	F	ATGGTGGAGGAGGCTTCTTT	60°C
			R	CAAGCAGGGGAAAACTCAG	
D2S125	2	240,81	F	PE	55°C
			R	PE	
D3S3530	3	190,63	F	ACAAACCATTTGCCACAGAC	59°C
			R	ACATTGCAGAGACGAAGCAC	
D3S2747	3	191,76	F	TTTCACATTGCTTGCCTG	57°C
			R	CCTTATATTATGACCTTGGGGA	
D3S1601	3	193,16	F	PE	55°C
			R	PE	
D6S304	6	119,47	F	TTCCACTCTGCTCCAGACAG	58,5°C
			R	TTGAAAGTTTGAGAAGCACTTGTTA	
D6S1696	6	119,61	F	GCTCTTGAGAATGCACAC	52°C
			R	TCCAACGTGTGTTTTGGT	
D6S1620	6	129,98	F	CAAAGAGTAACAATCCTAAGCAAC	57°C
			R	TCATCCTAAGTTAATGCACAGC	
D6S292	6	136,35	F	PE	55°C
			R	PE	
D6S1569	6	139,1	F	AGCCTGGGTGACAAAAG	55°C
			R	AGTATGCAAGAACTGCTAGA	
D6S314	6	140,1	F	AAAATGACTTCTTTGGGTGGGC	62,5°C
			R	GTGGGTAGCAACACTGTGGC	
D6S1684	6	140,22	F	CAACTGGATTCAAAATAGATGTC	55°C
			R	ATGGCAGCAGGCTATGT	
D6S308	6	141,29	F	PE	55°C
			R	PE	
D6S310	6	142,1	F	GATCCAGATTGCAGAAGG	55°C
			R	GAAACAGGACCAGTAGGATATG	
D8S285	8	57,22	F	PE	55°C
			R	PE	
D8S260	8	61,98	F	PE	55°C
			R	PE	
D8S543	8	70,17	F	PE	55°C
			R	PE	
D10S537	10	72,06	F	PE	55°C
			R	PE	
N10S73.723	10	73,723	F	CCCATTCTGCTTCCTCTTTG	60°C
			R	GTGGGAGCATCTCACCATCT	
N10S76.920	10	76,920	F	TTCCCTGATGGGCACTTAAT	60°C
			R	GGTGAAAACACGCTGAGTGA	
N10S77.158	10	77,158	F	AATGATGTTGCCCTTGAACA	60°C
			R	TTTTCTGCCCTTCTTGAGGA	
D10S201	10	80,69	F	AGCTAAAAGGCTGCTGGAGA	55°C
			R	AGCTCATGGGATGGAAGCAT	
D10S1686	10	85,55	F	PE	55°C
			R	PE	
N10S86.505	10	86,505	F	TGGTGACCCCCAGTATAGGA	60°C
			R	TTAATCAAAAACGGCTTGTTCTG	
N10S87.395	10	87,395	F	TGACATCCACTGCTCTCTGC	60°C
			R	AGACTGGCTGCCTCAGTGTC	
N10S87.80	10	87,80	F	AGAAACGCCAGAACCAGAGA	59°C
			R	AGCTGTGAGACGTTGTCTGC	

N10S88.118	10	88,118	F	ATGAGCCAGCAAGGTGACTT	60°C
			R	GGGTGGGTCAGGTTTCACTA	
D10S608	10	88,716	F	ATCACCTGCCTCTTCCCTTT	60°C
			R	TGTTTCTTGCACCTCTGCTG	
N10S88,71	10	88,72	F	GCTCTTCCAAACGTCAGGTC	60°C
			R	GAAGCACACATGAAGGCTCA	
N10S89.138	10	89,138	F	CAACAAGAGCCACACTGACC	60°C
			R	CAGGAAAGCCAAGAAGCAAT	
N10S89.453	10	89,453	F	TCTGTGACAGCCAGGACAAG	60°C
			R	AAGTCTGGGGAGGATGTGG	
D10S1765	10	89,59	F	PE	55°C
			R	PE	
D10S1419	10	92,25	F	TCAGAGGCACAAGGCTAAGTAA	59°C
			R	GCCCTCCTAGCTCCTCAAG	
D10S583	10	94,35	F	TCTGACCAAAAATACCAAAAAGAAC	57°C
			R	AGAGACTCCAGATGTTTGATGA	
D10S571	10	97,12	F	CAGTCCTTGCTTTGTGAGAA	56.5°C
			R	ATGTACACTGTGTCTGTAATCCCT	
N10S98,92	10	98,92	F	TGAGTGTGTGCGATAGAGAGAAG	59°C
			R	GGTGAGTTCTGGGAGAGGAG	
N10S100,97	10	100,97	F	CAAGTTCAGGGAATGAAACACA	60.5°C
			R	TGAGAATCCTTCATCAAAATGGA	
N10S101,26	10	101,26	F	GAGAGGGGGCAGGAATTTT	60°C
			R	GTTGAAGCCTGGGAAACTTG	
D10S192	10	102,42	F	PE	55°C
			R	PE	
N10S103,45	10	103,45	F	GGCAAAAACATCAAGTTGAGC	60°C
			R	GCCTGCTTCCCTTCCAGAG	
D10S1267	10	104,36	F	CTGAGGAGCTGGAGGTAAG	59°C
			R	TCCGAGGATAGGTTCAAGAGC	
D10S467	10	106,49	F	GGCTTTTGGGTAACCTGCTT	60°C
			R	TGGGCTTGCACCTTCTAAGGA	
D10S597	10	111,22	F	PE	55°C
			R	PE	
D12S59	12	33,88	F	GATCACGTCAGACTGGGCT	55°C
			R	CTCACTCATGCTTGTTTTGA	
D12S85	12	45,62	F	PE	55°C
			R	PE	
D12S368	12	50,91	F	PE	55°C
			R	PE	
D12S83	12	59,17	F	PE	55°C
			R	PE	
D12S313	12	66,78	F	PE	55°C
			R	PE	
N13S35.62	13	35,62	F	TTCTTCTAACCACCAAAATCTGC	60°C
			R	AGCCATGATGGTGCCACT	
SPG20int	13	35,8	F	GGTAGGTCATTCTCGGGTGA	60°C
			R	ATCAGGGGTTGAATGAGGTG	
N13S35.99	13	35,99	F	GCATGTGTGGACATTGCTTT	60°C
			R	GAATTCTGGCCTACGGTCAA	
D13S268	13	50,78	F	CACATTCTCCCCAGAAGGAA	60°C
			R	CTCACAGAGGAAGCCAAAG	
N13S52.23	13	52,23	F	AAGCTCCCAAATGAAAAGCA	60°C
			R	TATTCTGCCTCCTGCCTGTT	
D14S1048	14	38,49	F	TGACTTAAAATGCAGATTCTGGGC	64.5°C
			R	TTGTTTCATCAAAATCACCTGGGAG	
D14S79	14	40,92	F	AGGTTGATAGACCATGGAGACA	56°C
			R	TTTTATTGTTATGTGGCTTTCA	
D14S976	14	47,15	F	GATACACAGCCCTGAAGTACAAAT	58°C
			R	GCGGTATAGACATTGTTTCCA	
D14S984	14	49,16	F	CTTGAATATGTGTTTCCAGGT	56°C
			R	CTGAGATCACGCAGTTGTAC	
D14S989	14	52,77	F	TGGCTATAACTATGTGAGGCATTA	57°C
			R	TCATTCCGGATCCAGG	
D14S125	14	65,44	F	CCTGGGGCTCTTAACCTCTC	60°C
			R	GGTTGAATGTGGCGTGTTT	
D14S1069	14	67,45	F	AAGCAAGGACATAACCCACAA	60°C
			R	TGGGAACTGGGATTTTTGTT	
D15S537	15	42,6	F	CCCAGCAGTAATCCCACCATT	63°C
			R	TGGTTCACTGGAGCCTCAAAC	
SPG11INT	15	42,72	F	CCGAAAAGAAAAATAGGCAAAA	59°C

			R	TGTTCTTGCCAGCACTTAATT	
N15S428	15	42,8	F	CTTCACCTGGCTGCAAATAA	60°C
			R	TGCTCACCTTGACTTTCCAA	
N15S62.95	15	62,95	F	TCAGAGGGGACCTGGTATTG	60°C
			R	CTGACCCCCAGAATAACCA	
N15S63.1	15	63,1	F	AGCGGCCCTAGATTTTTGTT	60°C
			R	TGTGCCTGTACCCCAGCTA	
D16S3091	16	81.53	F	PE	55°C
			R	PE	
N16S88.03	16	88.03	F	CACACGCAGACGTACTTTCG	60°C
			R	GTTCTTGAGCGAACAGACC	
SPG7int	16	88.11	F	CAGGCACAAATGACCACAAC	60°C
			R	GGCAACGAAGAGTGAAACT	
N16S88.4	16	88.4	F	AGGCCAACAAATGCCAATT	60°C
			R	ATTCCAAGGAACCAAGCTCA	
D19S406	16	7.32	F	AATATGTAGAAACACAGAAACCCAG	55°C
			R	CAATGTGGGGGTGTATT	
D19S884	16	8.05	F	PE	55°C
			R	PE	
D21S258	21	14,5	F	TGGTGCAAGACTTCATCCAT	58°C
			R	TCATTGCCATAGCCATCTT	
D21S1911	21	14,7	F	PE	55°C
			R	PE	
D21S1904	21	15	F	ATGAGTTCAGTGTTTCATGGACATC	61°C
			R	AGCAAGATTACTGTCTGGTTTCCC	
D21S1886	21	15,4	F	CGGGATCTATACCCTACCATTAGAG	59°C
			R	CATGCAATCTGTTGTTGAACC	
D21S1256	21	16,6	F	PE	55°C
			R	PE	
D21S1899	21	18,2	F	PE	55°C
			R	PE	
D21S1905	21	19	F	GACAGGTGTCATTCCATTG	55°C
			R	TCCCTAATCCAGAGATGTG	

Tab. C1: VNTR analizzate in gel di poliacrilammide; il protocollo di amplificazione viene descritto nelle tabelle 5.2 e 5.3 a pag. 39. Questi marcatori sono stati amplificati mediante l'enzima AmpliTaq Gold. In **grassetto** vengono riportate le VNTR con *primers* di nuova sintesi; PE indica le VNTR acquistate dalla ditta Perkin Elmer, di cui non è nota la sequenza dei *primers*.

Marcatori VNTR analizzati mediante lettura in fluorescenza

Marcatore	Chr	Posizione in Mb	Primers 5'→3'		T°An-Nealing	Fluoro-Foro
D1S2877	1	187,6	F	PE	55°C	NED
			R	PE		
D1S413	1	196,9	F	PE	55°C	FAM
			R	PE		
D2S140	2	241,38	F	PE	55°C	FAM
			R	PE		
D10S1696	10	83,22	F	GAGACAGCATTTCATTATGA	55°C	FAM
			R	TCCTGGGTGACAGAGTGA		
D10S1744	10	88,32	F	ACAATAGACTGCTGCTGCTGC	61°C	FAM
			R	TCTCGTGTCTGACTCCCACC		
D10S185	10	95,17	F	TCCTATGCTTTCATTTGCCA	55°C	FAM
			R	CAAGACACACGATGTGCCAG		
D13S153	13	47,78	F	PE	55°C	NED
			R	PE		
D14S275	14	25,76	F	PE	55°C	FAM
			R	PE		
D14S1040	14	31,28	F	PE	55°C	NED
			R	PE		
D14S70	14	33,52	F	PE	55°C	HEX
			R	PE		
D14S288	14	43,17	F	PE	55°C	NED
			R	PE		
D14S276	14	54,75	F	PE	55°C	NED
			R	PE		
D14S980	14	56,22	F	PE	55°C	FAM
			R	PE		
D14S258	14	69,65	F	PE	55°C	FAM
			R	PE		
D16S415	16	52,22	F	PE	55°C	FAM
			R	PE		
D16S320	16	56,56	F	TGCGTGTGCGTGTGCGTG	60°C	FAM
			R	CGAAGGCACATCTCCTAATC		
D16S265	16	62,07	F	CCAGACATGGCAGTCTCTA	57°C	HEX
			R	AGTCCTCTGTGCACTTTGT		
D16S503	16	62,15	F	PE	55°C	HEX
			R	PE		
D16S515	16	75,07	F	PE	55°C	FAM
			R	PE		
D16S516	16	77,68	F	PE	57°C	NED
			R	PE		
D16S289	16	78,47	F	AGTTGGAGGAAGAGAGAAGCAG	58°C	HEX
			R	CACCACTTATCATTCTTCCAAGCTGTG		

Tab. C2: VNTR analizzate mediante corsa su capillare al sequenziatore automatico; il protocollo di amplificazione viene descritto nelle tabelle 5.2 e 5.3 a pag. 39. Questi marcatori sono stati amplificati mediante l'enzima AmpliTaq Gold. In **grassetto** vengono riportate le VNTR con *primers* di nuova sintesi; PE indica le VNTR acquistate dalla ditta Perkin Elmer, di cui non è nota la sequenza dei *primers*.

Primers di sequenziamento del gene SNCG

Esone	Primers 5'→ 3'		Taq	DMSO (% v/v)	T° Annealing	Dimensioni Amplificato
1	F	TCTGCCTTCCTATCCTGGAG	EXT	3,2	56°C	500 bp
	R	GAGACCCACCTTGATAGCC				
2	F	CCCCAGACACCATCCTTA	EXT	-	57°C	366 bp
	R	CTGACTCCAGGGCACCTCT				
3	F	TAAACTAGGGTGGGCGTCTC	ATG	-	58°C	487 bp
	R	TCGAACAGCAAGCATGGA				
4	F	AGCCCCTCCAAGTACAACAA	ATG	-	60°C	381 bp
	R	GACCTCCACTCAGGTTCA				
5	F	GACCTCCACAGCCCCTAC	ATG	-	58°C	596 bp
	R	ATGAATGCCCTGTGTGTGTC				

Tab. E: Primers utilizzati nel sequenziamento del gene SNCG; il protocollo di amplificazione viene descritto nelle tabelle 5.2 e 5.3 a pag. 39. Questi primers sono stati amplificati a seconda della voce riportata in tabella mediante l'enzima AmpliTaq Gold (ATG) o mediante l'enzima ExpeRTaq RTB (EXT)

Primers di sequenziamento del gene GLUD1

Esone	Primers 5'→ 3'		Taq	DMSO (% v/v)	T° Annealing	Dimensioni Amplificato
1a	F	GTCCGTCCTCCCCGTTAG	EXT	3,2	60°C	466 bp
	R	CTTCTGCTCCTCGCTCTCC				
1b	F	AGGACGACCCCAACTTCTTC	EXT	3,2	60°C	448 bp
	R	TTAAGGCGGAAAAATCACCA				
2	F	TGGACATAGCTTGGATGTAATA	ATG	-	58°C	299 bp
	R	AGCATCTTAACAGTAACATGTGTGT				
3	F	TGTGTGGTGCTTTCTGTCATT	ATG	-	59°C	211 bp
	R	GCCTGAACAACAGAGGAAGAC				
4	F	TGGCAATGCCTACTTTATGAGTT	ATG	-	60°C	248 bp
	R	TCCCACCTTTATACCAAAAATATGTG				
5	F	CAAGGATCTTTGTGTTCGAGA	ATG	-	58°C	260 bp
	R	CCCAGGGATTCTCAACTTTT				
6	F	TTGATTAAATGAGAATGTGCTTTGA	ATG	-	60°C	532 bp
	R	GGTTGAATTTGGTGATAGTTTGG				
7 + 8	F	CATTGGTCAAAATATGACTCTTGC	ATG	-	60°C	496 bp
	R	CCCCCTAACGTCATTCACAT				
9	F	ACATCTCTTGCCCTCAGTGG	ATG	-	60°C	235 bp
	R	TCCTCTCTCCTCCAAATTCC				
10	F	AAGGTCTTAGGTTCAATTTTCAGC	ATG	-	58°C	293 bp
	R	TTCCCAAAGGGATCAGTTCT				
11	F	GGGTGACAGACCACGACTCT	ATG	-	60°C	320 bp
	R	CAAAGACTATGCCGCAGATG				
12	F	TTGACTTGAGAATCCTTTGTCATC	ATG	-	60°C	229 bp

	R	CAGTCTGGCGGCTGAGATA				
13a	F	CCTGCCTAGAGGTTCTGCTG	ATG	-	60°C	668 bp
	R	GTGTGTCCCAGACTCATCCA				
13b	F	AGCCTCCTTTATCTGGCTGT	ATG	-	58°C	596 bp
	R	TTAACATGATAAAAAGTGA CTGCAT				
13c	F	GCAAAATGGTGGAGGCTATT	ATG	-	59°C	592 bp
	R	TTTCAGAAATCCAATTGCAGTATTA				

Tab. E: *Primers* utilizzati nel sequenziamento del gene GLUD1; il protocollo di amplificazione viene descritto nelle tabelle 5.2 e 5.3 a pag. 39. Questi primers sono stati amplificati a seconda della voce riportata in tabella mediante l'enzima AmpliTaq Gold (ATG) o mediante l'enzima ExperTaq RTB (EXT)

Primers dei cluster di SNPs

Esone	Primers 5'→ 3'		Taq	T° An-nealing	Dimensioni Amplificato
Clus_ATAD1	F	TCATTCTTCACTGGCTGCAC	ATG	60	595
	R	GCAGGAAGGACTTTGTGATGA			
Clus_GLUD1	F	AATTCTTCTCGAACACAAAGATCC	ATG	60	284
	R	TGAGGTCAAGAGAGGCTAAACTG			

Tab. F: primers utilizzati per l'analisi di SNPs; il protocollo di amplificazione viene descritto nelle tabelle 5.2 e 5.3 a pag. 39. Questi *primers* sono stati amplificati mediante l'enzima AmpliTaq Gold (ATG)

APPENDICE C

Marcatori VNTR analizzati mediante lettura in fluorescenza e dopo colorazione argintica

Marcatore	Chr	Posizione in Mb	Primers 5' → 3'		T° An-Nealing	Fluoro-Foro
D15S994	15	38,3	F	PE	55°C	NED
			R	PE		
D15S537	15	42,6	F	CCCAGCAGTAATCCCACCATT	63°C	-
			R	TGGTTCACTGGAGCCTCAAAC		
SPG11int	15	42,7	F	CCGAAAAGAAAAATAGGCAAAA	59°C	-
			R	TGTTCTTGCCAGCACTTAATT		
N15S428	15	42,8	F	CTTCACCTGGCTGCAAATAA	60°C	-
			R	TGCTACCTTGACTTTCCAA		
D15S978	15	47	F	PE	55°C	HEX
			R	PE		

Tab. G: VNTR interni e fiancheggiati il locus SPG11; il protocollo di amplificazione viene descritto nelle tabelle 5.2 e 5.3 a pag. 39. Questi marcatori sono stati amplificati mediante l'enzima AmpliTaq Gold. In **grassetto** le vengono riportate le VNTR con *primers* di nuova sintesi; PE indica le VNTR acquistate dalla ditta Perkin Elmer, di cui non è nota la sequenza dei *primers*.

APPENDICE D

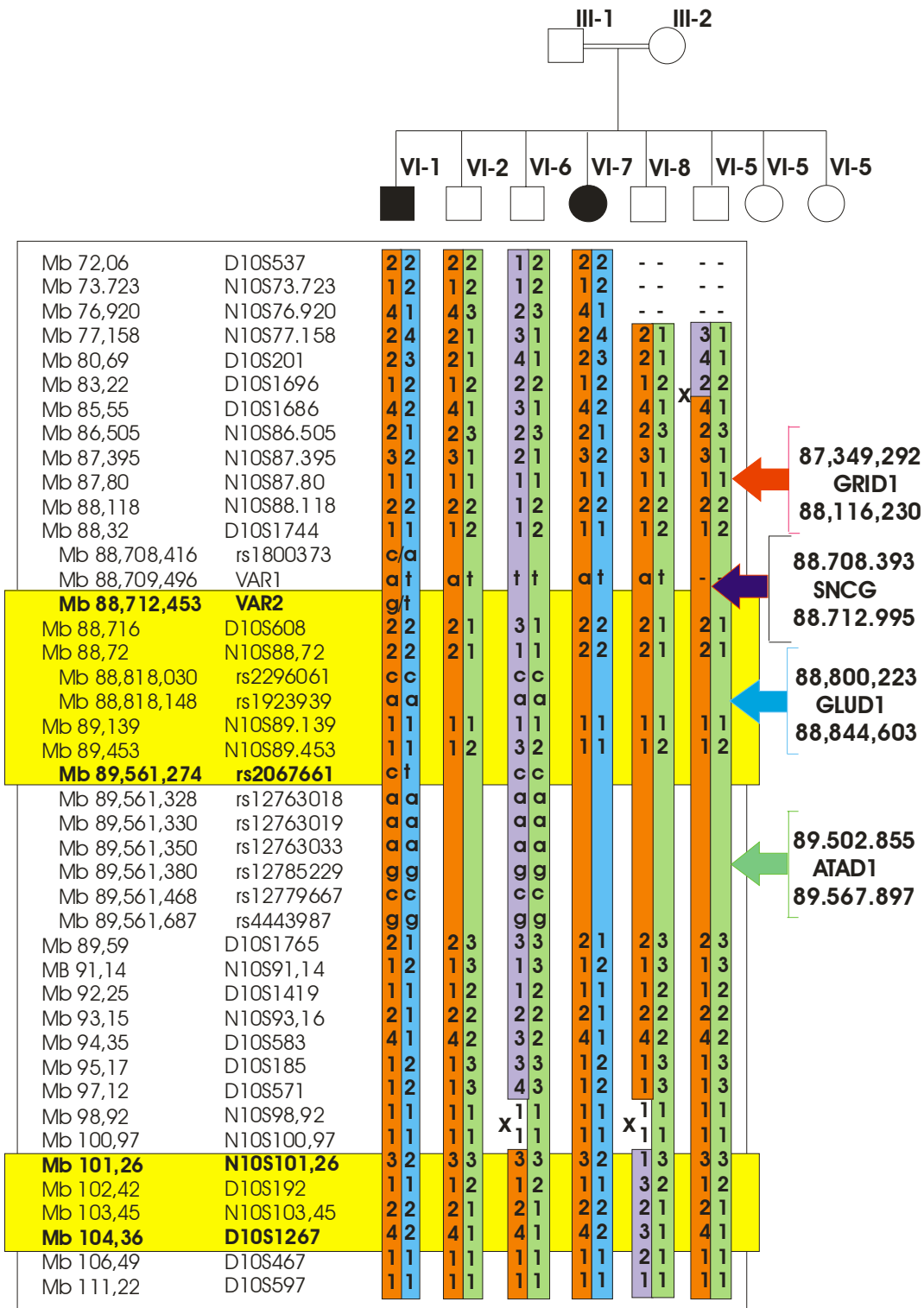
Primers utilizzati per il clonaggio del 3'UTR del gene STCH

Primers 5' → 3'		
3 tailSTCHF	F	TCCATCTAGATTCTGCAGAAATAATGGTTA
3 tailSTCH3R	R	TACGGTTAACTAGGCAACAGCTACTGAGAT

Tab. H: *primers* utilizzati nel clonaggio del 3'UTR del gene STCH, l'amplificato è stato ottenuto con la Taq AccuPrime™ Pfx (Invitrogen) secondo il protocollo fornito dalla ditta. In **grassetto** sono evidenziati le sequenze riconosciute dagli enzimi di restrizione utilizzati per il clonaggio.

APPENDICE E

Ricostruzione degli aplotipi a livello del locus SPG27 (73,03-111,20 Mb)



ricostruzione degli aplotipi degli individui della famiglia 1; in giallo sono evidenziate le regioni in linkage

APPENDICE F

Publicazioni pertinenti la tesi

Crimella C, Arnoldi A, Crippa F, Mostacciolo ML, **Boaretto F**, Sironi M, D'Angelo MG, Manzoni S, Piccinini P, Turconi AC, Toscano A, Musumeci O, Benedetti S, Fazio R, Bresolin N, Daga A, Martinuzzi A, Bassi MT
Point mutations and an intragenic deletion in *SPG11* in autosomal recessive complex spastic paraplegia without thin corpus callosum
J med genet (in stampa)

Simonati A, **Boaretto F**, Vettori A, Dabrilli P, Criscuolo L, Rizzuto N, Mostacciolo ML.
A novel missense mutation in the LICAM gene in a boy with L1 disease.
Neurol Sci. 2006 Jun;27(2):114-7.

Publicazioni su altri filoni di ricerca

Striano P, Gambardella A, Coppola A, Di Bonaventura C, Bovo G, Diani E, **Boaretto F**, Egeo G, Ciampa C, Labate A, Testoni S, Passarelli D, Manna I, Sferro C, Aguglia U, Caranci F, Giallonardo AT, Striano S, Nobile C, Michelucci R.
Familial mesial temporal lobe epilepsy (FMTLE) : a clinical and genetic study of 15 Italian families.
J Neurol. 2008 Jan;255(1):16-23.

Vazza G, Bertolin C, Scudellaro E, Vettori A, **Boaretto F**, Rampinelli S, De Sanctis G, Perini G, Peruzzi P, Mostacciolo ML.
Genome-wide scan supports the existence of a susceptibility locus for schizophrenia and bipolar disorder on chromosome 15q26.
Mol Psychiatry. 2007 Jan;12(1):87-93.

8 RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA

Le paraparesi spastiche ereditarie (HSP) sono un gruppo di disordini neurodegenerativi caratterizzate da progressiva spasticità e debolezza degli arti inferiori. Nelle forme complicate si possono osservare altre manifestazioni neurologiche o non neurologiche associate alla spasticità. I dati presenti in letteratura sulle HSP ad oggi riportano 39 loci mappati su diversi cromosomi e sono descritte sia forme a trasmissione autosomica dominante, che recessiva, che *X-linked*. Nei pazienti affetti da HSP sono state trovate mutazioni in 18 diversi geni coinvolti nel *trafficking* intracellulare, nel trasporto assonale e in anomalie nel funzionamento dei mitocondri. In un tale scenario in cui la quantità di informazioni raccolte sono molte, non è facile scegliere quale strada intraprendere per determinare da quale forma di HSP un paziente risulti affetto, né tanto meno accrescere, con dati di rilievo, le conoscenze generali.

In questi tre anni sono stati studiati molti casi isolati ed alcuni casi familiari che presentavano un fenotipo di HSP complicata, con l'intenzione di individuare il locus e/o il gene coinvolto nei diversi pazienti.

In primo luogo è stato analizzato un campione di 10 soggetti con uno grave fenotipo caratterizzato da spasticità agli arti inferiori, idrocefalo, ritardo mentale e pollici addotti (sindrome di CRASH). In questi individui, mediante sequenziamento diretto sono state studiate le regioni codificanti del gene L1CAM, associato alla sindrome di CRASH. Cinque nuove mutazioni sono state trovate in altrettanti pazienti non correlati, più una descritta in precedenza. La maggior parte delle mutazioni identificate in questo studio sono localizzate nella porzione extracellulare della proteina matura che svolge un ruolo primario nelle iterazioni omo- ed etero-filiche proteina-proteina. Nei pazienti privi di mutazioni puntiformi nelle regioni codificanti è stata condotta un'analisi di duplicazione del gene L1CAM mediante differenti metodiche (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification e Real Time-PCR). Nessuno degli individui analizzati si è dimostrato essere portatore di tali riarrangiamenti.

Nella seconda parte di questo lavoro si è proceduto con un'indagine molecolare su 3 famiglie affette da paraparesi spastica complicata a trasmissione autosomica recessiva.

Nella prima famiglia (Fam. 1) con HSP associata a deficit cognitivo è stata eseguita un'indagine preliminare di esclusione dei loci coinvolti nella HSP. Sono stati valutati geni candidati nella regione di *linkage* più promettente, ma non sono state trovate mutazioni causative. Ulteriori analisi saranno necessarie per comprendere quale forma di paraparesi spastica sia responsabile della patologia negli affetti di questa famiglia. Nella seconda famiglia (Fam. 2) a cui è stata diagnosticata, in due fratelli, una forma di HSP complicata da sospetto assottigliamento del corpo calloso si è proceduto con la caratterizzazione della regione 15q21.1 dove mappa il gene SPG11 tra i marcatori D15S994 e D15S978. Data la condivisione del genotipo negli individui affetti si è proceduto con il sequenziamento del gene SPG11. Apparentemente i due fratelli affetti risultavano omozigoti per un'inserzione di tre paia di basi a livello del sito di *splicing* dell'esone 39 (c.7000-3_-4insAGG; NM_025137). Ulteriori analisi hanno dimostrato che sono invece portatori di due mutazioni diverse, la mutazione descritta inizialmente ed una delezione di 2,76 kb tra gli introni 36 e 39 (c.6754_7152del1397).

Per il terzo nucleo familiare, 11 fratelli nati da genitori consanguinei (Fam. 3), in passato erano già state eseguite delle analisi (*genome-wide search* e *fine mapping*) per cui era stata individuata una regione di omozigosità sul cromosoma 21. Solo gli individui affetti, tre fratelli con HSP complicata da un lieve ritardo mentale e neuropatia periferica, in questa regione condividevano l'assetto genotipico.

L'analisi dei geni candidati ha portato all'individuazione di una sostituzione di un singolo nucleotide (T→C) sul 3'UTR del gene STCH (*Heat shock protein 70 family member 13*)

localizzato in posizione 21q11.2 che cosegrega con la patologia e non risulta presente in 300 individui sani analizzati. Uno studio funzionale preliminare ha permesso di valutare gli effetti di questa variazione nella linea cellulare murina motoneurone-simile NSC34. Usando un vettore modificato esprime il gene della luciferasi fuso con il 3'UTR del gene STCH si è potuto osservare una differente attività trascrizionale evidenziata come minor attività della luciferasi in presenza dell'allele mutato. Tenuto conto che tale sostituzione nucleotidica potrebbe attivare un sito target di appaiamento criptico per un microRNA è stata eseguita un'analisi in silico ed in vitro per selezionare i microRNA che potrebbero interagire con il trascritto di tale gene. Al momento appaiono candidati i miRNA: hsa-miR-134, hsa-miR-194, hsa-miR-637, hsa-miR-758 e hsa-miR-924.

Hereditary spastic paraplegias (HSP) represents a group of single-gene disorders characterised by degeneration of the corticospinal tract axons, leading to slowly progressive lower extremity spasticity and weakness. HSP is termed as 'complicated' if additional symptoms such as dementia, extrapyramidal disturbance or peripheral neuropathy occur. So far 39 different chromosomal loci have been identified for HSP, which is inherited both as autosomal dominant, recessive and X-linked trait. Mutations in 18 genes involved in intracellular trafficking, axonal transport and impaired mitochondrial function have been identified in HSP patients. Such a scenario make then very difficult to decide what HSP form and consequently which gene have to be investigated in an affect subject.

During the last three years many isolated patients and some families with a complicated HSP phenotype, have been studied in our lab in order to identify the genomic locus and/or the gene involved in the disease.

We first investigated a subgroup of ten subjects with a specific severe phenotype characterized by the following major features: hydrocephalus, mental retardation, spasticity of the legs, and adducted thumbs (CRASH syndrome). Such patients were investigated by direct sequencing for mutations in L1CAM (Neural cell adhesion molecule L1) coding regions, a gene involved in CRASH syndrome. Five novel and one already known mutations have been detected in six unrelated patients. The large majority of the identified mutations were localized in the extracellular domain, which plays a primary role in the homo- and heterophilic protein-protein interactions. In the patients without causative mutations in the L1CAM coding region a duplication analysis using Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification and Real Time-PCR has been performed. None of the analyzed patients showed such a rearrangement.

In the second part of the present work, three families affected by a complicated form of recessive HSP were investigated. In the first one characterized by HSP with mental impairment, a linkage analysis for the known HSP loci have been performed. The candidate genes within the most reliable positive region have been direct sequenced without any significant result. Further studies are mandatory for identifying the molecular event responsible for HSP in such family. Haplotype analysis of the second family, in which two sibling were affected by HSP with suspected thin corpus callosum, was performed within the region 15q21.1 between the markers D15S994 and D15S978 where the SPG11 gene is located. As the two affected members shared the same genotype, the SPG11 gene was investigated by direct sequencing. Apparently both subjects were found to carry an homozygous 3 bp insertion at the splice site of exon 39, (c.7000-3_-4insAGG). However, further investigations demonstrated that they were compound heterozygous with the previously described insertion in one allele and an 2,6kb intragenic deletion between the 36 and the 39 introns (c.6754_7152del1397) in the other one.

The third family with eleven brothers born from consanguineous parents, was already studied by genome-wide search and fine mapping in a previous project. Such analysis allowed the identification of a region cosegregating with the disease, located on chromosome 21q11.2-q21.1. Only the three subjects affected by HSP complicated by mild mental retardation and distal motor neuropathy, share the same genotype at this locus. By the candidate genes study, a single nucleotide substitution in the 3'UTR of STCH gene (*Heat shock protein 70 family member 13*) that cosegregated with HSP have been detected. Such variation was never detected in 300 healthy subjects from the same population. In order to evaluate if such variant might affect transcription as well as RNA stability the mouse embryonic spinal cord-neuroblastoma cell line (NSC34) was transfected using a vector expressing the luciferase gene fused with the wild type or mutant STCH 3'UTR. Preliminary results suggest that the STCH 3'UTR single nucleotide substitution significantly affects the luciferase activity. In order to understand if such substitution could lead to an activation of a cryptic miRNA target site using in silico and in vitro approach, we performed a selection of putative miRNAs able to interact with the STCH mutated 3'UTR. Such analysis suggest hsa-miR-134, hsa-miR-194, hsa-miR-637, hsa-miR-758 e hsa-miR-924 might be involved in the pathogenic role of such variant. However further functional studies are mandatory for drawing final conclusions.