



Università degli Studi di Pisa

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in Biologia applicata alla biomedicina

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

APPLICAZIONE DEL SEQUENZIAMENTO DI NUOVA GENERAZIONE
NELLA CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DELLE EREDOATASSIE

Candidato

Daniele Galatolo

Relatore interno

Prof.ssa Federica Gemignani

Relatore Esterno

Dr. Filippo M. Santorelli

Anno Accademico 2015-1016

Indice

1. Introduzione	1
1.1. Atassia	1
1.2. Le atassie ereditarie	1
1.3. Atassie cerebellari autosomiche dominanti (ADCA)	2
1.3.1. Atassie spinocerebellari (SCA) da espansioni di poliglutammine	4
1.3.2. Atassie spinocerebellari (SCA) da espansioni non codificanti	8
1.3.3. Atassie spinocerebellari (SCA) da mutazioni convenzionali	9
1.4. Atassie cerebellari autosomiche recessive (ARCA)	10
1.4.1. Atassie di Friedreich (FRDA)	13
1.4.2. Atassia-telangiectasia (AT)	14
1.5. Atassie X-linked	15
1.5.1. Sindrome dell'X-fragile associata a tremore/atassia (FXTAS)	15
1.5.2. Anemia sideroblastica con atassia legata all'X (XLSA/A)	17
1.6. Next Generation Sequencing (NGS)	19
2. Scopo della tesi	23
3. Materiali e metodi	24
3.1. Pazienti	24
3.2. Estrazione del DNA	24
3.3. Controllo di qualità e quantità del DNA	25
3.4. Elettroforesi su gel d'agarosio	26
3.5. Polymerase Chain Reaction (PCR)	27

3.6. Sequenziamento automatico con metodo Sanger	29
3.7. Next Generation Sequencing (NGS)	31
3.7.1. Creazione del pannello	32
3.7.2. Preparazione delle librerie	36
3.7.3. Quantizzazione delle librerie su Tape Station	40
3.7.4. Sequenziamento su piattaforma MiSeq Illumina	42
3.7.5. Analisi dei dati	44
4. Risultati	48
5. Discussione	58
6. Conclusioni	70
7. Prospettive future	72
8. Bibliografia	73

1.Introduzione

1.1 Atassia

L'atassia (dal greco "*ataxia*", ovvero "mancanza di ordine") è un disturbo che consiste nella mancanza di coordinazione motoria e difficoltà nell'esecuzione di movimenti volontari. Il centro della coordinazione muscolare è il cervelletto, il quale elabora gli impulsi portati ai muscoli dal midollo spinale e dai nervi periferici. L'atassia può quindi essere provocata da problemi sia a livello del midollo spinale sia a livello dei nervi periferici. Oltre alla mancanza di coordinazione tra i vari segmenti del corpo si possono associare altri disturbi come la perdita di coordinazione della motilità oculare, del linguaggio ed una frequente atrofia cerebellare (Jayadev and Bird, 2013). L'eziologia dell'atassia comprende cause tossiche, autoimmuni, paraneoplastiche, disfunzioni metaboliche e forme ereditarie.

1.2 Le atassie ereditarie

Il quadro clinico delle eredoatassie è molto eterogeneo. Alcune manifestazioni sono, tuttavia, caratteristiche di alcuni sottotipi di atassie ereditarie, consentendo in questi casi una diagnosi più mirata. A livello molecolare, le atassie ereditarie vedono coinvolte nella loro eziopatogenesi più di 50 geni, e possono essere trasmesse secondo tutti i tipi di modalità di trasmissione ereditaria, ovvero in modo autosomico dominante, autosomico recessivo, trasmissione legata all'X ed anche con trasmissione mitocondriale (Nèmeth et al., 2013).

1.3 Atassie cerebellari autosomiche dominanti (ADCA)

Le atassie cerebellari autosomiche dominanti (ADCA) sono in gran parte riferite alle atassie spinocerebellari (SCA), un gruppo di malattie neurologiche ereditarie clinicamente e geneticamente eterogeneo. Finora sono stati identificati 32 loci e mappati 22 geni per SCA: SCA1-8, SCA10-15, SCA17-23, SCA25-28, SCA30-31 e l'atrofia dentato-rubro-pallido-luisiana-DRPLA.

Le SCA possono essere causate da espansioni di triplette CAG in regioni codificanti di alcuni geni (SCA da espansione di poliglutammine), espansioni nucleotidiche in regioni non codificanti di geni (SCA da espansioni non codificanti) e da mutazioni convenzionali (SCA da mutazioni convenzionali).

	Gene	Mutazione	Sintomi chiave in aggiunta all'atassia cerebellare
<u>SCA da espansione di poliglutammine</u>			
SCA1	<i>ATXN1</i>	Ripetizione di CAG	Segni respiratori
SCA2	<i>ATXN2</i>	Ripetizione di CAG	Lenti movimenti oculari
SCA3	<i>ATXN3</i>	Ripetizione di CAG	-
SCA6	<i>CACNA1A</i>	Ripetizione di CAG	-
SCA7	<i>ATXN7</i>	Ripetizione di CAG	Perdita visiva
SCA17	<i>TBP</i>	Ripetizione di CAG	Demenza
DRPLA	<i>ATN1</i>	Ripetizione di CAG	Epilessia
<u>SCA da espansioni non codificanti</u>			
SCA8	<i>ATXN8, ATXN805</i>	Ripetizioni di CTG	-
SCA10	<i>ATXN10</i>	ATTCT	-
SCA12	<i>PPP2R28</i>	Ripetizioni di CAG	-
SCA31	<i>BEAN-TK2</i>	Ripetizioni di TGGAA	-

	Gene	Mutazione	Sintomi chiave in aggiunta all'atassia cerebellare
<u>SCA da mutazioni convenzionali</u>			
SCA5	<i>SPTBN2</i>	Missenso, delezione in frame	-
SCA11	<i>TTBK2</i>	Frameshift	-
SCA13	<i>KCNC3</i>	Missenso	Ritardo mentale
SCA14	<i>PRKCG</i>	Missenso	Mioclono
SCA15/16	<i>ITPR1</i>	Missenso, delezione	-
SCA20	-	Duplicazione	Disfonia
SCA27	<i>FGF14</i>	Missenso, frameshift	-
SCA28	<i>AFG3L2</i>	Missenso	Ptosi
<u>Loci</u>			
SCA4	-	-	Neuropatia sensoriale
SCA18	-	-	Neuropatia sensoriale
SCA19	-	-	-
SCA21	-	-	Ritardo mentale
SCA22	-	-	Ritardo mentale
SCA23	-	-	-
SCA25	-	-	Neuropatia sensoriale
SCA26	-	-	-
SCA20	-	-	-

Tabella 1 - Geni e mutazioni responsabili di ADCA.

Le SCA da espansione sono più frequenti e più gravi di quelle causate da mutazioni convenzionali, le quali però presentano spesso una più grave atrofia cerebellare (Figura 1).

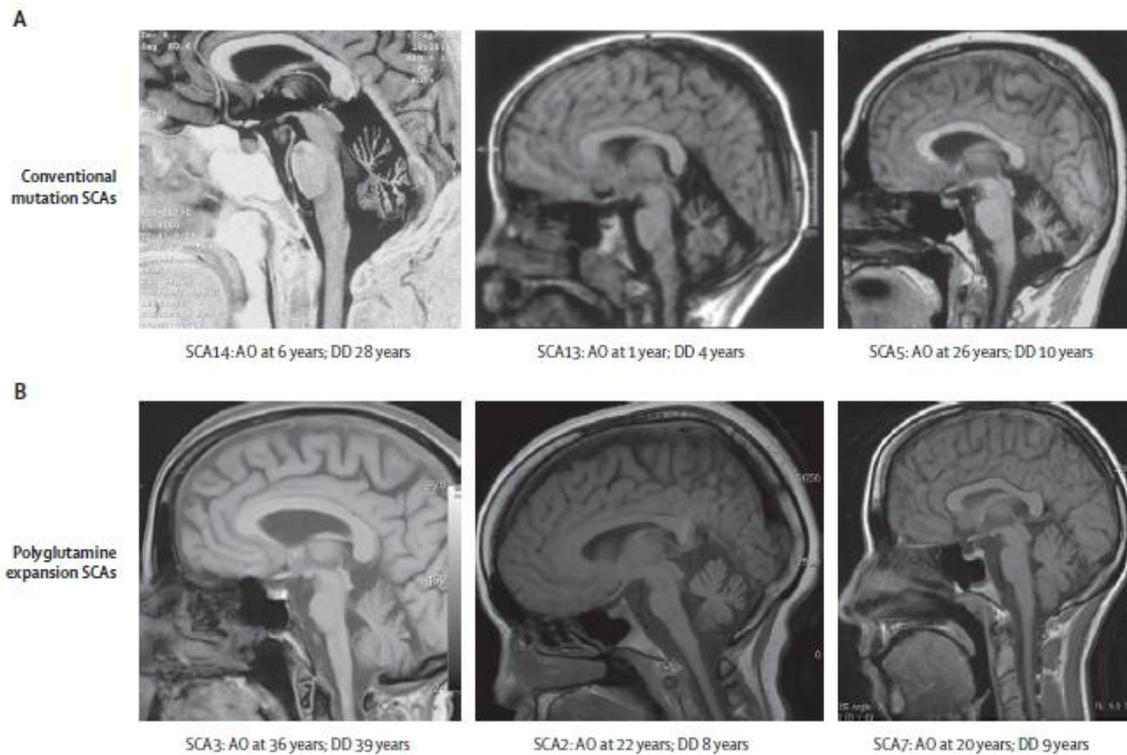


Figura 1 – Differenze del coinvolgimento cerebellare, ottenuto tramite Risonanza Magnetica Nucleare, tra SCA da espansioni di poliglutammine e SCA da mutazioni convenzionali. AO = Età di esordio. DD = Durata della malattia (modificato da Durr, 2010).

1.3.1 Atassie spinocerebellari (SCA) da espansioni di poliglutammine

Circa il 50% delle ADCA è rappresentata da espansione del trinucleotide CAG in regioni codificanti, determinando un allungamento anomalo di poliglutamina (poliQ) nelle proteine corrispondenti. Le ADCA da espansioni poliQ sono le uniche di cui si dispongono dati di epidemiologia molecolare (Figura 2). La prevalenza è stimata di circa 3 affetti su 100.000, sebbene alcuni dati siano riferiti a studi su aree geografiche ristrette. L'effetto fondatore contribuisce a creare differenze di distribuzione in varie regioni (Schols et al., 2004).

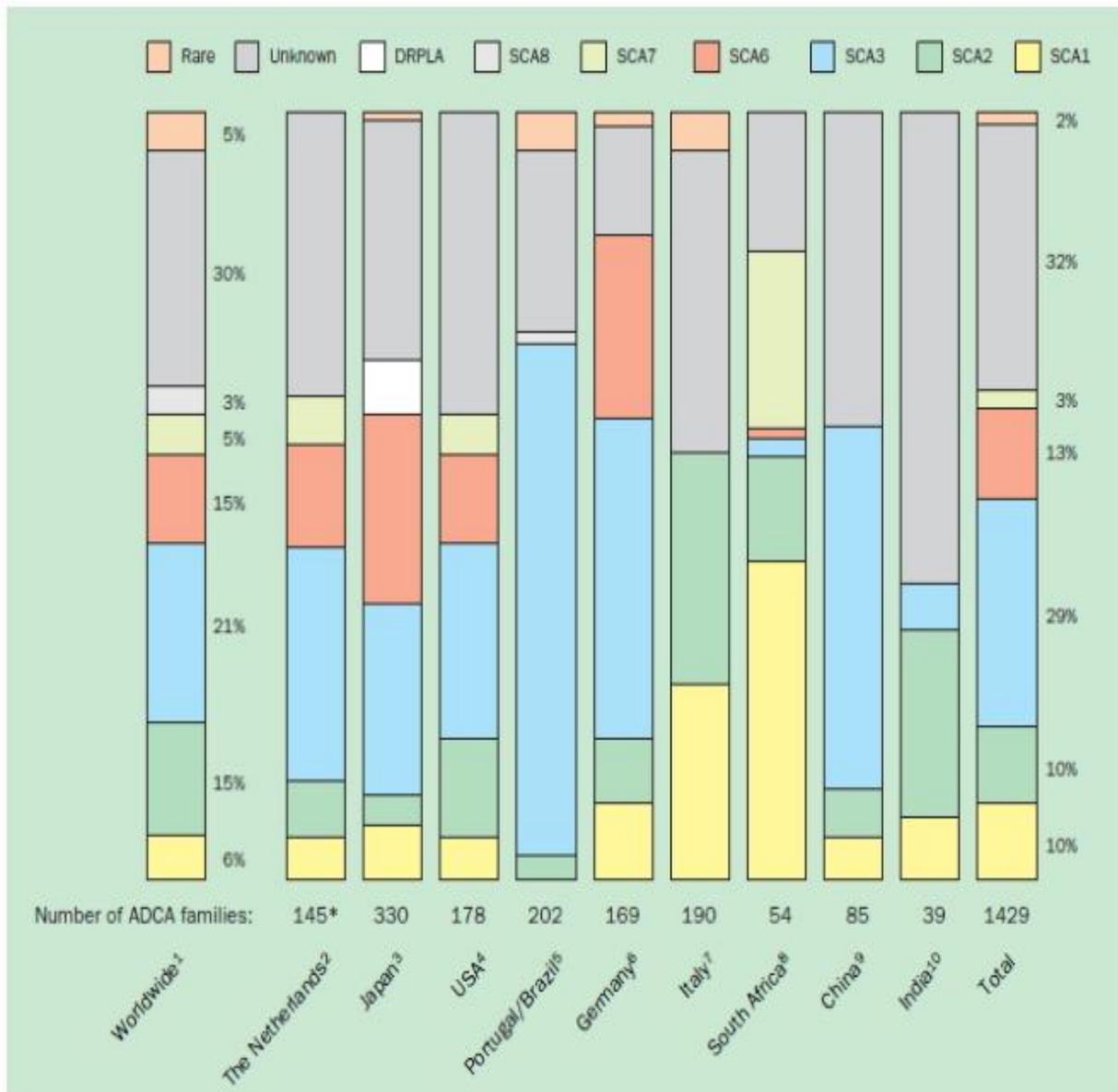


Figura 2 - Prevalenza di alcuni sottotipi di SCA. "Rare" mutazioni includono mutazioni in SCA10, SCA12, SCA14, SCA 17, e mutazioni puntiformi in FGF14 (modificato da Schols et al., 2004).

Le ADCA da espansioni poliQ sono caratterizzate da atassia cerebellare che comporta marcia instabile, postura impacciata e disartria (Durr, 2010), spesso accompagnata da altri segni neurologici come segni piramidali od extrapiramidali, oftalmoplegia e declino cognitivo (Harding, 1983). L'esordio avviene solitamente in età adulta, nella terza o quarta decade di vita. L'atrofia del cervelletto e del tronco encefalico sono le caratteristiche prominenti, ma ci sono altre strutture che possono essere affette, portando ad un grande spettro fenotipico (Yamada et al., 2008).

Le ADCA da espansione di poliQ condividono un meccanismo mutazionale con altre malattie da espansione di poliglutammine come la sindrome dell’X fragile e la malattia di Huntington (The Huntington’s Disease Collaborative Research Group, 1993). Questi disordini si manifestano quando viene oltrepassata una soglia, gene specifica, di ripetizioni CAG (Figura 3).

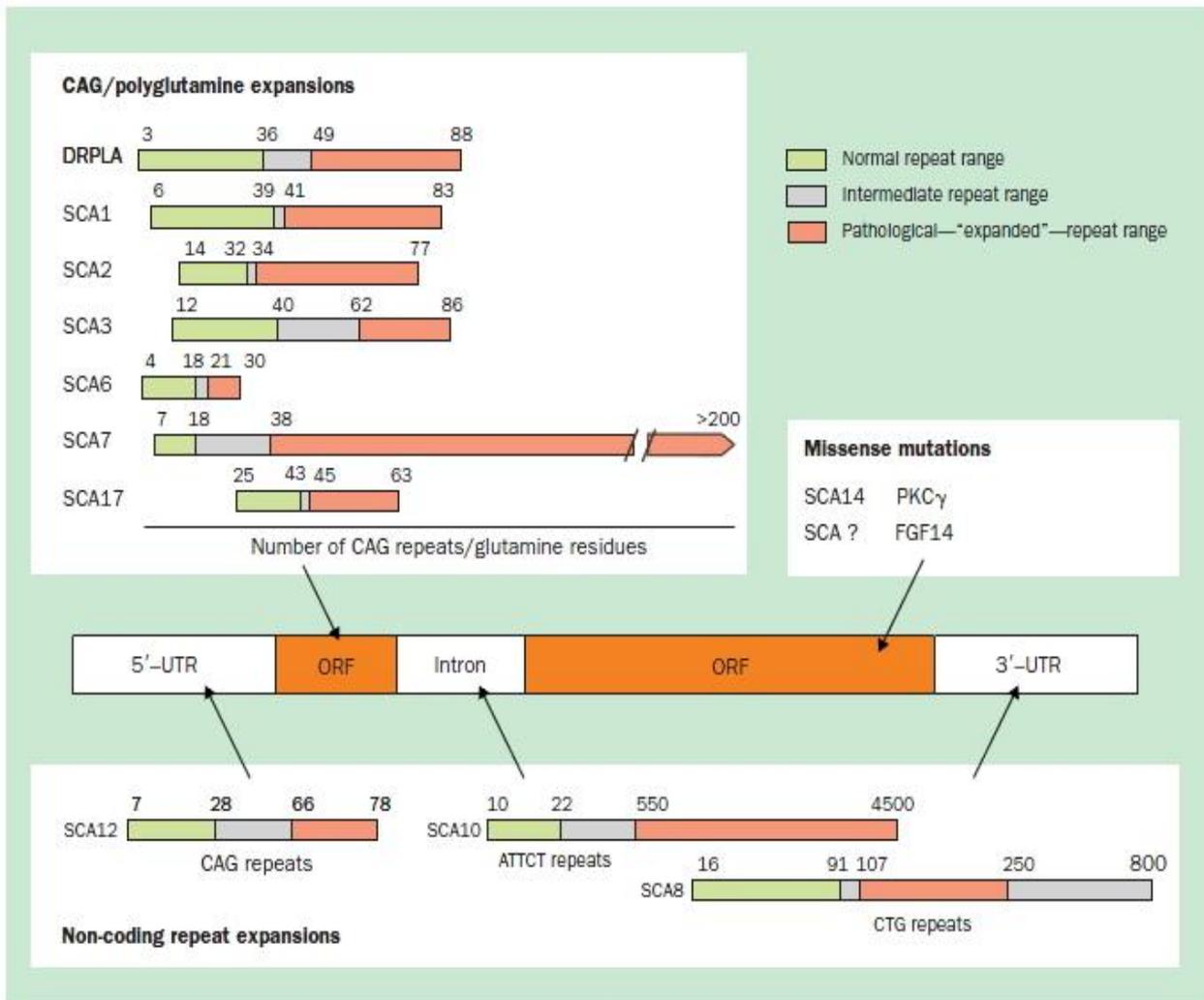


Figura 3 - Ripetizioni di CAG nelle principali forme di SCA (modificato da Schols et al., 2004).

I principali sottotipi di ADCA da espansione poliQ sono SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA17 e DRPLA (Tabella 2).

	Ripetizione piccole	Ripetizioni medie	Ripetizioni grandi	Ripetizioni molto grandi
SCA1	Sconosciuto	Atassia cerebellare, sindrome piramidale	Disordine simile a sclerosi laterale amiotrofica	Ritardo nello sviluppo
SCA2	Tremore posturale	Atassia cerebellare, riflessi diminuiti	Atassia cerebellare, corea, demenza	Mioclono, distonia, arresto cardiaco, degenerazione retinica
SCA3	Neuropatia assonale, parkinsonismo responsivo a DOPA	Atassia cerebellare, diplopia	Distonia, segni piramidali	Casi rari, distonia predominante
SCA6	Atassia episodica	Sconosciuto	Pochi segni associate dopo 10 anni del decorso della malattia	Sconosciuto
SCA7	Atassia cerebellare senza perdita visiva	Atassia cerebellare, degenerazione della macula	Perdita visiva prima della sindrome cerebellare	Arresto cardiaco
SCA17	Fenotipo simile alla malattia di Huntington, parkinsonismo	Atassia, demenza, corea, distonia, segni piramidali	Atassia, demenza, spasticità, epilessia	Ritardo della crescita
DRPLA	Corea, atassia, manifestazioni psichiatriche	Sconosciuto	Mioclono progressive, epilessia, ritardo dello sviluppo, atassia lieve	Epilessia mioclonica, corea, menomazioni cognitive

Tabella 2 - ADCA da espansione poliQ.

La correlazioni tra fenotipo e genotipo nelle ADCA da espansione di poliQ ha dimostrato che le differenze nella taglia delle ripetizioni contribuiscono alla variazione nella progressione della malattia e nella gravità della malattia ed inoltre contribuiscono ad alcune differenze cliniche nei pazienti.

Nelle SCA si osserva, come in altre patologie da espansione, il fenomeno dell'anticipazione

genetica, ossia un esordio più precoce ed un aumento della gravità della malattia nel passaggio da una generazione alla successiva. Il fenomeno dell'anticipazione genetica è spiegato dall'aumento del numero di ripetizioni CAG durante la trasmissione, determinato dall'instabilità degli alleli contenenti espansioni (Durr, 2010). Le espansioni di origine paterna sono più instabili durante la trasmissione e ciò sembra trovare spiegazione nell'elevato numero di divisioni mitotiche che precedono la gametogenesi maschile o da alterazioni nell'attività e nella concentrazione di proteine che riparano il DNA (Pearson et al., 2005).

L'effetto predominante di queste mutazioni è rappresentato da un guadagno di funzione delle proteine aberranti (Taroni, 2004), favorendo la capacità di aggregarsi con altre proteine. Nelle ADCA da poliQ ci sono, infatti, evidenze microscopiche di aggregati proteici nel citoplasma e nel nucleo dei neuroni di alcune regioni cerebrali. Nonostante l'esatto meccanismo patogenetico sia sconosciuto, è stato osservato che tali aggregati sequestrano proteine importanti per la funzione cellulare, come fattori di trascrizione, chaperonine e componenti dei sistemi di degradazione determinando alterazioni della regolazione genica, accumulo di proteine non degradate (Orr, 2012)

1.3.2 Atassie spinocerebellari (SCA) da espansioni non codificanti

Le SCA da espansioni in regioni non tradotte sono rappresentate da SCA8, SCA10, SCA12, SCA31 e SCA36.

SCA8 e SCA12 sono causate, rispettivamente, da espansione di CTG nella regione 3' non tradotta (UTR) del gene *SCA8*, la cui funzione non è stata del tutto delucidata (Day et al., 2000), e nel 5'UTR del gene *PPP2R2B*, coinvolto nella regolazione della morfogenesi mitocondriale (Dagda et al., 2008).

SCA10 è causata da un'espansione di un pentanucleotide ATTCT nell'introne 9 del gene *ATXN10*, la cui funzione sembra correlata con anomalie nella struttura della cromatina (Keren et al., 2010).

SCA10 è caratterizzata da una forma di atassia con lenta progressività.

SCA31 è causata da un'espansione di un pentanucleotide TGGAA nell'introne del gene timidina-chinasi 2 (*TK2*). Questa forma ha un esordio tardivo associato a sordità.

SCA36 è causata da espansione del tratto GGCCTG nel primo introne del gene *NOP56*, codificante per la proteina nucleolare 56 coinvolta nella biogenesi di RNA ribosomiale (Garcia-Murias et al., 2012)

Solo in SCA10 e SCA31 il grado di espansione correla negativamente con l'età di esordio della malattia e il fenomeno dell'anticipazione genetica con trasmissione paterna è stato riportato per SCA31.

Per le atassie spinocerebellari da espansioni non codificanti è stato ipotizzato un meccanismo tossico di guadagno di funzione di RNA. Le lunghe molecole di RNA, prodotte in seguito all'espansione, formerebbero delle foci di RNA nelle quali rimarrebbero sequestrate importanti proteine "*RNA-binding*" con conseguente alterazione dei processi di trascrizione e di splicing (Todd et al., 2010).

1.3.3 Atassie spinocerebellari (SCA) da mutazioni convenzionali

Solo in anni più recenti sono state, identificate mutazioni convenzionali (mutazioni puntiformi, delezioni, duplicazioni) in varie forme di ADCA. Grazie alle nuove tecniche di sequenziamento questo gruppo di ADCA è in continua crescita. Le SCA da mutazioni convenzionali sono molto meno comuni rispetto a quelle da espansione, spesso si tratta di mutazioni private riscontrate in poche famiglie, e per questo motivo non è possibile, attualmente effettuare una correlazione tra fenotipo e genotipo (Durr, 2010).

In molte di queste forme si osserva un'alterazione dei "*pathways*" di segnale neuronale dovuta a mutazioni in geni codificanti canali del potassio (Kv3.3 per SCA13 e Kv4.3 per SCA19/22)(Herman-

Bert et al., 2000), trasportatori del Ca^{2+} (IP3R in SCA15/16)(Marelli et al., 2011), proteine responsabili della stabilizzazione dei recettori/canali nella membrana plasmatica (β III-spettrina in SCA5 (Stevanin et al., 1999) e FGF14 in SCA27 (Brusse et al., 2006)), proteine coinvolte nella trasduzione del segnale (*TTBK2* e PKC γ in SCA11 (Houlden et al., 2007) e SCA14 (Chen DH et al., 2003)) o proteine coinvolte nel metabolismo energetico mitocondriale (*AFG3L2* in SCA28 (Di Bella D et al., 2010)).

La gran parte di questi geni sono stati identificati recentemente e per questo motivo il meccanismo patogenetico non è del tutto compreso; le proteine codificate da questi geni mostrano una sostanziale diversità funzionale ma è tutt'ora incerto se tutte convergano su comuni pathway funzionali.

1.4 Atassie cerebellari autosomiche recessive (ARCA)

Le atassie spinocerebellari autosomiche recessive (ARCA) comprendono anch'esse un gruppo eterogeneo di malattie neurodegenerative. Il fenotipo può variare da sindromi cerebellari a neuropatie sensorio-motorie, disturbi oftalmologici, movimenti involontari, convulsioni, anomalie cutanee e scheletriche. La patogenesi molecolare varia da: difetti di replicazione, trascrizione, riparazione, processamento e trasporto di DNA, disturbi mitocondriali, alterazioni della catena respiratoria, metabolismo lipidico, trasporto e ripiegamento delle proteine (Fogel and Perlman, 2007).

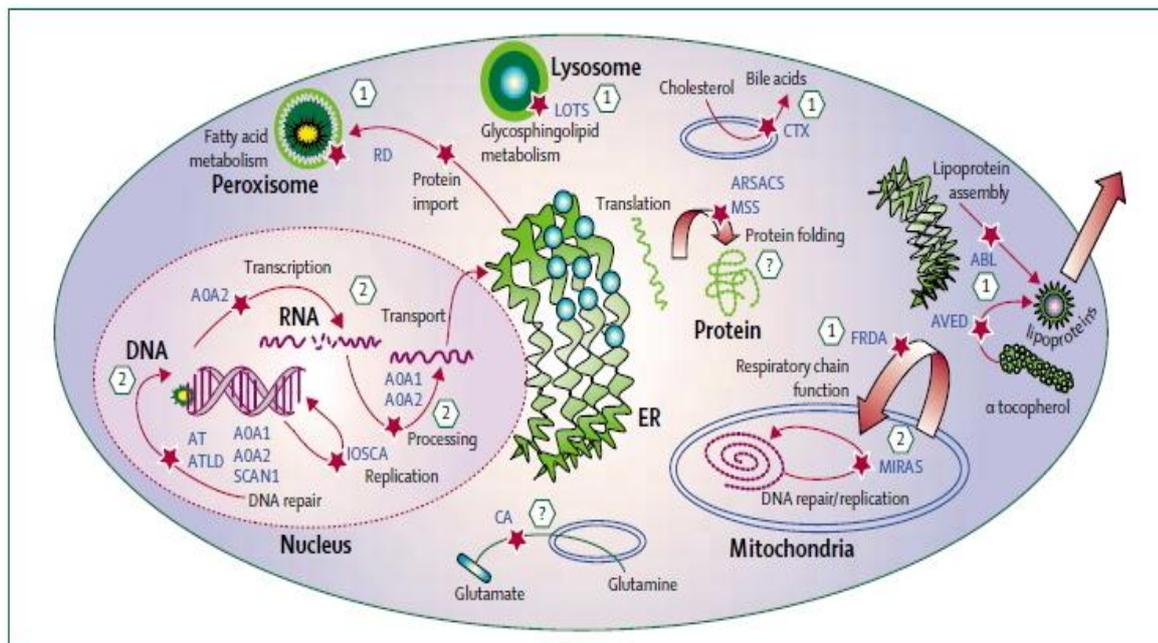


Figura 4 - Patogenesi molecolare delle atassie autosomiche recessive (modificato da Fogel and Perlman, 2007).

La maggior parte di ARCA hanno esordio precoce, di solito prima dei 20 anni di età (Harding, 1983). L'età di esordio non è, tuttavia, un criterio sempre applicabile nell'indirizzare la diagnosi, l'ataxia di Friedreich (FRDA), infatti, può avere un esordio anche in età adulta. La caratteristica principale in queste forme è l'ataxia spinocerebellare, che coinvolge cervelletto, tronco encefalico e fasci spinocerebellari, presentandosi con scarso equilibrio, perdita della coordinazione negli arti, tremore e disartria (Perlman, 2004), generalmente associate a neuropatia periferica. La presenza o l'assenza di profondi riflessi tendinei (Harding, 1981), così come la presenza di coinvolgimenti extra-cerebrali (Di Donato et al., 2001), può risultare molto utile nella diagnosi.

Le ARCA possono essere suddivise in "Atassia di Friedreich e malattie similari", di cui l'ataxia di Friedreich è ovviamente la più comune, "Disordini simili all'ataxia di Friedreich con atrofia cerebellare" e "Atassie ad esordio precoce con atrofia cerebellare", dove l'ataxia-telangiectasia è la più comune (Tabella 3).

	Gene/Proteina	Gene	Locus	Funzione della proteina
<u>Disordini simili all'atassia di Friedreich</u>				
Atassia di Friedreich (FRDA)	Fratassina	<i>FXN</i>	9q13	Metabolismo del ferro mitocondriale
Atassia con deficienza di vitamina E	Proteina trasportatrice dell' α -tocoferolo	<i>TTPA</i>	8q13.1-13.3	Omeostasi della vitamina E
Abetalipoproteinaemia	Proteina trasportatrice dei trigliceridi microsomiali	<i>MTP</i>	4q22-24	Metabolismo delle lipoproteine
Malattia di Refsum	Fitanoil-CoA idrossilasi Perossina 7	<i>PHYH</i> <i>PEX7</i>	10pter-11.2 6q21-22.2	Proteina dell'importazione perossisomale
<u>Disordini simili all'atassia di Friedreich con atrofia cerebellare</u>				
Malattia di Tay-Sachs	B-esosaminidasi A	<i>HEXA</i>	15q23-24	Metabolismo glicosfingolipidico
Xantomatosi cerebrotendinea	Sterolo 27-idrossilasi	<i>CYP27</i>	2q33-ter	Sintesi degli acidi biliari
Disordini della DNA polimerasi γ	DNA polimerasi γ	<i>POLG</i>	15q22-26	Riparazione e replicazione del DNA mitocondriale
Atassia spinocerebellare con neuropatia assonale	Tirosil-DNA fosfodiesterasi 1	<i>TDP1</i>	14q31-32	Riparazione del DNA
<u>Atassia ad esordio precoce con atrofia cerebellare</u>				
Atassia telangiectasia	Atassia-telangiectasia mutata	<i>ATM</i>	11q22-23	Risposta al danno del DNA
Disordine simile all'atassia telangiectasia	Ricombinazione e meiotica 11	<i>MRE11</i>	11q21	Risposta al danno del DNA
Atassia con aprassia oculomotoria di tipo 1	Apratassina	<i>APTX</i>	9p13	Riparazione del DNA, processamento dell'RNA
Atassia con aprassia oculomotoria di tipo 2	Senatassina	<i>SETX</i>	9q34	Possibile riparazione del DNA, trascrizione del DNA, processamento dell'RNA
Atassia di Charlevoix-Saguenay autosomica recessiva	Sacsina	<i>SACS</i>	13q11	Possibile ripiegamento delle proteine

	Gene/Proteina	Gene	Locus	Funzione della proteina
Atassia spinocerebellare ad esordio infantile	Twinkle, twinkly	<i>C10orf2</i>	10q24	Replicazione del DNA
Atassia di Cayman	Caytassina	<i>ATCAY</i>	19p13.3	Possibile metabolismo dei neurotrasmettitori
Sindrome di Marinesco-Sjogren	Proteina BiP-associata	<i>SIL1</i>	5q31	Possibile ripiegamento delle proteine

Tabella 3 - Caratterizzazione molecolare di ARCA.

1.4.1 Atassia di Friedreich (FRDA)

L'atassia di Friedreich (FRDA) è la più comune tra le ARCA ed in generale tra le eredoatassie, con una prevalenza di circa 1:30000/50000 nella maggior parte delle popolazioni (Pandolfo, 1999). L'età di esordio è tipicamente tra i 5 e i 25 anni di età. Questa malattia è caratterizzata da una progressiva e precoce atassia della marcia e degli arti, disartria, perdita del senso di vibrazione e propiocezione, areflessia, nistagmo e segni piramidali, oltre ad altre complicanze sistemiche come cardiomiopatia, diabete mellito e scoliosi (Alper and Narayanan, 2003). Pur essendo una malattia da espansione, FRDA non presenta la progressiva atrofia cerebellare tipica nelle ADCA (Schols et al., 2004).

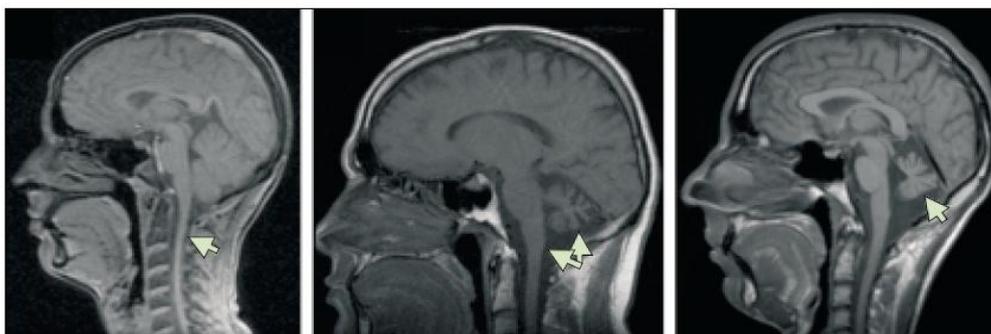


Figura 5 - Caratteristiche di neuroimaging delle atassie spinocerebellari autosomiche recessive. A sinistra è mostrato un paziente con atassia di Friedreich, al centro uno con atassia telangiectasia, a destra uno affetto da atassia con aprassia oculomotora di tipo 2 (modificato da Fogel and Perlman, 2007).

Nel 98% dei casi, la malattia è causata da espansione di triplette di GAA nel primo introne del gene *FXN*, localizzato sul cromosoma 9q13, e codificante per fratassina (Campuzano et al., 1996). Il numero di ripetizioni GAA può portare alla formazione di strutture “triplex” di DNA che impediscono la trascrizione del gene e ne limitano la produzione della proteina (Bidichandani et al., 1998). La correlazione inversa tra età di esordio e gravità della malattia con la grandezza delle espansioni, da 70-90 fino a 1000 ripetizioni GAA (normalità è minore di 40 ripetizioni GAA), sembra essere causata da espressione residua proteica dell'allele con le espansioni GAA più piccole. In una piccola percentuale di casi, tra il 2 ed il 4%, FRDA può essere causata da mutazioni puntiformi in *FXN* (Pandolfo, 1999). La fratassina è una proteina mitocondriale (Campuzano et al., 1997); ci sono evidenze che suggeriscono che la perdita della fratassina danneggi sia il trasporto mitocondriale di ferro sia le funzioni della catena respiratoria, aumentando lo stress ossidativo ed il danno cellulare (Bradley et al., 2000).

1.4.2 Atassia-telangiectasia (AT)

L'atassia-telangiectasia (AT) è la malattia-prototipo delle atassie ad esordio precoce con atrofia cerebellare. I pazienti con AT presentano una disfunzione cerebellare che inizia sin dal secondo-terzo anno di età ed è gravemente progressiva (Ball and Xiao, 2005). L'atassia-telangiectasia si presenta con aprassia oculomotoria (Chun and Gatti, 2004), atrofia cerebellare, telangiectasia oculare, gradi variabili di immunodeficienza ed un aumentato rischio per vari tipi di cancro. La prevalenza è variabile, negli Stati Uniti si stima che sia maggiore di 1:40000. Alte concentrazioni nel siero di α -fetoproteina costituiscono un marcatore utile per indirizzare la diagnosi (Ball and Xiao, 2005).

L'atassia-telangiectasia è causata da una mutazione nel gene *ATM*, localizzato sul cromosoma

11q22-23 (Taylor and Byrd, 2005), ed il suo prodotto è una serina/treonina chinasi coinvolta nella risposta al danno del DNA (McKinnon, 2004), in particolare nella cascata di trasduzione del segnale attivata dalla rottura del DNA a doppio filamento. La perdita della funzione della proteina sembra disgregare la via che conduce o alla regolazione del “*checkpoint*” del ciclo cellulare o all'apoptosi, provocando così instabilità genomica che plausibilmente dà luogo alla malattia (Shiloh, 2006).

1.5 Atassie X-linked

Tra le atassie legate al cromosoma X, le più comuni sono la sindrome dell'X-fragile associata a tremore/atassia (FXTAS), causata da espansione di triplette nucleotidiche CCG nel gene *FMR1*, e l'anemia sideroblastica legata all'X associata ad atassia, causata da mutazioni convenzionali nel gene *ABCB7* (Jayadev and Bird, 2013).

1.5.1 Sindrome dell'X-fragile associata a tremore/atassia (FXTAS)

La sindrome dell'X-fragile associata a tremore/atassia (FXTAS) è una malattia neurodegenerativa ad esordio tardivo che colpisce alcuni ma non tutti i portatori di piccole espansioni di ripetizioni CCG non codificanti (55-200 ripetizioni, premutazione) nel 5'UTR del gene dell'X fragile (*FMR1*).

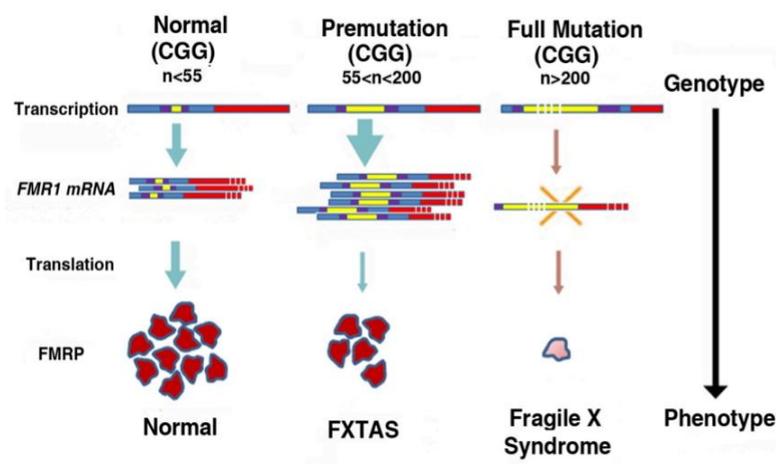


Figura 6 - Livelli di espansione CGG in *FMR1* (modificato da Hagerman and Hagerman, 2015).

Normalmente nel gene *FMR1* queste ripetizioni sono presenti in un numero variabile da 6 a 55 volte mentre nelle persone affette dalla Sindrome dell'X-fragile sono ripetute più di 200 volte (Figura 6). Le principali caratteristiche della FXTAS includono tremore non a riposo, atassia cerebellare, Parkinsonismo, deficit di memoria, atrofia cerebrale con disordini della materia bianca, e declino cognitivo.

Le caratteristiche diagnostiche standard della FXTAS richiedono una premutazione in un allele per *FMR1* ed inoltre una o più caratteristiche tra tremore non a riposo, atassia cerebellare, alterazione della materia bianca nei peduncoli cerebellari medi (Brunberg et al., 2002). Sebbene questa malattia fosse originariamente considerata essere confinata solo al range di espansione della premutazione, sono stati identificati, recentemente, casi di FXTAS con espansione nella cosiddetta "zona-grigia" (45-54 ripetizioni di CGG) e, in casi rari, con un allele completamente mutato (più di 200 ripetizioni) non metilato o mosaico. (Hall D et al., 2012).

Nei pazienti affetti da FXTAS si riscontrano frequentemente anche disordine alterazioni immunitarie, ipertensione, disfunzione autonoma, apnea nel sonno, sordità ed emicrania (Hagerman and Hagerman, 2013).

La caratteristica singolare della FXTAS, relativamente al suo meccanismo, è che l'espressione fenotipica è limitata ai portatori di alleli premutati (raramente agli individui con mosaicismo di taglia o metilazione (Loesch et al., 2012)) dove *FMR1* è trascrizionalmente attivo. La necessità della presenza di espressione del mRNA di *FMR1* ha portato ad ipotizzare un meccanismo patogenetico (Figura 7) che coinvolge un guadagno di funzione tossico dell'mRNA con espansione di ripetizioni CGG (Greco et al., 2002). Il guadagno di funzione avviene tramite sequestro delle ripetizioni CGG di uno o più proteine, in modo da portare un danno almeno parziale della loro normale funzione cellulare. Ad oggi non è stata trovata una proteina che singolarmente possa essere responsabile di tutto lo spettro fenotipico di FXTAS.

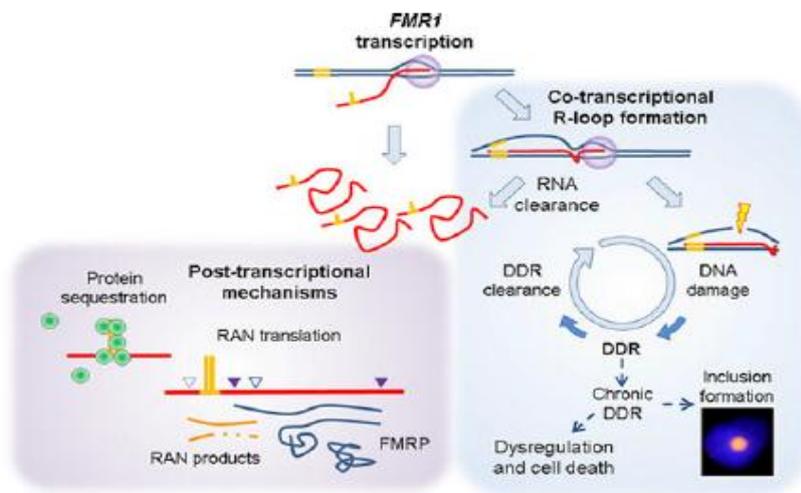


Figura 7 - Possibili meccanismi in atto nella FXTAS (modificato da Hagerman and Hagerman, 2015).

Secondo un'altra ipotesi, le espansioni di CGG porterebbero ad una traduzione aberrante e a codoni non-AUG (RAN), dove i piccoli peptidi prodotti risultano tossici. Oltre a meccanismi post-trascrizionali, anche eventi co-trascrizionali (come la formazione di R-loop) possono portare a tossicità cellulare, in questo caso attraverso la mancata riparazione di danno del DNA su o vicino l'R-loop. La mancata riparazione può anche portare ad un "signaling" continuo di reclutamento di proteine riparatrici, e ciò può portare a formazione di inclusioni (Hagerman and Hagerman, 2015)

1.5.2 Anemia sideroblastica con atassia legata all'X (XLSA/A)

L'anemia sideroblastica con atassia legata all'X (XLSA/A) è una rara causa di atassia ad esordio precoce, spesso trascurata a causa della sua lieve componente anemica asintomatica (D'Hooghe et al., 2012). Le anemie sideroblastiche sono caratterizzate dalla presenza di sideroblasti ad anello nel midollo osseo a causa di un patologico sovraccarico di ferro nei mitocondri, sia nei precursori eritroidi che negli eritrociti maturi (Camaschella, 2008). Il difetto genetico rilevato in questa patologia risiede in mutazioni nel gene *ABCB7*, nel cromosoma Xq12-q13, che codifica per una proteina trasportatrice "ATP-binding cassette" mitocondriale. La malattia è stata riscontrata finora

in poche famiglie, ognuna con una diversa mutazione missenso (D'Hooghe et al., 2012).

Le principali caratteristiche neurologiche della XLSA/A, oltre all'atassia e all'anemia sideroblastica, sono disartria, lieve spasticità, ipoplasia o atrofia cerebellare (Bekri et al., 2000).

Il gene *ABCB7* è altamente espresso non solo nel midollo osseo ma anche nel cervelletto, spiegando il fenotipo clinico (Allikmets et al., 1999). L'atassia osservata in XLSA-A potrebbe essere correlata al danno mediato dall'accumulo del ferro nel mitocondrio o all'alterazione dell'omeostasi del ferro nelle cellule neurali (Napier et al., 2005).

Il substrato trasportato dalla proteina *ABCB7* è sconosciuto. Inizialmente, si pensava che *ABCB7* fosse coinvolta nel trasporto dell'eme dal mitocondrio al citosol (Shimada et al., 1998)(Figura 8). Un possibile meccanismo di *ABCB7* prevede una funzione regolatoria (come un centro ferro-zolfo intatto o un intermedio dell'eme) segnalando alla cellula il contenuto di ferro nel mitocondrio. Quando le vie di sintesi dei centri ferro-zolfo o dell'eme sono perturbate, il compartimento citosolico percepisce dal mitocondrio, erroneamente, un segnale di deficienza di ferro e rispondere aumentando il carico di ferro nel mitocondrio, sovraccaricandolo (Ye and Rouault, 2010).

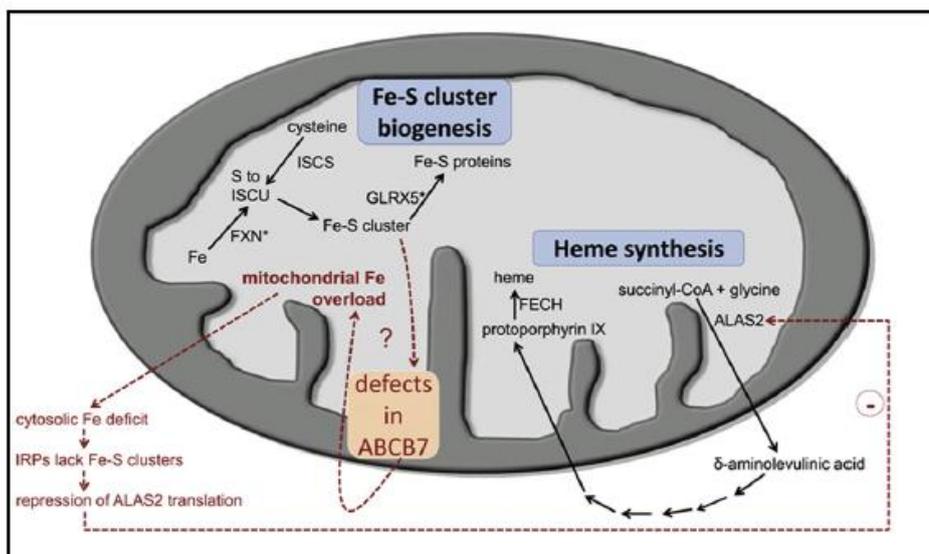


Figura 8 - Meccanismo molecolare legato alla XLSA/A (modificato da Hagerman and Hagerman, 2015).

1.6 Next Generation Sequencing (NGS)

Next Generation Sequencing (NGS) è una nuova tecnologia di sequenziamento che ha rivoluzionato l'approccio per identificare le cause genetiche di malattie ereditarie rare. La prima applicazione di successo di NGS ha portato all'identificazione del gene *DHODH*, responsabile della sindrome di Miller (Ng et al. 2010). L'avvento della tecnologia NGS ha condotto, dal 2010 ad oggi, ad una rapida ascesa nell'identificazione di nuovi geni malattia, anche in casi dove il tradizionale approccio di analisi di linkage sarebbe risultato difficoltoso (Isidor et al., 2011; Wang et al., 2010). Negli ultimi anni, il sequenziamento del genoma (WGS, Whole Genome Sequencing) ed il sequenziamento dell'esoma (WES, Whole Exome Sequencing) sono stati riconosciuti come test universalmente validi nella scoperta di nuove cause in famiglie con malattie a trasmissione Mendeliana (Yu et al., 2012), riducendo i tempi di analisi e costi per campione, rispetto al sequenziamento tradizionale del DNA con metodo Sanger, una procedura lunga e costosa.

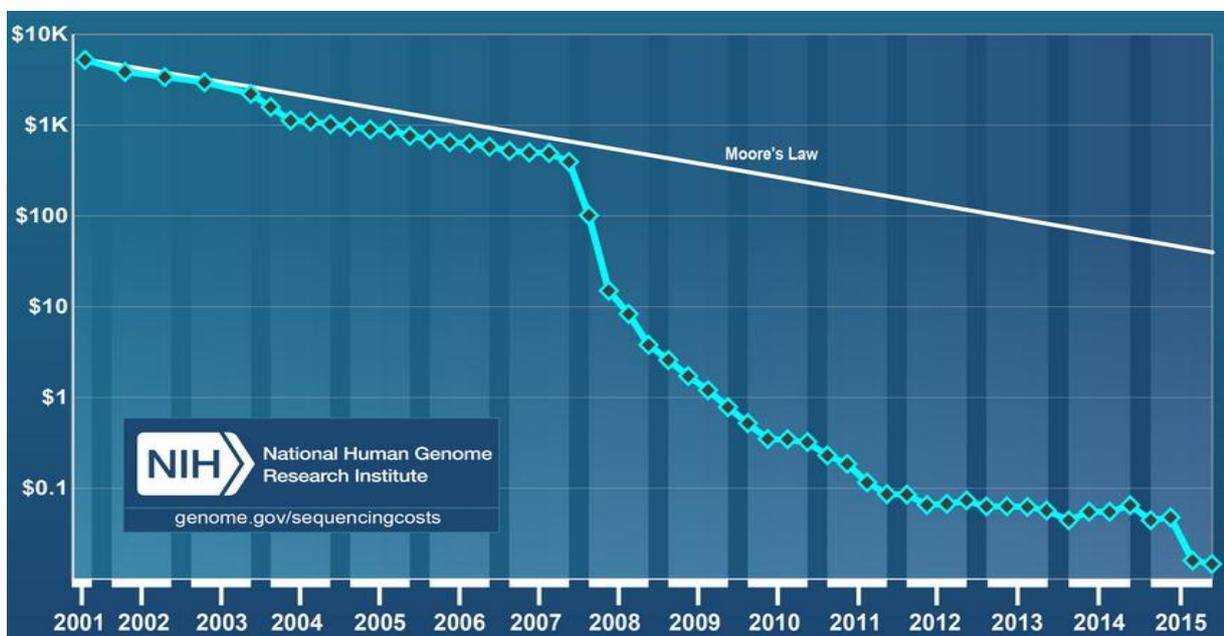


Figura 9 - Cambiamento del costo per megabase grezza di sequenza di DNA dal 2001 ad oggi (modificato da www.genome.gov).

Tuttavia il trasferimento di WGS nella pratica clinica appare ancora difficile sia per i costi ancora troppo elevati sia per la mole di dati risultante dal sequenziamento dell'intero genoma, che richiede complesse analisi di tipo bioinformatico a cui si associa la difficoltà nell'attribuire un significato funzionale a molte delle varianti rilevate. WGS trova attualmente la sua maggiore applicabilità nel campo della ricerca.

Un'alternativa valida al WGS, nella diagnosi molecolare, è rappresentata da WES. In generale il sequenziamento dell'esoma consente di ridurre i costi ed i tempi di sequenziamento senza che le probabilità di successo siano significativamente ridotte. Il limite principale dello studio dell'esoma è, chiaramente, la mancata determinazione di varianti presenti nella parte non codificante, così come di variazioni del numero di copie e variazioni strutturali (Gilissen et al., 2012).

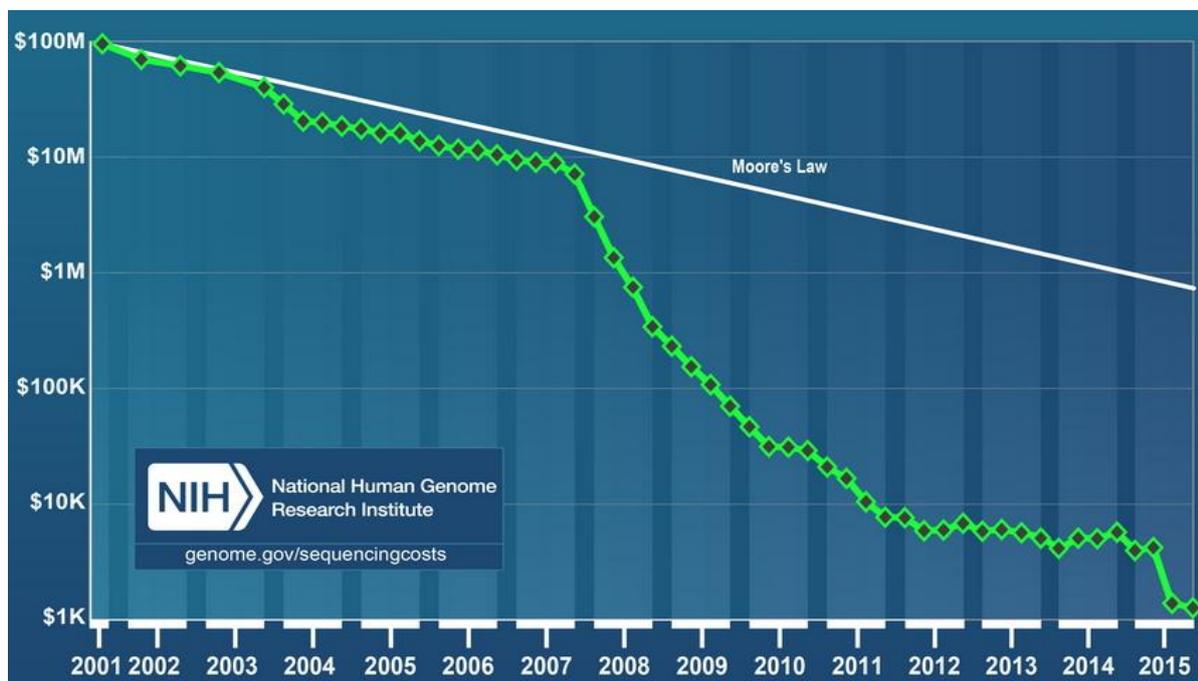


Figura 10 - Cambiamento del costo per genoma dal 2001 ad oggi (www.genome.gov).

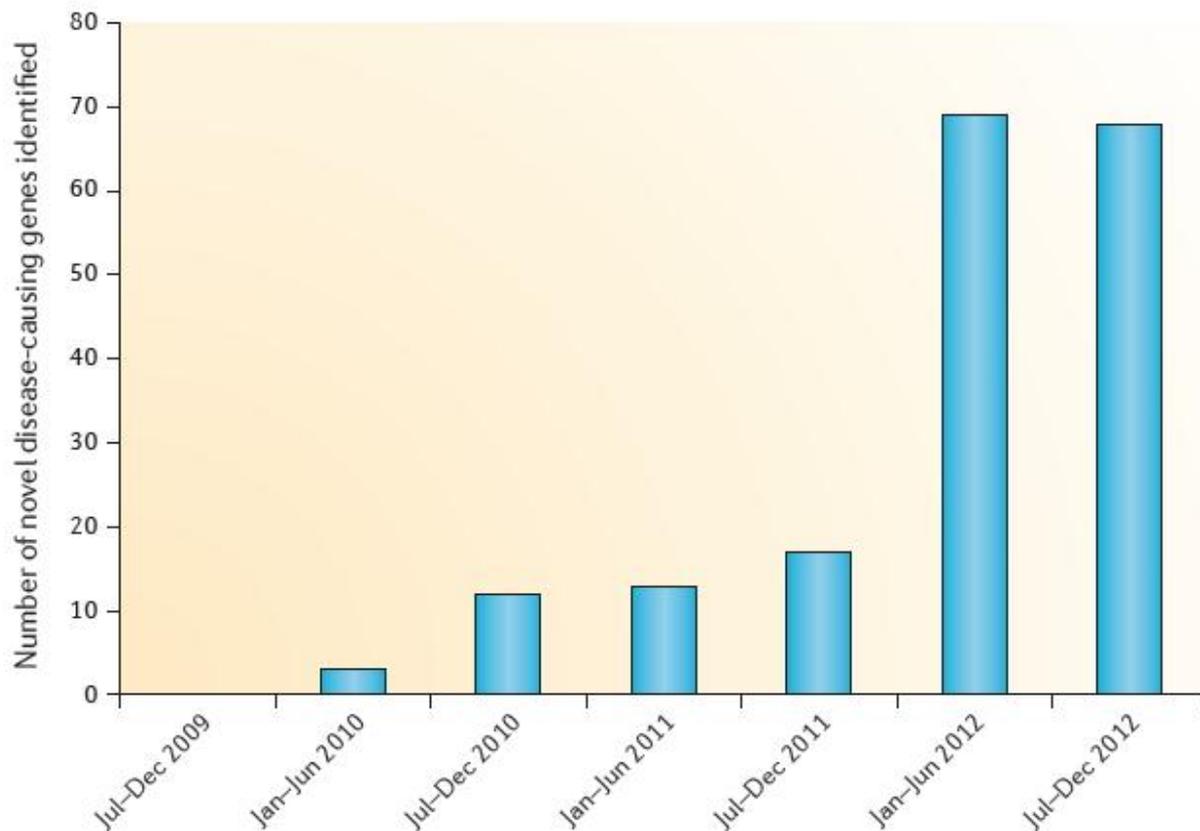


Figura 11 - Ritmo di scoperta di nuovi geni causanti malattie rare usando la Whole Exome Sequencing (WES)(Boycott et al., 2013).

Inoltre, l'uso di WGS/WES nella pratica clinica è ancora oggetto di discussione riguardo ai problemi etici legati all'identificazione di mutazioni patogenetiche in geni non coinvolti nella malattia del paziente, definiti "incidental findings". La seconda limitazione deriva dal fatto che la copertura delle regioni sequenziate è solitamente troppo bassa per la diagnosi clinica (Johnston et al., 2012). La copertura totale tende ad oscillare tra l'85 ed il 95%. Questo significa che un particolare gene di interesse potrebbe non essere coperto o esserlo parzialmente. La ragione risiede nella scarsa prestazione delle probe di cattura causata da regioni ricche in GC, omologia di sequenza, o sequenze ripetute. Un approccio più mirato invece permette una copertura molto più alta o addirittura completa.

Un'alternativa all'utilizzo di WES nella diagnosi molecolare è rappresentata dalla creazione di

pannelli di geni implicati o correlati con la malattia (Berglund et al., 2013) nei quali si ha un'amplificazione di molteplici geni in una singola provetta con sufficiente copertura delle sequenze ottenute. Il vantaggio rispetto a WGS e WES è una migliore amplificazione nelle regioni codificanti dei geni malattia, una maggiore profondità di analisi ed una maggiore percentuale di regioni genetiche coperte, ed un più limitato ma focalizzato numero di varianti malattia da associare al quadro clinico del paziente.

2. Scopo della tesi

La grande eterogenicità genica delle atassie ha reso fino ad oggi l'individuazione del gene causativo mediante sequenziamento tradizionale del DNA (metodo Sanger) una procedura lunga, parziale ed estremamente costosa. L'applicazione del sequenziamento massivo di nuova generazione, consentendo di analizzare una grande quantità di geni contemporaneamente, può facilitare l'individuazione di mutazioni patogenetiche, riducendo tempi di analisi e costi per campione.

In questa tesi è stato messo a punto un pannello di sequenziamento massivo targettato a 82 geni, direttamente implicati o correlati con le eredoatassie cerebellari. Questo pannello è stato applicato allo studio molecolare di 30 pazienti affetti da eredoatassia, e non ancora diagnosticati dal punto di vista molecolare. In tutti i pazienti erano state già escluse le forme più frequenti di malattia.

Lo sviluppo di una metodica di sequenziamento targettato di nuova generazione amplia la possibilità di comprendere le cause genetiche delle eredoatassie, di identificare nuove mutazioni, e permette di definire nuovi fenotipi clinici offrendo una più completa correlazione genotipo-fenotipo.

3. Materiali e metodi

3.1 Pazienti

Per questa tesi sono stati analizzati 30 pazienti affetti da eredoatassia con atrofia cerebellare, seguiti presso UOC Medicina Molecolare Malattie Neurodegenerative e Neuromuscolari - IRCCS Fondazione Stella Maris di Pisa ed in collaborazione con UO Neurologia, Università Federico II di Napoli. Lo studio genetico è stato eseguito previo consenso informato per l'accettazione delle indagini molecolari. I pazienti sono stati selezionati per questo studio dopo che erano state escluse le altre forme di atassia ed espansioni di triplette associate con le forme più comuni di SCA e FRDA.

3.2 Estrazione del DNA

I campioni di DNA sono stati estratti da leucociti ottenuti da prelievo di sangue periferico, trattato con l'anticoagulante etilendiamminotetracetico (EDTA). L'estrazione del DNA è stata effettuata utilizzando *Magna pure compact* (Roche), un sistema automatizzato per isolamento di acidi nucleici. Nel processo di purifica del DNA le operazioni basiche dello strumento sono le seguenti:

- Il campione di sangue viene caricato dall'operatore nell'apposita cartuccia alla quantità richiesta dal programma scelto (400 µl)
- Una volta avviata l'operazione al campione viene aggiunta una soluzione contenente un buffer di lisi per rompere le membrane cellulari e la proteinasi K per eliminare la componente proteica
- Segue l'inserimento di biglie di silice magnetiche all'interno delle provette, sulla cui superficie si legano le molecole di DNA per adsorbimento
- Successivamente si ha la separazione magnetica dei complessi biglia-DNA dalla restante miscela a cui seguono una serie di lavaggi in sequenza per rimuovere i residui cellulari e

altre componenti aspecifiche

- Il DNA viene infine eluito all'interno di nuove provette in un volume di 100 μl

3.3 Controllo di qualità e quantità del DNA

Il DNA genomico, una volta estratto, viene stato sottoposto a controlli di qualità che prevedevano una valutazione di DNA ad alto peso molecolare, non degradato, attraverso la visualizzazione di 2 μl in una corsa elettroforetica su gel di agarosio al 1,5%, ed una stima della concentrazione con Qubit. La concentrazione viene misurata con il *Qubit dsDNA Broad Range Assay* (Invitrogen). In questa metodologia, viene utilizzata, per ciascun campione, una soluzione costituita da 1 μl di *Qubit Reagent* e 199 μl di *Qubit Buffer*. A tale soluzione si aggiunge 1 μl di DNA, relativo a ciascun campione, e si effettua la lettura su Qubit, previa lettura effettuata su standard interni.

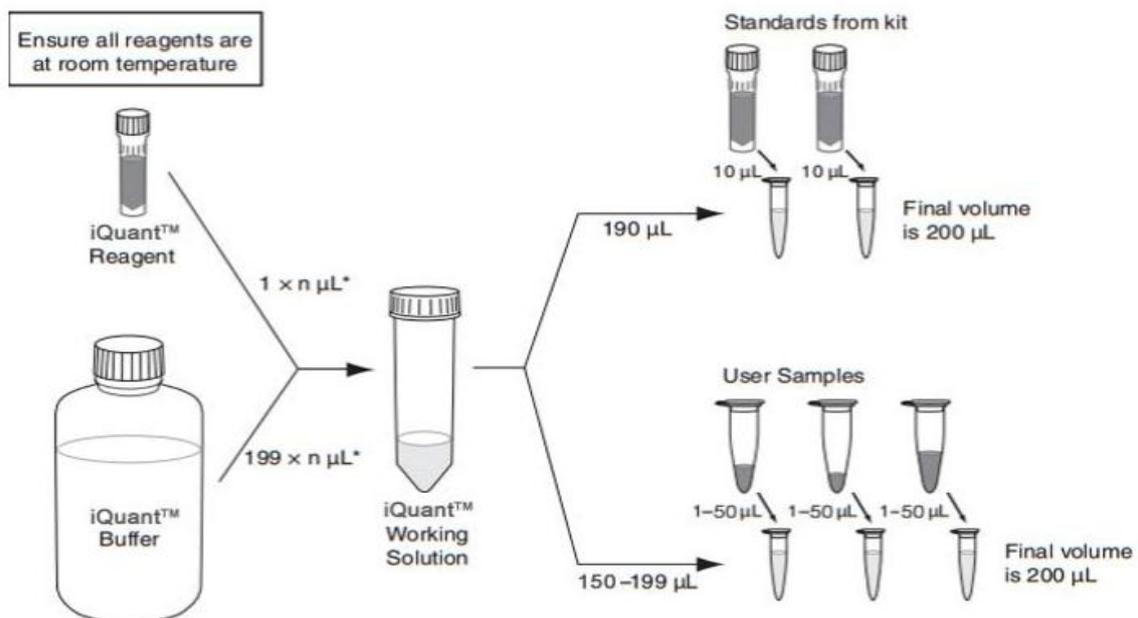


Figura 12 - Preparazione dei campioni nel Qubit dsDNA Broad Range Assay [www.genecopoeia.com].

3.4 Elettroforesi su gel d'agarosio

Uno dei primi e più semplici metodi utilizzati per la rivelazione del DNA sia come tale che amplificato mediante PCR consiste nella corsa elettroforetica in un campo elettrico a intensità e direzione costante, su gel d'agarosio. In sostanza, un gel può essere immaginato come una rete molecolare attraverso le cui maglie si fanno migrare le macromolecole sotto l'azione di un campo elettrico. La velocità di migrazione elettroforetica di una molecola in un gel d'agarosio dipende da più parametri quali il peso molecolare, la conformazione dell'acido nucleico, la concentrazione dell'agarosio, la corrente applicata e la temperatura. In generale si può dire che la velocità di migrazione del DNA nella matrice del gel è inversamente proporzionale al \log_{10} del numero di coppie di basi e quindi alla grandezza del frammento di DNA amplificato. In questo lavoro le molecole di DNA sono state separate su gel d'agarosio all'1.5%, preparato sciogliendo su una piastra riscaldante 1.5g di agarosio in 100 ml di tampone di corsa TBE 1X (tris-borato e acido borico 0.089 M ed EDTA 0.001 M), nel quale viene aggiunto etidio bromuro in quantità pari al 5%, un colorante fluorescente contenente un gruppo planare che ha la capacità di intercalarsi tra le basi del DNA. L'etidio bromuro legato al DNA ha un massimo di assorbimento alla lunghezza d'onda di 302 nm e, sottoposto a luce ultravioletta mediante un transilluminatore, emette una fluorescenza rosa/arancione consentendo la visualizzazione delle bande che hanno migrato lungo il gel.

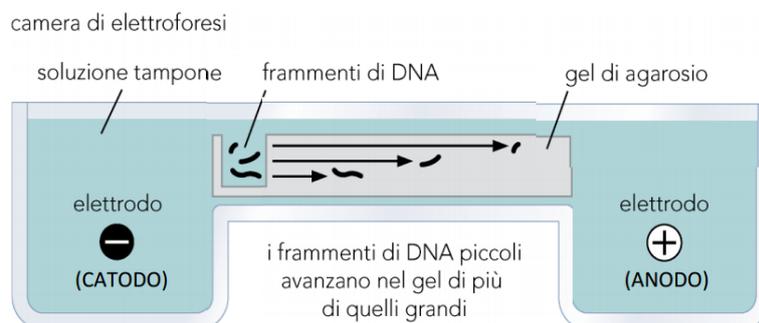


Figura 13 - Meccanismo dell'elettroforesi su gel di agarosio (www.elettroforesi.weebly.com).

3.5 Polymerase chain reaction (PCR)

Le varianti identificate mediante NGS sono state confermate mediante sequenziamento tradizionale Sanger. A tale scopo è necessario ottenere un amplificato della regione recante la variante. Gli ampliconi sono ottenuti mediante *Polymerase chain reaction* (PCR), una reazione di amplificazione *in vitro* di un segmento specifico di DNA. Nella reazione sono coinvolti tre segmenti dell'acido nucleico: lo "stampo" di DNA a doppia elica, che deve essere amplificato e due primers, complementari a zone specifiche sulle opposte catene di DNA. Ogni primer innesca la sintesi di catene verso l'altro primer. Il risultato è una amplificazione della regione di DNA compreso tra gli stessi primers. Inoltre sono presenti una componente proteica enzimatica (una DNA polimerasi), appropriati deossiribonucleotidi, un tampone e dei sali. L'enzima inizialmente utilizzato era facilmente distrutto dal calore e, di conseguenza, doveva essere aggiunto durante ciascun ciclo della reazione; la polimerasi attualmente utilizzata, invece, la Taq polimerasi, estratta da un batterio termofilo (*Thermus aquaticus*), è termoresistente e quindi stabile e attiva alle alte temperature e può essere aggiunta solo all'inizio del processo.

Un tipico ciclo di PCR comprende le seguenti fasi:

- Denaturazione mediante calore del DNA a doppia elica. La temperatura e il tempo di questa fase dipendono dal mezzo di reazione e dalla composizione in basi, dalla lunghezza e dalla quantità del DNA bersaglio.
- Ibridazione dei primers (*annealing*). Le condizioni di temperatura di questa fase dipendono dalla T_m (temperatura di *melting*), quindi dalla composizione in basi dei primers stessi. Per primers fino a 25 basi la T_m può essere calcolata secondo la seguente relazione:

$$T_m = 2\text{ }^\circ\text{C (A+T)} + 4\text{ }^\circ\text{C (G+C)} - 5\text{ }^\circ\text{C}$$

La durata di questo *step* deve essere scelta in base alla lunghezza e alla composizione dei primers.

- Elongazione della catena di DNA. La temperatura di estensione dei primers corrisponde a quella ottimale per l'enzima impiegato. Per la Taq polimerasi la temperatura generalmente utilizzata è di 72°C; a questa temperatura la Taq polimerasi è capace di incorporare 3550 nucleotidi al secondo. Il tempo di estensione dipende, principalmente, dalla lunghezza della sequenza che deve essere amplificata. La reazione ha un andamento esponenziale, dato che ad ogni ciclo gli stessi prodotti di amplificazione fungono da substrato per i cicli successivi. Sono sufficienti 25-30 cicli per ottenere milioni di copie della sequenza d'interesse.

Polymerase chain reaction - PCR

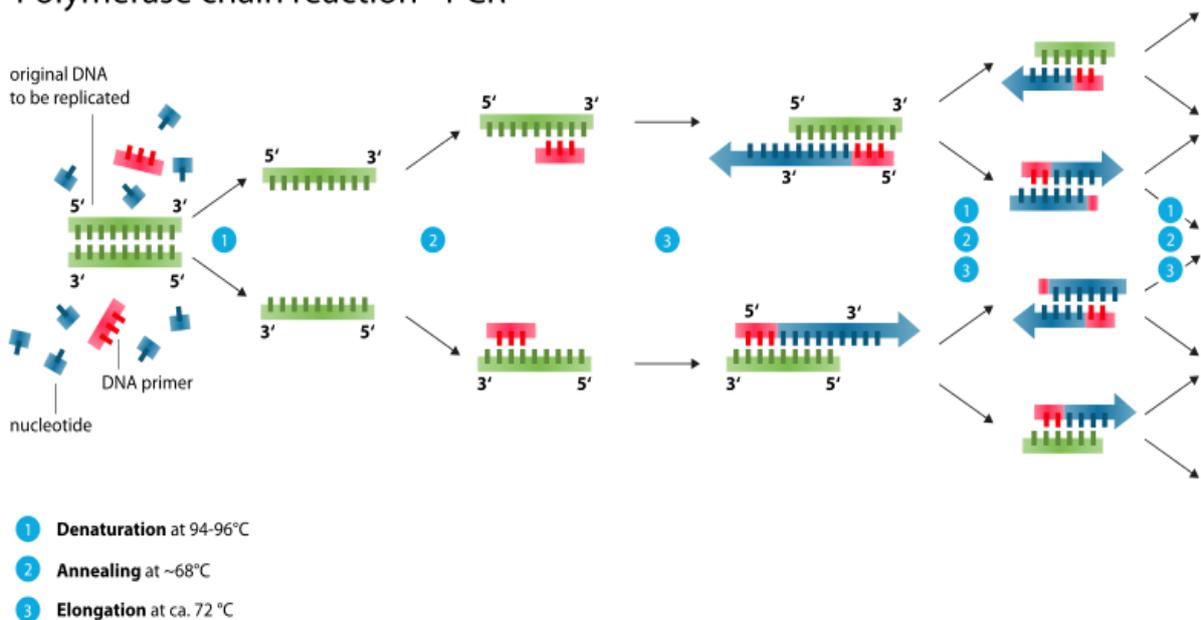


Figura 14 - Meccanismo della Polymerase Chain Reaction (PCR) [www.abmgood.com].

I prodotti di PCR vengono poi purificati con "Exo-SAP" (exonuclease I-shrimp alkaline phosphatase) prima di procedere al sequenziamento.

3.6 Sequenziamento automatico con metodo Sanger

La sequenza nucleotidica di un amplicone è stata ottenuta con il metodo di Sanger (Sanger, 1977) effettuando un'elettroforesi capillare tramite il sequenziatore automatico "ABI 3500 genetic analyzer" (Life Technologies) in associazione al kit "BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits" (BD3.1) (Life Technologies). Questo metodo implica la formazione, a partire dal prodotto di PCR precedentemente purificato mediante reazione enzimatica "Exo-SAP", di un nuovo filamento di DNA tramite la sintesi *in vitro* (PCR di sequenza).

BD3.1 è una mix che contiene una DNA polimerasi, che ha funzione di copiare una particolare sequenza del DNA target a partire da un primer complementare ad una sequenza del DNA target. Inoltre sono presenti i 4 deossiribonucleotidi trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) che permettono l'allungamento del filamento e analoghi 2',3'-dideoossi di ogni base (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) marcati ciascuno con diversa fluorescenza. L'incorporazione dei dideoossi interrompe a diversi livelli la crescita della nuova catena perché privi del terminale ossidrilico in 3', necessario per formare il successivo legame fosfodiesterico. In questo modo si producono casualmente frammenti di lunghezza diversa, tutti con un dideoossiribonucleotide marcato all'estremità 3'. Tali frammenti vengono separati mediante elettroforesi capillare su sequenziatore. Al passaggio delle molecole davanti alla lampada laser i fluorocromi vengono eccitati con conseguente emissione di fluorescenza che verrà captata e rielaborata da un software e convertita in elettroferogramma.

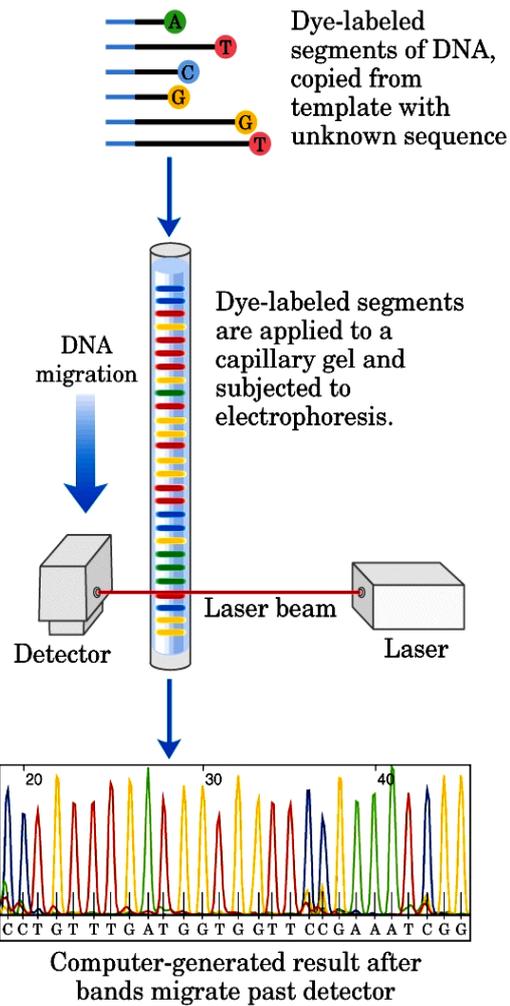


Figura 15 - Sequenziamento automatico mediante elettroforesi capillare.

Le reazioni di sequenza sono poi purificate con colonne "G50 Dye terminator removal kit" (RBC Bioscience) e caricate su una piastra 96 pozzetti per sequenziatore dopo l'aggiunta di un agente denaturante (formammide). L'analisi degli elettroferogrammi è stata fatta con l'ausilio del software SeqScape v2.7 (Life Technologies).

3.7 Next Generation Sequencing (NGS)

NGS rappresenta una tecnologia che si è andata sviluppando negli ultimi anni e consente un sequenziamento parallelo massivo, per cui numerose reazioni possono avvenire in contemporanea generando una quantità di dati decisamente superiore alla tecnica tradizionale tipo Sanger, in tempi brevi e con costi inferiori. La modalità utilizzata in questo studio è “amplicon based”.

Sebbene esistano diverse piattaforme di sequenziamento, tutti questi sistemi condividono almeno tre passi fondamentali:

- Preparazione e immobilizzazione del DNA (“sequencing library”)
- Reazione di amplificazione (PCR)
- Reazione di sequenziamento.

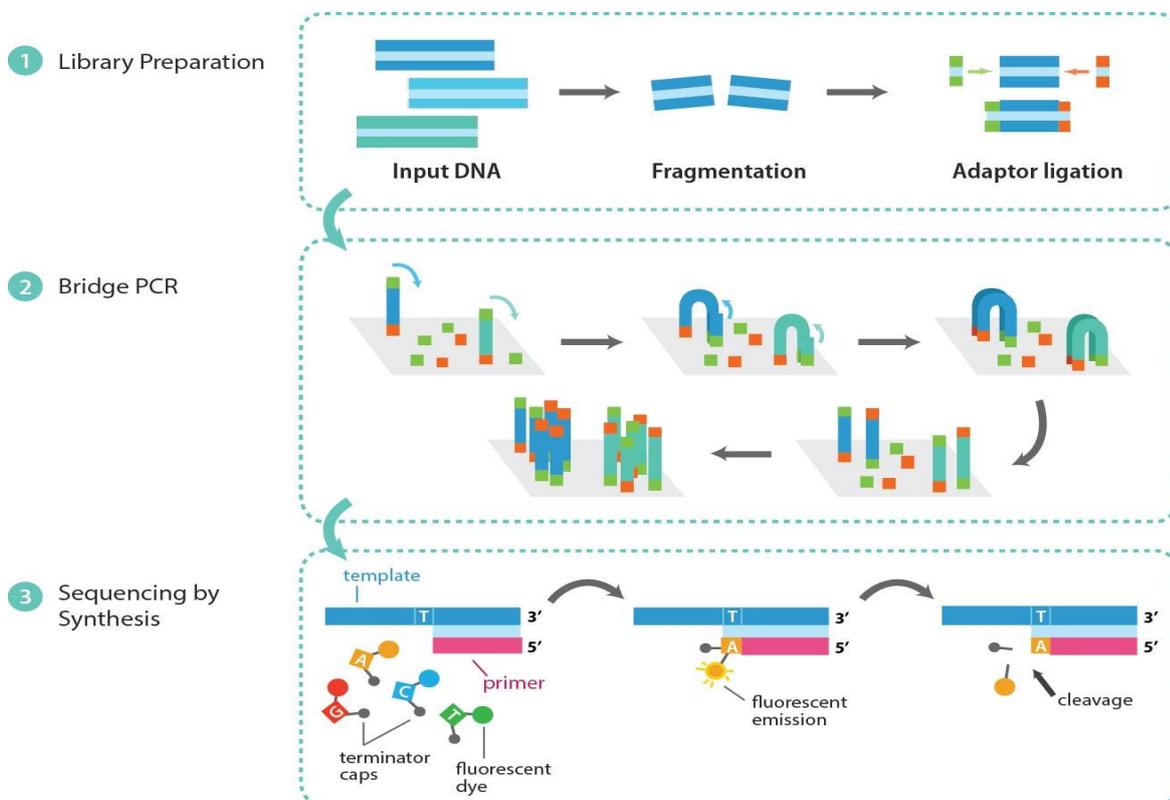


Figura 16 - Fasi della Next Generation Sequencing.

Nel presente studio è stato utilizzata la metodologia “*Halopex target enrichment system*” (Agilent) su piattaforma Miseq (Illumina) che consiste nella selezione, tramite reazioni di ibridazione con sonde specifiche, di regioni genomiche relative al pannello di geni prescelti in modo da sequenziare soltanto le porzioni di interesse (applicazione “*Target resequencing*”).

3.7.1 Creazione del pannello

Sulla base dei dati riportati in letteratura sono stati selezionati 82 geni (Tabella 4) direttamente già noti essere associati con eredoatassie o con malattie fenotipicamente simili.

Gene	Localizzazione	Fenotipo	Trasmissione
<i>ABCB7</i>	Xq13.3	Anemia sideroblastica con atassia	XR
<i>ACO2</i>	22q13.2	Atrofia ottica tipo 9 Degenerazione infantile cerebello-retinica	AR AR
<i>ADCK3</i>	1q42.13	Deficienza primaria di Coenzima Q10	AR
<i>AFG3L2</i>	18p11.21	Atassia spastica tipo 5 Atassia spinocerebellare 28	AR AD
<i>AMPD2</i>	1p.13.3	Paraplegia spastica 63 Ipoplasia pontocerebellare di tipo 9	AR AR
<i>ANO10</i>	3p21.1-p21.3	Atassia spinocerebellare tipo 10 recessiva	AR
<i>APTX</i>	9p21.1	Atassia con aprassia oculomotoria e ipoalbuminemia ad esordio precoce	AR
<i>ATCAY</i>	19p13.3	Atassia cerebellare tipo Cayman	AR
<i>ATM</i>	11q22.3	Atassia-telangiectasia Susceptibilità al cancro al seno	AR AD
<i>ATP1A3</i>	19q13.2	Emiplegia alternante tipo 2 Sindrome di CAPOS Distonia tipo 12	AD AD AD
<i>ATP2A3</i>	17p13.2	-	-
<i>ATP8A2</i>	13q12.13	Atassia cerebellare, ritardo mentale e sindrome del disequilibrio tipo 4	AR
<i>BEAN1</i>	16q21	Atassia spinocerebellare tipo 31	AD
<i>BRF1</i>	14q32.33	Sindrome cerebellofaciodentale	AR
<i>C10ORF2</i>	10q24.31	Sindrome di deplezione di DNA mitocondriale tipo 7 Sindrome di Perrault tipo 5 Oftalmoplegia progressiva esterna con delezione di DNA mitocondriale	AR AR AD

Gene	Localizzazione	Fenotipo	Trasmissione
<i>CA8</i>	8q12.1	Atassia cerebellare e ritardo mentale con o senza locomozione quadrupedale tipo 3	AR
<i>CACNA1A</i>	19p13.13	Atassia episodica di tipo 2 Emicrania emiplegica familiare tipo 1 Emicrania emiplegica familiare tipo 1 con progressiva atassia cerebellare Atassia spinocerebellare tipo 6	AD AD AD AD
<i>CACNB4</i>	2q23.3	Atassia episodica tipo 5 Susceptibilità ad epilessia idiopatica generalizzata Susceptibilità ad epilessia mioclonica giovanile	- AD AD
<i>CAMTA1</i>	1p36.31-p36.23	Atassia cerebellare non progressiva con ritardo mentale	AD
<i>CASK</i>	Xp11.4	Sindrome FG 4 Ritardo mentale e microcefalia con ipoplasia pontina e cerebellare Ritardo mentale con o senza nistagmo	- XD -
<i>CHMP1A</i>	16q24.3	Ipoplasia pontocerebellare tipo 8	AR
<i>CLP1</i>	11q12.1	Ipoplasia pontocerebellare tipo 10	AR
<i>COQ2</i>	4q21.22-q21.23	Deficienza primaria di coenzima Q10 1	AR
<i>EEF2</i>	16p13.3	-	-
<i>ELOVL4</i>	6q14.1	Atassia spinocerebellare tipo 34 Ittiosi, quadriplegia spastica e ritardo mentale Malattia di Stargardt	AD AR AD
<i>EXOSC3</i>	9p13.2	Ipoplasia pontocerebellare tipo 1B	AR
<i>FGF14</i>	13q33.1	Atassia spinocerebellare tipo 27	AD
<i>FLVCR1</i>	1q32.3	Atassia con retinite pigmentosa	AR
<i>GRID2</i>	4q22.1-q.22.2	Atassia spinocerebellare tipo 18 recessiva	AR
<i>GRM1</i>	6q24.3	Atassia spinocerebellare tipo 13 recessiva	AR
<i>IFRD1</i>	7q31.1	-	-
<i>ITPR1</i>	3p26.1	Atassia spinocerebellare tipo 15 Atassia spinocerebellare tipo 29 congenita non progressiva	AD AD
<i>KCNA1</i>	12p13.32	Atassia episodica/sindrome miochimia	AD
<i>KCNC3</i>	19q13.33	Atassia spinocerebellare tipo 13	AD
<i>KCND3</i>	1p13.2	Sindrome di Brugada tipo 9 Atassia spinocerebellare tipo 19	AD AD
<i>KCNJ10</i>	1q23.2	Acquedotto vestibolare allargato Sindrome SESAME	AR AR
<i>KIAA0226</i>	3q29	Atassia spinocerebellare tipo 15 recessiva	AR
<i>KIF1A</i>	2q37.3	Ritardo mentale tipo 9 Neuropatia ereditaria sensoria di tipo IIC Paraplegia spastica tipo 30	AD AR AR
<i>KIF1C</i>	17p13.2	Atassia spastica tipo 2	AR

Gene	Localizzazione	Fenotipo	Trasmissione
<i>MARS2</i>	2q33.1	Deficienza combinata della fosforilazione ossidativa Atassia spastica tipo 3	AR AR
<i>MRE11A</i>	11q21	Malattia atassia-telangiectasia-simile	AR
<i>MTPAP</i>	10p11.23	Atassia spastica tipo 4	AR
<i>NOP56</i>	20p13	Atassia spinocerebellare tipo 36	AD
<i>NPC1</i>	18q11.2	Malattia di Niemann-Pick tipo C1 Malattia di Niemann-Pick tipo D	AR AR
<i>OPHN1</i>	Xq12	Ritardo mentale con ipoplasia cerebellare e tratti facciali caratteristici	XR
<i>PDYN</i>	20p13	Atassia spinocerebellare tipo 23	AD
<i>PIK3R5</i>	17p13.1	Atassia con aprassia oculomotoria tipo 3	AR
<i>PLEKHG4</i>	16q22.1	-	-
<i>PMPCA</i>	9q34.3	Atassia spinocerebellare tipo 2 recessiva	AR
<i>PNKP</i>	19q13.33	Atassia con aprassia oculomotoria tipo 4 Microcefalia, convulsioni e ritardo dello sviluppo	AR AR
<i>PNPLA6</i>	19p13.2	Sindrome di Laurence-Moon Sindrome di Boucher-Neuhauser Sindrome di Oliver-McFarlane Paraplegia spastica tipo 39	AR AR AR AR
<i>PRKCG</i>	19q13.42	Atassia spinocerebellare tipo 14	AD
<i>RARS2</i>	6q15	Ipoplasia pontocerebellare tipo 6	AR
<i>RNF216</i>	7p22.1	Atassia cerebellare e ipogonadismo ipogonadotropico	AR
<i>SACS</i>	13q12.12	Atassia spastica di Charlevoix-Saguenay	AR
<i>SETX</i>	9q34.13	Sclerosi laterale amiotrofica giovanile tipo 4 Atassia spinocerebellare tipo 1 recessiva	AD AR
<i>SIL1</i>	5q31.2	Sindrome di Marinesco-Sjogren	AR
<i>SLC1A3</i>	5p13.2	Atassia episodica tipo 6	-
<i>SNX14</i>	6q14.3	Atassia spinocerebellare tipo 20 recessiva	AR
<i>SPG7</i>	16q24.3	Paraplegia spastica tipo 7	AR/AD
<i>SPTBN2</i>	11q13.2	Atassia spinocerebellare tipo 5 Atassia spinocerebellare tipo 14 recessiva	AD AR
<i>STUB1</i>	16p13.3	Atassia spinocerebellare tipo 16 recessiva	AR
<i>SYNE1</i>	6q25.2	Distrofia muscolare di Emery-Dreifuss Atassia spinocerebellare tipo 8 recessiva	AD AR
<i>SYT14</i>	1q32.2	Atassia spinocerebellare tipo 11 recessiva	AR
<i>TDP1</i>	14q32.11	Atassia spinocerebellare con neuropatia assonale	-
<i>TGM6</i>	20p13	Atassia spinocerebellare tipo 35	AD
<i>TPP1</i>	11p15.4	Lipofusina ceroidale neuronale tipo 2 Atassia spinocerebellare tipo 7 recessiva	AR AR
<i>TRPC3</i>	4q27	Atassia spinocerebellare tipo 41	AD

Gene	Localizzazione	Fenotipo	Trasmissione
<i>TSEN54</i>	17q25.1	Ipoplasia pontocerebellare tipo 5 Ipoplasia pontocerebellare tipo 2A Ipoplasia pontocerebellare tipo 4	AR AR AR
<i>TTBK2</i>	15q15.2	Atassia spinocerebellare tipo 11	AD
<i>TTC19</i>	17p12	Deficienza mitocondriale del complesso III di tipo nucleare 2	AR
<i>TTPA</i>	8q12.3	Atassia con deficienza isolata di vitamina E	AR
<i>TUBB4A</i>	19p13.3	Distonia tipo 4 e torsione Leucodistrofia ipomielinizzante tipo 6	AD AD
<i>UBR4</i>	1p36.13	-	-
<i>VAMP1</i>	12p13.31	Atassia spastica 1	AD
<i>VLDLR</i>	9p24.2	Ipoplasia cerebellare e ritardo mentale con o senza locomozione quadrupedale tipo 1	AR
<i>VRK1</i>	14q32.2	Ipoplasia pontocerebellare tipo 1A	AR
<i>WDR81</i>	17p13.3	Atassia cerebellare, ritardo mentale e sindrome del disequilibrio tipo 2	AR
<i>WFS1</i>	4p16.1	Cataratta tipo 41 Sordità tipo 6/14/38 Sindrome di Wolfram Sindrome Wolfram-simile Associazione con diabete mellito non-insulina dipendente	AD AD AR AD AD
<i>WWOX</i>	16q23.1-q23.2	Encefalopatia epilettica precoce infantile Carcinoma somatico esofageo a cellule squamose Atassia spinocerebellare tipo 12 recessiva	AR - AR
<i>ZFYVE26</i>	14q24.1	Paraplegia spastica tipo 15	AR
<i>ZNF592</i>	15q25.3	-	-

Tabella 4 – Caratteristiche dei geni del pannello.

Il pannello è stato disegnato utilizzando “*SureDesign*” (Agilent), che in seguito fornisce un report contenente le informazioni riguardanti il pannello disegnato.

Specie	Homo sapiens
Lunghezze delle letture	250 bp
Geni target	82
Regioni target	1605
Grandezza della regione	353.857 kbp
Ampliconi totali	17977

Basi target totali analizzabili	353.38 kbp
Grandezza del disegno totale sequenziabile	871.92 kbp
Copertura totale	99,86%
Sequenziamento minimo raccomandato per campione	174.39 Mbp
Database	RefSeq, Ensembl, SNP, Cytoband
Regioni	Esoni codificanti
Estensioni delle regioni	25 basi dalla fine del 3' a 25 basi dalla fine del 5'

Tabella 5 – Caratteristiche del pannello.

3.7.2 Preparazione delle librerie

La preparazione delle librerie si riassume in 4 passaggi principali.

- Digestione DNA genomico con enzimi di restrizione per frammentare il DNA
- Ibridazione delle sonde: le sonde delle librerie sono aggiunte e fatte ibridare al frammento target. Ogni sonda è un oligonucleotide biotinilato disegnato in modo da ibridare con entrambe le estremità al frammento di restrizione target in modo da portare i frammenti a formare una molecola di DNA circolare. Le sonde inoltre contengono un motivo di sequenziamento metodo-specifico che viene incorporato durante la circolarizzazione
- Ligazione e purificazione: le sonde sono biotinilate ed i frammenti target possono essere quindi recuperati con biglie magnetiche ricoperte di streptavidina. Le molecole circolari sono quindi chiuse con la ligazione, una reazione molto precisa che assicura che solo i frammenti perfettamente ibridati vengano circolarizzati.
- Amplificazione dei frammenti con la reazione di polimerizzazione a catena (PCR): solo i frammenti circolari vengono amplificati, fornendo un prodotto di amplificazione pronto per il sequenziamento.

1) Digest genomic DNA.



2) Hybridize the HaloPlex probe library in presence of the Indexing Primer Cassette. Hybridization results in gDNA fragment circularization and incorporation of indexes and Illumina sequencing motifs.



3) Capture target DNA-probe hybrids. Biotinylation of probe DNA allows capture using streptavidin-coated magnetic beads.



4) PCR amplify targeted fragments to produce a sequencing-ready, target-enriched sample.



Figura 17 - Fasi della preparazione delle librerie
(www.genomics.agilent.com).

Entrando nello specifico delle procedure e dei materiali utilizzati nella preparazione delle librerie, i passaggi sono i seguenti:

Step 1. Digestione del DNA genomico con enzimi di restrizione

- Per una resa ottimale si utilizzano 225 ng di DNA per ciascun paziente e a ciascun campione vengono poi aggiunti 45 μ l di acqua sterile per arrivare alla concentrazione finale di 5ng/ μ l.
- I campioni che possono essere processati in ciascuna reazione sono 12, di cui 11 campioni di DNA genomico ed un campione “*Enrichment Control DNA*”, fornito con i reagenti di “*Haloplex Target enrichment*” (Agilent) che può essere utilizzato per controllo di verifica in

alcuni passaggi della preparazione delle librerie.

- Il DNA genomico dei pazienti viene digerito con 16 differenti enzimi di restrizione per creare una libreria di frammenti di restrizione di DNA genomico. Questa reazione viene effettuata mettendo insieme un buffer per gli enzimi di restrizione (34 μ l), BSA (0,85 μ l) ed otto differenti reazioni di restrizione (contenenti ciascuno due enzimi di restrizione, per un totale di 16 enzimi di restrizione per ciascun campione. Le reazioni di digestione sono messe poi in un termocicizzatore a 37°C per 30 minuti a cui segue un passaggio ad 80°C per 5 minuti per inattivare gli enzimi di restrizione.

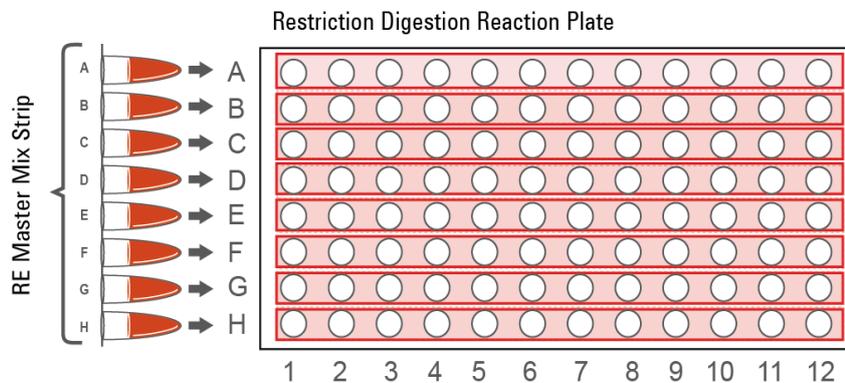


Figura 18 - Distribuzione delle miscele di enzimi di restrizione nella piastra (www.genomics.agilent.com).

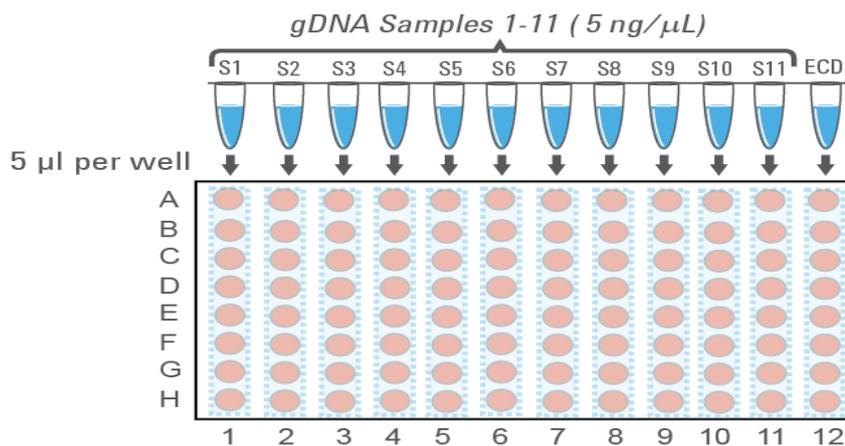


Figura 19 - Distribuzione dei campioni nelle miscele contenenti gli enzimi di restrizione (www.genomics.agilent.com).

Step 2. Ibridazione del DNA digerito con le sonde per il *“target enrichment”* ed il *“sample indexing”*

- In questa fase, la collezione di frammenti di restrizione di DNA genomico sono ibridati con sonde specifiche. Le sonde sono disegnate per ibridare selettivamente frammenti di regioni target relative ai geni del pannello e per indurre la circolarizzazione dei frammenti. Durante il processo vengono incorporate nei frammenti target delle sequenze nucleotidiche *“index”*, diverse per ciascun campione di DNA che consentiranno al termine del sequenziamento di identificare l'appartenenza dei prodotti relativi al sequenziamento dei diversi campioni.
- La reazione di ibridazione viene preparata, per ogni campione, con 50 µl di *“Hybridation Solution”* e 20 µl di *“Haloplex Probe”*, a cui vengono aggiunti 10 µl di *“Indexing Primer Cassette”* e tutto il DNA digerito. La reazione avviene in un termocicizzatore prima a 95°C per 10 minuti e poi a 54°C *“overnight”*.

Step3. Cattura del DNA target

- In questa fase il prodotto della reazione di ibridazione, contenente biotina, viene catturato con biglie con streptavidina.
- In questo passaggio, per ogni reazione vengono utilizzati *“Haloplex Magnetic Bead Suspension”* (40 µl), *“Capture Solution”* (40 µl), *“Wash Solution”* (100 µl) e una piastra magnetica che consente di catturare le biglie di streptavidina.

Step4. Ligazione dei frammenti catturati e circolarizzati

- In questa fase una DNA ligasi viene aggiunta alla reazione di cattura per chiudere i tagli nel prodotto di ibridazione circolarizzato.
- La reazione di ligazione si effettua, per ogni campione, con una *“Ligation Solution”* (47,5 µl) e una DNA ligasi (2,5 µl), usando poi un termocicizzatore impostato a 55°C per 10 minuti.

Step 5. Eluizione del DNA catturato con NaOH

- In questa fase si eluisce il DNA catturato utilizzando 100 µl di SSC Buffer e 25 µl di NaOH

mM, servendosi ancora della piastra magnetica.

Step 6. Amplificazione delle librerie tramite reazione della polimerasi a catena (PCR)

- In questa fase si amplificano le librerie del DNA catturato con una normale PCR.
- La reazione di PCR si effettua utilizzando il DNA catturato (20 µl), “*Nuclease-free water*” (16,1 µl), *5X Herculase II Reaction Buffer* (10µl), dNTPs (100 mM, 25 mM per ogni dNTP) (0,4 µl), Primer 1 25 mM (1 µl), Primer 2 25 mM (1 µl), Acido acetico 2 M (0,5 µl) ed *Herculase II Fusion DNA Polymerase* (1 µl). Il programma per l'amplificazione prevede 2 minuti a 58°C, 21 cicli 98°C-30 secondi/60°C-30 secondi/72°C-1 minuto, 10 minuti a 72°C e poi 8°C.

Step 7. Purificazione delle librerie amplificate

- In questa fase, il DNA target amplificato viene purificato con “*AMPure XP beads*”.
- La purifica avviene con una serie di lavaggi, si effettua utilizzando, per ogni campione, 40 µl di DNA amplificato, “*Nuclease-free water*” (40 µl), “*AMPure XP beads*” (100 µl), etanolo 70% (400 µl)

3.7.3 Quantizzazione delle librerie su TapeStation

In questa fase si verifica l'esito positivo della costruzione delle librerie di interesse e se ne valuta la concentrazione.

- L'analisi viene fatta utilizzando “*High Sensitivity D1000 ScreenTape*”.
- Per ogni campione si utilizzano 2 µl di “*D1000 Sample Buffer*” e 2 µl di libreria; viene utilizzato anche un “*ladder di riferimento*”, con una preparazione analoga. I campioni e il “*ladder*” vengono poi miscelati per 2' a 2000 rpm e quindi analizzati nella Tape Station.

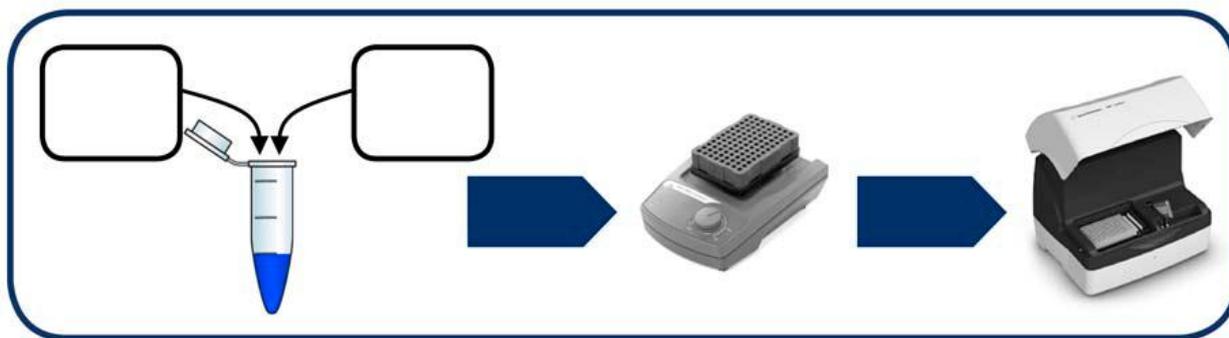


Figura 20 - Preparazione dei campione per l'analisi alla Tape Station (www.agilent.com).

- L'elettroferogramma ottenuto viene analizzato per ogni campione. Si sceglie un certo range di paia di basi (specifico per il pannello) e si determina la concentrazione di DNA arricchito integrando l'area della curva che si trova in un range. Per una accurata quantificazione è necessario che ciascuna libreria sia nel range quantitativo di 75-1000 pg/μl.

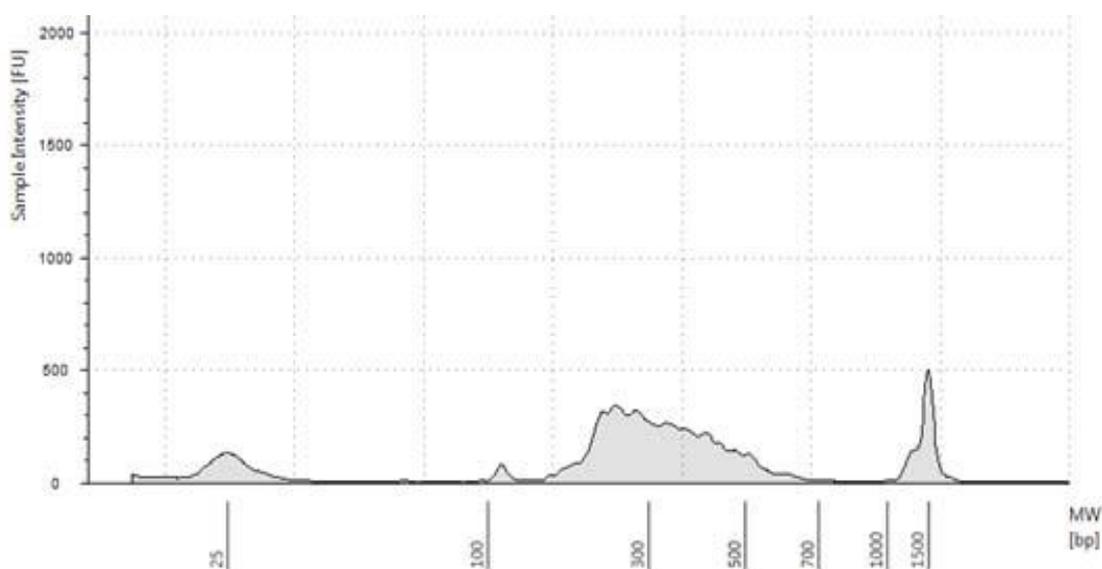


Figura 21 - Esempio di elettroferogramma ottenuto dopo l'analisi alla Tape Station con "High Sensitivity D1000 ScreenTape" (www.agilent.com).

3.7.4 Sequenziamento su piattaforma Miseq Illumina

Il metodo di sequenziamento su piattaforma Miseq Illumina avviene mediante un processo di amplificazione a ponte “*bridge amplification*”. I frammenti delle librerie presentano alle estremità degli oligo-adattatori che si legano ad oligonucleotidi complementari immobilizzati su una *flow-cell*.

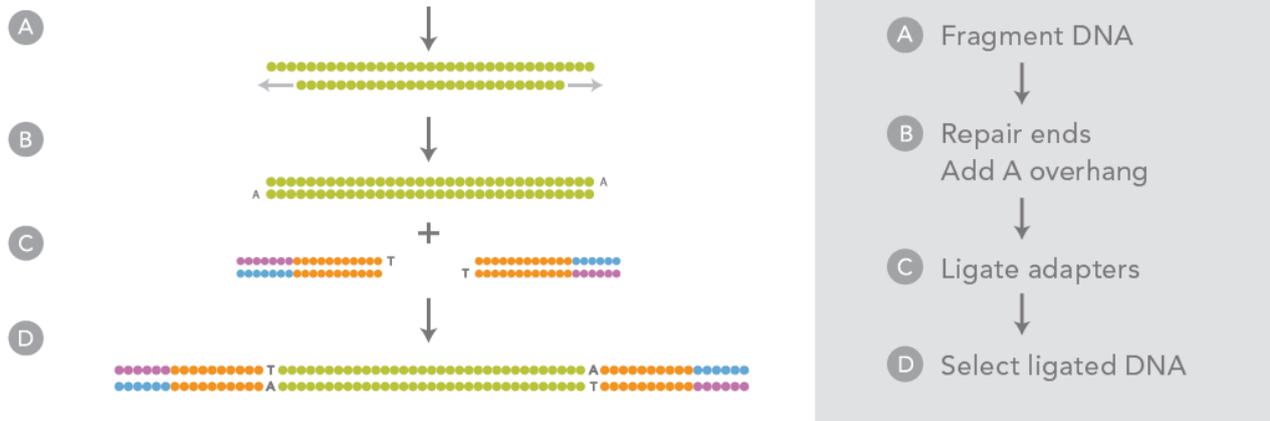


Figura 22 – Fasi della Next Generation Sequencing: preparazione librerie (Ansorge WJ, 2009.)

I frammenti di DNA delle librerie si legano con entrambe le estremità a questi oligonucleoti, formando delle strutture a ponte. Ogni frammento è amplificato attraverso “*bridge amplification*” formando dei “*clusters*”.

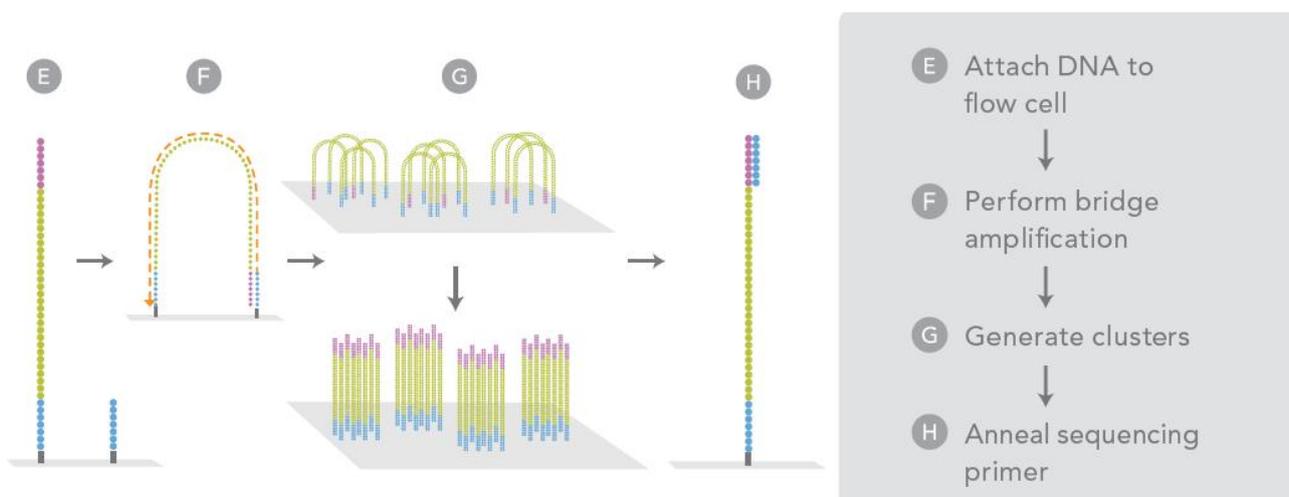


Figura 23 – Fasi della Next Generation Sequencing: bridge PCR (Ansorge WJ, 2009.)

Il sequenziamento, nella piattaforma Illumina impiega un metodo ciclico di incorporazione, fluorescenza, immagine e lavaggio, sfruttando la chimica di particolari dinucleotidi modificati, sviluppati sulla base dei dideossinucleotidi utilizzati nella tecnologia Sanger. Tali nucleotidi sono rappresentati dalla molecola 3'_O_Ozydometil, che riproducono dei terminatori reversibili. Durante il sequenziamento è presente una miscela delle quattro basi dinucleotidiche modificate e fluorescenti con quattro diversi fluorocromi che competono tra di loro. A seguito dell'incorporazione della base complementare alla prima base del filamento, il laser eccita la molecola ed il segnale luminoso viene raccolto come immagine per identificare la base appena aggiunta. Nel passaggio successivo viene ripristinato il 3'OH del dinucleotide modificato, appena incorporato, che sarà quindi in grado di accogliere la seconda base. Questo processo si verifica contemporaneamente per tutti i filamenti all'interno della *flow-cell* e le immagini vengono raccolte indipendentemente per ciascuno degli otto canali della *flow-cell*.

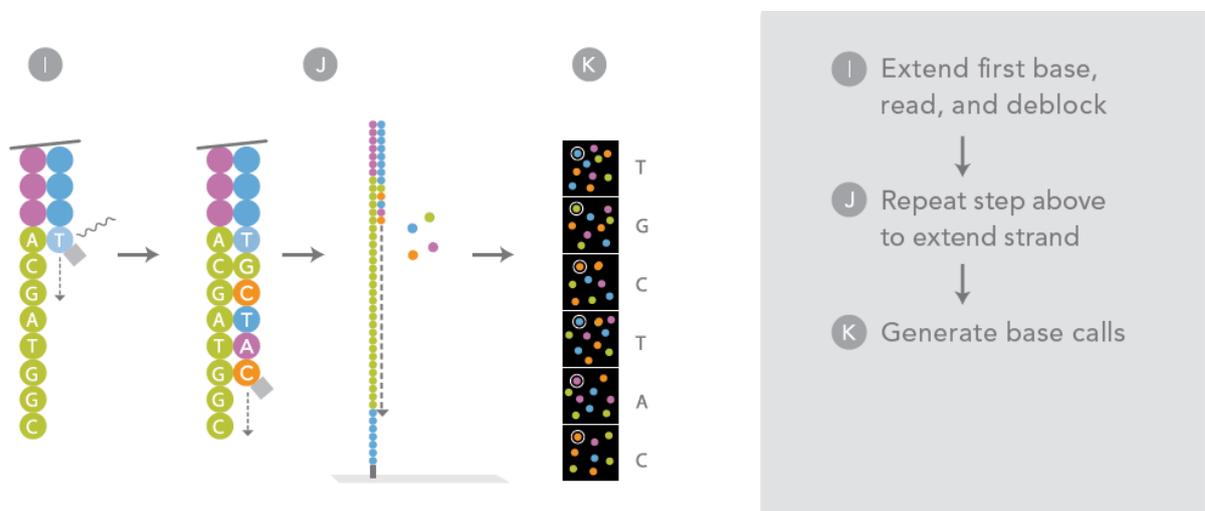


Figura 24 – Fasi della Next Generation Sequencing: sequenziamento (Ansorge WJ, 2009)

- Preparazione del pool. Per il caricamento delle librerie su Miseq (Illumina) si procede con la preparazione di un pool di librerie alla concentrazione finale di 2nM. Successivamente 5 µL

del pool 2nM vengono denaturati con 5 μ l di 0.2N NaOH alle quali si aggiungono 990 μ l di “Pre-chilled HT1”, ottenendo un pool 10 pM. L'ultima diluizione viene effettuata miscelando 480 μ L di librerie 10 pM con 120 μ L “Pre-chilled HT1” per ottenere un pool di librerie 8 pM.

- Programmazione del del MiSeq (Illumina) secondo gli appositi parametri di corsa (creazione della lista dei campioni con i rispettivi index, parametri di corsa per “Haloplex Target Enrichement”).
- Inserimento della “cartridge” del “Miseq reagent kit v2 (2x150bp)” e “flow cell” da 4.5Gb.

3.7.5 Analisi dei dati

L'analisi dei dati è stata effettuata mediante l'uso del software *SureCall* (Agilent) che allinea i dati grezzi ottenuti dal sequenziamento con Miseq, in formato FASTQ, con le sequenze del genoma umano di riferimento (hg19), relative ai geni presenti nel pannello in esame.

Le differenze che intercorrono tra questi due input rappresentano le varianti individuate nei campioni caricati per il sequenziamento. Le varianti sono state, tuttavia, analizzate e filtrate principalmente con il software “*Ingenuity variant analysis*” (Qiagen) che consente di ottenere in un unico file le varianti presenti in tutti i campioni analizzati. Ulteriore conferma delle varianti è stata effettuata con wAnnovar (<http://wannovar.usc.edu/>), il web-server del software di analisi Annovar.

I dati ottenuti dall'analisi di “*Ingenuity variant analysis*” sono stati filtrati secondo i seguenti parametri:

- Qualità della chiamata (*Call Quality*). Tutte le varianti ottenute hanno uno score riportato sotto la voce *Call quality*, che rappresenta la probabilità che la variante identificata sia effettivamente vera. Secondo questo parametro, vengono scartate le varianti rappresentate da una *Call quality* < 30.
- Copertura (*Read Depth*). Ogni variante ottenuta viene rappresentata anche da un indice di

copertura, che rappresenta il numero di volte che quella variante è stata sequenziata. Più alta è la copertura di una variante, più è alto il numero di volte che la variante è stata sequenziata, più è probabile che la chiamata sia vera. Secondo questo parametro, vengono scartate le varianti rappresentate da una *Read Depth* < 20X.

- Frequenza. I dati che otteniamo tengono conto di tutte le varianti, indipendentemente da quale sia la loro frequenza. Diventa quindi importante eliminare tutte quelle varianti che sono potenzialmente polimorfismi nella popolazione. Questo viene fatto applicando un filtro imponendo di scartare tutte le varianti che hanno una frequenza maggiore dell'1% nella popolazione e quindi non sono considerate "rare". Il principale database su cui viene fatto riferimento la frequenza delle varianti è *Exome Aggregation Consortium (ExAC)*, un database online (<http://www.exac.broadinstitute.org>) che raccoglie tutte le frequenze delle varianti geniche identificate da analisi di 65000 esomi effettuati in un'ampia varietà di progetti di sequenziamento su larga scala. I dati ottenuti prendono in considerazione anche la frequenza di altri due database 1000 Genomi (<http://www.1000genomes.org>), e NHLBI-ESP 6500 (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>)
- Falsi positivi. Alcune varianti possono essere presenti contemporaneamente in più campioni; considerando che le patologie prese in considerazione sono malattie rare e oltretutto geneticamente molto eterogenee, è difficile immaginare che molti campioni abbiano contemporaneamente la stessa variante. Queste varianti (per lo più delezioni o inserzioni) vengono esaminate sul visualizzatore di *SureCall* e si tratta, nella maggior parte dei casi, di errori del sequenziamento NGS. Queste varianti vengono considerate falsi positivi. Il filtraggio viene fatto scartando le varianti presenti in più di due diversi campioni.
- Predizione dell'impatto sulla proteina delle mutazioni missenso. I dati ottenuti fanno riferimento a due siti di predizione dell'effetto di una variante sulla proteina risultante, *SIFT*

e *PolyPhen*. L'algoritmo *SIFT* (*Sorting Intolerant From Tolerant*) (<http://sift.jcvi.org/>) è in grado di predire se una determinata sostituzione aminoacidica possa alterare la funzionalità della proteina utilizzando come parametri di predizione l'omologia di sequenza e l'analisi fisico-chimica degli aminoacidi. Per ogni sostituzione aminoacidica, tale algoritmo assegna un punteggio: variazioni prossime a 0 (varianti tollerate) a variazioni prossime a 1 (predette deleterie).

L'algoritmo *Polyphen* (*Polymorphism Phenotyping*) (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) utilizza come parametri di predizione l'omologia di sequenza e informazioni filogenetiche e assegna 3 classi "Probably damaging" (score >0.85), "Possibly damaging" (0.85-0.15) e benigne (<0.15).

Il filtro applicato, secondo questo parametro, è stato effettuato scartando le varianti considerate benigne da *PolyPhen*.

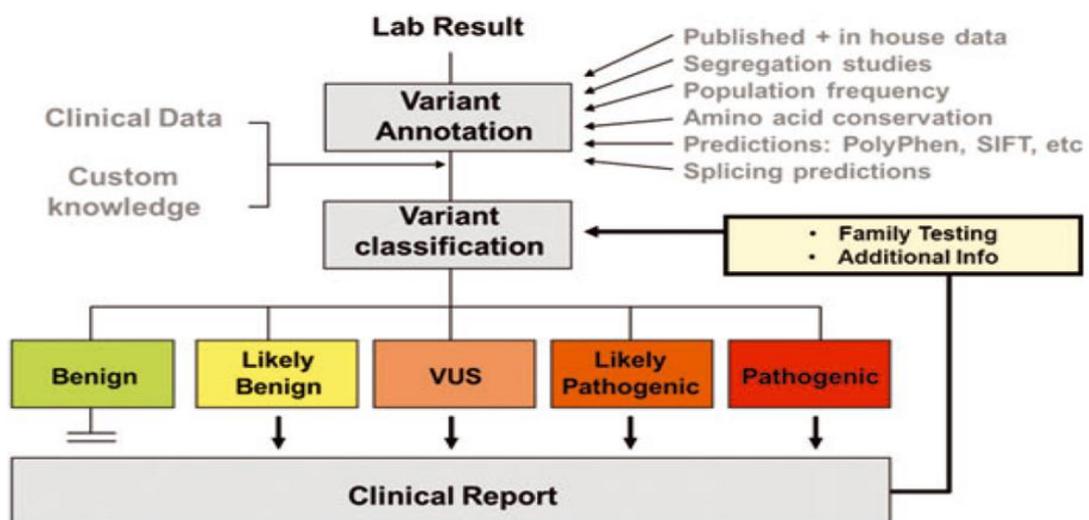


Figura 25 - Workflow dell'analisi dati

- Predizione delle varianti introniche sullo *splicing*. Le varianti introniche possono influire sullo *splicing* e quindi alterare la proteina. Sono state prese in considerazione le varianti

introniche che sono posizionate fino a -40 e +40 rispetto all'esone preso in considerazione. Il peso delle varianti viene assegnato in base al loro grado di conservazione. Vengono considerate patogenetiche le varianti introniche ± 2 (siti accettore e donatore di *splicing*) rispetto ad un esone. Le varianti introniche sono state esaminate secondo il seguente ordine di priorità: entro 5 rispetto ad un esone (altamente conservate), entro ± 15 (molto conservate) ed entro ± 40 (conservate). L'impatto delle varianti introniche sullo splicing è stato effettuato utilizzando su due siti di predizione quali NetGene2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>) e BDGP (<http://www.fruitfly.org>). Questi due siti di predizione sono stati utilizzati anche per le varianti sinonime, nel range di 5 nucleotidi dall'inizio e dalla fine di un esone che pur non avendo effetto sulla sequenza aminoacidica possono comunque, con il cambiamento della sequenza nucleotidica, influire sullo splicing.

Dopo la corsa viene fornito un report dove vengono riportate il numero di basi lette, le letture effettuate e la loro qualità. Vengono forniti anche i dati riguardo al coverage di ciascun gene. Quando il coverage è inferiore al 100% può dipendere, a priori dal disegno del pannello per la presenza di regioni del DNA sulle quali non è possibile disegnare delle sonde ottimali o da qualche problema di amplificazione legato alla qualità del DNA e, non ultimo, alla presenza di estese delezioni. Una valutazione delle regioni con una bassa copertura è importante in quanto potrebbe suggerire di sequenziare con metodo Sanger le regioni non coperte per una valutazione ottimale nell'analisi complessiva.

4. Risultati

Sono stati esaminati 30 pazienti, di cui 17 maschi (57%) e 13 femmine (43%), con un'età media di 44.1±18.2 anni. Le principali caratteristiche di questo gruppo di pazienti sono riportate nella tabella 6. La maggior parte di questi presenta atassia, atrofia cerebellare ed altri sintomi legati alle atassie. In tutti i pazienti mutazioni/espansioni nel gene *FXN* e l'espansione patologica CAG/CTG associata con le forme più frequenti di SCA erano state già escluse.

	Età	Sesso	Età di esordio	Progressione malattia	Familiarità	Segni clinici
Paziente 1	56	F	26	Marcata	AD, padre affetto	Atassia, parkinsonismo, distonia, problemi psichiatrici, atrofia cerebellare
Paziente 2	66	F	28	Moderata	AR, una sorella affetta	Atassia, atrofia del verme e midollo cervicale
Paziente 3	53	M	30	Lieve	Sporadico	Atassia, neuropatia periferica
Paziente 4	40	M	26	Lieve	AR, consanguineità	Atassia, ipogonadismo, atrofia cerebellare, retinite pigmentosa
Paziente 5	35	F	14-18	Nessuna	AR, una sorella affetta	Lieve atassia, ipogonadismo, amenorrea, tremore
Paziente 6	66	F	47	Moderata	AR, un fratello e un cugino affetti	Atassia, neuropatia sensitiva, atrofia cerebellare
Paziente 7	8	M	1	Moderata	Sporadico	Atassia, atrofia del verme e degli emisferi, tremore, disturbi del movimento, atrofia ottica
Paziente 8	30	M	2	Nessuna	Sporadico	Lieve atassia, atrofia vermiana
Paziente 9	78	F	35	Moderata	AR, consanguineità e un fratello affetto	Atassia, neuropatia periferica, modesta atrofia cerebellare
Paziente 10	26	F	3	Nessuna	Sporadica	Lieve atassia, declino cognitivo, atrofia cerebellare
Paziente 11	52	M	30	Marcata	Sporadica	Atassia, spasticità, parkinsonismo, distonia, insonnia, atrofia cerebellare e pontomesencefalica

	Età	Sesso	Età di esordio	Progressione malattia	Familiarità	Segni clinici
Paziente 12	19	M	5	Moderata	Sporadico	Atassia spastica, atrofia vermiana ed emisferica, tremore posturale
Paziente 13	40	M	39	Lieve	AR, consanguineità	Atassia, tremore
Paziente 14	18	M	3 mesi	Nessuna	Sporadica	Atassia, declino cognitivo
Paziente 15	54	F	12	Marcata	AR, genitori consanguinei, due fratelli affetti	Atassia, atrofia del verme e midollo cervicale, neuropatia periferica, retinite pigmentosa, declino cognitivo
Paziente 16	23	F	1	Nessuna	Sporadica	Atassia, declino cognitivo, atrofia cerebellare
Paziente 17	60	F	41	Lieve	AD, zia materna affetta	Atassia, neuropatia periferica, modesta atrofia cerebellare
Paziente 18	36	F	24	Lieve	AR, un fratello affetto	Lieve atassia, ipogonadismo, distonia, atrofia cerebellare
Paziente 19	59	M	50	Lieve	AR, una sorella affetta	Lieve atassia, neuropatia periferica, modesta atrofia cerebellare
Paziente 20	38	F	Primi mesi	Lieve	AR, una sorella affetta	Atassia, ritardo mentale, microcefalia
Paziente 21	29	M	18	Sconosciuta	Sporadica	Atassia spastica, marcata neuropatia sensitiva motoria demielinizzante, atrofia cerebellare, ipogonadismo
Paziente 22	41	M	19	Sconosciuta	Sporadica	Atassia, ipogonadismo ipogonadotropo, distrofia maculare, atrofia cerebellare
Paziente 23	23	M	18 mesi	Sconosciuta	Sporadica	Atassia spastica, ritardo mentale, neuropatia motoria, distonia, ipogonadismo
Paziente 24	31	M	1	Sconosciuta	Fratello affetto	Atassia congenita, ipoplasia cerebellare, strabismo
Paziente 25	60	F	52	Sconosciuta	Due fratelli affetti	Atassia spastica, lieve atrofia cerebellare
Paziente 26	63	F	44	Sconosciuta	Consanguineità, un fratello affetto	Atassia spastica, atrofia cerebellare e del tronco encefalico
Paziente 27	32	M	13-20	Sconosciuta	Sporadica	Atassia spastica, lieve ipoplasia del verme

	Età	Sesso	Età di esordio	Progressione malattia	Familiarità	Segni clinici
Paziente 28	50	M	11-17	Sconosciuta	Sporadica (fratello e padre con tremore)	Atassia, tremore del capo, neuropatia sensitivo motoria assonale
Paziente 29	67	M	21-36	Sconosciuta	Un fratello affetto	Atassia spastica, atrofia cerebellare, oftalmoparesi
Paziente 30	70	M	49	Sconosciuta	Consanguineità	Atassia, atrofia cerebellare e corticale, lieve disturbo cognitivo

Tabella 6 – Anagrafica e caratteristiche cliniche dei pazienti analizzati in questo studio.

L'analisi mirata di 82 geni, causanti o potenzialmente legati alle atassie ereditarie, ha mostrato un totale di 7209 varianti (media varianti per paziente = 240.3), classificate nei grafici sottostanti per impatto sulla proteina, tipo di mutazione e localizzazione.

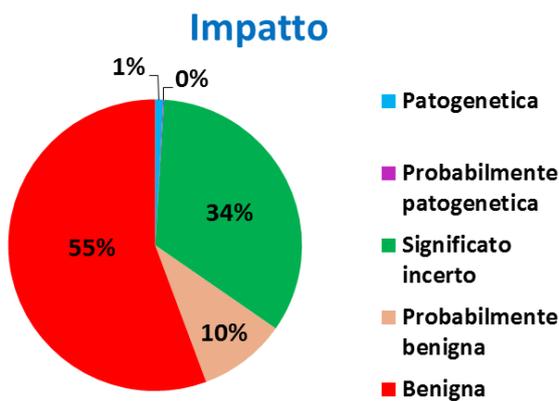


Grafico 1 - Impatto delle varianti totali

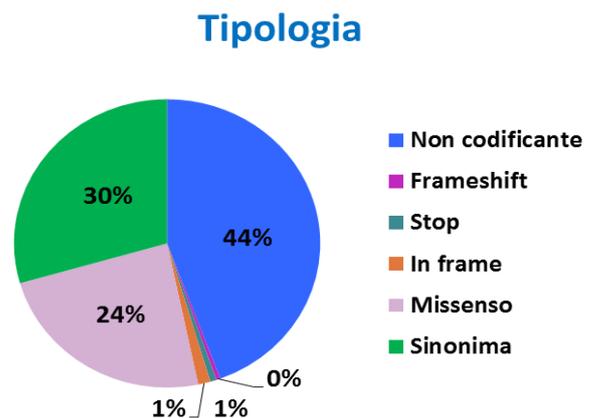


Grafico 2 - Tipologia delle varianti totali

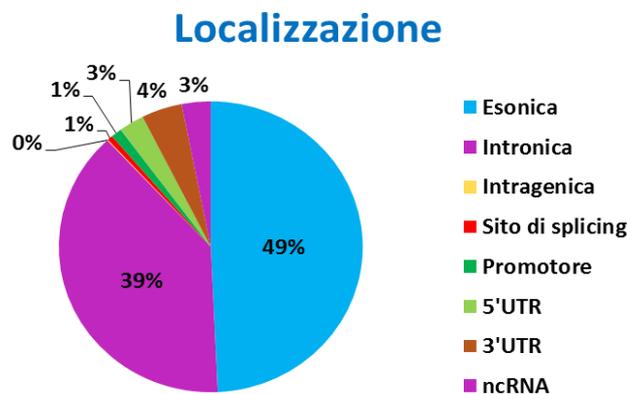


Grafico 3 - Localizzazione delle varianti totali

Queste varianti costituiscono il dato grezzo ottenuto dal sequenziamento. Questo è facilmente comprensibile in quanto molte varianti, che in questa fase non hanno ancora subito nessun tipo di filtrazione, sono in gran parte benigne (55%), non codificanti (44%) e sinonime (30%), e con localizzazione intronica (39%). L'analisi di questi grezzi tramite software porta ad una riduzione significativa di queste percentuali.

Impatto

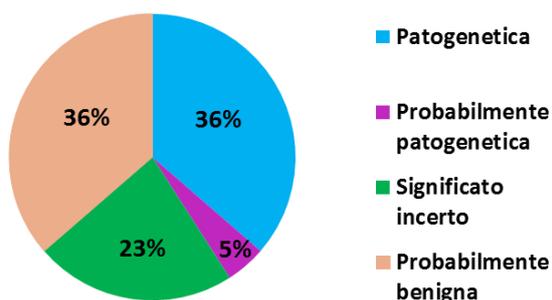


Grafico 4 - Impatto delle varianti predette deleteree

Tipologia

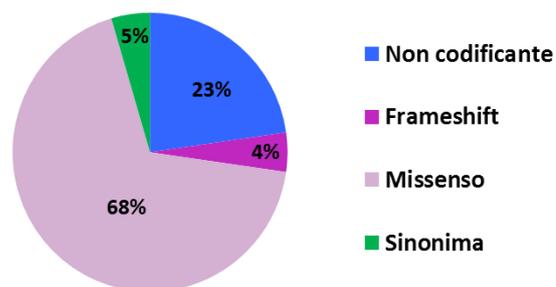


Grafico 5 - Tipologia delle varianti predette deleteree

Localizzazione

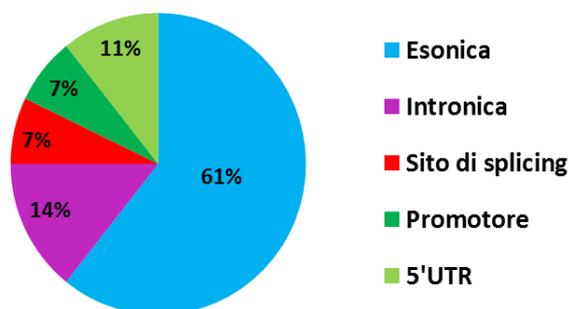


Grafico 6 - Localizzazione delle varianti predette deleteree

Le varianti ottenute con questa analisi automatizzata sono varianti chiamate "predette deleterie", un totale di 513 varianti rare (frequenza <0.01) individuate in 30 pazienti. Queste varianti sono state in seguito analizzate e filtrate secondo i parametri già descritti (qualità della chiamata,

copertura, frequenza, falsi positivi, predizione dell'impatto sulla proteina delle mutazioni missenso, predizione delle varianti introniche sullo splicing). Le mutazioni deleterie identificate grazie all'applicazione di questi filtri sono 49, con una media di 1.63 mutazioni individuate per ciascun paziente. Fatta eccezione per 2 varianti (4%), sono quasi tutte varianti nuove (96%).

Campione	Gene	Variante nucleotidica	Variante proteica	Hom/het
Paziente 1	-	-	-	-
Paziente 2	<i>SETX</i>	c.1468G>A	p.V490I	het
Paziente 3	<i>SIL1</i> <i>SYNE1</i>	c.994G>A c.21826G>A	p.V332M p.D7276N	het het
Paziente 4	<i>KIF1C</i>	c.2010+2T>G	Perdita sito di splicing	het
Paziente 5	<i>SYNE1</i> <i>ZFYVE26</i>	c.13849A>C c.1844C>T	p.N4617H p.S615F	het het
Paziente 6	<i>SYNE1</i> <i>TTC19</i>	c.14676G>C c.312+2T>A	p.E4892D Perdita sito di splicing	het het
Paziente 7	<i>SYNE1</i> <i>PNPLA6</i>	c.1964A>G c.1081A>C	p.Q655R p.T361P	het het
Paziente 8	<i>SYNE1</i>	c.3416G>A	p.W1139*	het
Paziente 9	<i>SETX</i>	c.3242T>C	p.F1081S	hom
Paziente 10	-	-	-	-
Paziente 11	<i>PNPLA6</i>	c.3058G>C	p.V419M	het
Paziente 12	<i>AFG3L2</i> <i>PRKCG</i>	c.838C>T c.653C>T	p.R280W p.T218M	het het
Paziente 13	-	-	-	-
Paziente 14	<i>SYNE1</i> <i>SACS</i> <i>PNPLA6</i>	c.14263C>T c.6511G>A c.656G>A	p.L4755F p.A2171T p.G219D	het het het
Paziente 15	<i>CACNB4</i> <i>ZNF592</i>	c.5C>T c.3107A>G	p.S2F p.H1036R	het het
Paziente 16	-	-	-	-
Paziente 17	<i>AMPD2</i>	c.2042C>T	p.T681M	het
Paziente 18	<i>SYNE1</i> <i>APTX</i> <i>PMPCA</i>	c.4609C>T c.526-3_526-2delTA c.1255G>A	p.R1537* Perdita sito di splicing p.V419M	hom hom het
Paziente 19	<i>CAMTA1</i> <i>IFRD1</i> <i>PNPLA6</i>	c.4886G>A c.1256G>A c.82G>T	p.S1629N p.R419H p.E28*	het het het
Paziente 20	<i>CLP1</i>	c.898C>T	p.R236C	het
Paziente 21	-	-	-	-

Campione	Gene	Variante nucleotidica	Variante proteica	Hom/het
Paziente 22	SETX PNPLA6 CACNA1A	c.7427C>T c.3365C>T c.4081C>T c.6982_6993del(CAG) ₄	p.P2476L p.P1122L; p.R1361* p.Q2328_Q2331del	het het het hom
Paziente 23	SYNE1 PLEKHG4	c.1141G>A c.2626G>C	p.D381N p.E876Q	het het
Paziente 24	-	-	-	-
Paziente 25	APTX SETX SPG7	c.167G>T c.472T>G c.1529C>T c.1972G>A	p.R56L p.L158V p.A510V p.A658T	het het het het
Paziente 26	RARS2 PNPLA6	c.437G>A c.3385G>A	p.R146H p.G1129R	het hom
Paziente 27	ATM	c.6495dupT	p.V2166fs*9	het
Paziente 28	SETX SPTBN2 PIK3R5 NPC1	c.7292dupA c.1033C>T c.470G>A c.3614C>A	p.N2431fs*19 p.Q345* p.R157H p.T1205K	hom het het het
Paziente 29	SPG7	c.73_80delCCAGGCC c.1940C>A	p.P25fs*46 p.A647E	hom het
Paziente 30	SYNE1 SPG7	c.22675G>T c.1529C>T	p.D7559Y p.A510V	hom hom

Tabella 7 – Risultati dell'analisi dati.

Numero di mutazioni per gene

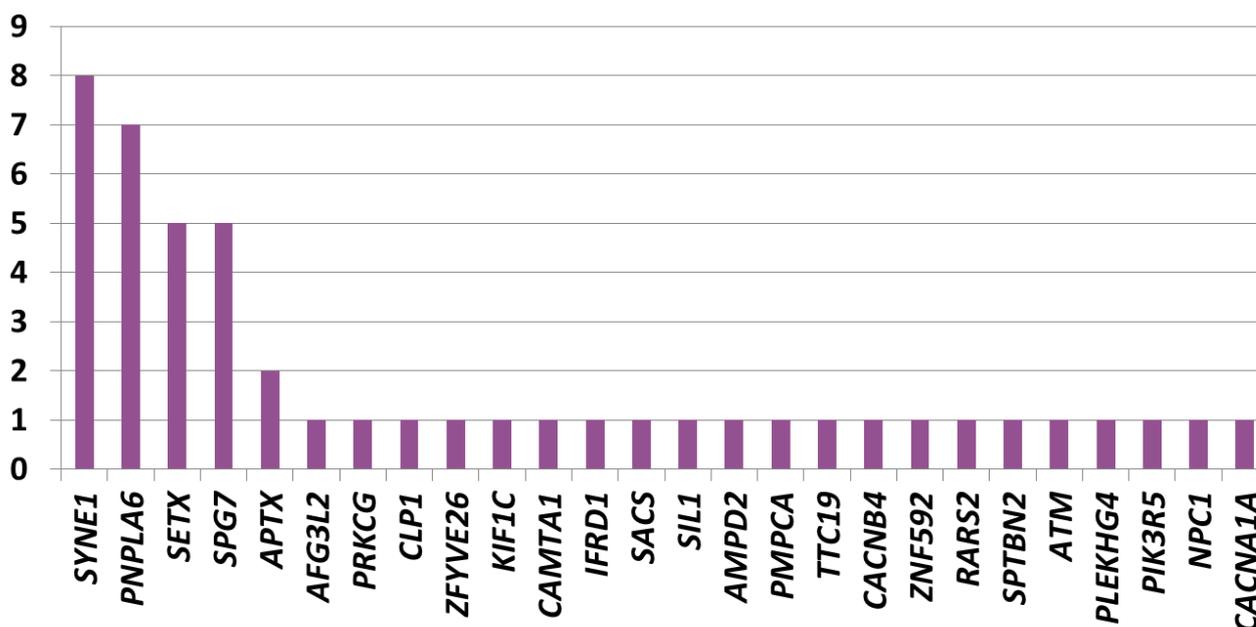


Grafico 7 - Numero di mutazioni per gene

Su un totale di 49 mutazioni, la maggior parte di esse sono state trovate in eterozigosi (41), e poche in omozigosi (8).



Grafico 8 - Zigosità delle mutazioni individuate.

In alcuni pazienti è stata identificata una sola mutazione, in altri più di una, ma ci sono anche casi in cui non sono state identificate mutazioni danneggianti.

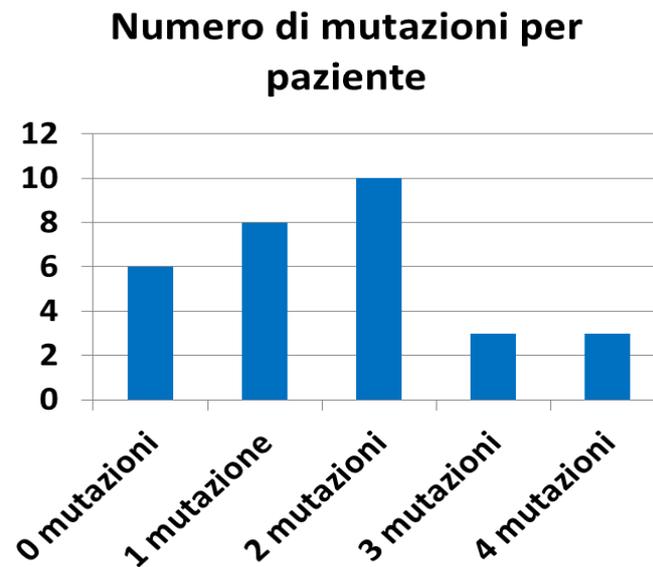


Grafico 9 - Numero di mutazioni per paziente.

I tipi di mutazioni individuate sono mutazioni nonsense, del sito di splicing, missenso, inserzioni e delezioni in frame e frameshift.

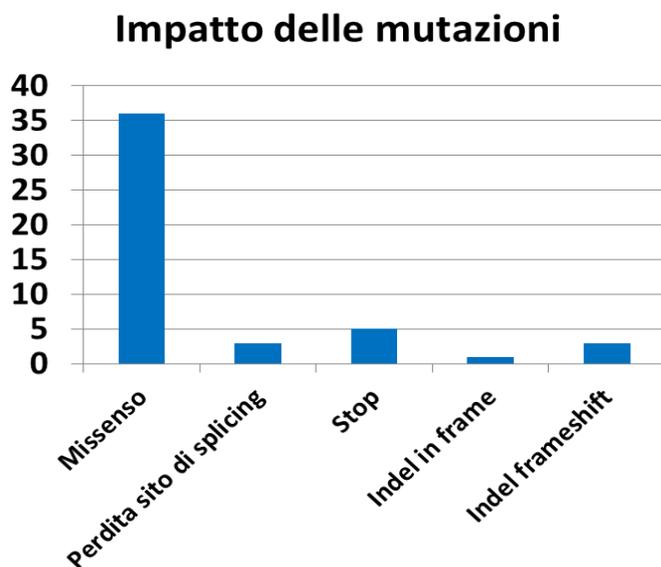


Grafico 10 - Impatto delle mutazioni individuate.

La medie del numero di varianti totali per paziente è di 240.3 , quella delle mutazioni predette deleterie per paziente è di 17.1.

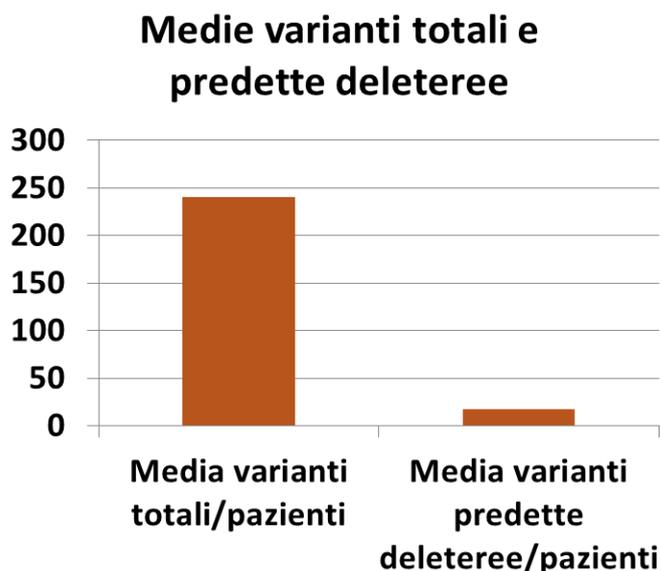


Grafico 11 - Media varianti totali per paziente e media varianti predette deleterie per paziente.

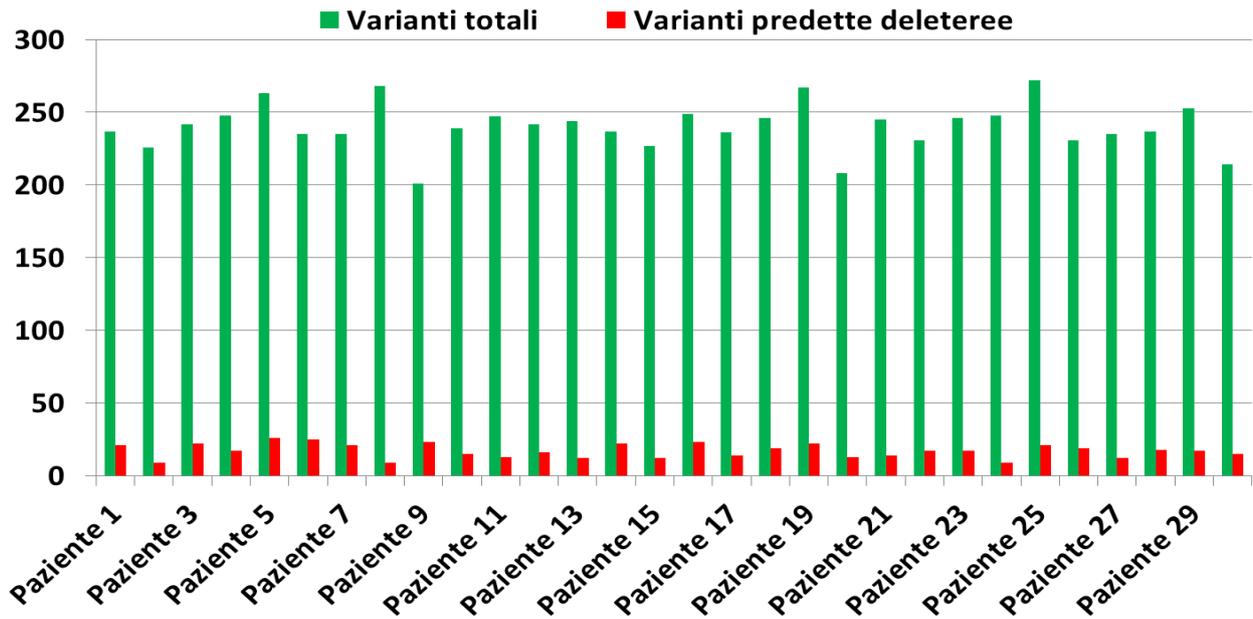


Grafico 12 - Varianti totali e varianti predette deleterie.

Inoltre, sono state identificate un numero di varianti di significato incerto (Variant of unknown significance, VOUS) che hanno una frequenza minore di 0.01 ma che non sono univocamente ritenute “patogenetiche” con i programmi di predizione. Il grafico sottostante (Grafico 13) riporta il *coverage* delle basi targettate per ogni paziente, per valori con copertura superiori a 20, 50 e 100.

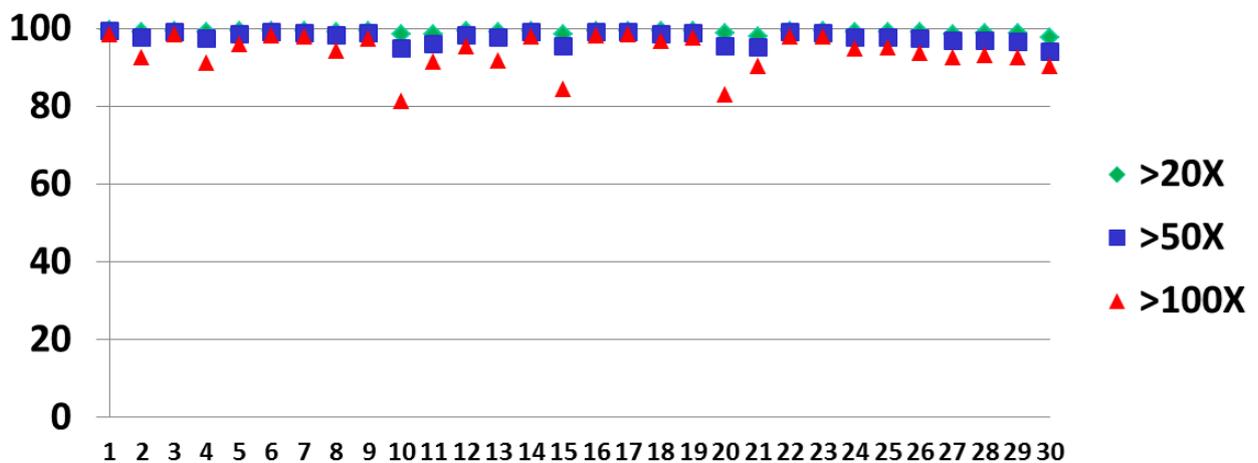


Grafico 13 – Copertura delle basi targettate per questo studio.

Sotto viene invece riportato un grafico simile ottenuto in uno studio analogo (Németh et al., 2013) a questo, in cui è stato creato un pannello di 53 geni correlate con atassia ed utilizzato per il sequenziamento di nuova generazione in un gruppo di 58 pazienti.

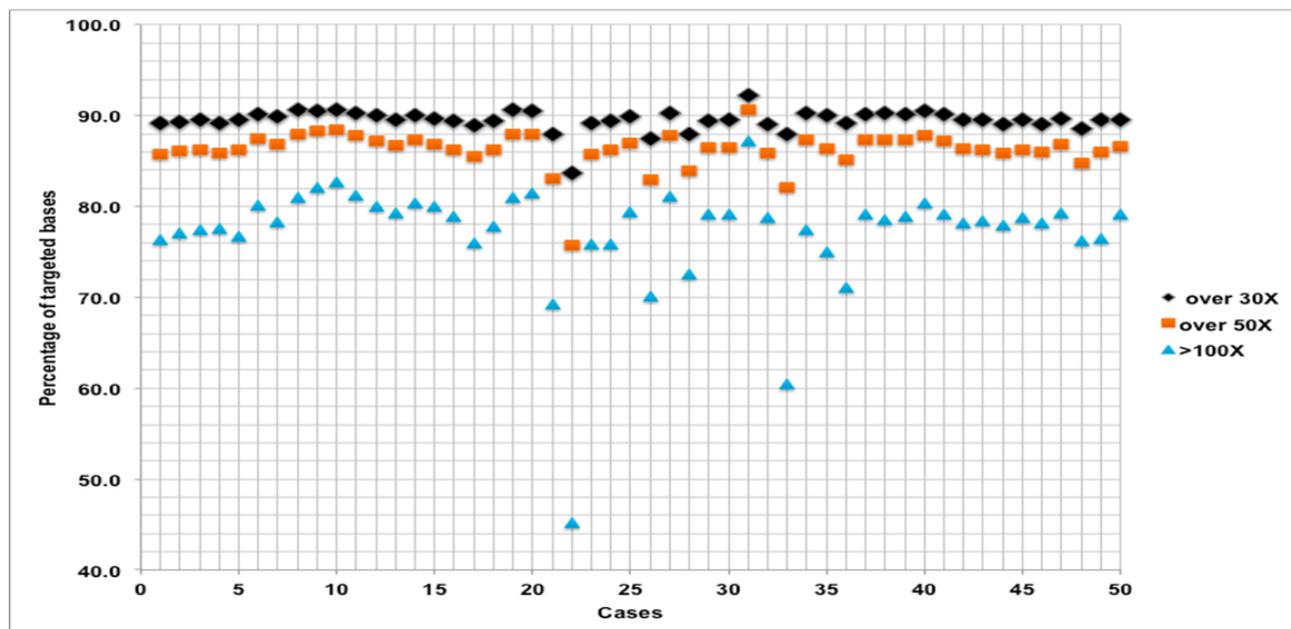


Grafico 14 - Coverage delle basi targettate in un lavoro analogo a questo studio (Németh et al., 2013).

Il coverage di 50X e di 100X per le basi targettate si attesta rispettivamente su una media del 95% e di circa il 90%, un dato quindi più alto di quelli nello studio riportato in letteratura che riportano un coverage 50X di circa l'85% e un coverage di 100X di circa il 75%, che risultano essere quindi addirittura inferiori a quelli ottenuti nel nostro studio. In base alle coperture ottenute nel nostro studio, possiamo ritenere i dati ottenuti molto attendibili.

5. Discussione

Le atassie ereditarie sono un gruppo di malattie estremamente eterogeneo sia dal punto di vista fenotipico che da quello genotipico. Le manifestazioni cliniche di queste patologie, pur condividendo alcune caratteristiche comuni, presentano uno spettro fenotipico molto ampio, ed in certi casi anche una gravità sintomatologica differente che rende difficile l'individuazione delle mutazioni coinvolte. Dal punto di vista del genotipo, nell'eziopatogenesi delle atassie sono coinvolti più di 50 geni che presentano tutte le modalità di trasmissione genetica, dominante, recessiva, legata all'X e mitocondriale. Proprio a causa di questa grande eterogeneità, un'analisi mutazionale con il tradizionale sequenziamento Sanger risulta essere laboriosa e costosa, diventando al giorno d'oggi perlomeno obsoleta. Il sequenziamento di NGS diventa quindi uno strumento importante nell'identificazione delle mutazioni genetiche nelle atassie ereditarie, in quanto consente un'analisi molto più ampia e veloce in un grande numero di geni.

In questo studio sono stati analizzati 30 pazienti (17 maschi ed 13 femmine con età media 44.1 anni) affetti da atassia, con forme tuttora indefinite a livello molecolare. L'analisi mediante metodologia Haloplex Target Enrichement System, di un pannello di 82 geni coinvolti o correlati con le atassie e le successive modalità di filtraggio e prioritizzazione delle varianti ha permesso di passare da un totale di 7209 varianti totali identificate, media per campione di 240.3, a 513 varianti predette deleterie totali (con una media per campione di 17.1).

Le varianti individuate possono essere classificate in patogenetiche, di significato incerto, possibilmente danneggianti e benigne. Le varianti patogenetiche sono definite come varianti che alterano la funzione della proteina, con la possibilità che siano già descritte in altri individui affetti con la stessa malattia o che sia stato dimostrato il loro effetto funzionale nell'alterazione della proteina in vitro o in modelli animali. Le varianti di significato incerto sono quelle varianti che hanno la possibilità di essere patogenetiche, ma che hanno una valutazione discordante secondo i

siti di predizione e una correlazione non congrua tra il fenotipo causato dalla mutazione del gene ed il fenotipo del paziente. Le varianti probabilmente patogenetiche sono quelle varianti individuate in singola copia in geni a trasmissione recessiva, dove però manca la seconda mutazione che per alcune ragioni potrebbe non essere stata individuata. Nella porzione di varianti benigne rientrano i pazienti che risultano negativi per l'analisi e per i quali sono stati trovati polimorfismi, presenti nella popolazione generale in una proporzione significativa (>0.01) (MacArthur et al.,2014).

Nel gruppo di pazienti studiato in questa tesi, i geni dove sono stati individuate le mutazioni sono *SYNE1*, *AFG3L2*, *PRKCG*, *PNPLA6*, *CLP1*, *ZFYVE26*, *KIF1C*, *SETX*, *CAMTA1*, *IFRD1*, *SACS*, *SIL1*, *AMPD2*, *APTX*, *PMPCA*, *TTC19*, *CACNB4*, *ZNF592*, *RARS2*, *SPTBN2*, *ATM*, *PLEKHG4*, *SPG7*, *PIK3R5*, *NPC1*, *CACNA1A*.

SYNE1 codifica per una proteina membro della famiglia delle specttrine che collega la membrana plasmatica al citoscheletro di actina (Schuurs-Hoeijmakers et al., 2013). In forma dominante può causare la distrofia di Emery-Dreifuss (Zhang et al., 2007), in forma recessiva SCAR8 (Gros-Louis et al., 2007). Per questo gene, in tutti i pazienti non è stata presa in considerazione la forma dominante in quanto nessuno di questi presenta distrofia. In questo gene, nel paziente 18 è stata riscontrata una mutazione in omozigosi (c.4609C>T, p.R1537*, hom) che conduce predittivamente alla precoce terminazione della proteina, quindi potrebbe essere patogenetica, in linea anche con il quadro clinico del paziente per il quale è prevista una forma recessiva che potrebbe causare una forma di atassia legata a questo gene. In altri 6 pazienti, casi 3-5-7-8-14-23, sono state trovate mutazioni, rispettivamente (c.21826G>A, p.D7276N) (c.13849A>C, p.N4617H) (c.1964A>G, p.Q655R) (c.3416G>A, p.W1139*) (c.14263C>T, p.L4755F)(c.1141G>A, p.D381N), ma in eterozigosi, dove quindi manca la seconda mutazione. Inoltre, solo nei pazienti 3 e 7, qualora la seconda mutazione ci sia ma che non sia stata trovata in questo studio, c'è un'effettiva corrispondenza tra

fenotipo atassico recessivo di *SYNE1* ed il fenotipo del paziente. Questa corrispondenza manca anche nel paziente 30, dove la mutazione (c.22675G>T, p.D7559Y) è stata identificata in omozigosi. *AFG3L2* codifica per una subunità catalitica della proteasi m-AAA, un complesso proteolitico ATP-dipendente della membrana interna mitocondriale che degrada proteine mal ripiegate e regola l'assemblaggio dei ribosomi (Koppen et al., 2007). In forma dominante può causare SCA28 (Di Bella et al., 2010), in forma recessiva l'atassia spastica tipo 5 (Pierson et al., 2011). Una mutazione in eterozigosi in questo gene è stata riscontrata nel paziente 12 (c.838C>T, p.R280W), ed il fenotipo di SCA28 potrebbe essere sovrapponibile con quello del paziente.

PRKCG codifica per la proteina chinasi C (Coussens et al., 1986), in forma dominante può causare SCA14 (Brkanac et al., 2002). Una mutazione in questo gene è stata riscontrata nel paziente 12 (c.653C>T, p.T218M), ed il fenotipo clinico del paziente, che ha una forma sporadica, è correlabile con il fenotipo della SCA14.

PNPLA6 codifica per un enzima che catalizza la de-esterificazione della fosfatidilcolina della membrana in acidi grassi e glicerofosfolina (Synofzik et al., 2014). In forma recessiva può causare paraplegia spastica 39 (Rainier et al., 2008), sindrome di Laurence-Moon (Hufnagel et al., 2015), sindrome di Boucher-Neuhauser (Synofzik et al., 2014) e sindrome di Oliver-McFarlane (Hufnagel et al., 2015). Sono state identificate 7 mutazioni in questo gene. Nel paziente 22 sono state identificate 2 mutazioni (c.3365C>T, p.P1122L; c.4081C>T, p.R1361*) in eterozigosi composta. Il fenotipo causato da queste due mutazioni si correla con la Sindrome di Boucher-Neuhauser. La mutazione P1122L è riportata in letteratura (Synofzik et al., 2014) ed è stata identificata tramite WES in uno studio su larga scala di pazienti con malattie neurodegenerative. In letteratura, come in questo studio, la mutazione (presente in eterozigosi composta) è stata identificata in pazienti inizialmente atasso-spastici e non da subito correlati con la sindrome di Boucher-Neuhauser. Nel paziente 26 è stata identificata una mutazione (c.3385G>A, p.G1129R) in omozigosi, ed il fenotipo

causato da questa mutazione è stato correlato con la Paraplegia spastica recessiva tipo 39 (SPG39). Le altre mutazioni in questo gene sono state trovate nel paziente 7 (c.1081A>C, p.1081A>C), nel paziente 11 (c.3058G>C, p.V419M), nel paziente 14 (c.656G>A, p.G219D) e nel paziente 19 (c.82G>T, p.E28*), tutte però in eterozigosi, mancando quindi l'identificazione della seconda mutazione che rimane indefinita. Un effettiva correlazione tra la paraplegia spastica 39 e il fenotipo dei pazienti la si può trovare, qualora fosse presente una seconda mutazione non identificata, nei pazienti 7 e 11.

CLP1 codifica per un componente del complesso endonucleasi del tRNA (TSEN), che rimuove introni da trascritti pre-tRNA. È una chinasi multifunzionale implicata nella maturazione del tRNA, mRNA e siRNA. In forma dominante può causare ipoplasia pontocerebellare di tipo 10 (Karaca et al., 2014) (Schaffer et al., 2014). Una mutazione in questo gene è stata trovata nel paziente 20 (c.898C>T, p.R236C). Sebbene il fenotipo del paziente possa spiegare la malattia, la variante è stata trovata in eterozigosi e non abbiamo quindi identificato la seconda mutazione.

ZFYVE26 codifica per una proteina contenente cinque domini zinc-finger, probabilmente coinvolta nel signaling cellulare (Nagase et al., 1997). In forma recessiva può causare paraplegia spastica 15 (Hughes et al., 2001). Una mutazione in questo gene è stata riscontrata nel paziente 5 (c.1844C>T, p.S615F) in eterozigosi, ma non c'è correlazione con malattia.

KIF1C codifica per un membro della famiglia delle chinesine (Dorner et al., 1998). In forma recessiva può causare atassia spastica 2 (SPAX2) (Dor et al., 2014). Una mutazione in questo gene è stata trovata nel paziente 4 (c.2010+2T>G, perdita del sito di splicing, het), ma in eterozigosi. Il fenotipo del paziente sarebbe correlabile con l'atassia spastica 2 (SPAX2), ma una seconda mutazione non è stata individuata.

SETX codifica per la senatassina, una proteina che potrebbe avere attività RNA e DNA elicasi ed anche un ruolo nella riparazione del DNA (Moreira et al., 2004). In forma dominante può causare

sclerosi laterale amiotrofica 4 giovanile (Chen et al., 2004), in forma recessiva SCAR1 (Moreira et al., 2004). In questo gene sono state trovate 5 mutazioni. Nel paziente 28 è stata identificata una mutazione (c.7292dupA, p.N2431fs*19) in omozigosi, ed il fenotipo del paziente si correla con SCAR1. Nel paziente 9 (c.3242T>C, p.F1081S) è stata identificata in omozigosi, causando una mutazione missenso: questa mutazione in omozigosi potrebbe far pensare ad un suo coinvolgimento in SCAR1, ma c'è discordanza tra i siti di predizione delle mutazioni missenso ed il fenotipo dato dalla mutazione del gene non si correla in modo adeguato con il quadro clinico del paziente, quindi il suo significato è incerto. Altre 3 mutazioni sono state trovate nel paziente 2 (c.1468G>A, p.V490I), nel paziente 22 (c.7427C>T, p.P2476L) ma in eterozigosi.

CAMTA1 è un gene poco conosciuto, ed abbiamo solo informazioni sulla funzione nel lievito, dove attiva la trascrizione di gene reporter (Bouche et al., 2002). In forma dominante può causare atassia cerebellare non progressiva con ritardo mentale (Thevenon et al., 2012). Una mutazione in questo gene è stata trovata nel paziente 19 (c.4886G>A, p.S1629N). Questa mutazione, essendo stata trovata in eterozigosi per un gene a trasmissione dominante, potrebbe essere correlata con l'atassia cerebellare non progressiva con ritardo mentale, ma essendo i risultati dei siti di predizione missenso discordanti ed essendo il fenotipo dato dalla mutazione del gene poco sovrapponibile con il fenotipo del paziente, questa variante resta di significato incerto.

IFRD1 codifica per un coregolatore trascrizionale istone deacetilasi-dipendente, espresso durante la differenziazione terminale dei neutrofili (Gu et al., 2009). Una mutazione di questo gene è stata riscontrata nel paziente 19 (c.1256G>A, p.R419H), ma si conosce ancora troppo poco sia sulle modalità di trasmissione del gene che sui suoi effetti patogenetici.

SACS codifica per la saccina, una proteina della dinamica mitocondriale che si ritiene integri il sistema ubiquitina-proteasoma e anche il sistema chaperone Hsp70, ed è implicata nel processamento dell'atassina 1 (Parfitt et al., 2009). In forma recessiva può causare atassia spastica

di Charlevoix-Saguenay (ARSACS) (Engert et al., 2000). Una mutazione eterozigote in questo gene è stata identificata nel paziente 14 (c.6511G>A, p.A2171T). La paziente ha una forma sporadica, ma per queste forme non possiamo escludere forme recessive.

SIL1 codifica per una glicoproteina residente nel reticolo endoplasmatico. In forma recessiva può causare la sindrome di Marinesco-Sjogren (Anttonen et al., 2005). Una mutazione in questo gene è stata trovata nel paziente 3 (c.994G>A, p.V332M), ma oltre ad essere in eterozigosi, non sembra esserci una significativa correlazione con la suddetta sindrome.

AMPD2 codifica per una adenosina monofosfato deaminasi-2, un enzima che catalizza la deaminazione dell'AMP in IMP e gioca un ruolo importante nel ciclo delle purine (Akizu et al., 2013). In forma recessiva può causare paraplegia spastica 63 (Novarino et al., 2014) o ipoplasia pontocerebellare di tipo 9 (Akizu et al., 2013). Una mutazione in questo gene è stata identificata nel paziente 17 (c.2042C>T, p.T681M), ma è in eterozigosi ed il fenotipo del paziente non si sovrappone con quello della malattie descritte.

APTX codifica per l'apratassina, un membro della superfamiglia della triade istidina, membri che hanno attività legante i nucleotidi e di adenosina polifosfato idrossilasi. In forma recessiva può causare atassia ad esordio precoce con aprassia oculomotoria ed ipoalbuminemia (Date et al., 2001). Una mutazione omozigote in questo gene è stata identificata nel paziente 18 (c.526-3_526-2delTA, con predetta perdita del sito di splicing); il fenotipo potrebbe spiegare rispettivamente l'ereditarietà di questo gene in questo paziente ed il suo quadro clinico. Un'altra mutazione è stata trovata nel paziente 25 (c.167G>T, p.R56L) ma in eterozigosi e con poca correlazione tra fenotipo del paziente e malattia.

PMPCA codifica per una peptidasi processante alfa-mitocondriale, un enzima eterodimerico responsabile per il taglio di precursori mitocondriali codificati nel nucleo dopo l'importazione nel mitocondrio. In forma recessiva può causare SCAR2 (Jobling et al., 2015). Una mutazione in questo

gene è stata trovata nel paziente 18 (c.1255G>A, p.V419M), ma oltre ad essere in eterozigosi non sembra esserci una potenziale correlazione tra fenotipo del paziente e SCAR2.

TTC19 codifica per una subunità del complesso III della catena respiratoria mitocondriale, che trasferisce elettroni dal coenzima Q al citocromo C. Questo trasferimento di elettroni potenzia l'estrusione di protoni attraverso la membrana mitocondriale interna e quindi contribuisce al potenziale elettrochimico mitocondriale. In forma recessiva può causare deficienza del complesso III mitocondriale, tipo nucleare 2 (Ghezzi et al., 2011). Una mutazione in questo gene è stata identificata nel paziente 6 (c.312+2T>A, perdita del sito di splicing), è in eterozigosi ma potenzialmente ha degli aspetti che si sovrappongono tra fenotipo clinico del paziente e quello della deficienza del complesso III mitocondriale che però è recessiva.

CACNB4 codifica per un membro della superfamiglia dei canali calcio voltaggio-dipendenti (Taviaux et al., 1997). Può causare atassia episodica di tipo 5 (Escayg et al., 2000). Una mutazione è stata identificata in questo gene nel paziente 15 (c.5>T, p.S2F, het), ma la modalità di trasmissione di questo gene per quanto riguarda l'atassia episodica di tipo 5 è incerta, ed inoltre l'atassia episodica non si correla con il fenotipo del paziente.

ZNF592 codifica per una proteina zinc-finger, e sembra essere coinvolta in SCA5 (Nicolas et al., 2010). Una mutazione in questo gene è stata riscontrata nel paziente 15 (c.310A>G, p.H1036R), ma le conoscenze sulle modalità di trasmissione di questo gene sono incerte e si sa ancora poco sul coinvolgimento di questo gene in SCA5.

RARS2 codifica per l'arginina-tRNA sintetasi mitocondriale. In forma recessiva può causare ipoplasia pontocerebellare di tipo 6 (Edvardson et al., 2007). Una mutazione in questo gene è stata identificata nel paziente 26 (c.437G>A, p.R146H), ma in eterozigosi, ed il fenotipo del paziente non si correla con quello dato dalla malattia.

SPTBN2 codifica per la β -III spettrina (Stankewich et al., 1998) coinvolta nella formazione di

tetrameri di spettrina che stabilizzano giunzioni cellulari, canali e molecole di adesione lungo la parte citoplasmatica della membrana (Clarkson et al., 2010). In forma dominante può causare atassia spinocerebellare 5 (SCA5) (Ikeda et al., 2006), in forma recessiva atassia spinocerebellare 14 recessiva (SCAR14) (Lise et al., 2012). Una mutazione in questo gene è stata trovata nel paziente 28 (c.1033C>T, p.Q345*), in eterozigosi, ma il fenotipo del paziente non trova correlazione con SCA5 e SCA14.

ATM codifica per un membro della famiglia delle fosfatidilinositolo 3-chinasi, che risponde al danno del DNA fosforilando dei substrati che hanno un ruolo chiave nella riparazione del DNA e nel controllo del ciclo cellulare (Savitsky et al., 1995). In forma dominante può causare suscettibilità al cancro al seno (Cortez et al., 1999), in forma recessiva atassia-telangiectasia (Savitsky et al., 1995). Una mutazione in questo gene è stata identificata nel paziente 27 (c.6495dupT, p.V2166fs*9), in eterozigosi ma potenzialmente ha degli aspetti che si sovrappongono tra fenotipo clinico del paziente e quello della atassia-telangiectasia.

PLEKHG4 è un gene che codifica per la puratrofina-1, una proteina di cui si conosce poco e che si pensa possa essere coinvolta nel signaling intracellulare e nella dinamica del citoscheletro actinico (Ishikawa et al., 2005). La sua modalità di trasmissione è poco chiara, ma si pensa che in forma dominante possa causare atassia cerebellare 31 (SCA31). Una mutazione in questo gene è stata trovata nel paziente 23 (c.2626G>C, p.E876Q) in eterozigosi, ma il fenotipo di SCA31 non si sovrappone bene con quello del paziente. La correlazione comunque tra questo gene e SCA31 è ancora poco chiara e approfondita.

SPG7 codifica per la paraplegina, un componente della proteasi m-AAA, un complesso proteolitico ATP-dipendente della membrana mitocondriale interna che degrada le proteine non ripiegate e che regola l'assemblaggio dei ribosomi (Koppen et al., 2007). In forma recessiva può dare paraplegia spastica 7 (Casari et al., 1998), ma questa stessa malattia in alcuni casi può presentarsi in forma

dominante (Sanchez-Ferrero et al., 2013). In questo gene sono state trovate 5 mutazioni in 3 pazienti. Nel paziente 25 sono state trovate 2 mutazioni (c.1529C>T, p.A510V; c.1972G>A, p.A658T) in eterozigosi composta, ed il suo fenotipo si correla con la paraplegia spastica di tipo 7 (SPG7). Questa malattia si correla anche con il fenotipo dato dalle mutazioni riscontrate nel paziente 29 (c.73_80delCCAGGCC, p.P25fs*46; c.1940C>A, p.A647E) e nel paziente 30 (c.1529C>T, p.A510V), rispettivamente in eterozigosi composta ed in omozigosi. Due pazienti su tre portano quindi la mutazione c.1529C>T, p.A510V (1 paziente omozigote, 1 paziente eterozigote composto). In letteratura p.A510V è stata identificata in 17 pazienti (sia in omozigosi che in eterozigosi composta) su un gruppo di 70 pazienti con sintomi di atassia e disturbo della marcia (Pfeffer et al., 2015), e quindi questa sembra essere una mutazione relativamente frequente nei pazienti con ARCA causata da mutazioni in SPG7.

PIK3R5 codifica per una subunità regolatoria della fosfatidilinositolo 3-fosfato chinasi (PI3K) (Brock et al., 2003). In forma recessiva può causare atassia con aprassia oculomotoria tipo 3 (Al Tassan et al., 2012). Una mutazione in questo gene è stata identificata nel paziente 28 (c.470G>A, p.R157H). Il fenotipo dell'atassia oculomotoria di tipi 3 si correlerebbe bene con il fenotipo del paziente, ma la mutazione è stata identificata in eterozigosi e quindi manca la seconda mutazione.

NPC1 codifica per una proteina coinvolta nella regolazione del traffico intracellulare del colesterolo (Carstea et al., 1997). In forma recessiva possono causare la malattia di Niemann-Pick di tipo C1 o di tipo D (Crocker, 1961). Una mutazione in questo gene è stata identificata nel paziente 28 (c.3614C>A, p.T1205K), ma in eterozigosi ed il fenotipo della malattia di Niemann-Pick in entrambe le forme non sembra correlare in modo corretto con il fenotipo del paziente.

CACNA1A codifica per una subunità facente parte di un poro transmembrana del canale calcio voltaggio-dipendente CaV2.1 (Kordasiewicz et al., 2006). In forma dominante può causare atassia episodica di tipo 2, emicrania familiare emiplegica di tipo 1 (Ophoff et al., 1996), emicrania

familiare emiplegica di tipo 1 con atassia cerebellare progressiva (Ducros et al., 1999), ed anche atassia spinocerebellare 6 (SCA6) (Zhuchenko et al., 1997). Una mutazione in questo gene è stata identificata nel paziente 22 (c.6982_6993delCAGCAGCAGCAG, p.Q2328_Q2331del) in omozigosi, ma il fenotipo identificato del paziente non sembra correlare con quello delle patologie sopracitate.

Nelle atassie sono possibili tutte le forme di ereditarietà, autosomica dominante, recessiva e legata all'X. I casi sporadici possono sottendere casi recessivi, in quanto possono essere portatori di mutazioni nella famiglia che non sono precedentemente riscontrabili, ma possono anche rappresentare mutazioni de novo o forme dominanti con penetranza ridotta o variabile. In questo lavoro di tesi, in 8 pazienti su 30 (27%) è stato quindi possibile effettuare una diagnosi molecolare. In 2 pazienti su 30 (7%) c'è mancanza di chiara correlazione tra fenotipo causato dalla mutazione patogenetica ed il fenotipo del paziente. In 10 pazienti su 30 (33%) c'è una sola mutazione in geni autosomici recessivi. Questo può trovare spiegazione sia nel fatto che la copertura possa essere risultata non ottimale, sia perché la seconda mutazione può ricadere in quella forbice di tipo di mutazione (variazione del numero di copie, mutazione strutturale) che il sequenziamento di nuova generazione non riesce ad identificare con sufficiente affidabilità, sia per il fatto che la seconda mutazione può ricadere in profonde regioni introniche o in regioni regolatorie che comunque non rientrano nel target delle regioni coperte da questo pannello. Può essere possibile che il fenotipo clinico sia spiegato da una sola mutazione. Sono descritti infatti geni (es. *SETX*, *POLG*) che, a seconda della zigosità, hanno diversi gradi clinici. In 10 pazienti su 30 (33%) non sono state riscontrate mutazioni o sono state riscontrate mutazioni valutate non patogenetiche o potenzialmente tali. Questo può essere dato ancora dal fatto di una bassa copertura o di mutazioni non identificabili da NGS, ma anche dalla presenza di mutazioni in geni non inclusi nel pannello perché non attualmente ritenuti correlati con le atassie, l'eventualità che siano stati

applicati filtri di analisi troppo stringenti, o addirittura più semplicemente l'atassia presente in questi pazienti potrebbe essere legata ad altre malattie fenotipicamente simili (fenocopie) e non studiate sul pannello oggetto di questo studio. Riassumendo, in questo studio i pazienti in cui è stata effettuata una diagnosi molecolare positiva è del 27%, incerta nel 7%, incompleta nel 33% e negativa nel 33%, percentuali che grossolanamente si avvicinano a quelle riportate in letteratura, dove troviamo la possibilità di effettuare una diagnosi molecolare in pannelli genici positiva nel 18%, incerta nel 26%, incompleta nel 26% e negativa nel 30%.

Diagnosi molecolare in questo studio

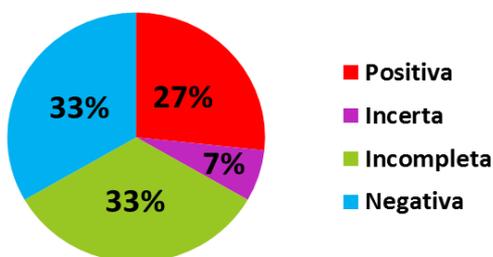


Grafico 15 - Diagnosi molecolare in questo studio

Diagnosi molecolare in pannelli genici

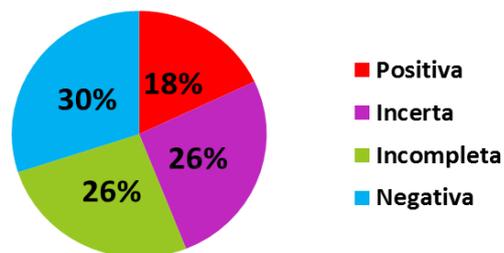


Grafico 16 - Diagnosi molecolare nei pannelli genici

In 20 pazienti su 30 (67%) sono state identificate varianti di significato patogenetico certo o predetto, una percentuale in linea con i valori riportati in letteratura nell'analisi dei pazienti genici che risulta essere del 60%.

Diagnosi molecolare in questo studio

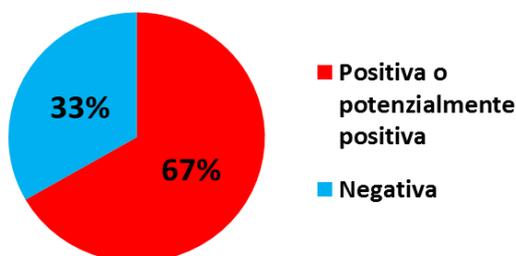


Grafico 17 - Diagnosi molecolare in questo studio

Diagnosi molecolare in pannelli genici

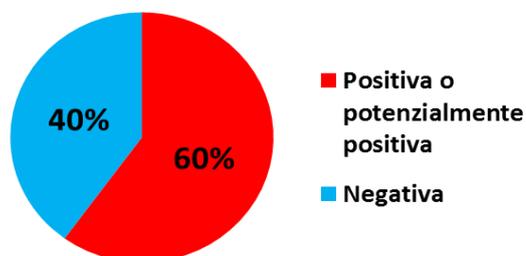


Grafico 18 - Diagnosi molecolare nei pannelli genici

Un possibile approccio per migliorare la possibilità di effettuare una diagnosi molecolare positiva o potenzialmente tale potrebbe essere l'utilizzo della Whole Exome Sequencing (WES), ma i dati riportati in letteratura ci indicano che questa possibilità si aggira intorno al 40%, un valore significativamente inferiore a quello dei pannelli genici.

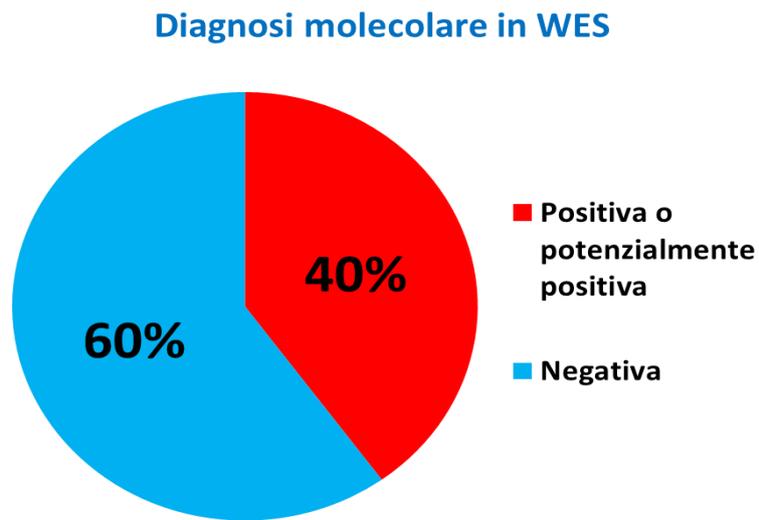


Grafico 19 - Diagnosi molecolare nella Whole Exome Sequencing (WES)

6. Conclusioni

Questo studio si era inizialmente prefissato lo scopo di applicare il sequenziamento di nuova generazione nell'identificazione delle basi molecolari della malattia, di identificare mutazioni nuove, e di applicare i risultati ottenuti per effettuare una correlazione genotipo-fenotipo nella coorte di pazienti presa in considerazione. I dati ottenuti sul coverage delle regioni sequenziate suggerisce che abbiamo applicato in modo ottimale NGS nell'identificazione delle basi molecolari delle malattie prese in considerazione. Riguardo l'identificazione di mutazioni nuove, abbiamo identificato 8 nuove varianti in 7 pazienti, ed è stato possibile effettuare una buona correlazione genotipo-fenotipo in 8 pazienti.

La grande eterogeneità delle atassie ereditarie costituisce un problema importante nella diagnosi di queste patologie. Gli studi di sequenziamento suggeriscono che i test genetici possono essere incompleti non solo quando la mutazione causativa è assente, ma anche quando la correlazione fenotipo/genotipo è debole. Questo accade in particolare quando la ricorrenza in una famiglia è poco chiara, con alcuni familiari che condividono solo sintomi minori. In famiglie con pazienti che sono più gravemente affetti, questa "area grigia" è problematica sia per una consulenza genetica sia per il trattamento specifico della mutazione. Tuttavia il sequenziamento di nuova generazione rimane un enorme passo avanti che consente di estendere la strategia di studio riducendo l'odissea diagnostica di molti pazienti, senza contare che l'analisi con NGS potrebbe costituire il test prioritario, precedendo altre procedure invasive (Savarese et al., 2014)

Sotto l'aspetto clinico ed in termini di correlazione genotipo-fenotipo, i risultati di NGS dovrebbero essere rivisti in funzione delle informazioni mediche. Quando una variante patogenetica viene individuata in un gene che spiega il fenotipo del paziente, i risultati dovrebbero essere confrontati con informazioni cliniche, ereditarietà, informazioni sulla famiglia, e quant'altro possa essere utile per una corretta correlazione genotipo-fenotipo. Oltre ad una migliore ridefinizione di un quadro

patologico, queste considerazioni possono mettere in luce un'estensione degli spettri fenotipici o addirittura nuove cause di malattie già note (Jamuar and Tan, 2015).

7. Prospettive future

L'utilizzo di pannelli con una serie limitata di geni target rimane uno strumento molto utile nel breve termine, ma con l'aumento delle nostre conoscenze sul genoma umano e sui geni correlati con le malattie, l'aggiunta nei pannelli di nuovi geni richiede tempo e potrebbe non essere vantaggioso dal punto di vista dei costi. Una futura prospettiva potrebbe essere il cosiddetto "esoma clinico", ovvero un WES applicato ad un gruppo di geni associato ad un certo fenotipo. Un'applicazione del genere potrebbe essere fatta sulle atassie, creando per esempio un cosiddetto "atassoma". I costi potrebbero aumentare, in quanto il numero di geni aumenterebbe di un ordine di grandezza, ma amplierebbe lo spettro di possibilità diagnostica. Alcune compagnie commerciali già stanno sviluppando kit diagnostici che rilevano solo regioni clinicamente rilevanti del genoma, eliminando il rischio di trovare varianti geniche la cui funzione è sconosciuta (Rehm, 2013). Un'altra possibilità è quella di utilizzare la WES andando a leggere solo quei geni coinvolti, o potenzialmente tali, nelle atassie. L'applicazione della NGS da un lato ha ribaltato l'approccio clinico nell'individuazione delle patologie (genotipo prima del fenotipo), ma dovrà essere utilizzata con cautela per evitare di incorrere in dati "clinicamente inutili" o incomprensibili e non incorrere nel paradosso che "più informazione è uguale a nessuna informazione". Certamente, integrazione tra NGS, migliori e più ampie rappresentazioni fenotipiche e incorporazione di dati funzionali (anche facendo ricorso a modelli in silico o semplici modelli in vivo di vertebrati) eviterà la situazione di stallo che si osserva tuttora, e soprattutto una nuova paradossale "odissea diagnostica" a molte famiglie (Korf and Rehm, 2013).

8. Bibliografia

- Akizu N, Cantagrel V, Schroth J, Cai N, Vaux K, McCloskey D, Naviaux RK, Van Vleet J, Fenstermaker AG, Silhavy JL, Scheliga JS, Toyama K, Morisaki H, Sonmez FM, Celep F, Oraby A, Zaki MS, Al-Baradie R, Faqeih EA, Saleh MA, Spencer E, Rosti RO, Scott E, Nickerson E, Gabriel S, Morisaki T, Holmes EW, Gleeson JG. "AMPD2 regulates GTP synthesis and is mutated in a potentially treatable neurodegenerative brainstem disorder." *Cell* 2013 154: 505-517.
- Al Tassan N, Khalil D, Shinwari J, Al Sharif L, Bavi P, Abduljaleel Z, Abu Dhaim N, Magrashi A, Bobis S, Ahmed H, AlAhmed S, Bohlega S. "A missense mutation in *PIK3R5* gene in a family with ataxia and oculomotor apraxia." *Hum Mutat.* 2012 33: 351-354.
- Allikmets R, Raskind WH, Hutchinson A, Schueck ND, Dean M, Koeller DM. "Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (*ABC7*) in Xlinked sideroblastic anemia and ataxia (XLSA/A)." *Hum Mol Genet.* 1999; 8:743-9.
- Alper G and Narayanan V. "Friedreich's ataxia." *Pediatr Neurol* 2003; 28: 335–41.
- Ansorge WJ. "Next-generation DNA sequencing techniques." *New Biotechnology* 2009; 25(4): 195-203.
- Anttonen AK, Mahjneh I, Hamalainen RH, Lagier-Tourenne C, Kopra O, Waris L, Anttonen M, Joensuu T, Kalimo H, Paetau A, Tranebjaerg L, Chaigne D, Koenig M, Eeg-Olofsson O, Udd B, Somer M, Somer H, Lehesjoki AE. "The gene disrupted in Marinesco-Sjogren syndrome encodes *SIL1*, an HSPA5 cochaperone." *Nature Genet.* 2005; 37:1309-1311.
- Ball LG and Xiao W. "Molecular basis of ataxia telangiectasia and related diseases." *Acta Pharmacologica Sinica* 2005; 26: 897–907.
- Bekri S, Kispal G, Lange H, Fitzsimons E, Tolmie J, Lill R, Bishop DF. "Human *ABC7* transporter: gene structure and mutation causing X-linked sideroblastic anemia with ataxia

- with disruption of cytosolic iron-sulfur protein maturation". *Blood*, 2000 Nov 1; 96(9):3256-64.
- Berglund EC, Lindqvist CM, Hayat S, Övernäs E, Henriksson N, Nordlund J, Wahlberg P, Forestier E, Lönnerholm G, Syvänen AC. "Accurate detection of subclonal single nucleotide variants in whole genome amplified and pooled cancer samples using HaloPlex target enrichment." *BMC Genomics*. 2013; 14:856.
 - Bidichandani SI, Ashizawa T, Patel PI. "The GAA triplet-repeat expansion in Friedreich ataxia interferes with transcription and may be associated with an unusual DNA structure." *Am J Hum Genet*. 1998; 62: 111–21.
 - Bouche N, Scharlat A, Snedden W, Bouchez D, Fromm, H. "A novel family of calmodulin-binding transcription activators in multicellular organisms." *J Biol Chem*. 2002; 277: 21851-21861.
 - Boycott KM, Vanstone MR, Bulman DE, MacKenzie AE. "Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: discovery to translation." *Nat Rev Genet*. 2013 Oct; 14(10):681-91.
 - Bradley JL, Blake JC, Chamberlain S, Thomas PK, Cooper JM, Schapira AHV. "Clinical, biochemical and molecular genetic correlations in Friedreich's ataxia." *Hum Mol Genet*. 2000; 9: 275–82.
 - Brkanac Z, Bylenok L, Fernandez M, Matsushita M, Lipe H, Wolff J, Nochlin D, Raskind WH, Bird TD. "A new dominant spinocerebellar ataxia linked to chromosome 19q13.4-qter." *Arch. Neurol*. 2002 59: 1291-1295. Note: Erratum: *Arch. Neurol*. 2002.; 59: 1972 only.
 - Brock C, Schaefer M, Reusch HP, Czupalla C, Michalke M, Spicher K, Schultz G, Nurnberg B. "Roles of G-beta-gamma in membrane recruitment and activation of p110-gamma/p101 phosphoinositide 3-kinase gamma." *J Cell Biol*. 2003; 160: 89-99.

- Brunberg JA, Jacquemont S, Hagerman RJ, Berry-Kravis EM, Grigsby J, Leehey MA, Tassone F, Brown WT, Greco CM, Hagerman PJ. "Fragile X premutation carriers: characteristic MR imaging findings of adult male patients with progressive cerebellar and cognitive dysfunction." *AJNR Am J Neuroradiol.* 2002; 23:1757–1766.
- Brusse E, de Koning I, Maat-Kievit A, Oostra BA, Heutink P, van Swieten JC. "Spinocerebellar ataxia associated with a mutation in the fibroblast growth factor 14 gene (SCA27): a new phenotype." *Mov Disord.* 2006; 21: 396–401.
- Camaschella C. "Recent advances in the understanding of inherited sideroblastic anaemia." *Br J Haematol.* 2008; 143:27-38.
- Campuzano V, Montermini L, Moltò MD, Pianese L, Cossée M, Cavalcanti F, Monros E, Rodius F, Duclos F, Monticelli A, Zara F, Cañizares J, Koutnikova H, Bidichandani SI, Gellera C, Brice A, Trouillas P, De Michele G, Filla A, De Frutos R, Palau F, Patel PI, Di Donato S, Mandel JL, Coccozza S, Koenig M, Pandolfo M. "Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion." *Science* 1996; 271: 1423–27.
- Campuzano V, Montermini L, Lutz Y, Cova L, Hindelang C, Jiralerspong S, Trottier Y, Kish SJ, Faucheux B, Trouillas P, Authier FJ, Dürr A, Mandel JL, Vescovi A, Pandolfo M, Koenig M. "Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes." *Hum Mol Genet.* 1997; 6: 1771–80.
- Carstea ED, Morris JA, Coleman KG, Loftus SK, Zhang D, Cummings C, Gu J, Rosenfeld MA, Pavan WJ, Krizman DB, Nagle J, Polymeropoulos MH, Sturley SL, Ioannou YA, Higgins ME, Comly M, Cooney A, Brown A, Kaneski CR, Blanchette-Mackie EJ, Dwyer NK, Neufeld EB, Chang TY, Liscum L, Strauss JF 3rd, Ohno K, Zeigler M, Carmi R, Sokol J, Markie D, O'Neill RR, van Diggelen OP, Elleder M, Patterson MC, Brady RO, Vanier MT, Pentchev PG, Tagle DA. "Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis."

Science 1997; 277: 228-231.

- Casari G, De Fusco M, Ciarmatori S, Zeviani M, Mora M, Fernandez P, De Michele G, Filla A, Coccozza S, Marconi R, Durr A, Fontaine B, Ballabio A. "Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease." *Cell* 1998; 93: 973-983.
- Chen DH, Brkanac Z, Verlinde CL, Tan XJ, Bylenok L, Nochlin D, Matsushita M, Lipe H, Wolff J, Fernandez M, Cimino PJ, Bird TD, Raskind WH. "Missense mutations in the regulatory domain of PKC gamma: a new mechanism for dominant nonepisodic cerebellar ataxia." *Am J Hum Genet.* 2003; 72: 839-49.
- Chen YZ, Bennett CL, Huynh HM, Blair IP, Puls I, Irobi J, Dierick I, Abel A, Kennerson ML, Rabin BA, Nicholson GA, Auer-Grumbach M, Wagner K, De Jonghe P, Griffin JW, Fischbeck KH, Timmerman V, Cornblath DR, Chance PF. "DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4)." *Am. J. Hum. Genet.* 2004 74: 1128-1135.
- Chun HH and Gatti RA. "Ataxia-telangiectasia, an evolving phenotype." *DNA Repair (Amst)* 2004; 3: 1187-96.
- Clarkson YL, Gillespie T, Perkins EM, Lyndon AR, Jackson M. "Beta-III spectrin mutation L253P associated with spinocerebellar ataxia type 5 interferes with binding to Arp1 and protein trafficking from the Golgi." *Hum Molec Genet.* 2010; 19: 3634-3641.
- Cortez D, Wang Y, Qin J, Elledge SJ. "Requirement of ATM-dependent phosphorylation of Brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks." *Science* 1999; 286: 1162-1166.
- Coussens L, Parker PJ, Rhee L, Yang-Feng TL, Chen E, Waterfield MD, Francke U, Ullrich A. "Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways." *Science* 1986; 233: 859-866.

- Crocker AC. "The cerebral defect in Tay-Sachs disease and Niemann-Pick disease. J." *Neurochem.* 1961; 7: 69-80.
- D'Hooghe M, Selleslag D, Mortier G, Van Coster R, Vermeersch P, Billiet J, Bekri S. "X-linked sideroblastic anemia and ataxia: a new family with identification of a fourth *ABCB7* gene mutation." *Eur J Paediatr Neurol.* 2012 Nov; 16(6):730-5.
- Dagda RK, Merrill RA, Cribbs JT, Chen Y, Hell JW, Usachev YM, Strack S. "The spinocerebellar ataxia 12 gene product and protein phosphatase 2A regulatory subunit Bbeta2 antagonizes neuronal survival by promoting mitochondrial fission." *J Biol Chem.* 2008 Dec 26; 283(52):36241-8.
- Date H, Onodera O, Tanaka H, Iwabuchi K, Uekawa K, Igarashi S, Koike R, Hiroi T, Yuasa T, Awaya Y, Sakai T, Takahashi T, Nagatomo H, Sekijima Y, Kawachi I, Takiyama Y, Nishizawa M, Fukuhara N, Saito K, Sugano S, Tsuji S. "Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia is caused by mutations in a new HIT superfamily gene." *Nature Genet.* 2001; 29: 184-188.
- Day JW, Schut LJ, Moseley ML, Durand AC, Ranum LP. "Spinocerebellar ataxia type 8: clinical features in a large family." *Neurology* 2000; 55: 649–57.
- Di Bella D, Lazzaro F, Brusco A, Plumari M, Battaglia G, Pastore A, Finardi A, Cagnoli C, Tempia F, Frontali M, Veneziano L, Sacco T, Boda E, Brussino A, Bonn F, Castellotti B, Baratta S, Mariotti C, Gellera C, Fracasso V, Magri S, Langer T, Plevani P, Di Donato S, Muzi-Falconi M, Taroni F. "Mutations in the mitochondrial protease gene *AFG3L2* cause dominant hereditary ataxia SCA28." *Nature Genet.* 2010; 42: 313-321.
- Di Donato S, Gellera C, Mariotti C. "The complex clinical and genetic classification of inherited ataxias—II: autosomal recessive ataxias." *Neurol Sci.* 2001; 22: 219–28.
- Dor T, Cinnamon Y, Raymond L, Shaag A, Bouslam N, Bouhouche A, Gausson M, Meyer V,

- Durr A, Brice A, Benomar A, Stevanin G, Schuelke M, Edvardson S. "KIF1C mutations in two families with hereditary spastic paraparesis and cerebellar dysfunction." *J Med Genet.* 2014, 51: 137-142.
- Dorner C, Ciossek T, Muller S, Moller NPH, Ullrich A, Lammers R. "Characterization of KIF1C, a new kinesin-like protein involved in vesicle transport from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum." *J Biol Chem.* 1998; 273: 20267-20275.
 - Ducros A, Denier C, Joutel A, Vahedi K, Michel A, Darcel F, Madigand M, Guerouaou D, Tison F, Julien J, Hirsch E, Chedru F, Bisgard C, Lucotte G, Despres P, Billard C, Barthez MA., Ponsot G, Bousser MG, Tournier-Lasserre E. "Recurrence of the T666M calcium channel CACNA1A gene mutation in familial hemiplegic migraine with progressive cerebellar ataxia." *Am J Hum Genet.* 1999; 64: 89-98.
 - Durr A. "Autosomal dominant cerebellar ataxias: polyglutamine expansion and beyond", *Lancet Neurology* 2010; 9:885-94.
 - Edvardson S, Shaag A, Kolesnikova O, Gomori JM, Tarassov I, Einbinder T, Saada E, Elpeleg O. "Deleterious mutation in the mitochondrial arginyl-transfer RNA synthetase gene is associated with pontocerebellar hypoplasia." *Am J Hum Genet.* 2007; 81: 857-862.
 - Engert JC, Berube P, Mercier J, Dore C, Lepage P, Ge B, Bouchard JP, Mathieu J, Melancon SB, Schalling M, Lander ES, Morgan K, Hudson TJ, Richter A. "ARSACS, a spastic ataxia common in northeastern Quebec, is caused by mutations in a new gene encoding an 11.5-kb ORF." *Nature Genet.* 2000; 24: 120-125.
 - Escayg, A., De Waard, M., Lee, D. D., Bichet, D., Wolf, P., Mayer, T., Johnston, J., Baloh, R., Sander, T., Meisler, M. H. "Coding and noncoding variation of the human calcium-channel beta(4)-subunit gene CACNB4 in patients with idiopathic generalized epilepsy and episodic ataxia". *Am. J. Hum. Genet.* 2000; 66: 1531-1539.

- Fogel BL and Perlman S. “Clinical features and molecular genetics of autosomal recessive cerebellar ataxias.” *Lancet Neurol.* 2007; 6:245-57.
- García-Murias M, Quintáns B, Arias M, Seixas AI, Cacheiro P, Tarrío R, Pardo J, Millán MJ, Arias-Rivas S, Blanco-Arias P, Dapena D, Moreira R, Rodríguez-Trelles F, Sequeiros J, Carracedo A, Silveira I, Sobrido MJ. “‘Costa da Morte’ ataxia is spinocerebellar ataxia 36: clinical and genetic characterization”. *Brain.* 2012 May; 135(5): 1423–1435.
- Ghezzi D, Arzuffi P, Zordan M, Da Re C, Lamperti C, Benna C, D'Adamo P, Diodato D, Costa R, Mariotti C, Uziel G, Smiderle C, Zeviani M. “Mutations in *TTC19* cause mitochondrial complex III deficiency and neurological impairment in humans and flies.” *Nature Genet.* 2011; 43: 259-263.
- Gilissen C, Hoischen A, Brunner HG, Veltman JA. “Disease gene identification strategies for exome sequencing.” *Eur J Hum Genet.* 2012,; 20:490–497.
- Greco CM, Hagerman RJ, Tassone F, Chudley AE, Del Bigio MR, Jacquemont S, Leehey M, Hagerman PJ. “Neuronal intranuclear inclusions in a new cerebellar tremor/ataxia syndrome among fragile X carriers.” *Brain* 2002, 125:1760–1771.
- Gros-Louis F, Dupre N, Dion P, Fox MA, Laurent S, Verreault S, Sanes JR, Bouchard JP, Rouleau GA. “Mutations in *SYNE1* lead to a newly discovered form of autosomal recessive cerebellar ataxia.” *Nature Genet.* 2007; 39: 80-85.
- Gu Y, Harley IT, Henderson LB, Aronow BJ, Vietor I, Huber LA, Harley JB, Kilpatrick JR, Langefeld CD, Williams AH, Jegga AG, Chen J, Wills-Karp M, Arshad SH, Ewart SL, Thio CL, Flick LM, Filippi MD, Grimes HL, Drumm ML, Cutting GR, Knowles MR, Karp CL. “Identification of *IFRD1* as a modifier gene for cystic fibrosis lung disease.” *Nature* 2009; 458: 1039-1042.
- Hagerman PJ and Hagerman RJ, “Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome”, *Ann N Y*

Acad Sci. 2015 March ; 1338(1): 58–70.

- Hagerman RJ and Hagerman P. “Advances in clinical and molecular understanding of the *FMR1* premutation and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome.” *Lancet Neurol.* 2013; 12:786–798.
- Hall D, Tassone F, Klepitskaya O, Leehey M. “Fragile X-associated tremor ataxia syndrome in *FMR1* gray zone allele carriers.” *Mov Disord.* 2012; 27:296–300.
- Harding AE. “Early onset cerebellar ataxia with retained tendon reflexes: a clinical and genetic study of a disorder distinct from Friedreich’s ataxia.” *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1981; 44: 503–08.
- Harding AE. “Classification of the hereditary ataxias and paraplegias.” *Lancet* 1983; 1: 1151–55.
- Herman-Bert A, Stevanin G, Netter JC, Rascol O, Brassat D, Calvas P, Camuzat A, Yuan Q, Schalling M, Dürr A, Brice A. “Mapping of Spinocerebellar Ataxia 13 to Chromosome 19q13.3-q13.4 in a Family with Autosomal Dominant Cerebellar Ataxia and Mental Retardation”. *Am J Hum Genet.* 2000 Jul; 67(1): 229–235.
- Houlden H, Johnson J, Gardner-Thorpe C, Lashley T, Hernandez D, Worth P, Singleton AB, Hilton DA, Holton J, Revesz T, Davis MB, Giunti P, Wood NW. “Mutations in *TTBK2*, encoding a kinase implicated in tau phosphorylation, segregate with spinocerebellar ataxia type 11.” *Nat Genet.* 2007 Dec; 39(12):1434-6.
- Hufnagel RB, Arno G, Hein ND, Hersheson J, Prasad M, Anderson Y, Krueger LA, Gregory LC, Stoetzel C, Jaworek TJ, Hull S, Li A, Plagnol V, Willen CM, Morgan TM, Prows CA, Hegde RS, Riazuddin S, Grabowski GA, Richardson RJ, Dieterich K, Huang T, Revesz T, Martinez-Barbera JP, Sisk RA, Jefferies C, Houlden H, Dattani MT, Fink JK, Dollfus H, Moore AT, Ahmed ZM. “Neuropathy target esterase impairments cause Oliver-McFarlane and Laurence-Moon

syndromes." *J Med Genet.* 2015; 52: 85-94.

- Hughes CA, Byrne PC, Webb S, McMonagle P, Patterson V, Hutchinson M, Parfrey NA. "SPG15, a new locus for autosomal recessive complicated HSP on chromosome 14q." *Neurology* 2001; 56: 1230-1233.
- Ikeda Y, Dick KA, Weatherspoon MR, Gincel D, Armbrust KR, Dalton JC, Stevanin G, Durr A, Zuhlke C, Burk K, Clark HB, Brice A, Rothstein JD, Schut LJ, Day JW, Ranum LPW. "Spectrin mutations cause spinocerebellar ataxia type 5." *Nature Genet.* 2006; 38: 184-190.
- Ishikawa K, Toru S, Tsunemi T, Li M, Kobayashi K, Yokota T, Amino T, Owada K, Fujigasaki H, Sakamoto M, Tomimitsu H, Takashima M, Kumagai J, Noguchi Y, Kawashima Y, Ohkoshi N, Ishida G, Gomyoda M, Yoshida M, Hashizume Y, Saito Y, Murayama S, Yamanouchi H, Mizutani T, Kondo I, Toda T, Mizusawa H. "An autosomal dominant cerebellar ataxia linked to chromosome 16q22.1 is associated with a single-nucleotide substitution in the 5-prime untranslated region of the gene encoding a protein with spectrin repeat and Rho guanine-nucleotide exchange-factor domains." *Am J Hum Genet.* 2005; 77: 280-296.
- Isidor B, Lindenbaum P, Pichon O, Bézieau S, Dina C, Jacquemont S, Martin-Coignard D, Thauvin-Robinet C, Le Merrer M, Mandel JL, David A, Faivre L, Cormier-Daire V, Redon R, Le Caignec C. "Truncating mutations in the last exon of *NOTCH2* cause a rare skeletal disorder with osteoporosis." *Nature Genetics* 2011; 43:306–308.
- Jamuar SS and Tan EC. "Clinical application of next-generation sequencing for Mendelian disease." *Human genomics* 2015; 9:10.
- Jayadev S and Bird TD. "Hereditary ataxias: overview." *Genet Med.* 2013 Sep; 15(9):673-83.
- Jobling RK, Assoum M, Gakh O, Blaser S, Raiman JA, Mignot C, Roze E, Dürr A, Brice A, Lévy N, Prasad C, Paton T, Paterson AD, Roslin NM, Marshall CR, Desvignes JP, Roëckel-Trevisiol N, Scherer SW, Rouleau GA, Mégarbané A, Isaya G, Delague V, Yoon G. "PMPCA mutations

cause abnormal mitochondrial protein processing in patients with non-progressive cerebellar ataxia." *Brain* 2015; 138:1505-1517.

- Johnston JJ, Rubinstein WS, Facio FM, Ng D, Singh LN, Teer JK, Mullikin JC, Biesecker LG. "Secondary variants in individuals undergoing exome sequencing: screening of 572 individuals identifies high-penetrance mutations in cancer-susceptibility genes." *Am J Hum Genet.* 2012; 91:97–108.
- Karaca E, Weitzer S, Pehlivan D, Shiraishi H, Gogakos T, Hanada T, Jhangiani SN, Wiszniewski W, Withers M, Campbell IM, Erdin S, Isikay S, Franco LM, Gonzaga-Jauregui C, Gambin T, Gelowani V, Hunter JV, Yesil G, Koparir E, Yilmaz S, Brown M, Briskin D, Hafner M, Morozov P, Farazi TA, Bernreuther C, Glatzel M, Trattng S, Friske J, Kronnerwetter C, Bainbridge MN, Gezdirici A, Seven M, Muzny DM, Boerwinkle E, Ozen M; Baylor Hopkins Center for Mendelian Genomics, Clausen T, Tuschl T, Yuksel A, Hess A, Gibbs RA, Martinez J, Penninger JM, Lupski JR. "Human *CLP1* mutations alter tRNA biogenesis, affecting both peripheral and central nervous system function." *Cell* 2014; 157: 636-650.
- Keren B, Jacquette A, Depienne C, Leite P, Durr A, Carpentier W, Benyahia B, Ponsot G, Soubrier F, Brice A, Héron D. "Evidence against haploinsufficiency of human ataxin 10 as a cause of spinocerebellar ataxia type 10." *Neurogenetics*. 2010 May; 11(2):273-4.
- Koppen M, Metodiev MD, Casari G, Rugarli EI, Langer T. "Variable and tissue-specific subunit composition of mitochondrial m-AAA protease complexes linked to hereditary spastic paraplegia." *Molec Cell Biol.* 2007; 27: 758-767.
- Kordasiewicz HB, Thompson RM, Clark HB, Gomez CM. "C-termini of P/Q-type Ca(2+) channel alpha1A subunits translocate to nuclei and promote polyglutamine-mediated toxicity." *Hum Molec Genet.* 2006; 15: 1587-1599.
- Korf BR and Rehm HL. "New approaches to molecular diagnosis." *JAMA*

2013;309(14):1511–21.

- Lise S, Clarkson Y, Perkins E, Kwasniewska A, Sadighi Akha E, Schnekenberg RP, Suminaite D, Hope J, Baker I, Gregory L, Green A, Allan C, Lamble S, Jayawant S, Quaghebeur G, Cader MZ, Hughes S, Armstrong RJE, Kanapin A, Rimmer A, Lunter G, Mathieson I, Cazier JB, Buck D, Taylor JC, Bentley D, McVean G, Donnelly P, Knight SJL, Jackson M, Ragoussis J, Németh AH. “Recessive mutations in *SPTBN2* implicate beta-III spectrin in both cognitive and motor development.” *PLoS Genet.* 2012; 8: e1003074. Note: Electronic Article.
- Loesch DZ, Sherwell S, Kinsella G, Tassone F, Taylor A, Amor D, Sung S, Evans A. “Fragile X-associated tremor/ataxia phenotype in a male carrier of unmethylated full mutation in the *FMR1* gene.” *Clin Genet.* 2012; 82:88–92.
- MacArthur DG, Manolio TA, Dimmock DP, Rehm HL, Shendure J, Abecasis GR, Adams DR, Altman RB, Antonarakis SE, Ashley EA, Barrett JC, Biesecker LG, Conrad DF, Cooper GM, Cox NJ, Daly MJ, Gerstein MB, Goldstein DB, Hirschhorn JN, Leal SM, Pennacchio LA, Stamatoyannopoulos JA, Sunyaev SR, Valle D, Voight BF, Winckler W, Gunter C. “Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease.” *Nature* 2014; 508(7497):469–76.
- Marelli C, van de Leemput J, Johnson JO, Tison F, Thauvin-Robinet C, Picard F, Tranchant C, Hernandez DG, Huttin B, Boulliat J, Sangla I, Marescaux C, Brique S, Dollfus H, Arepalli S, Benatru I, Ollagnon E, Forlani S, Hardy J, Stevanin G, Dürr A, Singleton A, Brice A. “SCA15 due to *ITPR1* deletions in a large cohort of Caucasian families with dominant ataxia.” *Arch Neurol.* 2011; 68:637-43.
- McKinnon PJ. “*ATM* and ataxia telangiectasia.” *EMBO Rep.* 2004; 5: 772–76.
- Moreira MC, Klur S, Watanabe M, Németh AH, Le Ber I, Moniz JC, Tranchant C, Aubourg P, Tazir M, Schöls L, Pandolfo M, Schulz JB, Pouget J, Calvas P, Shizuka-Ikeda M, Shoji M,

- Tanaka M, Izatt L, Shaw CE, M'Zahem A, Dunne E, Bomont P, Benhassine T, Bouslam N, Stevanin G, Brice A, Guimarães J, Mendonça P, Barbot C, Coutinho P, Sequeiros J, Dürr A, Warter JM, Koenig M. "Senataxin, the ortholog of a yeast RNA helicase, is mutant in ataxia-ocular apraxia 2." *Nature Genet.* 2004; 36: 225-227.
- Nagase, T., Ishikawa, K., Nakajima, D., Ohira, M., Seki, N., Miyajima, N., Tanaka, A., Kotani, H., Nomura, N., Ohara, O. "Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. VII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins in vitro." *DNA Res.* 1997; 4: 141-150.
 - Napier I, Ponka P, Richardson DR. "Iron trafficking in the mitochondrion: novel pathways revealed by disease." *Blood* 2005; 105:1867-74.
 - Németh AH, Kwasniewska AC, Lise S, Parolin Schnekenberg R, Becker EB, Bera KD, Shanks ME, Gregory L, Buck D, Zameel Cader M, Talbot K, de Silva R, Fletcher N, Hastings R, Jayawant S, Morrison PJ, Worth P, Taylor M, Tolmie J, O'Regan M; UK Ataxia Consortium, Valentine R, Packham E, Evans J, Seller A, Ragoussis J. "Next generation sequencing for molecular diagnosis of neurological disorders using ataxias as a model." *Brain* 2013 Oct; 136(Pt 10):3106-18.
 - Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, Bigham AW, Tabor HK, Dent KM, Huff CD, Shannon PT, Jabs EW, Nickerson DA, Shendure J, Bamshad MJ. "Exome sequencing identifies the cause of a Mendelian disorder." *Nat Genet.* 2010; 42(1):30-5.
 - Nicolas E, Poitelon Y, Chouery E, Salem N, Levy N, Megarbane A, Delague V. "CAMOS, a nonprogressive, autosomal recessive, congenital cerebellar ataxia, is caused by a mutant zinc-finger protein, *ZNF592*." *Europ J Hum Genet.* 2010; 18: 1107-1113
 - Novarino G, Fenstermaker AG, Zaki MS, Hofree M, Silhavy JL, Heiberg AD, Abdellateef M, Rosti B, Scott E, Mansour L, Masri A, Kayserili H, Al-Aama JY, Abdel-Salam GM, Karminejad

- A, Kara M, Kara B, Bozorgmehri B, Ben-Omran T, Mojahedi F, Mahmoud IG, Bouslam N, Bouhouche A, Benomar A, Hanein S, Raymond L, Forlani S, Mascaro M, Selim L, Shehata N, Al-Allawi N, Bindu PS, Azam M, Gunel M, Caglayan A, Bilguvar K, Tolun A, Issa MY, Schroth J, Spencer EG, Rosti RO, Akizu N, Vaux KK, Johansen A, Koh AA, Megahed H, Durr A, Brice A, Stevanin G, Gabriel SB, Ideker T, Gleeson JG. "Exome sequencing links corticospinal motor neuron disease to common neurodegenerative disorders." *Science* 2014; 343: 506-511.
- Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, van Eijk R, Oefner PJ, Hoffman SMG, Lamerdin JE, Mohrenweiser HW, Bulman DE, Ferrari M, Haan J, Lindhout D, van Ommen GJB, Hofker MH, Ferrari MD, Frants RR. "Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca(2+) channel gene *CACNL1A4*." *Cell* 1996; 87: 543-552.
 - Orr HT. "Polyglutamine neurodegeneration: expanded glutamines enhance native functions." *Curr Opin Genet Dev.* 2012 Jun; 22(3):251-5 .
 - Pandolfo M. "Molecular pathogenesis of Friedreich ataxia." *Arch Neurol.* 1999; 56: 1201–08.
 - Parfitt D A., Michael G J, Vermeulen EGM, Prodromou NV, Webb TR, Gallo JM, Cheetham ME, Nicoll WS, Blatch GL, Chapple JP. "The ataxia protein saccin is a functional co-chaperone that protects against polyglutamine-expanded ataxin-1." *Hum Molec Genet.* 2009; 18: 1556-1565.
 - Pearson CE, Nichol Edamura K, Cleary JD. "Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations." *Nat Rev Genet.* 2005; 6: 729–42.
 - Perlman S. "Symptomatic and disease-modifying therapy for the progressive ataxias." *Neurologist* 2004; 10: 275–89.
 - Pfeffer G, Pyle A, Griffin H, Miller J, Wilson V, Turnbull L, Fawcett K, Sims D, Eglon G, Hadjivassiliou M, Horvath R, Németh A, Chinnery PF. "SPG7 mutations are a common cause of undiagnosed ataxia." *Neurology* 2015 Mar; 84(11): 1174-6.

- Pierson TM, Adams D, Bonn F, Martinelli P, Cherukuri PF, Teer JK, Hansen NF, Cruz P, Mullikin For The Nisc Comparative Sequencing Program JC, Blakesley RW, Golas G, Kwan J, Sandler A, Fuentes Fajardo K, Markello T, Tift C, Blackstone C, Rugarli EI, Langer T, Gahl WA, Toro C. “Whole-exome sequencing identifies homozygous *AFG3L2* mutations in a spastic ataxia-neuropathy syndrome linked to mitochondrial m-AAA proteases.” *PLoS Genet.* 2011; 7: e1002325. Note: Electronic Article.
- Rainier S, Bu, M, Mark E, Thomas D, Tokarz D, Ming L, Delaney C, Richardson RJ, Albers JW, Matsunami N, Stevens J, Coon H, Leppert M, Fink JK. “Neuropathy target esterase gene mutations cause motor neuron disease.” *Am J Hum Genet.* 2008; 82: 780-785, 2008.
- Rehm HL. “Disease-targeted sequencing: a cornerstone in the clinic”. *Nat Rev Genet.* 2013; 14:295-300.
- Sanchez-Ferrero E, Coto E, Beetz C, Gamez J, Corao AI, Diaz M, Esteban J, del Castillo E, Moris G, Infante J, Menendez M, Pascual-Pascual SI, Lopez de Munain A, Garcia-Barcina MJ, Alvarez V. “*SPG7* mutational screening in spastic paraplegia patients supports a dominant effect for some mutations and a pathogenic role for p.A510V.” *Clin. Genet.* 2013; 83: 257-262.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. “DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.” *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Dec; 74(12): 5463–5467.
- Sarah B Ng, Kati J Buckingham, Choli Lee, Abigail W Bigham, Holly K Tabor, Karin M Dent, Chad D Huff, Paul T Shannon, Ethylin Wang Jabs, Deborah A Nickerson, Jay Shendure, Michael J Bamshad. “Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder”. *Nature Genetics* 2010; 42:30–35.
- Savarese M, Di Fruscio G, Mutarelli M, Torella A, Magri F, Santorelli FM, Comi GP, Bruno C, Nigro V. “MotorPlex provides accurate variant detection across large muscle genes both in

- single myopathic patients and in pools of DNA samples." *Acta Neuropathol Commun.* 2014 Sep 11; 2:100.
- Savitsky K, Sfez S, Tagle DA, Ziv Y, Sartiel A, Collins FS, Shiloh Y, Rotman G. "The complete sequence of the coding region of the *ATM* gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species." *Hum Molec Genet.* 1995; 4: 2025-2032.
 - Schaffer AE, Eggens VR, Caglayan AO, Reuter MS, Scott E, Coufal NG, Silhavy JL, Xue Y, Kayserili H, Yasuno K, Rosti RO, Abdellateef M, Caglar C, Kasher PR, Cazemier JL, Weterman MA, Cantagrel V, Cai N, Zweier C, Altunoglu U, Satkin NB, Aktar F, Tuysuz B, Yalcinkaya C, Caksen H, Bilguvar K, Fu XD, Trotta CR, Gabriel S, Reis A, Gunel M, Baas F, Gleeson JG. "*CLP1* founder mutation links tRNA splicing and maturation to cerebellar development and neurodegeneration." *Cell* 2014; 157: 651-663.
 - Schols L, Amoiridis G, Przuntek H, Frank G, Epplen JT, Epplen C. "Friedreich's ataxia." *Brain* 1997; 120: 2131-40.
 - Schols L, Bauer P, Schmidt T, Schulte T, Riess O. "Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis." *Lancet Neurol.* 2004; 3: 291-304.
 - Schuurs-Hoeijmakers JH, Vulto-van Silfhout AT, Vissers LE, van de Vondervoort II, van Bon BW, de Ligt J, Gilissen C, Hehir-Kwa JY, Neveling K, del Rosario M, Hira G, Reitano S, Vitello A, Failla P, Greco D, Fichera M, Galesi O, Kleefstra T, Greally MT, Ockeloen CW, Willemsen MH, Bongers EM, Janssen IM, Pfundt R, Veltman JA, Romano C, Willemsen MA, van Bokhoven H, Brunner HG, de Vries BB, de Brouwer AP. "Identification of pathogenic gene variants in small families with intellectually disabled siblings by exome sequencing." *J Med Genet.* 2013; 50: 802-811.
 - Shiloh Y. "The *ATM*-mediated DNA-damage response: taking shape." *Trends Biochem Sci.* 2006; 31: 402-10.

- Shimada Y, Okuno S, Kawai A, Shinomiya H, Saito A, Suzuki M, Omori Y, Nishino N, Kanemoto N, Fujiwara T, Horie M, Takahashi E. "Cloning and chromosomal mapping of a novel ABC transporter gene (hABC7), a candidate for X-linked sideroblastic anemia with spinocerebellar ataxia." *J Hum Genet.* 1998; 43:115-22.
- Stankewich MC, Tse WT, Peters LL, Ch'ng Y, John KM, Stabach PR, Devarajan P, Morrow JS, Lux SE. "A widely expressed beta-III spectrin associated with Golgi and cytoplasmic vesicles." *Proc Nat Acad Sci.* 1998; 95: 14158-14163.
- Stevanin G, Herman A, Brice A, Durr A. "Clinical and MRI findings in spinocerebellar ataxia type 5." *Neurology* 1999; 53: 1355–57.
- Synofzik M, Gonzalez MA, Lourenco CM, Coutelier M, Haack TB, Rebelo A, Hannequin D, Strom TM, Prokisch H, Kernstock C, Durr A, Schols L, Lima-Martinez MM, Farooq A, Schule A, Stevanin G, Marques Jr. M, Zu S. "PNPLA6 mutations cause Boucher-Neuhauser and Gordon Holmes syndromes as part of a broad neurodegenerative spectrum." *Brain* 2014; 137: 69-77.
- Taroni F, DiDonato S. "Pathways to motor incoordination: the inherited ataxias." *Nat Rev Neurosci* 2004; 5: 641–55.
- Taviaux, S., Williams, M. E., Harpold, M. M., Nargeot, J., Lory, P. "Assignment of human genes for beta-2 and beta-4 subunits of voltage-dependent Ca(2+) channels to chromosomes 10p12 and 2q22-q23." *Hum Genet.* 1997; 100: 151-154.
- Taylor AMR and Byrd PJ. "Molecular pathology of ataxia telangiectasia." *J Clin Pathol.* 2005; 58: 1009–15.
- The Huntington's Disease Collaborative Research Group. "A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes." *Cell* 1993; 72: 971–83.

- Thevenon J, Lopez E, Keren B, Heron D, Mignot C, Altuzarra C, Béri-Dexheimer M, Bonnet C, Magnin E, Burglen L, Minot D, Vigneron J, Morle S, Anheim M, Charles P, Brice A, Gallagher L, Amiel J, Haffen E, Mach C, Depienne C, Doummar D, Bonnet M, Duplomb L, Carmignac V, Callier P, Marle N, Mosca-Boidron AL, Roze V, Aral B, Razavi F, Jonveaux P, Faivre L, Thauvin-Robinet C. "Intragenic *CAMTA1* rearrangements cause non-progressive congenital ataxia with or without intellectual disability." *J Med Genet.* 2012; 49: 400-408.
- Todd PK and Paulson HL. "RNA-mediated neurodegeneration in repeat expansion disorders". *Ann Neurol.* 2010; 67(3): 291-300.
- Wang K, Li M, Hakonarson H. "Analysing biological pathways in genome-wide association studies." *Nat Rev Genet.* 2010 Dec; 11(12):843-54.
- www.abmgood.com
- www.agilent.com
- www.elettroforesi.weebly.com
- www.genecopoeia.com
- www.genome.gov
- www.genomics.agilent.com
- Yamada M, Sato T, Tsuji S, Takahashi H. "CAG repeat disorder models and human neuropathology: similarities and differences." *Acta Neuropathol* 2008; 115: 71–86.
- Ye H and Rouault TA. "Human iron-sulfur cluster assembly, cellular iron homeostasis, and disease." *Biochemistry* 2010; 49:4945-56.
- Yu Y, Wu BL, Wu J, Shen Y. "Exome and whole-genome sequencing as clinical tests: a transformative practice in molecular diagnostics." *Clin Chem.* 2012 58:1507–1509.
- Zhang Q, Bethmann C, Worth NF, Davies JD, Wasner C, Feuer A, Ragnauth CD, Yi Q, Mellad

JA, Warren DT, Wheeler MA, Ellis JA, Skepper JN, Vorgerd M, Schlotter-Weigel B, Weissberg PL, Roberts RG, Wehnert M, Shanahan CM. "Nesprin-1 and -2 are involved in the pathogenesis of Emery Dreifuss muscular dystrophy and are critical for nuclear envelope integrity." *Hum Molec Genet.* 2007; 16: 2816-2833.

- Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P, Ashizawa T, Stockton DW, Amos C, Dobyns WB, Subramony SH, Zoghbi HY, Lee CC. "Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha(1A)-voltage-dependent calcium channel." *Nature Genet.* 1997;15: 62-69.