



**Relazione attività di ricerca su:**

***“Messa a punto di una metodica innovativa per l’individuazione dei portatori sani di atrofia muscolare spinale”***

Il presente progetto è stato cofinanziato da:

Fondazione “Beneficentia Stiftung” di Valduz, Liechtenstein

U.I.L.D.M. (Unione Italiana Lotta alla Distrofia Muscolare) Sezione di Udine

Università degli Studi di Udine

Borsa per 2 mesi (periodo 19/01/07-19/03/07) importo totale lordo di euro 2.620,00.

Assegno di ricerca annuale (01/04/07-01/04/08) importo totale lordo di 18.666,29 euro.

Beneficiaria: dott.ssa Passon Nadia.

## **INTRODUZIONE SULL’ATROFIA MUSCOLARE SPINALE**

### **La patologia**

La SMA è una patologia neuromuscolare ereditaria dell’uomo, a trasmissione autosomica recessiva. La sintomatologia è dovuta alla morte progressiva dei motoneuroni alfa delle corna anteriori del midollo spinale con compromissione della forza muscolare agli arti inferiori e superiori. La gravità dei sintomi che caratterizzano la malattia è variabile. Clinicamente si distinguono tre forme di SMA, la SMA di tipo I (Werdnig-Hoffman), che è la più grave, si presenta con debolezza muscolare e compromissione respiratoria fin dalla nascita. Generalmente i bambini affetti non superano l’anno di vita. La SMA di tipo II (Kugelberg-Welander) ha migliori previsioni di vita, si manifesta molto precocemente e i bimbi affetti arrivano a stare seduti ma mai a camminare. La SMA di tipo III, o SMA dell’adulto si manifesta in età adolescenziale e comunque giovanile, riducendo progressivamente la capacità dei soggetti a deambulare.

Un soggetto affetto da SMA, nella stragrande maggioranza dei casi, porta nel proprio DNA una delezione, allo stato omozigote, del gene SMN1 localizzato sul cromosoma 5 dell’uomo (Lefebvre, 1995; Velasco, 1996; Rodrigues, 1996; Cobben, 1995). Questo significa che le due copie del gene SMN1, quella di origine materna e quella di origine paterna sono entrambe non funzionanti. Questa condizione di delezione viene ereditata dai genitori e la si può trasmettere ai figli. La ricerca degli ultimi anni ha dimostrato che in circa il 96% degli individui affetti da SMA, indipendentemente dalla forma clinica da cui sono affetti, la mutazione consiste nell’assenza in omozigosi dell’esone 7 del gene SMN1. Sullo stesso cromosoma 5 esiste una copia omologa del gene SMN1 detta SMN2 che, pur differendo dal primo in sole 5 basi di DNA su un totale di circa 25000, non ha ruolo determinante nello sviluppo della malattia. Il gene SMN2 ha ruolo invece come modulatore della severità dei sintomi patologici negli individui affetti. E’ stata dimostrata infatti una

---



correlazione inversa tra numero di copie di questo gene e gravità della malattia (Campbell, 1997; Feldkötter 2002). La motivazione di un tale ruolo svolto dal gene SMN2 risiede nel fatto che esso è trascritto ed una parte dei suoi trascritti, dal 10 al 20% del totale, per effetto dello splicing alternativo codifica per una proteina SMN full-length, perfettamente funzionante. Quindi, dal momento che il numero di geni SMN2 per genoma diploide può variare da 1 a 4 copie negli affetti SMA (da 0 a 4 copie nei soggetti normali), tutte regolarmente trascritte, l'attesa di un fenotipo patologico meno grave si associa all'attesa di un numero maggiore di copie geniche SMN2. Una tale informazione consente al medico una migliore gestione degli affetti SMA con la programmazione di una più adeguata/personalizzata sorveglianza sanitaria dell'affetto.

La presenza nel genoma degli affetti SMA di un gene potenzialmente in grado di codificare la proteina SMN integra, di cui questi pazienti sono carenti in quanto deleti in omozigosi del gene SMN1, offre una possibilità di tentativo terapeutico nel momento in cui si individuano molecole in grado di influire sullo splicing alternativo del gene SMN2 o comunque sui livelli di produzione di proteina SMN integra (Sangiuolo 2005; Angelozzi 2007). A questo scopo, diversi trials clinici che vedono coinvolti i pazienti SMA più giovani, per i quali la degenerazione neuronale è ancora arginabile, vengono programmati dalla comunità scientifica internazionale (Brahe 2005; Mercuri 2007). L'eventuale inserimento dei pazienti SMA nel trial clinico adeguato passa attraverso una completa definizione della rispettiva conformazione genetica alla regione SMA (numero geni SMN2), sia per l'ottenimento del beneficio terapeutico atteso che per il successo e quindi l'accreditamento in ambito sanitario della strategia terapeutica adottata.

### **Individuazione dei portatori sani di Atrofia Muscolare Spinale**

Lì dove c'è un affetto con diagnosi molecolare di omozigote per delezione, ci sono dei portatori sani, spesso inconsapevoli, di delezione. Sono portatori in primis i genitori dell'affetto e, con il 50% di probabilità, i nonni, gli zii, i fratelli dell'affetto, coinvolgendo i due nuclei familiari di entrambi i genitori. I portatori si dicono eterozigoti per delezione in quanto soltanto una delle due copie del gene SMN1 è alterata e si tratta di individui che non manifestano segni della malattia. Una coppia in cui entrambi i partners siano portatori di delezione ha un rischio elevato di generare prole affetta, pari a 1 su 4 nati. Oggi la diagnosi molecolare di malattia è relativamente semplice, e viene effettuata da circa 8-10 anni in diversi laboratori di Genetica Medica sul territorio nazionale.

Laboriosa, dai costi molto elevati e non sempre affidabile nei risultati rimane invece la ricerca dei portatori sani di delezione. Attualmente l'analisi viene effettuata nei seguenti centri:

- Cagliari, Ospedale Regionale Microcitemie
- Chieti, Policlinico Universitario di Chieti
- Milano, Istituto Neurologico "Carlo Besta"
- Roma, Università Cattolica del Sacro Cuore
- S. Giovanni Rotondo (Fg), Casa sollievo della Sofferenza
- Udine, Istituto di Genetica dell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Udine

Le tecniche comunemente adoperate sono: a) PCR competitiva, estremamente laboriosa e soggetta ad errori tecnici (McAndrew 1997); b) PCR ed SSCP, spesso poco affidabile (Semprini 2001); c) simplex Real-Time PCR, costosa nei reagenti e sensibile a piccole variazioni qualitative degli stessi (Feldkötter 2002, Cuscó 2002, Anhof 2003).

Data l'alta frequenza di portatori sani di mutazione del gene SMN1 (pari a circa 1 su 50 individui nella popolazione generale) si calcola che la valutazione dello stato di portatore sano interesserebbe parecchie decine di migliaia di individui.

---



## OBIETTIVI DEL PROGETTO

### Proponenti

Lo scopo primario del progetto è consistito nella messa a punto di una tecnica siglata MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification; Schouten 2002) che consente di individuare i portatori sani di SMA. L'MLPA è una tecnica che assembla le proprietà di performance e collaudata efficacia di diverse metodiche comunemente adoperate in biologia molecolare divenendo, nel giro degli ultimi anni, una delle innovazioni biotecnologiche più ambite in campo diagnostico e di ricerca applicata alla clinica. La particolare configurazione della regione cromosomica in cui è situato il gene responsabile della SMA, non ultima la presenza del gene altamente omologo SMN2, rende alquanto complicata l'identificazione della delezione allo stato eterozigote. Le caratteristiche tecniche della MLPA, sotto in breve descritte, offrono il vantaggio di una maggiore rapidità diagnostica, affidabilità e riproducibilità dei risultati e costo dell'analisi sicuramente contenuto.

Per la messa a punto della metodica MLPA sono stati scelti 34 genitori di figlio/figlia affetti SMA con delezione in omozigosi dell'esone 7 del gene SMN1 e 68 soggetti non-portatori di delezione selezionati tra la popolazione generale. Lo stato di portatore e non portatore è stato precedentemente determinato utilizzando la tecnologia Taqman (Anhuf 2003) che si basa su una determinazione quantitativa relativa mediante Real-Time PCR simplex, costosa nei reagenti e sensibile a piccole variazioni qualitative degli stessi.

La messa a punto della metodica MLPA quindi ha comportato:

- a) Il setting nel nostro laboratorio di metodiche già accreditate dal punto di vista diagnostico come l'analisi quantitativa mediante Real-Time PCR simplex.
- b) Il miglioramento dei parametri di affidabilità e riproducibilità dei risultati quantitativi ottenuti mediante Real-Time attraverso il setting di una metodica Real-Time PCR multiplex
- c) La validazione dei risultati ottenuti con la metodica MLPA attraverso il confronto con quelli ottenuti con le metodiche precedenti, riferendosi alla stessa coorte di campioni di DNA esaminati.

### Obiettivi raggiunti

Tutti gli obiettivi su proposti sono stati raggiunti. I risultati ottenuti sono stati oggetto di 2 tesi sperimentali: una nel corso di Laurea interfacoltà in Biotecnologie di Udine ed una nella Scuola di Specializzazione in Genetica Medica di Trieste. Le metodiche innovative di Real-Time PCR multiplex ed MLPA messe a punto nell'Istituto di Genetica con la realizzazione di questo progetto sono in via di pubblicazione. Qui di seguito vengono descritte sinteticamente.

### Real-Time PCR multiplex

Innanzitutto si è partiti dalla metodica che fa riferimento alla tecnologia Taqman in quanto già accreditata come metodologia diagnostica, perfezionandola nell'affidabilità e riproducibilità dei risultati ottenuti. A tale scopo è stata messa a punto una reazione Real-Time PCR multiplex che a differenza della simplex consente l'amplificazione contemporanea, nello stesso mix di reazione, del gene da quantizzare SMN1 e del gene di riferimento albumina (ALB). L'amplificazione

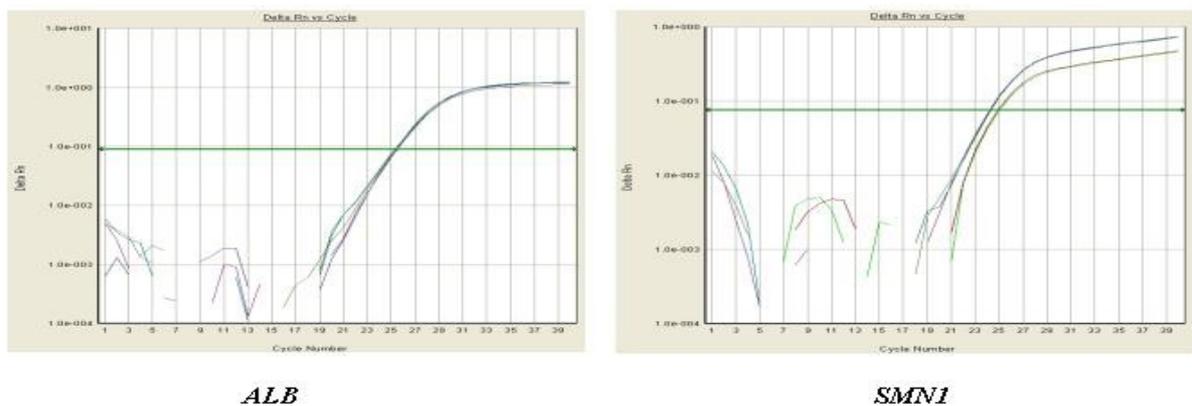
---



contemporanea dei due geni annulla gli eventuali errori di valutazione che possono derivare dal riportare i risultati di amplificazione dei due geni ottenuti in due reazioni indipendenti e/o dovuti alla manualità dell'operatore. Anche i costi globali della multiplex sono dimezzati rispetto alla simplex. La quantificazione relativa tra i diversi campioni (i.e. campione da diagnosticare per il numero di copie geniche SMN1 per genoma diploide e campione con numero di copie geniche SMN1 noto) è stata eseguita con il metodo  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

In sintesi, lo studio di quantificazione genica è stato condotto per mezzo di amplificazione multiplex in Real-Time PCR del gene SMN1 (target) e del gene per l'albumina (ALB, riferimento interno) noto essere presente in numero di 2 copie per genoma diploide (fig.1).

## Grafici di amplificazione



*Fig. 1. Grafici di amplificazione di un non-portatore e di un portatore di delezione del gene SMN1. È possibile notare nell'amplificazione di SMN1 la piccola differenza nei CT dei due campioni (non-portatore a sinistra e di un portatore a destra) che si diversificano per una sola copia del gene SMN1.*

Si è proceduto quindi nella validazione della metodologia multiplex analizzando il DNA di 34 individui portatori e di 68 individui non-portatori precedentemente caratterizzati (tabella 1). Tutti i valori delle 102 determinazioni sono coerenti con le attese e le due classi di individui sono ben separate con una sensibilità pari al 97,06 % e una specificità pari al 100%. La sensibilità inferiore al 100% è dovuta ad un soggetto obbligato portatore di delezione in quanto genitore di affetto che risulta negativo all'indagine quantitativa. Questo risultato non è inatteso ma suggerisce che il soggetto in esame faccia parte del 4% circa di portatori di delezione del gene SMN1 che presenta un numero di due copie del gene SMN1 sullo stesso cromosoma (conformazione 2/0), mascherando l'assenza dello stesso sull'altro cromosoma.

Individui con conformazione 2/0 non sono diagnosticabili con alcuna metodica di analisi quantitativa condotta sul genoma allo stato diploide. Attualmente la condizione di assetto cromosomico 2/0 è rilevabile mediante il metodo di ibridi di cellule somatiche (es. topo/uomo), sviluppato da Yan (Yan 2000), non utilizzabile dal punto di vista diagnostico.



Tabella 1. Multiplex real-time PCR: valutazione statistica del numero di copie del gene SMN1

Soggetti	# copie SMN1	Media # copie del SMN1	Range	DS	CV %
Portatori sani obbligati	1 (n=35)	0.98	0.79 - 1.22	0.09	9.18
	2 (n=1)	2.25	-	-	-
Controlli	2 (n=86)	2.03	1.76 - 2.32	0.12	5.91
	3 (n=2)	3.15	3.11 - 3.18	0.04	1.27

DS: deviazione standard; CV: coefficiente di variazione

### Metodica MLPA

Le fasi fondamentali del metodo MLPA nel complesso possono essere sintetizzate in:

1. Design delle emisonde gene-specifiche e di dimensione unica per ciascun target genico
2. Ibridazione delle emisonde con il DNA denaturato
3. Ligazione tramite ligasi termostabile delle emisonde correttamente ibridizzate allo stampo di DNA, per generare le sonde gene-specifiche
4. Amplificazione in PCR delle sonde gene-specifiche adoperando un'unica coppia di primers
5. Elettroforesi capillare e analisi computerizzata dei picchi
6. Normalizzazione dei dati e determinazione quantitativa del numero di copie del gene d'interesse

Le suddette fasi della metodica MLPA sono riassunte in figura 2.

Lo studio di quantificazione genica nella metodica MLPA da noi messa a punto è stato condotto sui geni SMN1 e SMN2 come geni target e Fattore VIII (FVIII) e Albumina (ALB) come geni di riferimento interno. I 2 geni di riferimento interno sono stati utilizzati come normalizzatori nella fase di analisi. Il gene FVIII (localizzato sul cromosoma X) è presente in singola copia per genoma diploide nei soggetti di sesso maschile mentre è presente in 2 copie per genoma diploide negli individui di sesso femminile. Il gene dell'Albumina (localizzato sul cromosoma 4) è presente in 2 copie per genoma diploide negli individui di entrambi i sessi. Si è scelto di utilizzare il FVIII per avere un riferimento quantitativo certo nella messa a punto della metodica. Il quoziente di dosaggio genico del FVIII deve risultare, negli individui di sesso maschile, la metà dell'Albumina. Negli individui di sesso femminile, invece, deve risultare uguale all'Albumina.

## Metodica MLPA

*(Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)*

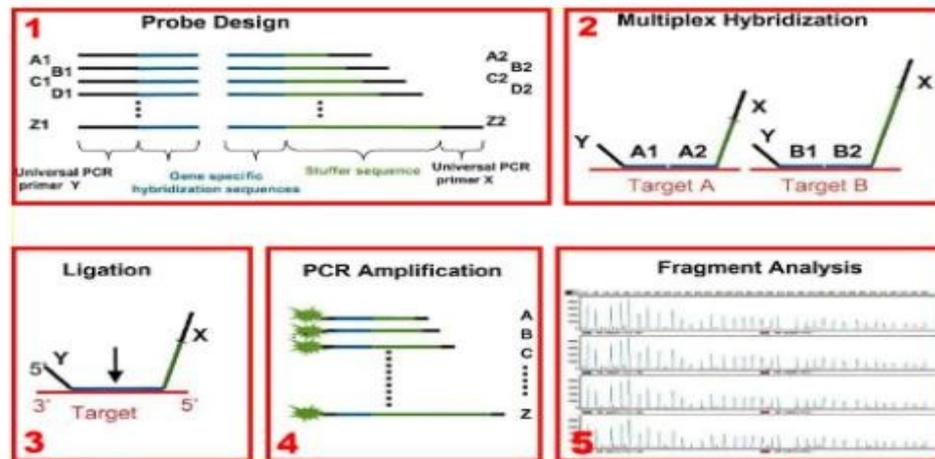


Fig. 2. Il protocollo MLPA

### *Design emisonde (fig.2, pannello 1)*

Ciascuna delle due emisonde MLPA è formata da due porzioni oligonucleotidiche, una porzione specifica per la sequenza di uno dei quattro geni adoperati nell'analisi ed una porzione non specifica che non influenza la capacità delle emisonde di ibridare al gene target, ma consente, successivamente, l'uso di un'unica coppia di inneschi per l'amplificazione in PCR di tutti i geni, o regioni genomiche, da analizzare in contemporanea. Per disegnare tali sequenze ci si è avvalsi delle informazioni disponibili in NCBI (National Center of Biotechnology Information) ed Ensembl Genome Browser. Mediante l'utilizzo del programma <http://www.bioinfo.rpi.edu/application/mfold/old/dna/> si è verificato che le emisonde alla temperatura di ibridazione di 60° C non formino strutture secondarie che interferiscano nell'ibridazione delle stesse alla sequenza gene-specifica o non formino cattivi appaiamenti di basi nelle adiacenze dei primers di innesco della reazione di PCR onde evitare che ne venga influenzata l'efficienza di amplificazione.

### *Ibridazione e ligazione delle emisonde (fig. 2, pannelli 2 e 3)*

Altro punto di forza della metodica MLPA è rappresentato dall'enzima DNA ligasi-65 termostabile che viene adoperato per ligare le due emisonde specifiche di ogni gene a formare una sonda di dimensioni note successivamente amplificabile. La ligasi termostabile è attivo tra 54-65 °C ed è facilmente inattivabile prima dell'inizio della reazione PCR semplicemente portando la tempe-



ratura a 95-98 °C. Questa ligasi inoltre è molto sensibile ai *mismatch* tra la sonda e la sequenza target vicina al sito di ligazione, in particolare è molto sensibile nei confronti dell'ultimo nucleotide al 3' di una emisonda e la reazione di ligazione avviene solamente quando è presente un perfetto *match*, ovvero una perfetta complementarità, sonda-gene target. Le emisonde specifiche per i geni SMN sono state costruite sfruttando un mismatch (C-> T) che esiste naturalmente alla posizione + 6 dell'esone 7 dei geni SMN1 ed SMN2, in modo da ottenere la ligazione e, quindi, l'amplificazione del prodotto di ligazione. Sono stati effettuati diversi tests preliminari per saggiare la sensibilità della ligasi al mismatch introdotto dalla mutazione puntiforme esistente tra i geni SMN1 e SMN2. La messa a punto di un protocollo diverso da quello indicato dall'azienda fornitrice della ligasi-65 ci ha permesso di non avere prodotti di cross-reazione, ossia segnali che derivano dalla coppia genica SMN2 e vengono confusi per SMN1 e viceversa, falsando così i risultati dell'analisi.

#### ***Amplificazione mediante PCR (fig. 2, pannello 4)***

La possibilità di usare un'unica coppia di inneschi per l'amplificazione contemporanea sia dei geni SMN1 ed SMN2 da quantizzare, sia dei geni Albumina e FVIII di riferimento, è uno dei principali punti di forza della metodica MLPA in quanto annulla le differenze di efficienza di amplificazione in PCR che possono derivare da inneschi di diversa sequenza.

Ciascuna sonda, risultato dell'unione delle due emisonde ad opera della DNA ligasi-65, dà un prodotto di amplificazione in PCR di un'unica dimensione in termini di coppie di basi: il Fattore VIII ha una dimensione di 103 paia di basi, l'Albumina di 109 paia di basi, il gene SMN1 di 115 paia di basi ed il gene SMN2 di 124 paia di basi.

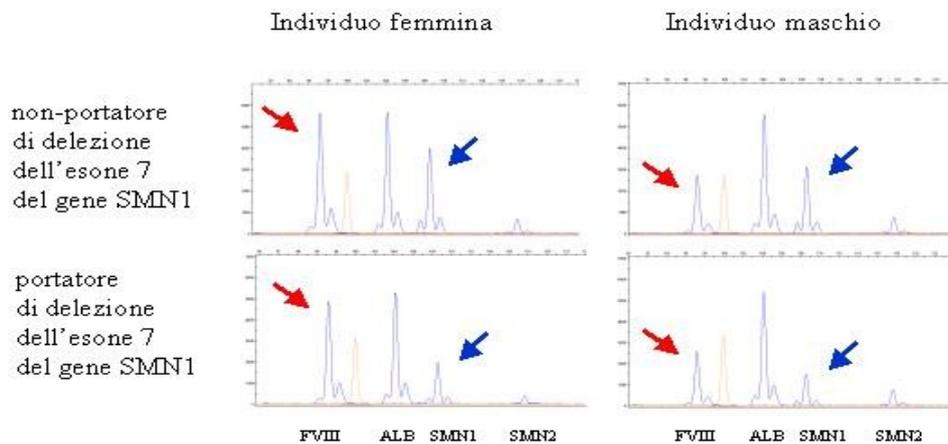
#### ***Elettroforesi capillare ed analisi computerizzata dei picchi (fig. 2, pannello 5)***

La separazione e la quantificazione relativa dei prodotti di amplificazione sono state eseguite con un sequenziatore automatico monocapillare ABI Prism 310 Analyzer (Applied Biosystem); a tale scopo è necessario che uno dei due inneschi per la reazione PCR sia marcato con un fluoroforo per consentire una corretta visualizzazione delle sonde amplificate tramite il sequenziatore (fig.3).

L'analisi dei picchi è stata eseguita mediante l'utilizzo del software GeneMapper v. 4.0. I dati ottenuti sono stati elaborati mediante un programma Excel.

I prodotti di reazione MLPA influenzano direttamente l'intensità e quindi l'altezza e l'area dei picchi ottenuti in fase analitica. Essi sono in stretta relazione con il numero di copie con cui ciascun gene (target e di riferimento) è presente nel genoma da analizzare, quindi, consentono una analisi quantitativa del gene diagnostico (SMN1) per la SMA, consentendo l'individuazione dei portatori sani di delezione del gene SMN1.

## ELETTROFEROGRAMMA



*Fig. 3. I grafici in colonna sinistra sono riferiti ad individui di sesso femminile mentre nella colonna a destra ad individui di sesso maschile. Notare che l'altezza del picco relativo al fattore VIII nei maschi è inferiore a quello delle femmine così come l'altezza del picco relativo al gene SMN1 nei portatori di delezione è inferiore a quello dei non-portatori.*

### **Normalizzazione dei dati**

La fase analitica della metodica MLPA viene così condotta: per ciascuno dei DNA genomici analizzati, l'altezza o l'area dei picchi relativi ai gene target (SMN1) è rapportata all'altezza o l'area del picco relativo ad un gene di riferimento (FVIII o ALB). Ad esempio, il valore del rapporto SMN1/ALB che si ottiene da un DNA campione di riferimento noto essere un non portatore di delezione del gene SMN1, viene posto uguale ad 1.0, di conseguenza il valore del rapporto SMN1/ALB che si ottiene dal DNA del campione da testare risulterà pari a circa 0.5 nel caso di un soggetto portatore di delezione, risulterà invece pari a circa 1.0 nel caso di un soggetto non portatore di delezione del gene SMN1.

Anche questo studio è stato sottoposto ad un'analisi di tipo statistico per valutare sia i parametri di specificità e sensibilità del metodo che sono risultati identici a quelli ottenuti con la metodica Real-Time PCR duplex (sensibilità pari al 97,06 % e specificità pari al 100%).



## Sensibilità/specificità del metodo

	Portatori	Non-Portatori
Positivi al Test	A 33	B 0
Negativi al Test	C 1	D 68

$$\text{Sensibilità} = A/(A+C) = 33/34 = 97,06\%$$

$$\text{Specificità} = D/(B+D) = 68/68 = 100\%$$

$$\text{Frequenza falsi positivi} = B/(B+A) = 0/(0+34) = 0\%$$

$$\text{Frequenza falsi negativi} = C/(C+D) = 1/(1+68) = 1,45\%$$

### Analisi comparativa dei costi diagnostici delle due metodiche sviluppate

E' stata effettuata un'analisi dei costi, per paziente, dei reagenti necessari ad effettuare il test per portatore sano di atrofia muscolare spinale con la metodica Real-Time PCR multiplex e con la metodica MLPA ed i costi sono stati confrontati con quelli che vengono sostenuti per effettuare l'analisi di portatore di mutazioni sul gene CFTR responsabile della fibrosi cistica e che si avvale dell'utilizzo di un kit commerciale in vendita presso diverse ditte.

Costo dell'estrazione di DNA da 5 ml di sangue periferico con kit PuraGene DNA Purification System (Gentra): euro 6,28 per paziente.

Costi dei reagenti necessari per l'effettuazione di una singola analisi:

metodica Real-Time PCR multiplex (analisi quantitativa del gene SMN1)	3,55 euro per singolo test
metodica MLPA (analisi quantitativa dei geni SMN1 e SMN2)	1,82 euro per singolo test
Kit INNO-LiPA (Innogenetics, 12 mutazioni)	117,00 euro per singolo test
Kit INNO-LiPA (Innogenetics, 17 mutazioni+poly T)	117,00 euro per singolo test
Kit Fibrosi Cistica (Nuclear Laser Medicine,35 mutazioni+poly T)	168,00 euro per singolo test

### Conclusioni e prospettive

La sempre maggiore conoscenza del genoma umano ha permesso ai ricercatori di chiarire alcune cause alla base di molte malattie a base genetica, individuando le alterazioni geniche responsabili delle stesse e ponendoci nella condizione di comprendere e diagnosticare queste malattie.

---



Considerando che molte di queste sono causate da mutazioni del DNA, difformi sia qualitativamente (slittamento della cornice di lettura, mutazioni, delezioni, inserzioni, duplicazioni, ecc.) sia quantitativamente (per la loro estensione), diventa fortemente auspicabile proporre ed attuare progetti di ricerca che mirano a migliorare l'efficienza di identificazione delle stesse in modo da fornire a pazienti, famiglie e dunque alla società tutta, uno strumento importante anche ai fini della prevenzione.

I saggi di quantificazione qui presentati sono stati sviluppati allo scopo di identificare i portatori sani di Atrofia Muscolare Spinale, cercando di superare le limitazioni imposte dall'uso di PCR semiquantitativa e di ridurre al massimo costi e tempi di esecuzione. I risultati ottenuti si sono rivelati confortanti: si può affermare che il problema è stato risolto con efficacia ed entrambi i tests si sono rivelati essere di relativa semplicità di esecuzione, poco costosi e significativamente affidabili al di sopra di molti altri saggi similari, con una sensibilità pari al 97,06 % e una specificità pari al 100%.

Rimane tuttavia presente una problematica che è comune a tutti i saggi quantitativi: l'impossibilità di rivelare un assetto cromosomico di tipo 2/0, mutazioni ex novo, mutazioni nonsense e mutazioni nella linea germinale, non riscontrabili con un comune test di quantificazione genica.

L'assetto cromosomico della maggior parte dei portatori SMA, circa il 95%, è caratterizzato da una delezione che coinvolge il gene SMN1 in eterozigosi; il restante 5% della popolazione, invece, è costituito da individui recanti due copie di SMN1.

La presenza di due geni SMN1 intatti in soggetti con prole affetta da SMA è indicatore o di un evento mutazionale avvenuto nella generazione successiva, inusuale in un'ereditarietà di tipo recessivo, o di una mutazione puntiforme di uno dei 2 geni SMN1 portati da un genitore, gene quindi che non risulta deletato, o della presenza di entrambe le copie SMN1 su un unico cromosoma e zero copie sull'omologo. La presenza di due copie SMN1 su uno stesso cromosoma non è infatti inusuale: è stato osservato che circa il 4% della popolazione normale possiede tre copie SMN1 in assetto cromosomico 2/1 (Mailman 2001).

Un portatore di delezione del gene SMN1 che quindi presentasse un assetto 2/0, con delezione di tutte le copie SMN1 su un cromosoma ma con due copie sull'omologo, sfuggirebbe all'individuazione mediante test di quantificazione genica convenzionali in quanto si avrebbe sempre la conferma di due copie del gene in esame.

Attualmente la condizione di assetto cromosomico 2/0 è rilevabile mediante il metodo di ibridi di cellule somatiche, sviluppato da Yan (Yan 2000). In tal modo sarebbe possibile quantificare il contenuto genico di ogni singolo cromosoma, individuando sia l'assetto 1/0 tipico del 95% della popolazione di portatori sani, sia l'assetto 2/0 probabile nella maggioranza dei restanti casi.

Purtroppo tale metodo presenta elevati costi e lunghi tempi di esecuzione che non ne consentono l'uso in diagnostica routinaria, ma attualmente è l'unico che permetta di individuare i portatori di delezione con assetto 2/0. Una sensibilità del 97,06 % in entrambe le metodiche oggetto di questo studio è dovuta probabilmente ad un assetto 2/0 incontrato nell'iter diagnostico, in quanto una portatrice obbligata (madre di un affetto SMA) è risultata negativa in entrambi i tests.

L'intero iter diagnostico dei tests presentati, dall'estrazione del DNA all'ottenimento dei risultati, è di 1-2 giorni, un tempo estremamente limitato considerati i normali tempi di attesa per un test genetico.

---



I tests possono essere poi applicati anche alla diagnosi di paziente affetto e alla determinazione del numero di copie SMN2, offrendo così l'opportunità di un dato diagnostico concernente l'evoluzione e la gravità soggettiva della patologia SMA.

A questo punto, escludendo la casistica particolare di cui sopra, si disporrebbe di due validi tests per una completa diagnosi di SMA, fornendo all'utente un servizio rapido ed affidabile.

### **OBIETTIVI FUTURI**

I risultati ottenuti consentono di ampliare l'inquadramento diagnostico e prognostico degli affetti di Atrofia Muscolare Spinale, ricercando indicatori molecolari della gravità della malattia. Precisamente, si intende valutare il numero di copie del gene "SMN2", modulatore del fenotipo patologico, per genoma diploide sia di individui affetti SMA che di individui già portatori di delezione del gene SMN1.

Per quanto riguarda i primi, ossia i soggetti colpiti dalla malattia, il numero di copie del gene SMN2 modula in maniera dose-dipendente la severità della patologia, correla quindi con il tipo di SMA (età d'esordio e severità dei sintomi) e può essere prognostico sull'aspettativa di vita dei pazienti. Infatti, l'analisi quantitativa del numero di copie del gene SMN2 effettuata su 375 pazienti con SMA ha dimostrato che nell'80 % dei pazienti affetti da SMA di tipo I sono presenti 1 o 2 copie del gene SMN2, nell'80% dei pazienti con SMA di tipo II sono presenti 3 copie del gene e nel 95% dei pazienti con SMA di tipo III sono presenti da 3 a 4 copie del gene SMN2 (Feldkotter 2002).

Il test MLPA da noi messo a punto per l'individuazione dei portatori sani di delezione del gene SMN1 (una sola copia del gene SMN1), può essere facilmente applicato anche alla diagnosi di paziente affetto (zero copie del gene SMN1) e alla determinazione del numero di copie del gene modulatore SMN2. La possibilità di determinare il numero di copie del gene modulatore SMN2 per singolo genoma diploide dell'affetto offre l'opportunità di un dato diagnostico/prognostico concernente la gravità soggettiva della patologia SMA e l'evoluzione attesa della stessa. Questo consente un adeguato inserimento dei pazienti SMA in programmi riabilitativi e/o preventivi nei confronti delle complicanze e progressione clinica della malattia.

Per quanto riguarda invece i portatori di delezione del gene SMN1, soprattutto se valutati come coppia a rischio riproduttivo, l'obiettivo che la determinazione del numero di copie del gene SMN2 si pone di raggiungere consiste in una valutazione più completa del rischio genetico della coppia. Ad esempio, se in una coppia di portatori di delezione del gene SMN1 uno dei due risulta privo di copie del gene SMN2 e l'altro risulta portatore di una sola copia dello stesso, esiste un rischio elevato che nasca un figlio affetto con la forma più grave di SMA (tipo I), oppure che l'embrione venga spontaneamente abortito nelle prime fasi dello sviluppo in quanto non vitale per assenza completa di geni SMN (sia SMN1 che SMN2). Situazioni genetiche di questo tipo possono essere causa di poliabortività in coppie portatrici, per altro sane (Tizzano E.F. 1998; Sarnat H.B. 2007). La possibilità di un'analisi genetica completa per i geni SMN1 ed SMN2 offerta ad una coppia in procinto di procreare rappresenta un potente strumento di prevenzione attraverso la consulenza preconcezionale.

---



### ***Metodologia sperimentale***

Per la genotipizzazione totale al locus SMN (numero di copie di SMN1 e numero di copie di SMN2) verrà adoperata una coorte di DNA appartenenti a 30 soggetti affetti SMA diagnosticati nel nostro laboratorio, a 34 soggetti portatori di delezione del gene SMN1 e 68 controlli negativi (né affetti né portatori di delezione).

Su questa coorte di soggetti si procederà innanzitutto alla determinazione del numero totale di geni SMN per genoma diploide, mediante analisi dei polimorfismi Ag1-CA e C212 secondo la metodica di Cusin 2003. I dati così ottenuti per ciascun soggetto verranno confrontati con quelli derivati dall'analisi quantitativa diretta dei geni SMN1 ed SMN2 mediante metodica MLPA.

### ***Importanza dei risultati attesi***

L'importanza di una completa definizione dei geni al locus SMN per gli affetti SMA si inquadra nell'ottenimento di uno strumento diagnostico/prognostico utile alla programmazione di adeguati interventi di monitoraggio clinico e terapeutico. Data l'alta frequenza dei portatori sani di delezione del gene SMN1, seconda solo ai portatori di fibrosi cistica (circa 1/25), e vista l'incompatibilità con la vita dell'assenza completa di geni SMN, i risultati del progetto proposto consentiranno una valutazione completa del rischio genetico delle coppie di portatori sani di delezione. Da ultimo, dato i costi contenuti dei tests proposti, l'alta frequenza dei portatori sani e la limitazione attuale del test agli individui che hanno palese familiarità con la malattia, si potrebbe proporre l'attuazione di un programma di prevenzione attraverso lo screening su tutte le coppie che intendono pianificare la scelta riproduttiva.

---



## BIBLIOGRAFIA

1. Angelozzi C., Borgo F., Tiziano FD, Martella A., Neri G., Brahe C. Salbutamol increases SMN mRNA and protein levels in spinal muscular atrophy cells, 2008, *J. Med. Genet.* 45(1):29-31
  2. Anhof D., Eggermann T., Rudnik-Schoneborn S., Zerres K. Determination of SMN1 and SMN2 copy number using TaqMan technology, 2003, *Hum. Mutat.* 22, 74-78.
  3. Brahe C., Vitali T., Tiziano FD, Angelozzi C., Pinto AM, Borgo F., Moscato U., Bestini E., Mercuri E., Neri G. Phenylbutyrate increase SMN gene expression in spinal muscular atrophy patients. 2005 *Eur. J. Hum. Genet.* 13(2): 256-259
  4. Campbell L., Potter A., Ignazius J., Dubowitz V., Davies K. Genomic variation and gene conversion in spinal muscular atrophy: implication for disease process and clinical phenotype. 1997 *Am J Hum Genet* 61: 40-50.
  5. Cobben JM., van der Steege G., Grootsholten P., de Visser M., Scheffer H., Buys CH. Deletions of the survival motor neuron gene in unaffected siblings of patients with spinal muscular atrophy. 1995 *Am J Hum Genet* 57: 805-808.
  6. Cuscó J., Barceló MJ., Baiget M., Tizzano E.F. Implementation of SMA carrier testing in Genetic laboratories: Comparison of two methods for quantitating the SMN1 gene. 2002 *Hum Mut* 20: 452-459.
  7. Cusin V., Clermont O., Gérard B., Chanterreau D., Elion J. Prevalence of SMN1 deletion and duplication in carrier and normal population: Implication for genetic counselling. 2003 *J. Med. Genet.* 40; 39-doi:10.1136/jmg.40.4.e39
  8. Feldkötter M., Schwarzen V., Wirth R., Wienker TF., Wirth B. Quantitative analysis of SMN1 and SMN2 based on real-time lightcycler PCR: Fast and Highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. 2002 *Am J Hum Genet* 70: 358-368.
  9. Lefebvre S., Burglen L., Reboullet S., et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. 1995 *Cell* 80: 155-165.
  10. Mailman M.D., Hemingway T., Darsey L.R., Glasure C.E., Huang Y., Chadwick R.B., Heinz J.W., Papp A.C., Snyder P.J., Sedra M.S., Schafer R.W., Abuelo D.N., Reich E.W., Theil K.S., Burghes A.H.M., de la Chapelle A., Prior T.W., Hybrids monosomal for human chromosome 5 reveal the presence of a spinal muscular atrophy (SMA) carrier with two SMN 1 copies on one chromosome, 2001, *Hum. Mol. Genet.* 10, 109-115.
  11. Mc Andrew PE., Parson DW., Simard LR., Rochette C., Ray PN., Mendell JR., Prior TW., Burghes AHM. Identification of proximal spinal muscular atrophy carrier and patients by analysis of SMN<sup>T</sup> and SMN<sup>C</sup> gene copy number. 1997 *Am J Hum Genet* 60: 1411-1422.
  12. Mercuri E., Bertini E., Messina S., Solari A., D'Amico A., Angelozzi C., Battini R., Berardinelli A., Boffi P., Bruno C., Cini C., Colitto F., Kinali M., Minetti C., Mongini T., Moranti L., Neri G., Orcesi S., Pane M., Pelliccioni M., Pini A., Tiziano FD, Villanova M., Vita G., Brahe C. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of phenylbutyrate in spinal muscular atrophy. 2007 *Neurology* 68(1):51-55
  13. Rodrigues NR., Owen N., Talbot K., et al. Gene deletions in spinal muscular atrophy. 1996 *J Med Genet* 33 : 93-96.
  14. Sangiuolo F., Filareto A., Spitalieri P., Scaldaferrì ML, Mango R., Bruscia E., Citro G., Brunetti E., De Felici M., Novelli G. In vitro restoration of functional SMN protein in human trophoblast cells affected by spinal muscular atrophy by small fragment homologous replacement. 2005 *Human Gene Therapy* vol. 16 (7):869-880
-



- 15.** Semprini S., Tacconelli A., Capon F., Brancati F., Dallapiccola B., Novelli G. A single strand conformation polymorphism-based carrier test for spinal muscular atrophy. 2001 *Genetic Testing* 5: 33-37.
- 16.** Sarnat HB., Trevenen CL. Motor neuron degeneration in a 20 week male fetus: Spinal muscular atrophy type 0. 2007 *the Canadian J. of Neurol. Sci.* 34 (2): 215-220.
- 17.** Schouten J.P., McElgunn C.J., Waaijer R., Zwijnenburg D., Diepvens F., Pals G., Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification, 2002, *Nucleic Acid Research* vol. 30, N. 12e57
- 18.** Tizzano EF., Cabot C., Baiget M. Cell-specific survival motor neuron gene expression during human development of central nervous system. 1998 *Am. J. Path.* 153 (2): 355-361.
- 19.** Velasco E., Valero C., Valero A., Moreno F., Hernandez-Chico C. Molecular analysis of the SMN and NAIP genes in Spanish spinal muscular atrophy (SMA) families and correlation between number of copies of cBCD541 and SMA phenotype. 1996 *Hum Mol Gen* 5: 257-263.
- 20.** Yan H., Papadopoulos N., Marra G., Perrera C., Jieicny J., Boland R., Lynch H.T., Chadwick R.B., de la Chapelle A., Berg K., Eshleman J.R., Tuan W., Markowitz S., Laken S.j., Lengauer C., Kinzler K.W., Vogelstein B., Conversion of diploidy to haploidy, 2000, *Nature* 403,723-724.

Dott.ssa Passon Nadia

Responsabile per la Neurogenetica

Dott.ssa Lonigro Renata

Direttore dell'Istituto di Genetica

Prof. Giuseppe Damante