Isabel Alexandra Azevedo da Silveira

MAPEAMENTO CROMOSSÓMICO DA DOENÇA DE MACHADO-JOSEPH E HETEROGENEIDADE GENÉTICA DAS ATAXIAS DOMINANTES

ICBAS, Universidade do Porto

1997

Isabel Alexandra Azevedo da Silveira

MAPEAMENTO CROMOSSÓMICO DA DOENÇA DE MACHADO-JOSEPH E HETEROGENEIDADE GENÉTICA DAS ATAXIAS DOMINANTES

ICBAS, Universidade do Porto

1997

Isabel Alexandra Azevedo da Silveira

MAPEAMENTO CROMOSSÓMICO DA DOENÇA DE MACHADO-JOSEPH E HETEROGENEIDADE GENÉTICA DAS ATAXIAS DOMINANTES

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor em Ciências Biomédicas, Especialidade de Genética, apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, sob orientação do Professor Jorge Sequeiros.

Porto
1997

ICBAS
BIBLIOTECA
U P
PORTO
7485

Preceitos legais

De acordo com o disposto no n°2 do Art° 8° do Dec. -Lei n° 388/70, foram utilizados, em parte, resultados contidos nos seguintes trabalhos, pessoais ou de colaboração, já publicados ou em publicação:

- Sequeiros J, Manaia A, **Silveira I**, Coutinho P, Loureiro JML, Melki J, Rozet JM, Burlet P, Amorim A, Prata JM, Veiga I, Almeida VM, Santos MT, Santos MS, Rocha J, Brandão MC, Munnich A: *Linkage Analysis of Machado-Joseph disease with 44 traditional DNA polymorphisms* (Abs). **Am J Hum Genet** 51: A373, **1992**.

- **Silveira I**, Manaia A, Melki J, Coutinho P, Loureiro L, Guimarães J, Burlet P, Rozet JM, Gispert S, Auburger G, Munnich A, Sequeiros J : *Machado-Joseph disease is genetically different from the Cuban dominant ataxia (SCA2).* Abstr. Intern. Symp. Dominant Hereditary Ataxia, La Habana, Cuba, 11 Dez **1992**.

- **Silveira I**, Manaia A, Maciel P, Melki J, Burlet P, Rozet JM, Coutinho P, Loureiro JML, Guimarães J, Tanaka H, Takiyama Y, Sakamoto H, Nishizawa M, Nomura Y, Segawa M, Tsuji S, Munnich A, Sequeiros J: *Localização cromossómica do gene da doença de Machado-Joseph por análise de ligação com polimorfismos do ADN.* Reunião da Primavera da Sociedade Portuguesa de Neurologia, Espinho, 29 Mai **1993**.

- **Silveira I**, Maciel P, Manaia A, Melki J, Burlet P, Rozet JM, Coutinho P, Loureiro JML, Guimarães J, Tanaka H, Takiyama Y, Sakamoto H, Nishizawa M, Nomura Y, Segawa M, Tsuji S, Munnich A, Sequeiros J: *The locus for Machado-Joseph disease maps to chromosome 14q in Portuguese-Azorean families.* Intern. Works. on the Molecular Genetics of Friedreich's and Dominant Ataxias, Abstract Book pp.82-83, Capri, 22 Jun **1993**.

- **Silveira I**, Manaia A, Melki J, Magarino C, Lunkes A, Hernandez A, Gispert S, Burlet P, Rozet JM, Coutinho P, Loureiro JML, Guimarães J, Auburger G, Munnich A, Sequeiros J. *Machado-Joseph disease is genetically different from Holguin dominant ataxia (SCA2).* **Genomics** 17:556-559, **1993**.

- Sequeiros J, **Silveira I**, Maciel P, Coutinho P, Manaia A, Gaspar C, Burlet P, Loureiro JML, Guimarães J, Tanaka H, Takiyama Y, Sakamoto H, Nishizawa M, Nomura Y, Segawa M, Tsuji S, Melki J, Munnich A. *Genetic linkage of Machado-Joseph disease to chromosome 14q STRPs in 16 Portuguese-Azorean Kindreds.* **Genomics** 21: 645-648, **1994**.

- Maciel P, Gaspar C, **Silveira I**, Coutinho P, Loureiro JML, Guimarães J, Melki J, Munnich A, Twist E, Rouleau GA, Sequeiros J: *Linkage analysis of Machado-Joseph disease in Portuguese-Azorean families.* 3rd International Workshop on Machado-Joseph Disease, Abstract Book pp.45, Furnas, São Miguel, 9 Abr **1994**.

-Gaspar C, Maciel P, **Silveira I**, Coutinho P, Loureiro JML, Guimarães J, Melki J, Munnich A, Twist E, Rouleau GA, Sequeiros J: *Haplotype analysis of chromosome 14q markers for Machado-Joseph Portuguese-Azorean families.* 3rd International Workshop on Machado-Joseph Disease, Abstract Book pp.46, Furnas, São Miguel, 9 Abr **1994**.

- **Silveira I**, Maciel P, Gaspar C, Twist E, Lopes-Cendes I, Jain S, Teive H, Arruda W, Sack G, Sequeiros J, Rouleau GA: *Genetic linkage studies in other non-Portuguese MJD families.* 3rd International Workshop on Machado-Joseph Disease, Abstract Book pp.48, Furnas, São Miguel, 9 Abr **1994**.

- Gaspar C, Twist EC, Maciel P, Casaubon L, **Silveira I**, Macleod PM, Radvany J, Coutinho P, Farrer L, Sequeiros J, Rouleau GA: *Refining the localization of the Machado-Joseph disease gene by linkage analysis.* Abstr. 2nd International Chromosome 14 Workshop, Oxford, 1-3 Set **1994**.

- Sequeiros J, Gaspar C, Maciel P, **Silveira I**, Manaia A, Oliveira J, Teixeira CM, Amorim A, Prata MJ, Loureiro JML, Guimarães J, Burlet P, Rozet JM, Melki J, Munnich A, Twist EC, Rouleau G, Sousa A, Coutinho P: *Machado-Joseph disease: towards identification of the gene.* **Abstr.** II Cong. Neurociências, Programa e Resumos pp.69, Coimbra 5-7 Out **1994**.

- **Silveira I**, Lopes-Cendes I, Maciel P, Gaspar C, Twist E, Jain S, Teive H, Arruda W, Sack G, Sequeiros J, Rouleau GA: *Genetic linkage studies in autosomal dominant ataxia families with an MJD phenotype (*Abs). **Am J Hum Genet** 55: A353, **1994**.

- Gaspar C, Twist EC, Maciel P, Casaubon L, **Silveira I**, MacLeod PM, Radvany J, Coutinho P, Farrer L, Sequeiros J, Rouleau GA: *A linkage study of Machado-Joseph disease-refining the localization of the gene (*Abs). **Am J Hum Genet** 55: A348, **1994**.

- Maciel P, Gaspar C, DeStefano A, **Silveira I**, Coutinho P, Radvany J, Dawson DM, Sudarski L,Guimarães J, Loureiro L, Lopes-Cendes I, Rooke K, Rosenberg R, MacLeod P, Farrer LA, Sequeiros J, Rouleau GA. *Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease.* **Am J Hum Genet** 57:54-61, **1995**.

- **Silveira I**, Lopes-Cendes I, Kish S, Steiner CE, Pinto-Junior W, Maciel JA, Botez MI, Arruda W, Teive H, Jain S, Sack G, Radvany J, Andermann E, Sequeiros J, Rouleau GA: *Analysis of SCA1 and DRPLA mutations in a large population of spinocerebellar ataxia patients* (Abs). **Neurology** 54: A422, **1995**.

- Maciel P, Gaspar C, **Silveira I**, Coutinho P, Guimarães J, Rouleau GA, Sequeiros J: *Machado-Joseph disease: CAG repeat length and clinical features.* Abstr. Fifth Meet. European Neurological Society, 17-21 Jun **1995**.

- **Silveira I**, Lopes-Cendes I, Kish S, Maciel P, Gaspar C, Coutinho P, Botez MI, Teive H, Arruda W, Steiner CE, Pinto-Júnior W, Maciel JA, Jain S, Sack G, Andermann E, Sudarsky L, Rosenberg R, MacLeod P, Rouleau GA, Sequeiros J: *Estudo das mutações para a ataxia espinocerebolosa 1 (SCA1), degenerescência dentatorubropalidoluisiana (DRPLA) e doença de Machado-Joseph (DMJ) num grande grupo de doentes com ataxia espinocerebolosa e de diferente origem geográfica e étnica.* Abstr. Reunião da Primavera da Sociedade Portuguesa de Neurologia, **1995.**

- Maciel P, Gaspar C, **Silveira I**, Lopes-Cendes I, DeStefano A, Guimarães J, Loureiro JL, Radvany J, Dawson D, Sudarsky L, Rosenberg R, MacLeod P, Farrer L, Rouleau GA, Coutinho P, Sequeiros J: *Correlação entre genótipo (número de repetições CAG) e fenótipo (idade de inicio e subtipo clinico) e seu valor predictivo na doença de Machado-Joseph.* Abstr. Reunião da Primavera da Sociedade Portuguesa de Neurologia, **1995.**

- **Silveira I**, Lopes-Cendes I, Sequeiros J, Rouleau GA: *Molecular Diagnosis of SCA1, DRPLA and MJD mutations in a large group of ataxia patients* (Abs). **Am J Hum Genet** 57: A228, **1995**.

- **Silveira I**, Lopes-Cendes I, Kish S, Maciel P, Gaspar C, Coutinho P, Botez MI, Teive H, Arruda W, Steiner CE, Pinto-Junior W, Maciel JA, Jain S, Sack G, Andermann E, Sudarski L, Rosenberg R, MacLeod P, Sequeiros J, Rouleau GA. *Frequency of spinocerebellar ataxia type 1, dentatorubropallidoluysian atrophy and Machado-Joseph disease mutations in a large group of spinocerebellar ataxia patients.* **Neurology** 46: 214-218, **1996**.

- Lopes-Cendes I, **Silveira I**, Maciel P, Gaspar C, Radvany J, Chitayat D, Babul G, Stewart J, Dolliver M, Robitaille Y, Rouleau GA, Sequeiros J. *Limits of clinical assessment in the accurate diagnosis of Machado-Joseph disease.* **Arch Neurol** 53:1168-1174, **1996**.

- Lopes-Cendes I, Steiner CE, **Silveira I**, Pinto-Junior W, Maciel JA, Rouleau GA. *Clinical and molecular characteristics of a Brazilian family with spinocerebellar ataxia type 1.* **Arq Neuropsiquiatr** 54: 412-418, **1996**.

- Lopes-Cendes I, Kish S, **Silveira I**, Robitaille Y, Rouleau GA: *Testing CAG trinucleotide repeats in post-mortem brains from patients with spinocerebellar ataxia: building the bridge between neuropathology and molecular genetics* (Abs). **Neurology** 46: A329, **1996**.

- Gaspar C, Lopes-Cendes I, DeStefano A, Maciel P, **Silveira I**, Coutinho P, Farrer L, Sequeiros J, Rouleau GA: *Linkage disequilibrium in a group of Machado-Joseph disease patients of diferent geographical origins* (Abs). **Neurology** 46: A197, **1996**.

- Maciel P, Lopes-Cendes I, Kish S, Gaspar C, **Silveira I**, Coutinho P, Sequeiros J, Rouleau GA: *Somatic mosaicism of the CAG repeat lenght in brain specimens of spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) and Machado-Joseph disease (MJD)* (Abs). **Neurology** 46: A330, **1996**.

- Gaspar C, Lopes-Cendes I, DeStefano A, Maciel P, **Silveira I**, Coutinho P, MacLeod P, Farrer L, Sequeiros J, Rouleau GA. *Linkage desiquilibrium analysis in Machado-Joseph disease patients of Brazilian origin.* Abstr. 9th International Congress of Human Genetics, **1996**.

- Lopes-Cendes I, Teive HAG, **Silveira I**, Maciel JA, Radvany J, Arruda WO, Bittencourt PC, Calcagnotto ME, Costa JC, Steiner CE, Pinto-Junior W, Santos AS, Rouleau JA. *Frequency of the three mutations causing spinocerebellar ataxia (SCA1, MJD/SCA3 and DRPLA) in Brazilian patients.* Abstr. 9th International Congress of Human Genetics, **1996**.

- Gaspar C, Goto J, Lopes-Cendes I, Maciel P, **Silveira I**, Coutinho P, Riess O, Sasaki H, Wood N, Brunt E, Watanabe M, Volpini V, HsiehM, Soong B-W, Wang G-X, Brice A, Sequeiros J, Rouleau GA. *Haplotype analysis in a large group of Machado-Joseph disease families with different ethnic backgrounds* (Abs). **Am J Hum Genet** 59:A218, **1996**.

Sequeiros J, Maciel P, Taborda F, Ledo S, Rocha JC, Lopes A, Fortuna AM, Gaspar C, **Silveira I**, Fleming M, Coutinho P, Rouleau GA, Jorge CS. *Diagnóstico pré-natal (DPN) na doença de Machado-Joseph (DMJ) por detecção directa da mutação.* Abstr. IV Jornadas Internacionais de Diagnóstico Pré-Natal, Coimbra, **1996**.

Silveira I, Sequeiros J. *Mechanism of pathogenesis in autosomal dominant spinocerebellar ataxias.* X Congresso Nacional de Bioquímica, Abstract Book pp.20, Braga, **1996**.

- Gaspar C, Lopes-Cendes I, DeStefano AL, Maciel P, **Silveira I**, Coutinho P, MacLeod P, Farrer LA, Sequeiros J, Rouleau GA. *Linkage disequilibrium analysis of MJD1 closely linked markers in Machado-Joseph disease patients with different ethnic origins.* **Hum Genet** 98:620-624, **1996**.

- Lopes-Cendes I, Maciel P, Kish S, Gaspar C, Robitaille I, Clark HB, Koeppen AH, Nance M, Schutt L, **Silveira I**, Coutinho P, Sequeiros J, Rouleau GA. *Somatic mosaicism in the central nervous system in spinocerebellar ataxia type 1 and Machado-Joseph disease.* **Ann Neurol** 40: 199-206, **1996**.

- Coutinho P, Guimarães J, Barros J, Loureiro JL, Ribeiro P, Chorão R, Lourenço E, Alves C, Santos JV, **Silveira I**, Maciel P, Gaspar C, Lopes-Cendes I, Rouleau G, Sequeiros J. *Autosomal dominant ataxias in Portugal: review of 106 families.* XVI World Congress of Neurology, Argentina (abs submitted), **1997**.

- **Silveira I**, Coutinho P, Gaspar C, Guimarães J, Loureiro L, Maciel P, Sequeiros J, Rouleau GA. *Analysis of spinocerebellar ataxia type 1, dentatorubropallidoluysian atrophy and Machado-Joseph disease CAG repeats in 48 Portuguese ataxia families* (submetido para publicação).

AGRADECIMENTOS

À Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica a concessão da bolsa de doutoramento sem a qual não teria sido possível realizar este trabalho.

Ao Prof. Jorge Sequeiros, meu orientador, o seu constante esforço de orientação e a sua preciosa contribuição para a minha formação.

Ao Dr Guy A. Rouleau o seu acolhimento no Centre for Research in Neurosciences da McGill University aonde foi realizada a parte experimental, e a sua inestimável contribuição na concretização deste trabalho.

À unidade INSERM U12 de l'Hôpital Necker Enfants Malades, aonde foi executada outra parte experimental, designadamente ao Prof. Arnold Munnich e à Dr Judith Melki pela orientação prestada.

À Prof. Paula Coutinho pela sua colaboração ao longo da execução deste trabalho e pela leitura atenta e cuidada que fez desta dissertação.

A todos os que me acompanharam durante a execução deste projecto, designadamente à Alexandra Manaia, ao Phillippe Burlet, ao Jean-Michel Rozet, à Patrícia Maciel, à Iscia Lopes-Cendes e particularmente à Claudia Gaspar pelo apoio que sempre me manifestou.

A todos quantos estiveram envolvidos no diagnóstico e na recolha das famílias, designadamente à Prof. Paula Coutinho e ao Prof. Jorge Sequeiros e aos Drs João Guimarães, Leal Loureiro, Hélio Teive, Walter Arruda, Lewis Sudarsky, George Sack e Satish Jain.

Agradeço ainda aos doentes e às famílias pela sua colaboração e participação.

Aos meus Pais e à minha família desejo exprimir toda a minha gratidão.

Ao António pelo apoio que sempre me demonstrou e pela sua ajuda durante a realização deste trabalho.

ABREVIATURAS

ADN - Ácido desoxiribonucleíco

APS - Persulfato de amónio

BET - Brometo de etídio

BSA - Albumina de soro bovino

DTT - Ditiotreitol

dATP - Desoxiadenosina-trifosfato

dCTP - Desoxicitidina-trifosfato

dGTP - Desoxiguanosina-trifosfato

dTTP - Desoxitimidina-trifosfato

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

Meio LB - Meio Luria Bertani

PEG - Polietilenoglicol

PVP - Polivinilpirrolidona

rpm - Rotações por minuto

SDS - Dodecil-sulfato de sódio

TAE - Tampão Tris-acetato EDTA

TBE - Tampão Tris-borato EDTA

TE - Tampão Tris-EDTA

TEMED - N,N,N',N'-Tetrametil-etilenodiamina

RESUMO

As ataxias espinocerebelosas (SCAs) são um grupo muito heterogéneo de doenças neurológicas com grande sobreposição fenotípica entre si, para as quais não existe ainda tratamento. A doença de Machado-Joseph (DMJ) é uma SCA com elevada prevalência no arquipélago dos Açores, enquanto a SCA2 é muito comum entre a população cubana, tendo sido colocada a hipótese de serem formas alélicas. Com vista ao mapeamento cromossómico da DMJ adoptámos uma estratégia de *clonagem posicional* baseada no estudo de regiões candidatas. Analisámos o *locus* da SCA2, excluindo ligação genética numa região de 15 cM de cada lado do *locus* da FAH (fenilalanina hidroxilase; a 4 cM do *locus* SCA2, em 12q) em 16 famílias com DMJ. As exclusões efectuadas nas outras regiões candidatas analisadas totalizavam aproximadamente 200 cM quando a localização do gene da DMJ em cinco famílias japonesas nos conduziu ao estudo desta região em 16 famílias portuguesas, confirmando a ligação a 14q e mostrando a homogeneidade entre a DMJ nas duas populações. A identificação das expansões $(CAG)_n$ nos genes da SCA1, DMJ e atrofia dentatorubropalidoluisiana (DRPLA), permitiu-nos determinar a frequência destes três tipos de ataxia. A mutação DMJ estava presente em 17% e a mutação SCA1 em 10% das famílias sem origem portuguesa com SCA dominante; a mutação DRPLA foi encontrada apenas num doente japonês. As mutações SCA1 e DRPLA não foram encontradas entre as famílias portuguesas (residentes em Portugal) estudadas em que a mutação DMJ representava 74% das ataxias dominantes. Comparámos as características étnicas, clínicas e moleculares de portadores da mutação DMJ em famílias sem diagnóstico clínico prévio desta doença com as famílias com diagnóstico clínico e molecular de DMJ. A origem étnica, o número de doentes examinados, a ausência de sintomas específicos e o tamanho do $(CAG)_n$ no gene DMJ revelaram-se factores importantes na elaboração de um diagnóstico clínico correcto de DMJ. Caracterizámos uma família brasileira com SCA1, não diagnosticada clinicamente, em que os três doentes apresentavam ataxia de evolução muito lenta e seis indivíduos mostravam expansão do gene SCA1, tendo sido observada instabilidade na transmissão do $(CAG)_n$.

O mapeamento e a caracterização dos genes das ataxias dominantes permitiram já o início do estudo dos mecanismos patogénicos que, por sua vez, conduzirão a médio prazo à investigação de terapias para estas doenças.

ABSTRACT

The spinocerebellar ataxias (SCAs) are a heterogeneous group of neurodegenerative diseases with extensive phenotypic overlapping for which no treatment exist to date. Machado-Joseph disease (MJD) is a type of SCA with high prevalence in the islands of Azores, while SCA2 is very common in the Cuban population; allelic mutations at the same locus had been suggested as causes of these diseases. We used a positional cloning strategy, based on a candidate region approach, to map the MJD gene. We excluded linkage to the SCA2 *locus* in a region of 15 cM on each side of the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene (at 4 cM to the SCA2 *locus*) in 16 families with MJD. We had already excluded approximately 200 cM on the candidate regions when the MJD gene was assigned to chromosome 14q in 5 Japanese families. We confirmed linkage to this region in our 16 Portuguese families showing homogeneity between these two MJD populations. Expansions of a $(CAG)_n$ tract in the SCA1, dentatorubropallidoluysian atrophy (DRPLA) and MJD genes are responsible for these three types of ataxia allowing the determination of their frequencies. The frequency of the MJD mutation was 17% in the non-Portuguese families with dominantly inherited ataxia, while the SCA1 mutation was present in 10% of the same families; we found the DRPLA mutation in only one Japanese patient. The SCA1 and DRPLA mutations were not found among the Portuguese families studied (resident in Portugal), whereas the MJD mutation represented 74% of the dominant families in this group. Ethnic background, clinical and molecular characteristics of individuals carrying the MJD mutation, in families without clinical diagnosis of this disease, were compared with a group of Portuguese families having clinical and molecular diagnoses of MJD. Several factors seemed to have an impact in the accuracy of the clinical diagnosis, such as ethnic origin; the number of affected individuals available for examination; the absence of specific clinical features; and the size of the expanded CAG repeat in the MJD gene. We studied the clinical and molecular characteristics of a Brazilian family segregating an autosomal dominant type of SCA. Three individuals presented gait ataxia which progressed slowly over the years; six individuals showed one expanded SCA1 allele; instability in the transmission of the expanded CAG tract was also observed.

Mapping and characterization of the SCAs genes has allowed the study of the pathogenic mechanisms and will lead to the research of therapies for these diseases.

RÉSUMÉ

Les ataxies spinocérébelleuses (SCAs) sont un groupe très hétérogène de maladies neurologiques avec une large superposition phénotypique, pour lesquelles aucun traitement existe. La maladie de Machado-Joseph (MMJ) est une SCA prévalante dans l'archipel des Açores, tandis que la SCA2 est fréquente parmi la population cubaine, ce que a suggéré la possibilité de mutations alléliques. Pour la cartographie génétique du gène responsable de la MMJ, une stratégie de clonage positionnel a été envisagé avec une approche de "régions candidates". Le *locus* de la SCA2 a été exclut dans une région de 15 cM de chaque coté du *locus* de la phénylalanine hydroxilase (PAH) (à 4 cM du *locus* SCA2, dans le 12q) dans 16 familles avec la MMJ. Les exclusions effectuées dans les régions candidates analysées totalisaient déjà environ 200 cM lors de la localisation du gène de la MMJ en cinq familles japonaises. L'étude de cette région dans 16 familles portugaises a permit de confirmer liaison au chromosome 14q et montrer l'homogénéité des deux populations pour la MMJ. L'identification des expansions $(CAG)_n$ dans les gènes de la SCA1, MMJ et DRPLA a permis de déterminer la fréquence de chacun de ces types d'ataxie. La mutation MMJ, était présente dans 17% et la mutation SCA1 dans 10% des familles d'origine non-portugaise avec une SCA dominante; la mutation DRPLA a été trouvée seulement dans un malade japonais. Les mutations SCA1 et DRPLA n'ont pas été trouvées dans les familles portugaises (résident au Portugal) étudiées dont la mutation MMJ a représenté 74% des ataxies dominantes. Les caractéristiques ethniques, cliniques et moléculaires des porteurs de la mutation MMJ en familles dépourvues de diagnostique clinique préalable a été comparé avec celles des familles qui ont reçu un diagnostique clinique et moléculaire de MMJ. L'origine ethnique, le nombre de malades examinés, l'absence de symptômes spécifiques et la longueur du $(CAG)_n$ se sont montrés comme des facteurs importants lors de l'élaboration d'un diagnostique clinique correct de la MMJ. Une famille brésilienne, avec une SCA dominante, a été caractérisée; trois malades ont présenté une ataxie d'évolution lente et six individus avaient une expansion du gène SCA1; une instabilité dans la transmission du $(CAG)_n$ a aussi été observée.

La cartographie et l'identification des gènes des ataxies dominantes a déjà permit le début des études sur les mécanismes pathogéniques et conduira à la recherche de thérapies pour ces maladies.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO GERAL

I - LOCALIZAÇÃO CROMOSSÓMICA DE DOENÇAS MONOGÉNICAS POR CLONAGEM POSICIONAL 23

História *23*

Genética molecular *25*

Hibridação de células somáticas *29*

Métodos citogenéticos *30*

Análise de ligação genética *30*

Aplicação e Estratégias *31*

Nota final *35*

II - ANÁLISE DE MUTAÇÕES GENÉTICAS 36

Tipos de mutação *36*

Mutações clássicas 36

Mutações dinâmicas 37

Mecanismos de mutação genética *39*

Aplicação *43*

III - ATAXIAS AUTOSSÓMICAS DOMINANTES 45

Definição *45*

História *45*

Ataxia espinocerebelosa tipo 1 (SCA1) 46

Ataxia espinocerebelosa com movimentos oculares lentos (ataxia espinocerebelosa tipo 2), SCA2 47

Doença de Machado-Joseph (DMJ) e ataxia espinocerebelosa tipo 3 (SCA3) 49

Atrofia dentatorubropalidoluisiana 50

Ataxia espinocerebelosa tipo 4 51

Ataxia espinocerebelosa tipo 5 51

Ataxia espinocerebelosa tipo 6 52

Ataxia espinocerebelosa tipo 7 52

Critérios e classificações clínicas *53*

Epidemiologia *57*

IV - DOENÇA DE MACHADO-JOSEPH 61

V - OBJECTIVOS 63

Mapeamento cromossómico da doença de Machado-Joseph *63*

Determinação da frequência das mutações causadoras de ataxia dominante *66*
Diagnóstico molecular e relação genótipo-fenótipo nas ataxias dominantes *67*

MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS

FAMÍLIAS E MATERIAL BIOLÓGICO 71
Famílias *71*
Colheitas de sangue *73*
Material de autópsia *73*
Sondas Genéticas *74*
Oligonucleótidos sintéticos *74*
Nota *75*
METODOLOGIA GERAL E ESTRATÉGIAS 76
Definição das regiões candidatas para o mapeamento da DMJ *76*
Preparação de ADN de elevado peso molecular *78*
Separação dos leucócitos do sangue total 79
Extracção do ADN 79
Digestão dos leucócitos 79
Extracção com fenol-clorofórmio e precipitação do ADN 79
Controle de qualidade do ADN 80
Preparação das sondas genéticas *80*
Preparação dos plasmídeos e cosmídeos 81
Transformação bacteriana 81
Preparação das células competentes 81
Transformação 82
Minipreparação do ADN plasmídico e cosmídico 82
Extracção do ADN plasmídico e cosmídico 82
Marcação das sondas genéticas 84
Marcação pela técnica de nick translation 84
Marcação pela terminal-transferase 84
Análise genotípica pelo método de Southern *85*
Hidrólise do ADN pelas enzimas de restrição 85
Electroforese do ADN em gel de agarose 86
Transferência do ADN para membrana de nylon 86
Pré-hibridação e hibridação das membranas 87
Análise genotípica pela técnica de amplificação PCR *88*
Técnica de amplificação por PCR 88
Electroforese em gel de poliacrilamida 89
Transferência do ADN para membranas de nylon 89
Hibridação das membranas 89
Análise do minisatélite (VNTR) no gene da FAH humana 90

Análise dos microsatélites $(CA)_n$ do cromossoma 14q 92
Análise de mutações causadas por repetição do trinucleótido CAG 92
Sequenciação do ADN *93*
Sequenciação do $(CAG)_n$ no gene SCA1 94
Preparação do ADN de cadeia simples 94
Reacção de amplificação por PCR 94
Separação dos alelos do locus SCA1 por electroforese em gel não-desnaturante de poliacrilamida 94
Separação das cadeias de ADN - esferas metálicas revestidas com estreptavidina 95
Sequenciação das cadeias de ADN 96
Sequenciação do ADN do fago M13mp18 97
Análise de dados *97*
Os programas do LINKAGE 97
O programa HOMOG 99

RESULTADOS

1- HETEROGENEIDADE GENÉTICA DAS ATAXIAS DOMINANTES E MAPEAMENTO CROMOSSÓMICO DA DOENÇA DE MACHADO-JOSEPH 103

Resumo *104*
ARTIGO I - MACHADO-JOSEPH DISEASE IS GENETICALLY DIFFERENT FROM HOLGUIN DOMINANT ATAXIA (SCA2). 105
ARTIGO II - GENETIC LINKAGE STUDIES OF MACHADO-JOSEPH DISEASE WITH CROMOSOME 14 STRPS IN 16 PORTUGUESE AZOREAN KINDREDS 111

2- FREQUÊNCIA DAS MUTAÇÕES CAUSADORAS DE ATAXIA DOMINANTE 117

Resumo *118*
ARTIGO III - FREQUENCY OF SPINOCEREBELLAR ATAXIA TYPE 1, DENTATORUBROPALLIDOLUYSIAN ATROPHY, AND MACHADO-JOSEPH DISEASE MUTATIONS IN A LARGE GROUP OF SPINOCEREBELLAR ATAXIA PATIENTS. 119
ARTIGO IV - ANALYSIS OF SPINOCEREBELLAR ATAXIA TYPE 1, DENTATORUBROPALLIDOLUYSIAN ATROPHY AND MACHADO-JOSEPH DISEASE CAG REPEATS IN 48 PORTUGUESE ATAXIA FAMILIES. 131

3- DIAGNÓSTICO MOLECULAR E CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO NAS ATAXIAS DOMINANTES 157

Resumo *158*
ARTIGO V - LIMITS OF CLINICAL ASSESSMENT IN THE ACCURATE DIAGNOSIS OF MACHADO-JOSEPH DISEASE. 159
ARTIGO VI - CLINICAL AND MOLECULAR CHARACTERISTICS OF A BRAZILIAN FAMILY WITH SPINOCEREBELLAR ATAXIA TYPE 1 (SCA1). 167

DISCUSSÃO GERAL

MAPEAMENTO CROMOSSÓMICO DA DMJ EM FAMÍLIAS PORTUGUESAS 177

Estratégia aplicada *177*

Dificuldades na execução da estratégia adoptada *178*

Aspectos clínicos 178

Idade de início 179

Penetrância 179

Fenocópias 179

Heterogeneidade genética 180

Obtenção de famílias informativas 180

Frequências alélicas dos marcadores 181

Análise apenas dos afectados 181

Exclusões obtidas *182*

HETEROGENEIDADE GENÉTICA ENTRE A DMJ E A SCA2 183

MAPEAMENTO DA DMJ AO CROMOSSOMA 14 184

FREQUÊNCIA DAS MUTAÇÕES SCA1, DRPLA E DMJ EM DOENTES DE DIVERSAS ORIGENS... 185

Origens étnicas *185*

Frequência das mutações *186*

Dificuldades do diagnóstico clínico e patológico *188*

Formas recessivas e casos isolados *188*

FREQUÊNCIA DAS MUTAÇÕES SCA1, DRPLA E DMJ NAS FAMÍLIAS PORTUGUESAS COM ATAXIA 189

Frequências *189*

Limites normais para alelos DMJ *190*

Correlação genótipo-fenótipo na DMJ *191*

Instabilidade mutacional do $(CAG)_n$ na DMJ *191*

HETEROGENEIDADE GENÉTICA DAS ATAXIAS DOMINANTES 194

IMPORTÂNCIA DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR NA IDENTIFICAÇÃO DA DMJ 195

Origem étnica das famílias *195*

Características clínicas e patológicas específicas *195*

Tamanho do $(CAG)_n$ no gene DMJ *197*

Diagnóstico molecular *198*

ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E MOLECULARES DE UMA FAMÍLIA COM SCA1 198

Correlação genótipo-fenótipo na SCA1 ..... *199*

Instabilidade mutacional do $(CAG)_n$ na SCA1 ..... *200*

Identificação de outros tipos de ataxia *201*

MECANISMO PATOLÓGICO NA DMJ E NAS OUTRAS ATAXIAS DOMINANTES 202

Modelo animal de degenerescência neuronal *204*
Mecanismo celular de degenerescência neuronal *205*
Doença de Huntington: um modelo para as doenças poliglutamínicas *206*
Cadeias poliglutamínicas como substratos de transglutaminases *207*
Proteínas de ligação ao ADN *208*
Cadeias homopoliméricas de glutamina ou prolina na transcrição *208*
ARN contendo $(CAG)_n$ interactua com proteínas de ligação ao ARN *209*
Necessidade de estudos adicionais *210*
PERSPECTIVAS FUTURAS PARA A DMJ E OUTRAS ATAXIAS DOMINANTES 211
Prevenção *211*
Identificação da origem geográfica das mutações *211*
Análise de outras mutações *212*
Identificação de outros genes *212*
Identificação do mecanismo patológico *212*
Terapia convencional *213*
Terapia génica *213*
CONCLUSÕES GERAIS 215
BIBLIOGRAFIA **217**

INTRODUÇÃO GERAL

I - LOCALIZAÇÃO CROMOSSÓMICA DE DOENÇAS MONOGÉNICAS POR CLONAGEM POSICIONAL

História

A descoberta, por Mendel [1865], da existência de uma transmissão determinada por pares de ***factores hereditários***, baseada no estudo de segregação de características contrastantes, foi o primeiro contributo importante para a actual genética humana. Mais tarde, Walther Fleming (1877) descobriu os cromossomas, tendo a meiose sido descrita por volta de 1880. Só depois surgiu a hipótese de que os cromossomas continham os elementos que determinam a hereditariedade [Connor & Ferguson-Smith, 1987].

No início do século XX, Bateson e Punnett descreveram o fenómeno de ligação genética, introduzindo a terminologia atracção e repulsão. Pela mesma altura, baseado em estudos sobre a *Drosophila*, Thomas Hunt Morgan (1911) desenvolveu o conceito de organização linear dos genes nos cromossomas, enquanto E.B. Wilson, baseado na transmissão familiar, descobriu que o gene do daltonismo se encontrava no cromossoma X, surgindo assim a primeira descrição de localização de um gene a um cromossoma [McKusick, 1991].

Através de estudos de ligação entre pares de *loci*, os geneticistas do início do século começaram a ser capazes de classificar os *loci* nos chamados **grupos de ligação**, nos quais

cada *locus* se encontrava ligado a pelo menos um membro do grupo, mas nunca a um *locus* de um outro grupo. A interpretação destes grupos de ligação tornou-se clara a partir da observação de que o seu número coincidia com o número de pares de cromossomas em cada espécie analisada [Ott, 1985].

A análise dos sistemas dos grupos sanguíneos permitiu importantes avanços nos estudos de ligação e o estabelecimento das primeiras ligações autossómicas. O primeiro grupo de ligação num autossoma foi anunciado em 1951: Jan Mohr, em Copenhague, descobriu a ligação genética entre o factor secretor e o grupo sanguíneo luterano; os seus estudos indicaram também ligação entre estes dois *loci* e a distrofia miotónica de Steinert (DM), tendo posteriormente sido confirmado que estes três *loci* se localizavam no cromossoma 19. Para isso, Mohr utilizou o método dos *sib-pairs* de Penrose, o qual se baseia no princípio de que se dois *loci* se encontram ligados, a transmissão a irmãos das características determinadas pelos genes aí localizados não será ao acaso. Pela mesma altura, Newton Morton e C.A.B. Smith desenvolveram o método de estimativa das probabilidades de ligação, que foi a base dos actuais *lod scores* ou logaritmo dos *odds* de ligação *versus* não-ligação [McKusick, 1991].

Entre 1951 e 1968, foram descritos vários grupos de ligação, mas em nenhum caso era ainda conhecida a sua localização autossómica. Só em 1968 foi demonstrada a primeira localização a um autossoma, por Roger Donahue, que descobriu ligação do grupo sanguíneo Duffy ao cromossoma 1. Por esta mesma altura, já cerca de 68 genes tinham sido localizados no cromossoma X, com base no modo de transmissão familiar [McKusick, 1991]. Em Dezembro de 1996, 3968 genes responsáveis por doenças hereditárias tinham já localização cromossómica conhecida [McKusick, 1996]. Este grande desenvolvimento foi possível devido essencialmente a quatro metodologias diferentes: (genética molecular, genética das células somáticas, métodos citogenéticos e estudos familiares por análise de ligação genética), muitas vezes combinadas entre si.

Genética molecular

A descoberta das **enzimas de restrição**, endonucleases bacterianas que reconhecem e cortam o ADN de cadeia dupla em locais específicos e de forma reprodutível, foi um acontecimento de extraordinária importância para a análise do ADN [Smith, 1970]. Foi a observação de que certas estirpes bacterianas não evidenciavam bacteriólise quando infectadas pelos bacteriófagos, que levou à descoberta do **fenómeno de restrição**: a destruição, por cortes produzidos pelas endonucleases, do ADN do bacteriófago. Actualmente, são já conhecidas mais de 500 enzimas de restrição, tendo sido adoptada uma nomenclatura baseada no nome da espécie bacteriana que as origina e na sua ordem de descoberta para a mesma bactéria [Smith & Nathans, 1973]. Assim, a primeira letra é maiúscula e provem da inicial da espécie bacteriana de onde é extraída a endonuclease; as duas letras seguintes são minúsculas e correspondem às duas primeiras letras do género da bactéria que produz a enzima; as três letras são seguidas de um número romano que representa o número de ordem de descoberta para cada bactéria. A *Pst I*, por exemplo, foi a primeira enzima encontrada proveniente da *Providencia stuarti* [Kaplan & Delpech, 1995].

As enzimas de restrição vieram permitir a construção de moléculas de ADN recombinante, o mapeamento genético através da análise de ligação e a elaboração de mapas físicos do ADN. As células somáticas humanas contêm duas cópias de cada sequência de ADN, uma de origem paterna e outra de origem materna; quando se forma uma nova célula germinal esta contem apenas uma cópia do genoma, a qual é uma combinação única dos dois genomas de que deriva. O mapeamento genético envolve a determinação, através de estudos familiares, da probabilidade de dois segmentos de ADN próximos serem transmitidos em conjunto na formação de cada célula germinal. Para o mapeamento genético é necessário pois fazer a distinção entre as duas cópias do mesmo gene presentes nas células de que derivam as células germinais. Pequenas diferenças na sequência de bases do ADN alteram por vezes os locais de corte pelas endonucleases (locais de restrição) e, consequentemente, o tamanho dos

fragmentos de restrição (polimorfismos de restrição). Estas alterações podem ser detectadas, mesmo em genomas complexos, pelo método de Southern [1975].

Qualquer característica com uma forma de transmissão mendeliana, facilmente analisável e polimórfica, pode ser utilizada como **marcador genético**. Os primeiros estudos de análise de ligação genética baseavam-se, essencialmente, em **marcadores fenotípicos**, polimórficos nas suas propriedades antigénicas, mobilidade electroforética ou função. Este tipo de marcadores apresentavam os inconvenientes de serem em número muito limitado e de reflectirem apenas as variações do genoma com expressão fenotípica. Por outro lado, os **marcadores genotípicos** consistem em variações individuais da sequência do ADN. Estas variações, que resultam normalmente de mutações pontuais, delecções, inserções ou amplificações, podem alterar os locais de restrição reconhecidos pelas endonucleases, resultando num **polimorfismo de restrição** (*restriction fragment length polymorphism*, - RFLP). O desenvolvimento, em 1975, do método de Southern veio permitir evidenciar os RFLPs. Este método consiste na transferência do ADN genómico, por capilaridade, para um suporte solido, após digestão do ADN com uma enzima de restrição e separação dos fragmentos obtidos por migração electroforética em gel de agarose; o polimorfismo dos fragmentos obtidos é depois revelado por hibridação com uma sequência polinucleotídica complementar (**sonda**) que pode ser um ADN complementar (ADN_c), ADN genómico correspondente a um gene ou ADN genómico *anónimo*. Os RFLPs são então caracterizados pelo conjunto sonda/enzima e correspondem a uma localização precisa no genoma (*locus*). Para determinar a informatividade de um RFLP foi introduzida, por Botstein e colaboradores [1980], a noção de PIC (*polymorphism information content*), que representa a probabilidade de um descendente, resultante da união de um portador de uma característica dominante rara e um não portador, ser informativo para análise de ligação entre dois *loci*. Os RFLPs bi-alélicos possuem um PIC inferior a 0.50 [Kaplan & Delpech, 1995].

Os RFLPs multi-alélicos, inicialmente identificados na proximidade dos genes da insulina, α-globina e Ha-ras1, originaram um outro grupo de marcadores genotípicos

denominados **polimorfismos de repetição - VNTRs** (*variable number of tandem repeats*), de grande importância para o desenvolvimento do mapeamento genético. Os VNTRs são constituídos por sequências repetidas, cujo número varia de indivíduo para indivíduo, alterando o mapa de restrição de numerosas enzimas e originando, desta forma, diferentes alelos. Os VNTRs podem ser postos em evidência, após digestão do ADN genómico com uma enzima que corta de cada lado da repetição, por hibridação com uma sonda obtida por clonagem das sequências únicas que delimitam a repetição. Estes marcadores são excelentes para a análise genotípica pelo facto de serem muito informativos, apresentando um PIC que ronda normalmente um valor de 1 [Jeffreys *et al.*, 1985; Nakamura *et al.*, 1987].

Mais recentemente, o método de amplificação *in vitro* do ADN em ciclos consecutivos de síntese enzimática, denominado de PCR (*polymerase chain reaction*), permitiu o desenvolvimento de uma nova classe de marcadores genéticos altamente polimórficos - os **microssatélites**. Estes marcadores consistem em pequenas sequências repetitivas e polimórficas de oligonucleótidos, que se encontram distribuídas com elevada frequência no genoma humano. O motivo mais comum é o dinucleótido CA. Nos locais em que ocorre esse motivo, o número *n* de repetições do dinucleótido CA é muito variável de um genoma para outro. Valores de *n* diferentes, originam produtos de PCR de tamanhos diferentes, quando o $(CA)_n$ completo é amplificado (por extensão de oligonucleótidos que limitam a repetição). Estas diferenças podem ser detectadas por electroforese em gel de acrilamida [Weber & May, 1989].

Os primeiros métodos de sequenciação do ADN relativamente eficientes apareceram em 1977 [Sanger *et al.*, 1977; Maxam & Gilbert, 1977]. O método químico de sequenciação implica a clivagem química das moléculas de ADN, radoactivamente marcadas na sua porção terminal [Maxam & Gilbert, 1977]. O método de sequenciação por interrupção de cadeia baseia-se na síntese enzimática do ADN em presença de moléculas que vão a dada altura interromper essa mesma síntese [Sanger *et al.*, 1977].

Em 1985, surgiu a primeira descrição do método de amplificação por PCR, que permite a amplificação *in vitro* do ADN em ciclos consecutivos de síntese enzimática [Saiki *et al.*, 1985]. Mas, esta técnica apenas teve grande aplicabilidade a partir de 1988, com a introdução de uma ADN polimerase termo-estável [Saiki *et al.*, 1988].

Foi a partir de 1980, em resultado do desenvolvimento das técnicas de genética molecular, que a localização de genes humanos entrou no seu apogeu. As técnicas de recombinação do ADN forneceram sequências polinucleotídicas - de ADN ou ARN - contendo normalmente mais de 20 nucleótidos, que se hibridam de forma estável e específica a sequências celulares homólogas, sendo por isso denominadas **sondas genéticas**. Quando detectam um polimorfismo de restrição, as sondas dizem-se **polimórficas**, podendo ser usadas no mapeamento genético. As sondas **não polimórficas** são utilizadas apenas no mapeamento físico.

O **mapeamento físico** envolve a localização cromossómica de sequências polinucleotídicas de ADN genómico (ou de genes) através de métodos como a hibridação *in situ* ou a hibridação de células somáticas. No entanto, este tipo de metodologia oferece apenas uma resolução à escala citogenética. O **mapeamento genético** implica a distinção dos dois cromossomas homólogos e a determinação da taxa de recombinação meiótica através de estudos familiares por análise de ligação genética. No CEPH (*Centre d'Étude du Polymorphisme Humain*) em Paris, foi formada uma colecção de ADNs de famílias de referência, constituída por grandes famílias, com oito ou mais filhos, pais e avós, que são utilizadas para mapear geneticamente os marcadores do ADN [Dausset *et al.*, 1990]. Estas famílias permitem construir mapas genéticos de referência para todos os cromossomas.

As sondas possuem três aplicações principais: (1) em conjunto com o ADN dos híbridos de células somáticas, suprimindo a necessidade de expressão genética das células em cultura; (2) para a hibridação *in situ* de cromossomas; e (3) como marcadores do ADN nos

estudos familiares por análise de ligação, permitindo detectar os polimorfismos de restrição (RFLPs) e os polimorfismos de repetição (VNTRs) do ADN.

Hibridação de células somáticas

A partir de 1970, especialmente devido ao desenvolvimento dos **métodos de hibridação de células somáticas**, o mapeamento génico teve uma rápida evolução. O isolamento de cromossomas ou parte de cromossomas, pelo método de híbridos somáticos ratinho-homem, e a possibilidade de os identificar, devida ao desenvolvimento das técnicas de **bandeamento,** contribuíram de modo essencial para o mapeamento genético. Alguns cromossomas humanos contêm genes marcadores que permitem uma selecção positiva, após fusão com uma espécie de roedores deficiente para o marcador, como por exemplo o gene HPRT (hipoxantina fosfo-ribosil-transferase) do cromossoma X, o gene APRT (adenina fosfo-ribosil-transferase) do cromossoma 15 e o gene TK (timidina quinase) do cromossoma 17. Desta forma, é possível obter híbridos somáticos que perderam todos os cromossomas humanos à excepção daquele que contém o gene seleccionado. É assim possível estabelecer uma colecção de híbridos, cada um contendo um ou mais dos diversos complementos dos cromossomas humanos. A uma dada sonda pode ser atribuída uma localização definida, comparando os resultados obtidos pelo método de Southern e a presença ou ausência de cada um dos cromossomas nos híbridos [Kaplan & Delpech, 1995].

A hibridação de uma sonda pelo método de Southern com o ADN extraído de híbridos somáticos (homem/ratinho, homem/hamster), contendo um número reduzido de cromossomas humanos, inspira-se directamente nos métodos clássicos de mapeamento com marcadores fenotípicos. O problema da falta de expressão dos marcadores fenotípicos, nas células em cultura, é ultrapassado, uma vez que a sonda reconhece directamente a sequência complementar no ADN dos híbridos [McKusick, 1991].

Métodos citogenéticos

O grande desenvolvimento alcançado pelos métodos citogenéticos, nomeadamente com o aumento de resolução permitido pelas técnicas de bandeamento, e a hibridação *in situ* de cromossomas em metafase, contribuíram enormemente para o avanço alcançado pelo mapeamento genético. A hibridação *in situ* é realizada sobre preparações citogenéticas, normalmente de linfócitos do sangue periférico em metafase, fixados sobre uma lâmina, após tratamento pela ARNase e desproteinização pela proteinase K [Trask, 1991]. As técnicas de bandeamento indispensáveis ao reconhecimento dos cromossomas e regiões cromossómicas são aplicadas antes ou depois da hibridação, dependendo do método usado. Este método fornece informações preciosas sobre a distribuição e localização das sequências que hibridam com as sondas utilizadas, permitindo assim a "visualização" de genes únicos sobre um cromossoma humano e a interpretação dos rearranjos cromossómicos (delecções, translocações, trissomias) [Kaplan & Delpech, 1995].

Análise de ligação genética

Mas o rápido desenvolvimento alcançado pelo mapeamento génico nos últimos anos provem, em grande parte, do aparecimento recente de marcadores uniformemente distribuídos por todo o genoma e da sua aplicação nos estudos familiares por análise de ligação, tendo também permitido a elaboração de mapas genéticos baseados na distância entre os marcadores.

O processo, que tem em vista a identificação de genes, tendo por primeira etapa o seu mapeamento cromossómico, foi inicialmente denominado *genética inversa*. Esta terminologia foi, no entanto, contestada por muitos autores pelo facto de já possuir um outro significado perfeitamente aceitável, referindo-se à análise funcional de um gene por criação de mutações e

estudo dos efeitos produzidos. Consequentemente, esta denominação foi substituída por **clonagem posicional** [Collins, 1992].

A primeira etapa da *clonagem posicional* é a localização do gene da doença. Para isso, são efectuados estudos de mapeamento genético, em famílias com múltiplos membros afectados. Os gâmetas são células haplóides que contêm um só exemplar de cada cromossoma, ao contrário das células somáticas que contêm um par de cromossomas homólogos. Durante a primeira fase da divisão meiótica, quando os cromossomas se dispõem aos pares, dá-se a formação de quiasmas e ocorre o fenómeno de *crossing-over*, do qual resultam as recombinações génicas. Um *crossing-over* pode ocorrer em qualquer parte do cromossoma; no entanto, a probabilidade de que ele ocorra entre dois *loci* fisicamente próximos é pequena e directamente proporcional à distância entre eles. Quando a taxa de recombinação *(θ)* entre dois *loci* é inferior a 0.5, isto significa que eles estão geneticamente ligados. Quando dois *loci* estão muito distantes num mesmo cromossoma a taxa de recombinação é próxima de 0.5 (recombinação livre), situação idêntica à de dois *loci* que se encontram em pares cromossómicos diferentes. A relação existente entre a distância genética e a taxa de recombinação constitui a base da análise de ligação genética. Os estudos de segregação familiar de uma doença monogénica, em conjunto com a *tipagem* de múltiplos marcadores genéticos (de localização conhecida), permitem assim localizar o gene responsável [Ott, 1985].

Aplicação e Estratégias

A utilização das novas metodologias, em conjunto com uma estratégia de *clonagem posicional*, que visa numa primeira fase a localização e identificação do gene e posteriormente o seu estudo funcional, permitiram identificar as bases moleculares de muitas doenças genéticas, cuja análise resistiu aos métodos bioquímicos tradicionais. Em geral, a análise

bioquímica do tecido envolvido no processo patológico raramente é eficaz, a menos que o defeito genético modifique uma proteína cuja função é conhecida no tecido normal. São raros, no entanto, os defeitos genéticos que seguem este critério entre as doenças que causam atraso mental, degenerescência do sistema nervoso, doença psiquiátrica, assim como malformações congénitas e tumores malignos ou outras doenças genéticas complexas.

A localização cromossómica de um gene por *clonagem posicional* pode, por vezes, servir-se de certas informações que orientam o estudo para uma região específica do genoma. Estes dados (que podem ser, por exemplo, rearranjos cromossómicos, um gene candidato ou um modelo animal) têm-se revelado factores essenciais na clonagem de genes responsáveis por muitas doenças.

A distrofia muscular de Duchenne (DMD), por exemplo, uma doença de transmisão recessiva ligada ao cromossoma X, beneficiou da existência de **anomalias citogenéticas** em alguns doentes, as quais permitiram a sua localização precisa no cromossoma X e, consequentemente, a clonagem posicional do gene responsável. Esta doença afecta essencialmente os homens, enquanto as mulheres são geralmente portadoras. Ocasionalmente, podem ocorrer casos femininos de DMD como, por exemplo, no caso de existirem translocações X-autossoma, uma vez que o cromossoma X normal é preferencialmente inactivado já que ocorreria monossomia parcial letal para a célula. Nos casos femininos de DMD por translocação X- autossoma foi, invariavelmente, identificado um ponto de rotura em Xp21, o que permitiu orientar o mapeamento para o braço curto do cromossoma X e localizar a doença nesta região [Murray *et al.*,1982].

Um outro elemento, aplicável na pesquisa de genes supressores de cancro, é a **perda de heterozigotia** (pequenas delecções) resultante de alterações somáticas não inscritas no património constitucional do indivíduo. Esta estratégia foi usada, por exemplo, na localização no cromossoma 13 do gene responsável pelo retinoblastoma [Cavenee *et al.*, 1983], baseando-

se na comparação entre o ADN da linha tumoral e o ADN constitucional, em indivíduos portadores de cancro, pelo estudo de polimorfismos do ADN de diversas regiões genómicas.

Um caso particularmente interessante do valor das **anomalias genéticas** na orientação do mapeamento génico foi evidenciado pela descoberta de sequências repetitivas localizadas nos genes da atrofia muscular espinobulbar ligada ao cromossoma X (síndrome de Kennedy ou SBMA) [La Spada et *al.*, 1991], do síndrome do X frágil [Oberlé *et al.*, 1991; Verkerk *et al.*, 1991; Kremer *et al.*, 1991] e da distrofia miotónica de Steinert (MD) [Brook *et al.*, 1992; Fu *et al.*, 1992; Mahadevan *et al.*, 1992]. Os indivíduos afectados por estas doenças apresentam uma sequência trinucleotídica repetida expandida em muitas (centenas ou mesmo milhares) cópias, resultando numa anomalia facilmente detectável. A gravidade e idade de início das doenças estão parcialmente relacionadas com a extensão da repetição nos genes respectivos. A descoberta dos genes destas três doenças, num espaço de um ano, sugere que este pode ser um fenómeno responsável por um grande número de doenças genéticas e incentivou muitos laboratórios a uma nova metodologia que consiste em tentar identificar genes com trinucleótidos repetidos [Riggins *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1993; Schalling *et al.*, 1993; Néri *et al.*, 1996; Margolis *et al.*, 1996]. O mapeamento destas sequências e a comparação com a localização cromossómica de doenças poderá assim permitir a identificação de novos genes.

Por outro lado, o conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos da doença pode orientar a sua localização cromossómica em relação a uma família de proteínas ou de **genes candidatos**. O gene responsável pela cardiomiopatia hipertrófica familiar (CHF), por exemplo, foi primeiro mapeado por ligação genética com os genes das cadeias pesadas (α e β) da miosina cardíaca [Solomon *et al.*, 1990]. Estes genes são expressos no coração, o órgão principal afectado na CHF, o que os tornou excelentes candidatos a responsáveis por esta afecção. Posteriormente, foi confirmado que a causa molecular da CHF em todos os doentes pertencentes a uma grande família era uma mutação pontual no exão 13 do gene da cadeia pesada β da miosina cardíaca, originando a substituição de uma arginina, geralmente

conservada, numa glutamina, demonstrando o envolvimento da miosina cardíaca nesta patologia [Geisterfer-Lowrance *et al.*, 1990].

A existência de **modelos animais**, resultantes de mutações espontâneas (mutantes naturais) ou provocadas (modelos transgénicos), pode permitir a execução de um mapeamento comparativo. O ratinho *jimpy* resulta de uma mutação espontânea, cujo modo de transmissão é recessivo ligado ao cromossoma X; o *jimpy* apresenta uma desmielinização do SNC resultante de uma mutação pontual na proteína proteolipídica (PPL). A semelhança entre as anomalias morfológicas da substância branca no ratinho *jimpy* e na doença de Pelizaeus-Merzbacher (PM) sugeria que esta doença poderia resultar de mutações na PPL. Finalmente, a detecção de mutações pontuais no gene PPL e a sua segregação nas famílias com PM permitiu concluir que o gene PPL era de facto o responsável [Gencic *et al.*, 1989].

Na ausência de um qualquer elemento orientador do mapeamento cromossómico, resta seguir uma estratégia de análise metódica de todo o genoma humano com uma bateria de marcadores genéticos. Actualmente, a amplitude do genoma humano já não constitui um obstáculo à **estratégia aleatória** de *screening* do genoma com vista ao mapeamento cromossómico, uma vez que o número e a distribuição dos marcadores genéticos existentes é largamente suficiente [Weissenbach *et al.*, 1992; NIH/CEPH Collaborative Mapping Group, 1992; Dib *et al.*, 1996]. O genoma humano contêm 3×10^9 pares de bases (distância física) correspondente a uma distância genética de aproximadamente 33 Morgans [Ott, 1985]. Em 1980, Botstein e colaboradores conceberam a estratégia a seguir, considerando que era possível saturar e mapear completamente o genoma humano com RFLPs. Inicialmente, esta metodologia visa o estabelecimento de um mapa genético, utilizando marcadores genéticos distanciados normalmente de 20cM, num total de aproximadamente 150 marcadores, sendo efectuada a análise de ligação e determinada a distância genética pelo método dos *lod scores*. A resolução oferecida por esta estratégia é, numa primeira aproximação, suficiente para localizar diversos *loci* responsáveis por doenças monogénicas. A metodologia baseia-se na constituição de uma colecção de marcadores genéticos, informativos e regularmente

distribuídos, e no estudo sistemático de famílias, seleccionadas pelo seu tamanho (número de meioses disponível para análise). Esta estratégia permitiu a localização de numerosos genes, o primeiro dos quais foi o gene da doença de Huntington [Gusella *et al.*, 1983], seguido por muitos outros; tais como, a fibrose quística [Knowlton *et al.*, 1985] e a atrofia espinal progressiva [Melki *et al.* 1990], entre muitos outros.

Nota final

O mapeamento génico, por clonagem posicional, de um gene responsável por uma doença tem início com a recolha de famílias que segreguem o gene em questão. Estas famílias são então analisadas com múltiplos marcadores genéticos até haver evidência de ligação com um ou vários marcadores. Nesta fase, podem surgir dificuldades se a doença for causada por mutações em vários *loci* (heterogeneidade genética), motivo pelo qual é preferível o estudo de um pequeno número de grandes famílias, em lugar de um grande número de famílias menos informativas. Posteriormente, a região vai sendo diminuída por um mapeamento fino com marcadores cada vez mais próximos; o número de meioses potencialmente informativas limitam este mapeamento a intervalos genéticos geralmente superiores a 1 cM; se não existirem outros elementos, o estudo prossegue com a análise de todos os transcritos da região candidata nos indivíduos afectados. A prova final da implicação de um gene numa patologia reside depois na demonstração de mutações nesse gene nos indivíduos doentes.

II - ANÁLISE DE MUTAÇÕES GENÉTICAS

Tipos de mutação

Mutações clássicas

As mutações genéticas são alterações, de maior ou menor extensão, da sequência nucleotídica do ADN genómico, que por vezes podem ser responsáveis por patologias genéticas. Estas alterações podem ser pontuais ou extensas a ponto de poderem ser detectadas por métodos citogenéticos.

A **delecção** é um tipo de mutação que resulta da perda de um segmento de ADN, em que a continuidade da dupla hélice do ADN é mantida. A perda de material genético é muito variável, podendo ir da possibilidade de detecção molecular até ultrapassar o limite de detecção citogenética [Liebhaber *et al.*, 1990].

A **duplicação** de um segmento mais ou menos longo de ADN contrapõe-se à delecção, embora ambos resultem de mecanismos semelhantes. Alguns exemplos de delecções e duplicações podem ser encontrados nas patologias dos genes da α-globina, como nas α-talassemias [Davies & Read, 1988; Higgs *et al.*, 1989].

Certas lesões resultam duma dupla rotura que se produziu em dois genes, seguida por transposição de um gene no outro, ocorrendo assim a **fusão de genes**. A transposição pode ocorrer no interior de um mesmo cromossoma ou envolver genes de dois cromossomas. [Kaplan & Delpech, 1995].

A mudança de orientação de um segmento mais ou menos longo de ADN origina um tipo de mutação chamada **inversão** [Borst & Greaves, 1987], enquanto as **inserções** podem corresponder à introdução num gene de uma sequência móvel ou viral [Kazazian *et al.*, 1988]. As mutações por **amplificação** génica têm sido observadas em células cancerosas, sobretudo ao nível dos proto-oncogenes da família MYC [Kaplan & Delpech, 1995].

As pequenas alterações podem originar **mutações pontuais**. Múltiplos factores, endógenos e exógenos, ocasionam alterações no ADN, que são constantemente reparadas pelos sistemas enzimáticos celulares (mecanismos de reparação do ADN). Quando a reparação não ocorre ou é deficiente, a alteração produzida pode perpetuar-se, através da sua replicação, nas gerações celulares posteriores. Estas consistem na **substituição, supressão ou adição** de uma ou de um pequeno número de bases [Davies & Read, 1988; Kazazian & Boehm, 1988].

Mutações dinâmicas

O genoma humano contém muitas sequências nucleotídicas repetitivas. As repetições de dinucleótidos CA (numa cadeia, GT na complementar) são os STRs (short tandem repeats) mais frequentemente encontrados no genoma humano; no entanto, também existem STRs envolvendo mono-, tri-, tetra- e pentanucleótidos. Os STRs são normalmente muito polimórficos, tendo nos últimos anos vindo a ser muito utilizados como marcadores genéticos no mapeamento de genes. Uma das características dos STRs de trinucleótidos é a sua capacidade de sofrer variações no número de cópias repetidas, por consequência denominada

de mutação dinâmica. Muitos dos STRs apresentam imperfeições da unidade repetida, havendo evidência de que, em geral, o grau de instabilidade das repetições possa estar relacionado com o tamanho da repetição perfeita (Weber, 1990).

Recentemente, foi identificada uma nova classe de mutações denominadas **mutações dinâmicas** [Richards & Sutherland, 1992]. Este é um processo de alteração do material genético que pode ocorrer através de várias gerações, consistindo na expansão de uma sequência trinucleotídica, geralmente polimórfica, para além de um número limite de repetições. Em geral, diferencia-se das mutações referidas anteriormente (mutações convencionais) por: 1) o produto de uma mutação dinâmica apresentar um risco de sofrer uma nova alteração (contracção ou expansão de tamanho); 2) a probabilidade de um STR sofrer alteração de tamanho ser frequentemente proporcional ao número de unidades perfeitas repetidas; 3) a mutação ocorrer geralmente em múltiplas etapas [Sutherland & Richards, 1995].

Até ao momento, foi evidenciada a ocorrência de mutação dinâmica em três repetições de trinucleótidos. A primeira doença associada a uma mutação dinâmica foi o síndrome do X-frágil, aparentemente a forma familiar mais comum de atraso mental [Oberlé *et al.*, 1991]. Esta doença é causada pela expansão de um trinucleótido CGG(/CCG) repetitivo, na posição 5'-não traduzida do gene FMR1 [Verkerk *et al.*, 1991; Kremer *et al.*, 1991]. Foram posteriormente identificadas expansões de um trinucleótido CAG(/CTG) em diversas doenças neurológicas, entre as quais a distrofia miotónica (doença de Steinert) e a atrofia muscular espinobulbar (SBMA ou doença de Kennedy). A distrofia miotónica é causada pela repetição de um trinucleótido CTG na posição 3' não traduzida de um gene localizado no cromossoma 19 [Brook *et al.*, 1992]. A SBMA foi a primeira de uma longa lista de doenças em que as mutações dinâmicas codificam para sequências poliglutamínicas nas proteínas envolvidas nos processos patológicos [La Spada *et al.*, 1991]; esta lista inclui ainda a doença de Huntington (HD) [The Huntington's Disease Research Collaborative Group, 1993], a ataxia espinocerebelosa tipo 1 (SCA1) [Orr *et al.*, 1993], a atrofia dentatorubropalidoluisiana

(DRPLA) [Koide *et al.*, 1994; Nagafuchi *et al.*, 1994] e a doença de Machado-Joseph (DMJ) [Kawaguchi *et al.*, 1994]. Mais recentemente, foi identificada a expansão de um novo tripleto, GAA, no primeiro intrão do gene responsável pela ataxia de Friedreich [Campuzano *et al.*, 1996], enquanto no final do ano de 1996 duas outras afecções vieram aumentar a lista das doenças poliglutamínicas: as ataxias espinocerebelosas de tipo 2 [Pulst *et al.*, 1996; Sanpei *et al.*, 1996; Imbert *et al.*, 1996] e de tipo 7 [Lindblad *et al.*, 1996]. No início de 1997, ocorreu ainda a identificação da mutação responsável por mais uma forma de ataxia espinocerebelosa, a SCA6, causada por uma pequena expansão poliglutamínica no gene codificador do canal de cálcio α_{1A} [Zhuchenko *et al.*, 1997].

Mecanismos de mutação genética

As alterações de maior extensão resultam, em geral, de acidentes que ocorrem ao nível da meiose. As delecções e as duplicações produzem-se devido a ***crossing-overs* desiguais** que ocorrem entre sequências muito idênticas, mas diferentes. Este mecanismo origina, por vezes, a eliminação de um gene de um cromossoma e a sua duplicação num outro cromossoma. Os *crossing-overs* desiguais explicam em grande parte a evolução dos genes e, nomeadamente, o aparecimento das famílias de genes a partir de um gene ancestral. A existência de sequências homólogas próximas, parece favorecer este fenómeno. Estas sequências podem codificar proteínas, como no caso da α-globina, ou não codificar, como o ADN repetitivo disperso da família Alu (pequenas sequências repetitivas de ADN, dispersas por todo o genoma humano) [Lehrman *et al.*, 1987; Higgs *et al.*, 1989].

O fenómeno de fusão génica resulta de acidentes que ocorrem ao nível da meiose, ou da mitose e originam uma **translocação**. Quando ocorre entre dois cromossomas diferentes pode ocasionar uma translocação detectável pelos métodos citogenéticos ou não. Como exemplos, existem a fusão bcr-abl (com produção de cromossoma de Filadélfia visível ou não

na leucemia miéloide crónica). O cromossoma de Filadélfia é um cromossoma 22 de tamanho diminuído, resultante de uma translocação recíproca entre o cromossoma 9, a nível do proto-oncogene c-abl, e o cromossoma 22, com ponto de rotura numa sequência denominada de bcr (*breakpoint cluster region*) [Chen *et al.*, 1989].

As mutações por **amplificação** resultam da multiplicação de sequências, normalmente únicas, podendo originar uma expansão visível à escala citogenética, pelo aparecimento de minicromossomas ou por alteração do padão de bandeamento de um dado segmento, sendo muito frequente em células cancerosas [Kaplan & Delpech, 1995].

A proximidade de dois genes semelhantes não só origina a produção de *crossing-overs* desiguais, mas também a **conversão génica**. Este fenómeno é difícil de detectar, sendo o único exemplo conhecido no homem o dos genes da enzima 21-hidroxilase (21A e 21B) situados na proximidade dos genes do complemento, no domínio dos genes da classe III do complexo HLA. Os genes 21A e 21B apresentam apenas 88 diferenças ao longo dos 3400 nucleótidos que os compõem. Apenas o gene 21B é funcional, o gene 21A apresenta um quadro de leitura fechado, sendo por isso um pseudogene. A análise desta região, em indivíduos que apresentam quer a falta das características fenotípicas do complemento C4A, quer uma deficiência em 21-hidroxilase, que origina hiperplasia congénita da supra-renal, permitiu concluir que no caso da falta das características fenotípicas do complemento C4A se tratava de uma delecção do bloco C4A-21A (por *crossing-over* desigual), enquanto no caso da hiperplasia tinha ocorrido uma conversão génica com perda do alélo C4B (que se convertera em C4A) e perda de actividade da 21-hidroxilase (devido à conversão do alelo 21-B em 21-A), sem perda de material genético [Kaplan & Delpech, 1995].

Um outro mecanismo foi ainda proposto para explicar certas delecções: a **perda de um anel de cromatina** entre dois pontos de união à matriz cromatiniana (distantes de 30 a 130 kb) durante a fase de replicação. Este fenómeno permite explicar a perda de uma centena

de kilobases no domínio dos genes da β-globina, que origina um síndrome de persistência hereditária de hemoglobina fetal [Kaplan & Delpech, 1995].

As sequências medianamente repetitivas pertencentes à família LINE (*long interspersed repeated sequences*) e Alu apresentam uma estrutura de transposão (ADN móvel, possuem genes que codificam para as proteínas necessárias à sua inserção), supondo-se que elas desempenham um papel muito importante na flexibilidade do genoma, no decurso da evolução e ao longo do desenvolvimento [Weiner *et al.*, 1986]. A transposição de sequências LINE ou Alu e a sua inserção no centro de um gene podem ser geradoras de patologias por **mutagénese de inserção**. Os primeiros exemplos identificados correspondem a um caso de hemofilia A por transposição de uma sequência LINE no exão 14 do gene do factor VIII, no cromossoma X [Kazazian *et al.*, 1988]; um caso de neurofibromatose por inserção de uma sequência Alu num intrão do gene NF1 [Wallace *et al.*, 1991]; um caso de deficiência de colinesterase por inserção de uma sequência Alu no gene desta enzima [Muratani *et al.*, 1991]. O mecanismo na origem destes casos é muito provavelmente a **retrotransposição** de um ARN, uma vez que as sequências em causa são transcritas em ARN e algumas contêm uma sequência que codifica para uma transcriptase inversa [Mathias *et al.*, 1991], podendo assim sofrer transcrição inversa em ADN_c, sendo reintegradas no genoma sobre esta forma.

As **mutações pontuais** são, porém, as causas mais frequentes de doença genética, sendo responsáveis por 70% dos casos de doença genética em que a alteração molecular foi identificada. A sua origem é variável, podendo resultar de perturbações bioquímicas endógenas tais como a depurinação espontânea, transições tautoméricas e, sobretudo, desaminação. A **depurinação espontânea** é devida à grande flexibilidade da ligação N-glicosídica que liga as bases púricas ao esqueleto de poli-desoxi-fosfato. As **transições tautoméricas** entre as formas NH2→ NH e C=O→ COH favorecem ligações anormais. A **desaminação,** que transforma adeninas em xantinas e citosinas em uracilos, não tem muitas hipóteses de se perpetuar nas gerações celulares seguintes, uma vez que os derivados formados são rapidamente reconhecidos pelos sistemas de reparação. O mesmo não acontece

quando a desaminação ocorre numa citosina metilada, formando 5-metil uracilo (timina), o qual não é reconhecido como elemento estranho. Esta transição acidental de C em T é então mantida no momento da replicação, ocorrendo a substituição de um G por um A na cadeia complementar. É devido a este fenómeno de mutação que os locais que contêm citosinas metiladas, como certos duetos CG, são locais muito vulneráveis constituindo ***locais quentes*** (*hot spots*) de mutação. As alterações pontuais podem também resultar de **erros de replicação** ou de **reparação** que escaparam à vigilância dos sistemas de controle, explicando assim as mutações por adição ou delecção de uma base ou de um pequeno número de bases [Kaplan & Delpech, 1995].

A **mutação dinâmica** resulta, habitualmente, de um processo que ocorre em **múltiplas etapas** [Sutherland & Richards, 1995]. No síndroma do X-frágil existe uma **fase de pré-mutação** evidente, na qual o *repeat* não se encontra metilado e não há expressão da doença [Oberlé *et al.*, 1991]. No caso das doenças neurológicas, a existência de uma fase de pré-mutação é menos evidente. Por exemplo, na distrofia miotónica, os alelos com 50-80 *repeats* estão associados a casos de não penetrância ou de expressividade mínima, tendo este fenómeno vindo a ser referido como ***proto-mutação*** [Barceló *et al.*, 1993]. Na doença de Huntington, os alelos com 30-37 cópias do *repeat*, que se encontram acima do limite normal, têm sido referidos como **alelos *intermédios*** [Goldberg *et al.*, 1993; Rubinsztein *et al.*, 1996]. O mesmo acontece com a ataxia espinocerebelosa de tipo 1 e na atrofia dentatorubropalidoluisiana, nas quais têm sido encontrados **alelos *intermédios*** contendo, respectivamente, 38 a 42 e 26 a 34 *repeats* [Ranum *et al.*, 1995; Nagafuchi *et al.*; 1994]. Na doença de Machado-Joseph existe um grande intervalo entre o número de *repeats* nos alelos normais e afectados, não tendo ainda sido descritos alelos de tamanho intermédio [Kawaguchi *et al.*, 1994; Maciel *et al.*, 1995; Ranum *et al.*, 1995].

O mecanismo molecular responsável pela instabilidade dos STRs é complexo e possivelmente difere entre as diversas doenças. Contudo, foi proposto um mecanismo para explicar este fenómeno, que se baseia em **erros da enzima polimerase** que persistem devido a

uma deficiência dos sistemas enzimáticos de reparação. Estes erros poderão, por exemplo, consistir em acidentes de replicação, mitóticos ou pré-meióticos, que favorecem a amplificação ou redução do número de repetições. Os vários componentes do sistema de reparação interviriam então como **factores de actuação em trans**, no processo de mutação dinâmica. Em adição aos factores trans, associados à instabilidade das repetições, a existência de cromossomas fundadores em várias doenças causadas pela expansão de um trinucleótido é um forte indício de que as próprias sequências repetitivas (ou sequências estreitamente ligadas) desempenham um papel importante, como **factores de actuação em cis**, no processo de mutação [Sutherland & Richards, 1995].

Aplicação

A análise de mutações genéticas tem por objectivo essencial o diagnóstico de doenças genéticas graves não detectadas (ou só dificilmente detectadas) pelos métodos bioquímicos clássicos, no intuito de prevenir ou tratar essas doenças. Através da análise molecular das anomalias genéticas é possível fazer o diagnóstico directo de portadores, o teste preditivo e o diagnóstico pré-natal, bem como confirmar diagnósticos clínicos de doenças que exibam grande heterogeneidade clínica e genética.

O diagnóstico de **portadores** susceptíveis de transmitir a doença à sua descendência, adquire importância no caso de doenças recessivas causadas por genes muito frequentes na população. No caso de doenças recessivas ligadas ao sexo, a possibilidade de detecção, nas famílias em risco, de mulheres portadoras do gene anormal, permite facilitar o aconselhamento genético e o diagnóstico pré-natal.

O teste preditivo é o diagnóstico **pré-sintomático** da mutação efectuado em indivíduos em risco de desenvolver uma doença autossómica dominante de início tardio.

O diagnóstico **pré-natal**, feito a partir da análise mutacional do ADN fetal pode ser útil para casais em risco de conceber crianças com doenças genéticas graves.

Uma outra aplicação importante da análise de mutações é permitir a detecção de **mutações *de novo***. Certas doenças, como a distrofia muscular de Duchenne e as hemofilias A e B, apresentam uma taxa de mutação elevada, sendo importante para o aconselhamento genético fazer-se a distinção entre os casos isolados, que resultam de uma nova mutação, e os casos familiares.

A análise de mutações é também de grande importância no **estudo epidemiológico** das diversas doenças genéticas. O estudo da frequência das várias doenças e mutações genéticas, por grupos étnicos, pode ter grande interesse, sobretudo em casos de doenças recessivas graves como, por exemplo, a fibrose quística, permitindo orientar rastreios populacionais no sentido de facilitar o aconselhamento genético aos casais em risco de conceber crianças gravemente doentes, e dessa forma diminuir a frequência dessas mutações nas respectivas populações.

III - ATAXIAS AUTOSSÓMICAS DOMINANTES

Definição

As ataxias de transmissão autossómica dominante são um grupo muito heterogéneo de doenças, com início habitual na idade adulta e com fenótipos clínicos variáveis, que se manifestam por ataxia da marcha e incoordenação dos membros, disartria, dismetria e tremor intencional, resultantes do envolvimento do cerebelo e das suas vias aferentes e eferentes. Apesar dos sintomas e sinais de degenerescência do cerebelo, medula e tronco cerebral serem predominantes, podem também ocorrer alterações nos gânglios da base, nervos ópticos, retina e nervos periféricos, podem também estar associados sinais de demência [Harding, 1984; Rosenberg, 1990; Currier e Subramony, 1993].

História

Em 1863, Friedreich, descreveu clinicamente vários grupos de irmãos, todos com idade de início de sintomas por volta da puberdade, sofrendo de ataxia, disartria, fraqueza muscular, escoliose e problemas cardíacos. Esta doença foi, após alguma controvérsia inicial, considerada como uma nova entidade clínica. Ladame em 1890, fez notar que alguns casos

diagnosticados como ataxia de Friedreich apresentavam algumas diferenças clínicas [Subramony & Currier, 1991].

As primeiras descrições de famílias com ataxia de início na idade adulta apareceram quase simultaneamente na Alemanha [Menzel, 1891] e nos Estados Unidos [Sanger Brown, 1892]. Sanger Brown descreveu uma família de 21 doentes com ataxia da marcha, inicialmente, e com disartria, mais tardiamente. A idade de início dos sintomas clínicos variava entre 14 e 45 anos. Em casos mais avançados, os doentes apresentavam fraqueza e espasticidade dos membros inferiores, bem como movimentos coreiformes. Na família descrita por Menzel, um dos doentes apresentava ataxia progressiva dos membros em conjunto com movimentos coreiformes; este doente morreu com a idade de 45 anos, tendo a sua autópsia revelado a presença de uma atrofia olivopontocerebelosa [Harding, 1984].

Em 1893, em França, Pierre Marie considerou as famílias de Sanger Brown, em paralelo com outras famílias, como tendo uma **ataxia cerebelosa hereditária** de início na idade adulta. Deste modo, Marie, separa as ataxias em dois grupos: as formas com hiperreflexia, de início habitual na idade adulta, e as formas de início precoce, com abolição dos reflexos, tipo Friedreich [Harding 1984; Subramony & Currier, 1991; Coutinho, 1992].

Posteriormente, seguiram-se muitas outras publicações, das quais serão no entanto aqui referidas apenas as de maior interesse para o presente trabalho.

Ataxia espinocerebelosa tipo 1 (SCA1)

Em 1950 foi descrita uma família americana de origem holandesa, com uma forma de ataxia cerebelosa combinada a um síndrome piramidal. O exame anátomo-patológico, em doentes pertencentes a esta família revelou alterações das células de Purkinje do cortex cerebeloso, das olivas cerebelosas e dos núcleos pônticos, recebendo por isso o diagnóstico de atrofia olivopontocerebelosa (OPCA) [Schut, 1950].

Em 1974, Yakura e colaboradores sugeriram que o gene da atrofia olivopontocerebelosa se encontrava no braço curto (p) do cromossoma 6. Alguns anos mais tarde, Jackson e colegas [1977] confirmaram que um tipo de **ataxia espinocerebelosa** (SCA) se localizava em 6p, baseados nos estudos de ligação numa grande família com o complexo HLA. Esta ataxia foi posteriormente designada como **tipo 1 (SCA1)**. A localização deste *locus* permitiu a sua análise nas várias famílias com ataxia dominante conhecidas, iniciando-se então uma nova era no estudo, identificação e classificação das ataxias hereditárias.

A clonagem do gene responsável pela SCA1 foi realizada em 1993, em paralelo com a identificação da respectiva mutação: expansão de um trinucleotídeo CAG repetitivo e instável, numa região do gene codificadora de uma sequência poliglutamínica [Orr *et al.*, 1993]. Os alelos SCA1 de tamanho normal apresentam (em 98% dos casos estudados) uma interrupção CAT, no interior da sequência CAG, enquanto os alelos expandidos (100% dos casos estudados) apresentam uma sequência CAG ininterrupta. A instabilidade da sequência CAG repetitiva, apresenta-se então, mais complexa do que uma simples variação no número de repetições, e a perda de uma interrupção CAT na SCA1 predispõe o trinucleotídeo CAG à expansão [Chung *et al.*, 1993].

Ataxia espinocerebelosa com movimentos oculares lentos (ataxia espinocerebelosa tipo 2), SCA2

Wadia e Swami descreveram, em 1971, nove famílias indianas com uma forma de ataxia espinocerebelosa autossómica dominante associada a **movimentos oculares lentos**. Anos mais tarde, a autópsia de três doentes demonstrou tratar-se efectivamente de um subtipo de OPCA [Wadia, 1993].

Desde as primeiras descrições de pacientes afectados com ataxias dominantes, um enorme número de famílias com ataxia cerebelosa progressiva tem sido encontradas [Harding 1984]. Destes salientam-se 263 doentes descritos por Orozco-Diaz e colegas [1990] provenientes da província **de Holguin**, em Cuba. Estes doentes tem uma ascendência comum, tendo sido descritos como resultantes de um *efeito fundador*. Segundo os autores, as características neuropatológicas são compatíveis com OPCA. É também opinião dos autores que a ataxia de Holguin e a ataxia descrita por Wadia e Swami são a mesma forma de ataxia em diferentes regiões geográficas. A análise de ligação entre 13 famílias com ataxia de Holguin e marcadores no cromossoma 12 permitiram localizar um segundo *locus* para a ataxia espinocerebelosa. A obtenção de *lod scores* significativamente positivos, com os marcadores D12S58 e PLA2, em duas famílias, e a existência de lod scores consistentes com ligação genética em outras oito, possibilitaram o mapeamento desta forma de ataxia espinocerebelosa, então designada por **tipo 2 (SCA2)** [Gispert *et al.*, 1993].

Recentemente, três grupos independentes utilizaram três metodologias diferentes na clonagem do gene SCA2 [Pulst *et al.*, 1996; Imbert *et al.*, 1996; Sanpei *et al.*, 1996]. Estes trabalhos demostraram que o gene SCA2 se exprime numa grande diversidade de tecidos e regiões cerebrais, tendo o produto deste gene sido designado *ataxina-2*. O gene SCA2 contêm na sua região codificadora (ORF) uma sequência $(CAG)_n$, geralmente pouco polimórfica, que se encontra expandida nos indivíduos doentes. O seu ADN_c contém 4351 pares de bases, com uma região codificadora para 1313 aminoácidos [Sanpei *et al.*, 1996]. A sequência $(CAG)_n$ encontra-se na posição 5' do gene, prevendo-se que codifique para uma cadeia poliglutamínica [Pulst *et al.*, 1996; Sanpei *et al.*, 1996]. Os alelos SCA2 de tamanho normal contêm de uma a três interrupções CAA, no interior da repetição, enquanto que os alelos expandidos analisados não apresentaram interrupções [Imbert *et al.*, 1996]

Doença de Machado-Joseph (DMJ) e ataxia espinocerebelosa tipo 3 (SCA3)

Em 1972, Nakano e colaboradores descreveram a família Machado, de ascendência açoriana e residente no Massachusetts, afectada por uma forma progressiva de ataxia cerebelosa. No mesmo ano, Woods e Schaumburg, publicaram uma grande família luso-americana (também de origem açoriana) afectada por uma **degenerescência nigro-espino-dentada com oftalmoplegia nuclear**. Apenas quatro anos depois, Rosenberg e colaboradores [1976] deram a conhecer a existência de uma nova família (Joseph), ainda de origem açoriana, sofrendo de uma doença progressiva do sistema motor. Romanul e colaboradores [1977] descreveram outra família açoriana residente no Massachusetts, com sinais clínicos heterogéneos entre os diversos doentes e que reunia as diferentes características descritas nas três famílias anteriores. Concluíram, então, que se tratava de uma única doença com expressividade clínica variável, propondo a designação de *doença açoriana* (*Azorean disease*). Independentemente, pela mesma altura, Coutinho e Andrade chegaram a uma conclusão semelhante quando observaram 40 doentes, pertencentes a 15 famílias açorianas e encontraram representados os três fenótipos numa mesma família, propondo a designação de doença de Machado-Joseph (**DMJ**) [Coutinho & Andrade, 1978; Lima & Coutinho,1980]. Posteriormente, este tipo de ataxia foi identificada em várias famílias de diferentes origens étnicas [Healton *et al.* 1980; Suite *et al.*, 1986; Sequeiros & Coutinho, 1993], nomeadamente em famílias japonesas (Sakai *et al.*, 1983; Yuasa *et al.*, 1986). Em 1993, o gene responsável foi mapeado em cinco famílias japonesas: o gene da DMJ foi então localizado no braço longo do cromossoma 14 (14q24.3-q32), por ligação genética com os STRs D14S55 e D14S48 [Takiyama *et al.*, 1993].

Em 1994, Stevanin e colaboradores decreveram ligação genética de duas famílias com ataxia espinocerebelosa, previamente excluídas dos *loci* SCA1 e SCA2, ao cromossoma 14q24.3-q32, compreendendo uma região de 29 cM, entre os marcadores D14S53 e D14S45. Foi, então, sugerido pelos autores que se tratava de uma forma de ataxia diferente das anteriores para a qual propuseram a designação de **SCA3** [Stevanin *et al.*, 1994].

A identificação do gene envolvido na DMJ surgiu em 1994, com o isolamento de um ADN_c de cérebro humano, contendo uma sequência CAG repetitiva. A análise das variações de tamanho nesta repetição, em indivíduos normais e em indivíduos com DMJ, permitiram concluir que a expansão deste CAG, repetitivo e instável, é a base molecular da doença. O ADN_c no gene DMJ (designado MJD1) contém 1776 pares de bases. A sequência CAG contém duas variações, CAA e AAG, em três posições diferentes, prevendo-se que codifique para uma sequência poliglutamínica [Kawaguchi *et al.*, 1994].

Mais tarde, foi confirmado que a expansão do trinucleótido CAG, repetitivo e instável, no gene DMJ, era a causa molecular da "SCA3", permitindo concluir que esta ataxia é a mesma entidade (clínica e genética) que a DMJ [Haberhausen *et al.*, 1995; Higgins *et al.*, 1996].

Atrofia dentatorubropalidoluisiana

Uma forma de ataxia, significativamente diferente das anteriores, foi denominada por Smith, em 1975, de atrofia dentatorubropalidoluisiana (**DRPLA**); Smith descreveu então um doente isolado, de meia idade, apresentando ataxia e movimentos coreicos. Em 1982, Naito e Oyanagi publicaram observações clínicas e patológicas extensas em cinco famílias japonesas afectadas com uma forma hereditária (dominante) desta ataxia. Baseados na hipótese de que genes com trinucleótideos repetitivos, com expressão no cérebro humano, poderiam estar envolvidos na DRPLA, Koide e colaboradores iniciaram o estudo de genes com estas características, previamente publicados na literatura. O estudo de diversos doentes com ataxias hereditárias revelou a presença de uma expansão instável num trinucleótido CAG repetitivo no gene B37 [Li *et al.*, 1993], apenas nos doentes com DRPLA [Koide *et al.*,1994]. Simultaneamente, Nagafuchi e colaboradores encontraram ligação entre dois marcadores genéticos localizados no braço curto do cromossoma 12 (12p12-ter), em 14 famílias com

DRPLA. Em consequência, a organização de uma lista de genes, contendo trinucleótidos repetitivos, levou à observação de que o gene B37 se encontrava na região de interesse [Nagafuchi *et al.*, 1994]. O estudo subsequente da variação do tamanho do gene B37 em doentes com DRPLA permitiu confirmar o envolvimento deste gene na doença, bem como identificar a mutação responsável: expansão de um trinucleótido CAG repetitivo e instável, no gene B37, no cromossoma 12p [Koide *et al.*, 1994; Nagafuchi *et al.*, 1994].

Ataxia espinocerebelosa tipo 4

A análise genética de uma família de origem escandinava com ataxia hereditária, caracterizada por neuropatia sensitiva, revelou a existência de um quarto *locus*, ligado ao marcador D16S422, localizado em 16q24-ter. Este tipo de ataxia espinocerebelosa foi, de acordo com a ordem de identificação, designado por tipo quatro (**SCA4**) [Gardner *et al.*, 1994]. Estes resultados foram confirmados por Flanigan e colaboradores [1996] após inclusão no estudo de nove doentes adicionais, pertencentes à mesma família.

Ataxia espinocerebelosa tipo 5

A identificação de 170 membros, dos quais 56 clinicamente doentes, pertencentes a uma grande família descendente dos avós do Presidente Lincoln, permitiu a descoberta de uma nova forma de ataxia autossómica dominante, caracterizada por um início normalmente na terceira ou quarta década de vida e uma evolução muito lenta, geralmente sem afectar a longevidade do doente. Na tentativa de localizar o gene responsável por esta ataxia, Ranum e colaboradores [1994b] executaram análises de ligação com marcadores genéticos, espaçados de 20 a 40 cM, uniformemente distribuídos pelo genoma. Desta análise resultou a detecção de ligação com marcadores no cromossoma 11, o primeiro dos quais foi D11S871; foram posteriormente analisados outros marcadores que possibilitaram assim a localização desta

ataxia espinocerebelosa de tipo 5 (**SCA5**) na região centromérica do cromossoma 11 [Ranum *et al.*, 1994b].

Ataxia espinocerebelosa tipo 6

No início de 1997, foi identificada em oito doentes não-aparentados com sintomatologia de ataxia cerebelosa, uma pequena expansão de um trinucleótido CAG no interior de um gene codificador de um canal de cálcio α_{1A}, localizado no cromossoma 19p13. A análise deste gene nas famílias dos doentes revelou que os afectados apresentavam um número maior de repetições (21 a 27) em comparação com 475 normais (4 a 16), permitindo concluir que esta pequena expansão poliglutamínica é muito provavelmente a causa de uma nova forma de ataxia espinocerebelosa, designada por **SCA6** [Zhuchenko *et al.*, 1997].

Ataxia espinocerebelosa tipo 7

Recentemente, foi localizada uma outra forma de ataxia autossómica dominante. Trata-se de uma ataxia espinocerebelosa associada a **degenerescência retiniana**, classificada como uma entidade clinicamente separada das SCAs previamente referidas. Esta ataxia foi classificada por Koningsmark & Weiner [1970] como OPCA tipo III. A análise de ligação, em várias famílias com esta forma de ataxia, permitiu a identificação de um novo *locus* em 3p12-p21.1 [Gouw *et al.*, 1995; Benomar *et al.*, 1995], tendo, posteriormente, esta região sido reduzida a um intervalo de apenas 5cM entre os marcadores D3S1312 e D3S1600 [David *et al.*, 1996]. Como já tinham sido identificados 5 *loci* para as SCAs dominantes e existiam já evidências de um sexto *locus* [Stevanin *et al.*, 1994; Lopes-Cendes *et al.*, 1994b; Twells *et al.*, 1994)], a comissão de nomenclatura da GDB aconselhou que este *locus* fosse designado de **SCA7**. Tudo indica que esta forma de ataxia é também causada pela expansão de um trinucleótido CAG repetitivo e instável [Lindblad *et al.*, 1996].

Critérios e classificações clínicas

O diagnóstico clínico diferencial entre as ataxias dominantes de início na idade adulta foi sempre muito controverso. Enquanto uns defendem a impossibilidade de diferenciação clínica dos diversos tipos de ataxia [Harding, 1984], outros acreditam na possibilidade e importância da elaboração de critérios clínicos diferenciais [Lima & Coutinho, 1980] e que a classificação genética das ataxias permitirá delimitar clinicamente as várias formas e, consequentemente, fazer a sua classificação clínica [Currier e Subramony, 1993]. Por consequência, os seguintes são os únicos critérios normalmente aceites para classificar estas doenças: 1) ataxia progressiva ou não; 2) modo de transmissão; 3) localização cromossómica conhecida ou não.

Existem variadas classificações clínicas das ataxias autossómicas dominantes, muitas vezes divergentes. O desconhecimento do processo metabólico envolvido neste grupo de doenças, bem como a variabilidade fenotípica entre as diferentes famílias e, dentro de cada família, entre os diversos membros, tem dificultado muito a elaboração de uma classificação clínica satisfatória.

Na falta de conhecimento dos defeitos genéticos e bioquímicos, as classificações das ataxias basearam-se no passado essencialmente nas suas características clínicas, neuropatologia e modo de transmissão, sendo por vezes difíceis de aplicar e pouco satisfatórias por múltiplas razões [Subramony & Currier, 1991]: variação intra-familiar das características clínicas, resultante do facto de um mesmo genótipo causar vários fenótipos, bem como a falta de descrições clínicas completas; falta frequente de exames neuropatológicos nos membros das famílias de forma a documentar a variação clínica; e a possibilidade de um mesmo fenótipo ou fenótipos semelhantes resultarem de diferentes genótipos.

Às primeiras descrições clínicas de doentes com ataxia, efectuadas por Friedreich em 1863, seguiu-se a classificação de Marie com a separação entre a ataxia de Friedreich [1863] e

outras ataxias hereditárias. Holmes [1907] foi o primeiro autor a elaborar um esquema de classificação das ataxias degenerativas, baseando-se essencialmente em características patológicas. Este tipo de classificação foi também usado por Zülch [1948] e Greenfield [1954]. Konigsmark e Weiner [1970] foram os primeiros neurologistas a utilizarem, em associação com as características patológicas, as características clínicas e o modo de transmissão, na classificação das atrofias olivopontocerebelosas (OPCA) [Subramony & Currier, 1991].

As tentativas mais recentes de classificação incluem as de Harding [1983], Barbeau e colaboradores [1984] e Currier [1984]. A classificação de Barbeau baseia-se primeiro no modo de transmissão, apresentando uma sub-classificação baseada na idade de início e em algumas características clínicas principais. A classificação de Harding baseia-se, sempre que possível, no conhecimento bioquímico da patogénese da doença e na idade de início. O modo de transmissão é também referido para várias doenças [Subramony & Currier, 1991].

Em 1990, Rosenberg acentuou a necessidade de encontrar as bases moleculares que expliquem a variabilidade inter- e intra-familiar observada nas ataxias dominantes. Segundo Rosenberg, a classificação das ataxias hereditárias, na falta de um suporte bioquímico, deverá basear-se na localização do gene envolvido no processo patológico (classificação genética).

A introdução simultânea de elementos clínicos e genéticos, por Currier e Subramony, torna esta classificação a mais completa e satisfatória, até ao momento. Assim, em 1993, Currier e Subramony dividiram as ataxias hereditárias em 8 grupos principais (Quadro 1).

Quadro 1. **Classificação das ataxias hereditárias** segundo Currier e Subramony [1993] (resumida)

1. Ataxias congénitas
2. Ataxia de Friedreich - recessiva, início antes da idade de 20 anos, reflexos osteotendinosos diminuídos; localizada no cromossoma 9
3. Outras ataxias, recessivas ou esporádicas, com início antes da idade de 20 anos
4. Outras ataxias, recessivas ou esporádicas, com início depois da idade de 20 anos
5. Ataxias dominantes de tipo comum (Marie) - presença inicial de desequilíbrio e reflexos aumentados (OPCA); inclui ataxias localizadas no cromossoma 6, bem como outras, excluídas ou indeterminadas
6. Ataxias dominantes de outros tipos

6.1. Ataxias dominantes como a DMJ que apresentam desequilíbrio, fasciculações faciais, sinais provenientes do envolvimento dos gânglios basais; são ataxias excluídas do cromossoma 6 e não-OPCA (não existe envolvimento das olivas bulbares)

6.2. Ataxias dominantes como o tipo indiano (Wadia e Swami) e cubano (Orozco-Dias), com desequilíbrio, movimentos oculares lentos, reflexos diminuídos; são OPCAs, excluídas do cromossoma 6

6.3. Ataxia com degenerescência retiniana

6.4. Ataxia com demência

7. Paraplegia espástica hereditária
8. Ataxia sem classificação (inclui ataxia de forma esporádica)

Até ao momento foram já identificados vários *loci* responsáveis por formas hereditárias de ataxia, permitindo assim a **classificação genética** destas formas (Quadro 2).

Quadro 2- **Classificação genética de algumas ataxias hereditárias**

Nome	**Locus**	**Características fenotípicas particulares**
Ataxias autossómicas recessivas		
Ataxia de Friedreich	9q13-21 (1)	Início antes dos 25 anos.
Ataxia com deficiência selectiva de vitamina E	8q (2)	Início antes dos 20 anos, deficiência selectiva de vitamina E.
Ataxia espinocerebelosa infantil	10q23.3-q24.1 (3)	Início infantil, neuropatia sensitiva, epilepsia, atrofia óptica.
Ataxia cerebelosa de Cayman	19p13.3 (4)	Não progressiva, início antes dos 20 anos.
Ataxias autossómicas dominantes		
SCA1	6p22-p23 (5, 6, 7)	Sinais piramidais e extrapiramidais.
SCA2	12q23-24 (8)	Movimentos oculares lentos, sinais piramidais e extrapiramidais.
MJD(/SCA3)	14q32.1 (9,10)	OEP, sinais piramidais, distonia e fasciculações da face.
SCA4	16q24-qter (11)	Neuropatia sensitiva.
SCA5	Região centromérica do cromossoma 11 (12)	Ataxia cerebelosa pura.
SCA6	19p13 (13)	Ataxia cerebelosa pura.
SCA7	3p12-p21.1 (14, 15)	Degenerescência retiniana
DRPLA	12p12-ter (16, 17)	Distonia, epilepsia e demência.

Referências: (1): Chamberlain *et al.*, 1988; (2). Ben Hamida *et al.*, 1993; (3): Nikali *et al.*, 1995; (4): Nystuen *et al.*, 1996; (5): Yakura *et al.*, 1974; (6): Jackson *et al.*, 1977; (7): Zoghbi *et al.*, 1988; (8): Gispert *et al.*, 1993; (9): Takiyama *et al.*, 1993; (10): Kawaguchi *et al.*, 1994; (11): Gardner *et al.*, 1994; (12): Ranum *et al.*, 1995; (13): Zhuchenko *et al.*, 1997; (14): Benomar *et al.*, 1995; (15): Gouw *et al.*, 1995; (16): Koide *et al.*, 1994; (17): Nagafuchi *et al.*, 1994.

Epidemiologia

A **ataxia espinocerebelosa de tipo 1** (SCA1), ou OPCA clássica, foi localizada no cromossoma 6, há já alguns anos [Yakura *et al.*, 1974; Jackson *et al.*, 1977; Zoghbi *et al.*, 1988]. Mais recentemente, foram estudadas cinco grande famílias italianas, com mais de 400 membros, ligadas a marcadores do cromossoma 6 [Frontali *et al.* 1991; Spadaro *et al.* 1992]. Apesar deste tipo de ataxia apresentar elevada frequência em famílias de origem italiana têm, no entanto, sido encontrado em famílias de origens étnicas muito diversas. A clonagem do gene SCA1, e a identificação da mutação responsável por esta patologia vieram permitir a análise sistemática de um grande número de famílias e indivíduos isolados com ataxia [Ranum *et al.*, 1994a; Dubourg *et al.*, 1995; Ranum *et al.*, 1995; Giunti *et al.*, 1995]. Ranum e colaboradores [1994a e 1995] identificaram indivíduos de diversas origens, com base na análise da expansão CAG no gene SCA1, entre os quais se encontravam famílias alemãs, anglo-saxónicas, afro-americanas, africanas e russas. Em 1995, em estudos semelhantes, dois grupos europeus encontraram famílias francesas, inglesas, indianas e italianas, portadoras da mutação SCA1 [Dubourg *et al.*, 1995; Giunti *et al.*, 1995]. Poucos anos antes, Matilla e colaboradores [1993] haviam publicado os resultados da análise da expansão CAG do gene SCA1, numa grande família espanhola. Foram também identificadas 12 famílias japonesas com expansões do tripleto CAG no gene SCA1 [Kameya *et al.*, 1995]. Mais recentemente, foi analisada a expansão CAG no gene SCA1 na maior família (constituída por sete grandes e 35 pequenas) até hoje identificada: uma família da Sibéria com 1484 indivíduos, entre os quais 225 doentes e 656 em risco [Goldfarb *et al.*, 1996].

Embora não exista ainda qualquer tipo de levantamento epidemiológico para a **ataxia de tipo indiano e cubano ou ataxia com movimentos oculares lentos** (SCA2), são conhecidas descrições de famílias que apresentam características clínicas semelhantes, com diversas origens geográficas incluindo doentes ingleses, franceses, japoneses, escoceses e americanos [Wadia, 1993]. Apesar de presente em famílias de origens étnicas variadas, este

tipo de ataxia apresenta sobretudo uma prevalência elevada entre famílias de origem indiana [Wadia e Swami, 1971]. Existe uma outra região, a província de Holguin em Cuba, onde a frequência de famílias com ataxia dominante associada a movimentos oculares lentos é muito elevada; Orozco-Diaz e colaboradores [1990] descreveram 263 doentes pertencentes a estas famílias, que ele supõe estarem ligadas por um ascendente comum. Presume-se que este tipo de ataxia seja o mesmo que a de Wadia e Swami. Em 1993, foi encontrado o *locus* da ataxia de Holguin, a partir de então designada SCA2, no braço longo do cromossoma 12 [Gispert *et al.*, 1993]. Esta localização genética foi confirmada primeiro por Pulst e colaboradores [1993] numa família americana de ascendência italiana e, mais tarde, por Lopes-Cendes e colaboradores [1994a] em duas famílias canadianas, uma de origem francesa e outra com ascendência austríaca. Posteriormente, Belal e colaboradores [1994] encontraram ligação genética a este *locus* numa família da Tunísia descrita clinicamente como SCA1. Entretanto, foi encontrada, por Filla e colaboradores [1995], uma outra família de origem italiana, com ligação ao cromossoma 12. Mais recentemente, foram publicadas três famílias da Martinica com ligação genética ao *locus* SCA2 [Lezin *et al.*, 1996]. Apesar de terem já sido identificadas várias famílias de diferentes origens geográficas com SCA2, é possível que existam muitas mais que, devido à sua pequena estrutura, não podiam ser identificadas por análise de ligação. A recente descoberta da mutação SCA2 vai facilitar enormemente a sua detecção [Sanpei *et al.*, 1996; Pulst *et al.*, 1996; Imbert *et al.*, 1996].

A **doença de Machado-Joseph** apresenta uma prevalência relativamente elevada nas ilhas do arquipélago dos Açores e nas comunidades portuguesas dos Estados-Unidos e Canadá (cerca de 1:4000) [Sequeiros e Coutinho, 1993]. Houve, no entanto, descrições de famílias presumivelmente com DMJ, provenientes das mais variadas origens como Japão [Sakai *et al.*, 1983; Yuasa *et al.*, 1986], França [Chazot *et al.*, 1983], Itália [Livingstone & Sequeiros, 1984; Suite *et al.*, 1986], Índia [Jain e Maheshwari, 1986 e 1990], Espanha [Pou-Serradel *et al.*, 1987], Brasil [Radvany *et al.*, 1993], Austrália [Burt *et al.*, 1993], China [Guo-Xiang, 1994] e Israel [Goldberg-Stern *et al.*, 1994]. A descoberta de ligação genética da DMJ ao cromossoma 14q [Takiyama *et al.*, 1993], bem como a clonagem do gene da DMJ e a

identificação da mutação responsável [Kawaguchi *et al.*, 1994], vieram permitir o diagnóstico molecular, não só familiar mas também individual. As análises moleculares permitiram assim a detecção da DMJ em novas famílias de várias origens: Japão [Takiyama *et al.*, 1993; Kawaguchi *et al.*, 1994], Portugal [Twist *et al.*, 1995; Maciel *et al.*, 1995], Brasil [Maciel *et al.*, 1995; Giunti *et al.*, 1995] Alemanha [Schöls *et al.*, 1995; Ranum *et al.*, 1995; Higgins *et al.*, 1996; Haberhausen *et al.*, 1995], Dinamarca [Verschuren-Bemelmans *et al.*, 1995], Inglaterra [Giunti *et al.*, 1995], Índia [Giunti *et al.*, 1995], Gana [Giunti *et al.*, 1995], França [Giunti *et al.*, 1995; Dürr *et al.*, 1996], Austrália [Burt *et al.*, 1996], África [Ranum *et al.*, 1995; Dürr *et al.*, 1996], Marrocos [Dürr *et al.*, 1996], Espanha [Dürr *et al.*, 1996], Bélgica [Dürr *et al.*, 1996], Argélia [Dürr *et al.*, 1996], Guiana Francesa [Dürr *et al.*, 1996], Israel [Gadoth *et al.*, 1996] e China [Soong and Cherng, 1996].

A **atrofia dentatorubropalidoluisiana** DRPLA tem sido essencialmente referida em famílias japonesas [Takahata *et al.*, 1978; Naito e Oyanagi, 1982; Takahashi *et al.*, 1988], em oposição com o ocidente onde apenas raros casos tinham sido descritos [Smith, 1975; Farmer & Hulette, 1992]. A identificação, em 1994, do gene e da mutação responsável pela DRPLA possibilitou a realização do diagnóstico molecular. Para além de numerosas famílias japonesas [Koide *et al.*, 1994; Nagafuchi *et al.*, 1994], foram já identificadas várias novas famílias, entre as quais uma afro-americana [Burke *et al.*, 1994], cinco inglesas [Warner *et al.*, 1994 e 1995; Connarty *et al.*, 1996], uma dinamarquesa [Norremole *et al.*, 1995], uma maltesa [Warner *et al.*, 1994 e 1995] e uma norte-americana [Potter *et al.*, 1995].

Em 1994, foi descrita a primeira família, de origem escandinava, ligada ao *locus* então denominado **SCA4** [Gardner *et al.*, 1994]. Esta é ainda a única família conhecida até ao momento [Flanigan *et al.*, 1996].

O *locus* **SCA5** foi identificado, em 1994, numa grande família descendente do presidente Lincoln [Ranum *et al.*, 1994], não tendo, até ao momento, sido dada a conhecer qualquer outra família.

No início de 1997, foi identificada em oito famílias uma nova forma de ataxia espinocerebelosa, a **SCA6**. Estas famílias apresentavam diversas origens: europeia, afro-americana e asiática [Zhuchenko *et al.*, 1997].

Benomar e colaboradores [1995] e Gouw e colaboradores [1995], em estudos independentes, identificaram o *locus* responsável pela **SCA7**. Na análise de ligação genética deste tipo de ataxia autossómica dominante, caracterizado pela presença de degenerescência retiniana, foram usadas oito famílias de diferentes origens geográficas: Bélgica, Marrocos, França e América do Norte [Benomar *et al.*, 1995; Gouw *et al.*, 1995]. Posteriormente, David e colaboradores [1996] descreveram mais duas famílias, uma brasileira e outra inglesa, ligadas ao locus SCA7.

IV - DOENÇA DE MACHADO-JOSEPH

A doença de Machado-Joseph é uma degenerescência do sistema nervoso, transmitida de modo autossómico dominante, para a qual não existe tratamento. Esta patologia apresenta uma prevalência muito elevada no arquipélago dos Açores e nas comunidades luso-americanas dos Estados-Unidos e Canadá (1:4000), sendo também muito frequente em muitas outras populações [Sequeiros, 1989]. O início da doença é quase sempre por desequilíbrio e alterações da marcha, devidas à ataxia cerebelosa e à espasticidade. A idade de início dos sintomas clínicos é muito variável, existindo casos com início na primeira década de vida e outros em que os primeiros sintomas apareceram depois dos 70 anos; mais frequentemente porém, a idade de início apresenta-se entre os 25 e os 55 anos.

Apesar das dificuldades de diferenciação clínica das ataxias autossómicas dominantes, a existência nas ilhas dos Açores de um elevado número de famílias com DMJ, permitiu à mesma equipa de neurologistas a observação de uma grande diversidade de doentes e a elaboração de critérios clínicos que a permitem diagnosticar. A DMJ apresenta uma expressão clínica variável e foi subdividida em três tipos principais caracterizados no quadro 4 e dependentes da idade de início. Os critérios clínicos de diagnóstico da DMJ foram assim estabelecidos, em 1980, por Lima e Coutinho e redefinidos, alguns anos mais tarde, por Coutinho (1992) (Quadro 3).

Quadro 3. **Critérios de diagnóstico da DMJ** (Lima & Coutinho, 1980; Coutinho, 1992)

1) modo de transmissão autossómico dominante.

2) quadro neurológico principal incluindo ataxia cerebelosa, oftalmoparésia externa progressiva (OEP) e sinais piramidais (tipo 2), associados a um síndrome extrapiramidal distónico proeminente (tipo 1) ou a amiotrofias periféricas importantes (tipo 3).

3) um quadro secundário caracterizado por fasciculações de contracção da face.

A doença de Machado-Joseph apresenta expressão clínica muito variável, que permitiu a sua subdivisão em três tipos [Coutinho & Andrade 1978; Coutinho, 1992] (Quadro 4).

Quadro 4. **Sub-classificação clínica da DMJ** (Coutinho & Andrade 1978; Coutinho, 1992)

tipo 1 - caracteriza-se pelo início precoce e evolução mais grave, apresentando, para além de ataxia cerebelosa e OEP, sinais piramidais e extrapiramidais marcados.

tipo 2 - apresenta uma idade de início mais tardia, exibindo sinais de envolvimento do sistema cerebeloso e OEP, com ou sem sinais piramidais.

tipo 3 - tem início tardio, caracterizando-se por um síndrome cerebeloso e OEP em conjunto com sinais periféricos marcados.

V - OBJECTIVOS

Mapeamento cromossómico da doença de Machado-Joseph

A DMJ é uma doença gravemente incapacitante, com uma evolução média de 15 anos, terminando com a morte do doente. Esta doença, que se manifesta na idade adulta, muitas vezes depois do nascimento da descendência, apresenta um risco de transmissão genética de 50%. Era, por isso, necessário ultrapassar a falta de conhecimento da alteração bioquímica e pôr em prática estratégias que visassem a identificação do gene responsável. Para esse efeito, foi planeada uma estratégia de *clonagem posicional,* que visava primeiro o mapeamento cromossómico do gene, permitindo prosseguir depois com a sua clonagem e o seu estudo funcional. A clonagem do gene permitiria identificar a mutação em causa e prosseguir no sentido de reparar essa alteração através de uma terapia génica. O estudo funcional facilitaria a descoberta e introdução de outros tratamentos para a doença. A identificação da mutação possibilitaria a realização de estudos epidemiológicos e clínico-moleculares, bem como pôr em prática um programa de teste preditivo.

O primeiro objectivo deste trabalho era pois a localização primária do gene envolvido na doença de Machado-Joseph, em famílias portuguesas. Para esse efeito foram seleccionadas, devido ao seu tamanho e estrutura, 16 famílias portuguesas diagnosticadas como DMJ, segundo os critérios de Lima e Coutinho [1980]; foi planeada uma estratégia de *clonagem*

posicional, tendo sido definidas regiões candidatas e estabelecido um mapa baseado nas exclusões anteriormente efectuadas.

Regiões candidatas e estratégias alternativas

Foram definidas várias regiões candidatas; no entanto, sendo a DMJ um tipo de ataxia espinocerebelosa dominante que apresenta uma grande sobreposição de alterações patológicas, sinais clínicos e características genéticas com as outras formas de ataxia espinocerebelosa, os *loci* envolvidos em formas dominantes de ataxia espinocerebelosa já conhecidos eram os melhores candidatos à localização do gene da doença de Machado-Joseph.

1 - Resultados preliminares positivos e negativos

Anteriormente, tinham sido efectuadas análises com marcadores séricos que produziram resultados levemente positivos no cromossoma 3q [Amorim *et al.*, 1991; Sequeiros *et al.*, 1992], tendo este sido considerado uma região candidata para a análise de ligação. Com os resultados obtidos pelo nosso grupo e outros, foi formado um *consórcio de exclusões*, através do qual eram partilhados os resultados negativos, por forma a evitar duplicação de trabalho.

2 - Análise dos *loci* da doença de Tay-Sachs

A descrição de uma família de origem africana com DMJ, em que uma doente apresentava os valores séricos de hexosaminidase A diminuídos [Healton *et al.*, 1979], bem como o ter sido levantada a hipótese da DMJ em Portugal ter tido origem numa comunidade sefardita de Trás-os-Montes [Sequeiros, 1989], sugeria que os *loci* envolvidos na doença de Tay-Sachs poderiam estar associados com o *locus* da DMJ. Esta hipótese originou a definição de duas regiões candidatas: os *loci* das sub-unidades α e β da hexosaminidase, respectivamente em 15q e 5q.

3 - Análise dos *loci* de modelos animais

O conhecimento da existência de um ratinho mutante natural com características anátomo-patológicas que o convertiam num possível modelo animal de ataxia espinocerebelosa com distonia em humanos [Sotelo & Guenet, 1988], orientou a definição de uma região candidata: a mutação *dystonia musculorum* localiza-se no cromossoma 1 do ratinho, numa região homologa ao cromossoma 2q no homem, tendo esta sido uma das regiões seleccionadas.

A informação obtida sobre dois outros ratinhos mutantes naturais com certas características próximas da doença de Machado-Joseph, permitiu-nos ainda estabelecer regiões candidatas adicionais nos cromossomas 10q, 13q e 14q [Guenet, 1991; comunicação pessoal].

4 - Procura sistemática orientada pelas exclusões efectuadas

Caso as regiões candidatas não produzissem resultados positivos, seria analisado o mapa genético estabelecido com marcadores espaçados de 20 cM, de forma a cobrir todo o genoma autossómico, eliminando as regiões previamente excluídas com marcadores proteicos [Myers *et al.*, 1986; Sequeiros *et al.*, 1992] e com marcadores do ADN [Forse *et al.*, 1989; Carson *et al.*, 1992].

5 - Análise do *locus* da ataxia de Holguin no cromossoma 12q

A ataxia dominante de Holguin (SCA2) foi a segunda forma de ataxia espinocerebelosa a ser mapeada, tendo sido localizada no braço longo do cromossoma 12q, entre os marcadores genéticos PLA2 e D12S58 [Gispert *et al.*, 1993]. O *locus* da SCA2 foi o primeiro *locus* responsável por uma forma de ataxia a ser estudado, uma vez que o *locus* da SCA1 fora já excluído em famílias brasileiras e norte-americanas de origem portuguesa [Carson *et al.*, 1992].

6 - Análise do *locus* responsável por DMJ em famílias japonesas

Em 1993, durante os nossos próprios esforços de localização do gene da doença de Machado-Joseph, este foi mapeado no cromossoma 14q, em famílias Japonesas [Takiyama *et al.*, 1993]. Este *locus* era naturalmente favorito ao mapeamento da DMJ nas famílias portuguesas.

Determinação da frequência das mutações causadoras de ataxia dominante

A classificação clínica das ataxias autossómicas dominantes tem sido difícil, devido à variação e sobreposição dos sintomas clínicos, da idade de início e da duração da doença, em cada família e sobretudo entre as diversas famílias. A descoberta das mutações responsáveis por três tipos de ataxia autossómica dominante (SCA1, DRPLA e DMJ) tornaram possível a identificação de famílias afectadas e o seu diagnóstico genético.

Frequência das mutações SCA1, DRPLA e DMJ em doentes de várias origens étnicas e geográficas com ataxia espinocerebelosa

A análise molecular destas mutações foi feita num grande grupo de doentes com ataxia espinocerebelosa, não aparentados, de origens étnicas várias e com diferentes formas de hereditariedade, com vista à identificação e determinação da frequência relativa destas três formas de ataxia.

Frequência das mutações SCA1, DRPLA e DMJ em famílias portuguesas com ataxia espinocerebelosa

A análise dos genes responsáveis pela SCA1, DRPLA e DMJ, foi feita num grande grupo de famílias portuguesas com formas hereditárias de ataxia, de forma a identificar e determinar a frequência relativa destas três mutações neste grupo de famílias.

Diagnóstico molecular e relação genótipo-fenótipo nas ataxias dominantes

A descoberta da existência, nos doentes com SCA1, DRPLA e DMJ, de um trinucleótido CAG repetitivo, expandido em genes dos cromossomas 6p, 12p e 14q, respectivamente, bem como da possível correlação entre a expressão clínica e idade de início da doença e o tamanho da expansão, conduziram a estudos de relação genótipo-fenótipo em várias famílias, anteriormente identificadas com uma destas formas de ataxia.

Avaliação da importância do diagnóstico molecular na identificação da doença de Machado-Joseph

Outro dos objectivos deste trabalho foi o estudo da relação entre as características clínicas observadas nas famílias com diagnóstico molecular de DMJ, mas sem diagnóstico clínico de DMJ, e o tamanho da expansão apresentado pelo trinucleótido CAG nos membros dessas famílias.

Caracterização clínica e molecular de uma família com SCA1

Foi ainda analisada a variação de tamanho do trinucleótido CAG, no gene SCA1, numa família brasileira e suas correlações clínico-moleculares.

MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS

FAMÍLIAS E MATERIAL BIOLÓGICO

Famílias

Este estudo foi realizado num total de 109 famílias e 14 casos isolados com ataxia, de várias origens étnicas, diagnosticados por equipas de neurologistas e neuropatologistas de diversos países.

Entre as famílias analisadas, 96 apresentavam uma forma de transmissão autossómica dominante, enquanto 13 tinham uma forma de transmissão recessiva: 53 eram famílias portuguesas (31 continentais e 22 açorianas), tendo sido examinadas e diagnosticadas por uma equipa constituída por Paula Coutinho, Jorge Sequeiros, João Guimarães e Leal Loureiro, entre outros; 36 eram famílias norte-americanas de ascendência diversa (10 portuguesas, 1 chinesa, 1 africana, 1 espanhola, 1 holandesa, 2 alemãs, 1 sueca, 15 francesas, 1 austríaca, 1 italiana e 2 de origem desconhecida), residentes nos Estados-Unidos e Canadá e examinadas por Roger Rosenberg, Lewis Sudarsky, Eva Andermann, David Chitayat, George Sack, Jorge Sequeiros, Guy Rouleau e John Stewart (em doentes pertencentes a sete destas famílias foi efectuado um diagnóstico patológico, por Stephen Kish); também diagnosticadas em centros norte-americanos foram três outras famílias: uma chinesa (Division of Clinical Genetics, The Hospital for Sick Children, Toronto), uma japonesa (Neurogenetics Unit, Montreal Neurological Institute and Hospital, Montreal) e uma iraniana (Centre for Research in Neurosciences, Montreal General Hospital Research Institute); nove famílias brasileiras apresentavam diversas proveniências (Portugal, Itália e Japão), tendo sido observadas por Hélio Teive, Walter Arruda, João Radvany e Jayme Maciel; na Índia, foram examinadas oito

famílias, por Satish Jain. As colheitas sanguíneas foram executadas em 668 indivíduos de famílias com duas a cinco gerações, compreendendo 255 doentes e 22 suspeitos.

Foram também integrados neste estudo 14 casos isolados de ataxia: 11 clinicamente diagnosticados por Paula Coutinho, Guy Rouleau, M. I. Botez, Hélio Teive e Walter Arruda, enquanto três tiveram diagnóstico patológico efectuado por Stephen Kish. Entre os doentes isolados, nove eram canadianos (seis com ascêndencia francesa, um de origem escandinava e dois de ascêndencia desconhecida); três eram brasileiros (dois com ascendência portuguesa e um italiana); entre estes doentes encontrava-se também um marroquino e um português.

As famílias estudadas apresentavam diferentes formas de ataxia espinocerebelosa progressiva, por vezes associada a movimentos oculares anormais ou a sinais piramidais; Em alguns doentes foram encontrados sinais de demência, bem como sinais extra-piramidais. A idade de início dos sintomas clínicos era muito variável, estando compreendida entre 3 e 70 anos.

Entre as 96 famílias com um padrão de transmissão dominante, 63 foram clinicamente diagnosticadas com DMJ, enquanto em sete famílias o diagnóstico neuropatológico revelou quatro casos de OPCA, dois de atrofia espinopôntica e um de "degenerescência espinocerebelosa". Em seis doentes com ataxia dominante os estudos de ressonância magnética nuclear sugeriram a presença de OPCA, em quatro casos, e de "atrofia cerebelosa", nos outros dois. Em 14 famílias foi apenas diagnosticada "ataxia cerebelosa", duas com sintomas associados de demência. Em 4 outras famílias o diagnóstico clínico foi de atrofia cortical cerebelosa. Um doente pertencente a uma família japonesa teve diagnóstico clínico de DRPLA, enquanto uma família portuguesa teve diagnóstico de ataxia espinocerebelosa tipo 2 (SCA2).

Treze famílias foram consideradas como tendo formas "recessivas" em virtude dos pais dos doentes (identificados pelo menos dois doentes por família) terem sido julgados clinicamente normais; contudo, em alguns casos estes tinham falecido precocemente. Os estudos de ressonância realizados em doentes pertencentes a sete famílias revelaram a presença de OPCA. Dois doentes foram diagnosticados com uma forma tardia pseudo-Friedreich, denominada ataxia Acadiana [Barbeau, 1980]. Um doente foi diagnosticado com

ataxia espástica do tipo Charlevoix-Saguenay [Bouchard *et al.*, 1978]. A única família portuguesa com uma ataxia de transmissão recessiva apresentava sintomas associados de retinite pigmentar e cataratas. Duas famílias tiveram diagnóstico clínico de "ataxia cerebelosa".

Em 14 doentes não foi encontrada história familiar de SCA mas, em alguns, os pais tinham falecido ainda jovens. Em sete doentes o diagnóstico revelou OPCA (três por autópsia e quatro por ressonância magnética). Num doente os estudos por imagem apenas revelaram "atrofia cerebelosa". Seis doentes tiveram diagnóstico clínico de "ataxia cerebelosa".

Colheitas de sangue

Por cada indivíduo das famílias estudadas, foram em regra colhidos 30 ml de sangue em tubo *Vacutainer* com anticoagulante EDTA e 10 ml em citrato de sódio. A partir de 30 ml de sangue é possível obter entre 600 µg e 1.4 mg de ADN, quantidade suficiente para o presente estudo. O sangue colhido em citrato de sódio, quando recebido a tempo (preferencialmente até três dias após colheita), foi usado para estabelecer linhas linfoblásticas após transformação dos linfócitos B com o vírus Epstein-Barr (EBV), constituindo uma fonte permanente de ADN.

Material de autópsia

Nos doentes diagnosticados patologicamente, em quem foi obtido tecido cerebral, os respectivos ADNs foram extraídos por Iscia Lopes-Cendes, que os disponibilizou para este trabalho.

Sondas Genéticas

Os marcadores genéticos, fragmentos de genes ou segmentos de ADN anónimo, integrados em vectores, foram reunidos e disponibilizados por Judith Melki (INSERM U-12, Paris). Este conjunto de sondas genéticas foi ainda completado por sondas compradas à *American Type Culture Collection* (*ATCC*).

Os dados publicados por diversas equipas [Donnis-Keller *et al.*, 1987; O'Connel *et al.*, 1989; Spurr & Naylor, 1991], bem como as informações facultadas pela equipa de Judith Melki e Arnold Munnich, foram compilados para construir mapas genéticos das regiões em estudo de forma a permitirem a selecção dos marcadores mais adequados (PIC>0.30).

Oligonucleótidos sintéticos

As moléculas de ADN de estrutura simples podem ser sintetizadas sem dificuldade por via orgânica. Os oligonucleótidos utilizados para amplificar o ADN genómico por PCR (*polymerase chain reaction*) foram obtidos por síntese, usando um sintetizador (*Applied Biosystems 381A*) e de acordo com as sequências publicadas [Luty & Litt, 1991; Goltsov *et al.*, 1992; Wang & Weber, 1992; Orr *et al.*, 1993; Chung *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1993; Kawaguchi *et al.*, 1994]. Foi usado um método que consiste na realização das reacções no interior de uma pequena coluna que contém fixado o primeiro nucleótido (em 3') do oligonucleótido em síntese. As funções reactivas deste nucleótido encontram-se bloqueadas. Cada ciclo de reacções permite a adição de um novo nucleótido, comportando: 1) desbloqueamento do fósforo em 5'; 2) activação; 3) fixação de um nucleótido; e 4) bloqueamento das extremidades 5' que não incorporaram o nucleótido. Na prática, todas estas operações foram realizadas pelo sintetizador, que contém um microprocessador, tendo apenas sido necessário encher os reservatórios do aparelho com os reagentes apropriados, inserir a sequência desejada no teclado e recuperar o oligonucleótido sintetizado.

Nota

Os materiais e métodos utilizados para a realização de cada objectivo encontram-se descritos mais em pormenor na secção 'Material e Métodos' de cada um dos artigos, incluído adiante como 'resultados'.

METODOLOGIA GERAL E ESTRATÉGIAS

Definição das regiões candidatas para o mapeamento da DMJ

Anteriormente à data de início deste trabalho tinham já sido feitas algumas tentativas de localização da doença de Machado-Joseph. Em 1986, Myers e colaboradores analisaram 18 famílias luso-americanas afectadas pela DMJ, com 18 marcadores proteicos, o que lhes permitiu excluir uma região do genoma humano superior a 160 cM mas, sem sucesso quanto à localização do *locus* DMJ. Este grupo estudou, entre outros, marcadores próximos do complexo HLA, o *locus* da primeira ataxia espinocerebelosa localizada [Yakura *et al.*, 1974; Jackson *et al.*, 1977], embora não tenha obtido resultados informativos. Mais tarde, foram excluídos dois *loci* importantes: Forse e colaboradores [1989] demonstraram que a DMJ era geneticamente diferente da doença de Huntington, tendo também sido definitivamente excluído o possível envolvimento na DMJ do *locus* da ataxia espinocerebelosa de tipo 1 (SCA1) [Carson *et al.*, 1992].

Previamente, tinham também sido realizadas análises em algumas das famílias DMJ portuguesas continentais e açorianas, resultantes do estudo de marcadores proteicos; as exclusões obtidas tinham sido analisadas com o programa EXCLUDE [Edwards *et al.*, 1987] e tinham permitido eliminar uma percentagem adicional do genoma humano [Amorim *et al.*,1991; Sequeiros *et al.*, 1992]. Estas análises foram também importantes por terem

produzido resultados fracamente positivos em certas regiões que foram consideradas candidatas para a análise de ligação com polimorfismos do ADN.

A descrição das características clínicas e patológicas de um ratinho mutante natural, com uma mutação denominada *dystonia musculorum (dt)*, cujo *locus* se localiza no cromossoma 1 do ratinho [Sotelo & Guenet, 1988], sugeria que este poderia ser um modelo animal para a DMJ. O *locus dt* encontra-se ligado a um grupo de genes (isocitrato desidrogenase, *Idh-1*; cadeia leve da miosina do músculo esquelético, *Myl-f*; e Vilina, *Vil*) com homologia a um mesmo grupo localizado no braço longo do cromossoma 2 humano. A existência deste modelo animal e a comparação entre os mapas genéticos do ratinho e humano permitiu defenir uma região candidata em 2q e seleccionar marcadores do ADN de forma a cobrir esta região.

A existência de dois outros ratinhos mutantes naturais com algumas características fenotípicas próximas da doença de Machado-Joseph permitiu-nos ainda estabelecer regiões candidatas adicionais: um dos ratinhos possui a mutação *wabbler-lethal (wl)* localizada no cromossoma 14 numa região com homologia nos cromossomas 14q e 10q humanos; enquanto, o outro apresenta uma mutação denominada *agitans (ag)*, também localizada no cromossoma 14, mas numa região homóloga ao cromossoma 13q humano [Guenet, 1991; comunicação pessoal].

Inicialmente, tinha sido descrita uma família afro-americana com DMJ, em que uma doente apresentava valores séricos de hexosaminidase A diminuídos, indicando que ela seria heterozigótica para a doença de Tay-Sachs [Healton *et al.*, 1979], uma doença muito rara na população africana. Posteriormente, foi levantada a hipótese da DMJ em Portugal poder ter tido origem numa comunidade sefardita de Trás-os-Montes [Sequeiros, 1989], tendo sido sugerido que os genes da doença de Tay-Sachs (uma doença muito frequente nos judeus ashkenazi) nas famílias portuguesas com DMJ poderiam ter uma frequência elevada. Esta hipótese determinou o estabelecimento de duas regiões candidatas: os *loci* das sub-unidades α e β da hexosaminidase A, respectivamente em 15q e 5q.

Foi encontrado, por Orozco-Diaz e colegas [1990], um grupo de doentes residentes na província de Holguin em Cuba; estes doentes caracterizavam-se pela presença de uma forma

de ataxia associada a movimentos oculares muito lentos, então denominada de ataxia de Holguin, apesar das semelhanças com a ataxia indiana descrita por Wadia e Swami [1971]. Esta forma de ataxia foi mais tarde localizada no cromossoma 12q [Gispert *et al.*, 1993], passando então a ser denominada ataxia espinocerebelosa tipo 2 (SCA2). Foi sugerido que esta forma de ataxia, que apresenta também uma larga sobreposição clínica com a DMJ, poderia ter sido introduzida em Cuba por açorianos, que imigraram em grande número para as Caraíbas, sendo nesse caso expressões geográficas diferentes da mesma doença [Orozco-Diaz *et al.*, 1990]. Esta hipótese originou uma das regiões candidatas prioritárias, na hierarquia de importância estabelecida neste trabalho.

Por último, o mapeamento da DMJ no braço longo do cromossoma 14 em cinco famílias japonesas [Takiyama *et al.*, 1993], em conjunto com as semelhanças clínicas existentes [Yuasa *et al.*, 1990] e a possibilidade da mutação DMJ ter sido introduzida na população japonesa pelos portugueses, uma vez que estes foram os primeiros europeus a estabelecer interesses comerciais com o Japão [Sequeiros, 1989], proporcionou uma região cujo estudo era de grande importância para a localização da doença de Machado-Joseph nas famílias portuguesas.

Preparação de ADN de elevado peso molecular

As metodologias utilizadas neste trabalho baseiam-se todas na análise do ADN genómico, tendo este geralmente sido obtido a partir dos leucócitos do sangue circulante. O ADN dos mamíferos é normalmemte isolado por digestão das células com uma enzima (proteinase K ou pronase) em presença de um detergente, seguido de extracção com fenol [Maniatis, 1989].

Separação dos leucócitos do sangue total

Foram centrifugados 30 ml de sangue, à temperatura ambiente, a 2000 rpm, durante 10 min. A camada de glóbulos brancos que se encontrava na interface glóbulos rubros/plasma foi transferida para um tubo estéril de 15 ml e adicionada de RSB (Tris HCl 10 mM, pH 7.6; KCl 10 mM; $MgCl_2$ 10 mM) até ao volume de 11 ml. Foram posteriormente adicionados 60 µl de *Nonidet* P-40 e homogeneizados até obtenção de uma cor cereja. Foi então efectuada uma nova centrifugação à temperatura ambiente, a 2000 rpm, durante 10 min, sendo o depósito posteriormente diluído em RSB (0.5 ml).

Extracção do ADN

Após lise dos leucócitos, o ADN foi isolado das proteínas que o envolviam, por hidrólise enzimática seguida de extracção com fenol e com clorofórmio, sendo depois precipitado com álcool isopropípilico absoluto.

Digestão dos leucócitos

Os leucócitos diluídos em RSB foram digeridos durante a noite à temperatura de 37°C, com 60 µl de pronase (10 mg/ml), em 3 ml de solução SDS para o sangue (Tris HCl 10 mM, pH 7.6; KCl 10 mM; $MgCl_2$ 10 mM; NaCl 0.4 M; EDTA 2 mM; SDS 0.5%).

Extracção com fenol-clorofórmio e precipitação do ADN

Para a extracção fenólica do ADN, o fenol deve ser saturado e tamponado (equilibrado a pH > 7.8). O fenol cristalizado é aquecido a 65°C e adicionado de Tris HCl 0.5 M, a pH 8.0. O fenol equilibrado é conservado a +4°C, ao abrigo da luz.

A um volume de leucócitos digeridos foi adicionado um volume de fenol; seguidamente agitados e centrifugados durante 10 min, a 2500 rpm. A fase aquosa superior

contém o ADN; a fase inferior contém as proteínas e os lípidos; a interface contém a maioria das proteínas e um pouco de ácidos nucleicos. A extracção pelo fenol foi repetida e seguida por uma extracção com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). Por último, foi executada a extracção com um volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1).

A precipitação do ADN foi obtida pela adição de dois volumes de álcool isopropípilico à ultima fase aquosa. O ADN foi então dissolvido num tampão Tris HCl 10 mM, a pH 7, EDTA 1 mM (TE 10:1).

Controle de qualidade do ADN

A concentração do ADN foi determinada por medição da densidade óptica (DO) a 260 e 280 nm, num espectrofotómetro. Os ácidos nucleicos tem um espectro de absorção máximo no comprimento de onda de 260 nm. A absorção a este comprimento de onda é proporcional à concentração de ADN (para o ADN de cadeia dupla, uma unidade de DO a 260 nm corresponde a 50 µg de ADN/ml). A medição da DO a 280 nm permite detectar eventuais contaminantes. A relação DO_{260nm}/DO_{280nm} deve estar compreendida entre 1.8 e 2.0. Um valor inferior a 1.8 indica a existência de contaminação por fenol ou por proteínas, podendo induzir uma incorrecta determinação da quantidade de ADN presente [Maniatis,1989).

A qualidade do ADN foi determinada por electroforese em gel de agarose (0.8%) em tampão TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0). Normalmente, as amostras de ADN foram ajustadas a uma concentração de 200 ng/µl e conservadas a -20°C.

Preparação das sondas genéticas

As sondas são marcadores genéticos que permitem revelar os polimorfismos de restrição e de repetição do ADN, tendo sido utilizadas na análise de ligação entre o *locus* da DMJ e os *loci* dos RFLPs estudados. Os marcadores genéticos usados encontravam-se

inseridos em vectores, existindo normalmente em quantidade suficiente para proceder à sua marcação radioactiva e hibridação com o ADN genómico. No entanto, em alguns casos foi necessário proceder à amplificação dos vectores, tendo sido utilizado o método de microamplificação ou minipreparação dos plasmídeos e cosmídeos, a partir de bactérias transformadas. Após transformação bacteriana pelos plasmídeos ou cosmídeos que continham o fragmento de ADN (sonda genética) que se pretendia amplificar, as bactérias foram colocadas num meio de crescimento de forma a que ocorresse a sua multiplicação e, simultaneamente, a amplificação do segmento de ADN inserido no vector.

Preparação dos plasmídeos e cosmídeos

Transformação bacteriana

A bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*), utilizada como hospedeiro no processo de transformação dos plasmídeos e cosmídeos, é normalmente refractária à transformação. O tratamento das bactérias pelo cloreto de cálcio, porém, torna-as transformáveis pelos plasmídeos ou cosmídeos. As bactérias são então ditas competentes: o cálcio modifica a estrutura da parede celular de forma a permitir a passagem do ADN. A transformação ocorre durante a fase de crescimento exponencial e diminui à medida que as bactérias entram em fase estacionária de crescimento [Maniatis, 1989].

Preparação das células competentes

Foram adicionados 400 µl de pré-cultura da estirpe bacteriana de *E. coli* (HB101) a 40 ml de meio de Luria-Bertani (LB) (Bactotriptona 1%, extracto de levedura 0.5%, NaCl 1%, pH 7.5) e incubados à temperatura de 37°C, com agitação. Quando as células atingiram a fase exponencial de crescimento (DO = 0.4 a 600 nm), foram recuperadas por centrifugação a 3000 rpm, durante 5 min, à temperatura de 4°C. O depósito celular foi diluído em 20 ml de

solução A ($CaCl_2$ 50 mM, Tris HCl 10 mM, pH 7.5) e colocado em gelo durante 1h. Após centrifugação o depósito de células competentes foi retomado por 3 ml da solução anterior.

Transformação

As células competentes, mantidas em gelo, foram distribuídas em volumes de 200 µl e incubadas com 60 µg de ADN plasmídico (ou cosmídico) em solução A, num volume final de 300 µl. Após 1h, as bactérias foram submetidas a um choque térmico por incubação, durante 3 min, à temperatura de 42°C. Esta incubação favorece a penetração do ADN adsorvido à parede das bactérias. As células foram novamente colocadas no gelo e adicionadas de 700 µl de LB, antes de serem incubadas durante 1h a 37°C. Esta fase permite à bactéria exprimir a resistência a antibióticos conferida pelo plasmídeo ou cosmídeo. As bactérias foram de seguida semeadas em placas de Petri com LB sólido (meio LB adicionado de agar 1.5%) e com um suplemento antibiótico ao qual as bactérias transformadas se tornaram resistentes. As placas de Petri foram então incubadas a 37°C, durante 24 a 36h.

Minipreparação do ADN plasmídico e cosmídico

A parede bacteriana foi permeabilizada pela lisozima e por um detergente, em meio alcalino, de forma a permitir a extracção do ADN plasmídico (ou cosmídico). Devido a este tratamento os plasmídeos e o ARN ficaram em solução. O ARN foi destruído pela ARNase e as proteínas bacterianas foram destruídas pela proteinase K, antes de terem sido eliminadas pela extracção com fenol. Os plasmídeos (ou cosmídeos) foram depois precipitados pelo etanol [Maniatis, 1989].

Extracção do ADN plasmídico e cosmídico

Os plasmídeos ou cosmídeos foram extraídos a partir de 50 ml de cultura de bactérias transformadas. Estas bactérias foram incubadas durante uma noite em presença de cloranfenicol (170 µg/ml). O crescimento bacteriano é bloqueado pelo cloranfenicol, mas o crescimento plasmídico e cosmídico, pelo contrário, não é alterado (este tratamento só pode

ser efectuado se o plasmídeo a amplificar não conferir às bactérias resistência ao cloranfenicol).

As bactérias foram recolhidas por centrifugação durante 10 min a 8500 rpm (Sorvall), à temperatura de 4°C. Foram depois lavadas com 10 ml de LB e novamente centrifugadas. O depósito bacteriano foi tratado com um tampão de lise (sacarose 20%, EDTA 10 mM, Tris HCl 25 mM, pH 8.0) e 1 ml de lisozima (20 mg/ml), em gelo durante 15 min, sendo a seguir adicionados 10 ml de uma solução de NaOH 0.2 N, SDS 0.1%. A solução resultante foi homogeneizada e colocada em gelo. Posteriormente, foram adicionados 8 ml de acetato de potássio 3M, a pH 4.8. Esta etapa foi seguida por uma nova homogeneização e incubação no gelo. A solução resultante foi centrifugada durante 20 min (8500 rpm), a 4°C, para eliminar os restos celulares. O sobrenadante foi filtrado e o ADN plamídico foi precipitado por adição de 2 volumes de álcool etílico, incubação no gelo durante 20 min e centrifugação. O ADN plasmídico foi retomado em 5 ml de TE 10/1, sendo novamente precipitado por adição de acetato de amónio 7.5 M a pH 7.5 (2.5 ml), de dois volumes de álcool etílico e reacção durante 30 min a -80°C. O ADN plasmídico (ou cosmídico) foi recuperado por centrifugação, lavado duas vezes com álcool etílico a 70% e novamente recuperado por uma última centrifugação. O ADN foi então seco no *speed-vacum* e retomado em 1 ml de TE 10/1.

A solução plasmídica ou cosmídica foi tratada pela ARNase (40 µg/µl) durante 1h a 37°C, de forma a retirar o ARN. As proteínas bacterianas foram digeridas pela proteinase K (400 µg/µl) em tampão (EDTA 10 mM, Tris HCl 10 mM, a pH 8.0, NaCl 10 mM, SDS 0.5%), durante 1h a 46°C.

Para retirar as proteínas bacterianas da solução (plasmídica ou cosmídica), efectuaram-se duas extracções fenólicas e uma extracção clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Os plasmídeos ou cosmídeos purificados foram precipitados pelo álcool etílico absoluto, lavados com álcool a 70%, secos e finalmente retomados em 400 µl de TE 10:1.

A concentração do ADN (plasmídico ou cosmídico) foi determinada por electroforese, em paralelo com um marcador de tamanho, com concentração conhecida. Normalmente, o rendimento para os plasmídeos pBR322 é de aproximadamente 10µg/50 ml de cultura bacteriana.

Marcação das sondas genéticas

Marcação pela técnica de nick translation

As sondas genéticas inseridas nos plasmídeos ou cosmídeos foram directamente marcados com radioactividade pela técnica de *nick translation*, que consiste na produção e deslocação de cortes numa das cadeias de ADN, sem que esta seja isolada do vector.

A enzima ADNase I provoca cortes aleatórios numa das cadeias do ADN a marcar radioactivamente. A ADN polimerase I degrada o ADN pela sua actividade exonucleásica 5'→ 3' e sintetiza-o devido à sua actividade polimerásica. Como pelo menos um dos nucleótidos presentes no meio é radioactivo (grupo fosfato marcado em posição α do nucleótido) esta síntese origina ADN marcado radioactivamente. Os nucleótidos que não foram incorporados foram separados da sonda marcada por cromatografia em coluna de *Sephadex*.

Os nucleótidos dGTP, dATP e dTTP na concentração final de 1 mM foram adicionados a 100 ng de sonda genética, junto com o tampão (Tris HCl 50 mM, pH 7.8, $MgCl_2$ 5 mM, β-mercaptoetanol 10 mM), a ADN polimerase de *E. coli* (0.5 U), a ADNase I (10 pg) e 60 μCi de [α^{32}P]dCTP num volume final de 20μl. Esta mistura reacional foi incubada durante 1h, a 15°C.

A sonda marcada foi separada dos nucleótidos que não foram incorporados, por passagem em coluna de Sephadex G50^R. Foi utilizada uma seringa plástica de 1 ml, cujo orifício tinha sido obstruído com lã de vidro, contendo Sephadex G50^R hidratado em TE 10:1. A coluna foi compactada por duas centrifugações sucessivas (2000 rpm, durante 3 min). A sonda foi depois colocada na coluna e recuperada por centrifugação.

Marcação pela terminal-transferase

Esta enzima catalisa a adição de desoxinucleótidos (que podem ser radioactivos) à extremidade 3'OH livre do ADN. O polidesoxinucleótido sintetizado possui então uma

composição em bases proporcional às respectivas concentrações das bases no meio; quando a única base presente no meio é o dATP radioactivo, ao ADN a marcar é adicionada uma cauda poliA radioactiva. Este método foi usado na marcação dos oligonucleótidos $(CA)_{20}$ e $(CAG)_{15}$ usados na detecção dos microsatélites e dos CAG *repeats.*

A 1µl de ADN (100 ng/µl) a marcar foram adicionados 10 µl de tampão TdT, 5X (500 mM de tampão cacodilato, a pH 6.8, 5 mM $COCl_2$, 0.5 mM DTT e 0.5 mg/ml de BSA), 25 U de terminal transferase, 30 µCi de [α^{32}P]dATP e água até ao volume de 50 µl. Esta mistura reacional foi incubada durante 1h a 37°C.

Análise genotípica pelo método de Southern

Esta técnica consiste em detectar especificamente, pela hibridação com sequências radioactivas complementares, fragmentos de ADN aderentes a uma membrana [Southern, 1975], tendo possibilitado a análise dos RFLPs e VNTRs usados no mapeamento genético. O ADN é primeiro digerido por enzimas de restrição que reconhecem sequências nucleotídicas especificas e o cortam a esse nível. Os fragmentos de ADN obtidos após digestão enzimática são separados, de acordo com o seu tamanho, por migração eletroforética em gel de agarose. Estes fragmentos são então desnaturados por tratamento alcalino e transferidos por capilaridade para uma membrana. A membrana é hibridada com uma sonda radioactiva. Os fragmentos reconhecidos pela sonda formam um híbrido estável, visualizado por autoradiografia.

Hidrólise do ADN pelas enzimas de restrição

Para proceder à análise de ligação entre o *locus* da DMJ e os RFLPs, o ADN dos indivíduos das famílias com a doença de Machado-Joseph foi digerido pelas seguintes

enzimas: *Msp*I, *Taq*I, *Pst*I, *Rsa*I e *Pvu*II. Os fragmentos de restrição originados por estas cinco enzimas permitem a análise de 90% das sondas genéticas utilizadas.

Para cada indivíduo das famílias estudadas foram digeridos 8 µg de ADN genómico com 6 a 8 U de enzima/µg em presença de tampão de digestão, de DTT (ditioteitrol) 1 mM e de espermidina 1 mM. A hidrólise foi efectuada a 37°C para todas as enzimas, excepto para a *Taq*I que requer uma temperatura de 65°C.

A qualidade da digestão foi visualizada por migração duma pequena fracção do ADN digerido em gel de agarose 0.8%, em tampão TAE.

Electroforese do ADN em gel de agarose

A electroforese em gel de agarose permitiu separar os fragmentos de ADN de acordo com o seu tamanho molecular. As amostras de ADN digerido foram concentradas a um volume adequado. Depois, foram adicionadas de 20% de azul de bromofenol (azul de bromofenol 0.5%, ficol 30%) e colocadas em gel de agarose (0.8%) com brometo de etídio (BET) (1 µg/ml). A electroforese foi efectuada a voltagem constante (45 V) durante 24h. O BET é uma substância intercalante, fluorescente, que se coloca entre as bases dos ácidos nucléicos permitindo visualizá-los à luz UV. As amostras de ADN foram sempre colocadas paralelamente a um marcador de peso molecular, de forma a permitir a determinação do tamanho dos fragmentos observados.

Transferência do ADN para membrana de nylon

Após migração electroforética, o gel foi tratado com uma solução de HCl 0.25 N, durante 10 min (de forma a fragmentar o ADN de tamanho molecular elevado), seguido de uma rápida lavagem em água destilada. O gel foi de seguida colocado sobre uma ponte de papel Whatman 3MM saturada e em contacto com uma solução de NaOH 0.4 N. Sobre o gel foi colocada uma membrana de *nylon*, carregada positivamente (Hybond H+), e sobre a

membrana foi colocado papel absorvente e uma placa de vidro, de forma a ser exercida uma pressão homogénea. A transferência foi feita durante um período mínimo de 3h. Como as membranas usadas eram carregadas positivamente, não foi necessário qualquer tratamento posterior.

Após a transferência, as membranas foram lavadas numa solução de SSEP 2X (NaCl 360 mM, EDTA 2 mM, NaH_2PO_4 20 mM a pH 7.5). A qualidade da transferência do ADN foi sempre verificada aos raios UV (ausência de ADN no gel).

Pré-hibridação e hibridação das membranas

As membranas foram pré-hibridadas durante 1h, a 65°C, numa solução de SSEP 5X, Denhart 5X (Ficoll 0.5%, PVP 0.5% e BSA 0.5%), SDS (0.5%) adicionada ainda de ADN (100 µg/ml) fragmentado de esperma de salmão ou ADN placentário humano (quando a sonda utilizada continha sequências repetidas).

Após a pré-hibridação, que tem a função de saturar as membranas, o tampão foi substituído por um novo, idêntico ao anterior, mas adicionado à sonda radioactiva desnaturada (100°C, 10 min).

A hibridação decorreu por um período de 16 a 18h, tendo sido seguida por lavagens consecutivas das membranas a 65°C, com soluções de poder crescente. Estas lavagens têm por objectivo eliminar toda a fixação não específica da sonda. Primeiro, foram efectuadas duas lavagens à temperatura ambiente com uma solução de SSEP 2X, SDS 0.1%, durante 10 min. Estas foram seguidas por lavagens de 15 min, a 65°C, em solução SSEP 1X, SDS 0.1%, e em solução SSEP 0.1X, SDS 0.1%.

Os filtros foram posteriormente envolvidos em plástico e postos em contacto com um filme Kodak X-AR, entre dois *écrans* intensificadores, à temperatura de -80°C, durante 48 a 72h.

As membranas foram novamente utilizadas, após desibridação em solução fervente de SDS 0.1%.

Análise genotípica pela técnica de amplificação PCR

Esta técnica permitiu analisar não só os microsatélites $(CA)_n$ usados no mapeamento genético, mas também as mutações causadas pela expansão de trinucleótidos CAG.

Técnica de amplificação por PCR

A *polymerase chain reaction* (PCR) é uma técnica de amplificação *in vitro* de sequências de ácidos nucleicos que consiste na utilização de duas sequências oligonucleotídicas (*primers*) de um lado (em 5') e outro (3') da sequência de ADN a amplificar. Quando se adicionam os dois oligonucleótidos ao ADN genómico, em condições adequadas à hibridação, eles vão-se colocar em face das respectivas sequências complementares. Por adição de ADN polimerase, dá-se a extensão de cada sequência oligonucleotídica no sentido 5'→ 3', formando-se uma cadeia exactamente complementar àquela que serviu de molde. Como resultado, a sequência de ADN a amplificar é completamente duplicada. A operação recomeça, cada ciclo comportando: 1) um tempo de desnaturação a 95°C; 2) um tempo de hibridação com os oligonucleótidos, a temperatura variável (37-51°C); e 3) um tempo de extensão a 72°C.

Cada etapa prolonga-se entre 30 seg e 2 min e origina a duplicação da sequência nucleotídica compreendida entre os dois oligonucleótidos. A amplificação é exponencial: ao fim de n ciclos obtêm-se 2^n segmentos de ADN.

As reacções de amplificação por PCR foram realizadas em aparelhos apropriados (Perkin Elmer Cetus *automated thermal cycler*) e com uma enzima ADN polimerase termo-resistente: a *Taq* ADN polimerase.

Electroforese em gel de poliacrilamida

Os produtos de amplificação por PCR, de pequeno tamanho (<300 pares de bases), foram analisados por electroforese em gel de poliacrilamida 6% (acrilamida / N, N'-metileno bis-acrilamida (38:2); ureia 7 M; Tris-borato 89 mM; EDTA 2 mM).

Transferência do ADN para membranas de nylon

Após electroforese em gel de poliacrilamida, o ADN foi transferido para membrana de *nylon* Hybond N+. A membrana foi inserida em solução de TBE 10X (Tris-borato 0.9 M; EDTA 20 mM) e colocada sobre o gel de poliacrilamida. Sobre a membrana, foram colocadas duas folhas de papel absorvente e uma placa de vidro. A transferência foi efectuada por um período de 1h e 30 min, ao fim do qual a membrana foi retirada e tratada com uma solução de NaOH (0.4 N) durante 20 min e neutralizada por uma solução de SSEP 2X.

Hibridação das membranas

A membrana foi de seguida hibridada com uma sonda $(CA)_{20}$ para a detecção de microsatélites do tipo $(CA)_n$, ou com uma sonda $(CAG)_{15}$ para a detecção de CAG *repeats*, marcada em 3' com [α^{32}P]dATP. A hibridação foi efectuada a 42°C, durante 3h, em tampão fosfato de sódio a 0.13 M, a pH 7.2, NaCl 0.25 M, SDS 7% e PEG (Mr 6000) 10% [Amasino,1986; Church & Kieffer-Higgins, 1988]. Após hibridação, as membranas foram lavadas duas vezes em SSEP 2X, SDS 0.1%, à temperatura ambiente, durante 10 min.

Finalmente, as membranas foram postas em contacto com um filme Kodak X-AR, entre dois *écrans* intensificadores, a -80°C durante 24h.

Análise do minisatélite (VNTR) no gene da FAH humana

As variações individuais da sequência do ADN originam polimorfismos que podem consistir na alteração dos locais de restrição reconhecidos pelas endonucleases designando-se polimorfismos de restrição (RFLPs), ou serem constituídos por sequências de ADN repetidas, cujo número é variável de indivíduo para indivíduo, e que simultaneamente alteram o mapa de restrição de muitas enzimas, designados polimorfismos de repetição (VNTRs).

O gene da fenilalanina-hidroxilase (FAH) humana contém uma região minisatélite rica, em nucleótidos AT (70%), responsável pelo polimorfismo de restrição *Hind*III [Goltsov *et al.* 1992]. Esta região contém vários múltiplos de uma sequência de 30 pares de bases (VNTR) e localiza-se 3 Kb após o último exon do gene FAH. Este VNTR pode ser detectado por PCR, usando as sequências oligonucleotídicas 2 e 3 do Quadro 1 [Goltsov *et al.* 1992]. Este *locus* encontra-se genéticamente ligado ao *locus* SCA2, tendo sido analisado no sentido de testar a hipótese de as duas doenças poderem ser causadas por mutações diferente (alélicas) no mesmo gene.

A reacção de amplificação por PCR foi realizada com 400 ng de ADN genómico, 1 µM de cada oligonucleótido, 200 µM de cada dNTP, 1 U de *Taq* polimerase e tampão Taq (Tris HCl 10 mM pH 8.3, KCL 50mM, MgCl2 1.5 mM, gelatina 0.01%) num volume final de 20 µl.

As condições de amplificação por PCR foram ligeiramente alteradas em relação às descritas por Goltsov e colaboradores [1992]. Foi efectuada uma primeira etapa de 10 min de desnaturação, a 94°C, seguida de 30 ciclos, cada um consistindo de 30 seg de desnaturação a 94°C, 30 seg de hibridação a 51°C, e 1 min de extensão a 72°C. O último ciclo foi seguido de uma extensão final de 5 min a 72°C.

Os produtos de amplificação por PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose *Seaplaque* (2%), em tampão TAE, adicionado de BET (1 µg/ml). Após migração eletroforética, o gel foi exposto à luz UV e fotografado.

Quadro 1. Sequências dos oligonucleótidos usados na amplificação por PCR

Locus/ Gene	Oligonucleótido	Sequência nucleotídica	Temperatura de Hibridação (°C)
FAH (1)	2	GCTTGAAACTTGAAAGTTGC	51
	3	GGAAACTTAAGAATCCCATC	
D14S53 (2)	1	CAACAAGAGCGAAACTCGC	52
	2	GAAGACTCAAGATATAGCAG	
D14S55 (2)	1	AGAACTGTTACCTGGAGGC	57
	2	AGAGAAGTTAAAAGCATTGC	
D14S48 (2)	1	CATAAAAGGCTTATTGGTTTG	57
	2	CAAAACAGAGAACAGAGTAG	
D14S45 (3)	1	TCCGTGAGTGATATCTTCTC	48
	2	CAGCATTACACAGGTACCAA	
SCA1 (4,5)	Rep1	AACTGGAAATGTGGACGTAC	55
	Rep2	CAACATGGGCAGTCTGAG	
	GCT 435	CCACCACTCCATCCCAGCG	55
	GCT 214	TGCTGGGCTGGTGGGGGG	
DRPLA (6)	CTG-B37a	CACCAGTCTCAACACATCACCATC	62
	CTG-B37b	CCTCCAGTGGGTGGGGAAATGCTC	
MJD (7)	MJD52	CCAGTGACTACTTTGATTGC	60
	MJD25	GGCTGGCCTTTCACATGGAT	

Referências: (1): Goltsov *et al.*, 1992. (2): Wang & Weber, 1992. (3): Luty & Litt, 1991. (4): Orr *et al.*, 1993. (5): Chung *et al.*, 1993. (6): Li *et al.*, 1993. (7): Kawaguchi *et al.*, 1994.

Análise dos microsatélites $(CA)_n$ do cromossoma 14q

O ADN dos eucariotas contém sequências muito pequenas, repetidas, tais como $(dCdA)_n$·$(dGdT)_n$, designadas $(CA)_n$ [Misfeld *et al.* 1981]. Estes polimorfismos de repetição são altamente informativos e podem ser analisados por PCR [Weber & May, 1989], sendo excelentes marcadores no mapeamento genético.

As reacções de PCR foram realizadas utilizando os respectivos oligonucleótidos (Quadro 1), dNTPs, *Taq* polimerase e tampão Taq nas concentrações descritas na alínea anterior.

As condições de amplificação por PCR consistiram de uma desnaturação inicial a 94°C, seguida de 30 ciclos, cada um compreendendo 1 min de desnaturação a 94°C, 1 min de hibridação à temperatura respectiva para cada par de oligonucleótidos (Quadro 1) e 1 min de extensão a 72°C. Foi ainda efectuada uma extensão final de 5 min, a 72°C.

Análise de mutações causadas por repetição do trinucleótido CAG

A base molecular do processo patológico na SCA1, DRPLA, DMJ, três formas de ataxia hereditária, é a expansão de um trinucleótido $(CAG)_n$, numa região codificadora dos respectivos genes [Orr *et al.* 1993; Koide *et al.* 1994; Nagafuchi *et al.* 1994; Kawaguchi *et al.* 1994]. A análise destas três mutações foi feita por amplificação do segmento $(CAG)_n$ no gene respectivo e determinação do número *n* de unidades repetidas.

As reacções de PCR foram executadas com as sequências oligonucleotídicas respectivas (Quadro 1) [Orr *et al.* 1993; Li *et al.* 1993; Kawaguchi *et al.* 1994], dNTPs e tampão Taq nas mesmas concentrações já descritas anteriormente, num volume final de 12 µl. Foi ainda adicionada *Taq* polimerase (1U) e formamida (2%).

As condições de amplificação por PCR consistiram numa desnaturação inicial a 96°C, seguida de 30 ciclos, cada um compreendendo 1 min de desnaturação a 96°C, 1 min de hibridação à temperatura respectiva (Quadro 1) e 1 min de extensão a 72°C.

Sequenciação do ADN

A sequenciação do ADN foi executada para analisar a composição em bases de determinadas sequências de ADN (detecção de interrupções CAT nas repetições $(CAG)_n$) e para determinar o tamanho (em pares de bases) dos alelos amplificados por PCR, por comparação com sequências conhecidas do fago M13mp18. A técnica de sequenciação utilizada foi o método enzimático pelos di-desoxinucleótidos, após amplificação por PCR do fragmento de ADN a sequenciar. O segmento de ADN amplificado é separado nas suas duas cadeias constituintes e sequenciado, utilizando um oligonucleótido, interno a esse segmento, para cada uma das cadeias. Este oligonucleótido hibrida-se à sequência de ADN e vai permitir à enzima *Sequenase* a síntese da sua cadeia complementar. Esta síntese é efectuada na presença dos quatro desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), um dos quais é marcado radioactivamente. O princípio desta técnica consiste na adição de um 2', 3'di-desoxinucleótido em quantidade muito pequena. As quatro reacções são realizadas em paralelo, cada uma contendo uma das quatro bases sob a forma de di-desoxiribonucleósido trifosfato. Como a síntese do ADN se efectua por esterificação da função 3' hidroxilo, do nucleótido já incorporado pelo 5' fosfato, em posição α de um desoxiribonucleósido trifosfato, assim que um di-desoxiribonucleótido é incorporado ocorre a interrupção da síntese, uma vez que ele não possui o 3' hidroxilo livre. Como este nucleótido está presente em muito pequena quantidade, incorpora-se muito raramente e ao acaso. Assim, estatisticamente, produzir-se-ão tantos fragmentos interrompidos quanto o número de vezes que a base correspondente estiver representada. Sobre o gel é feita a leitura em bases da sequência complementar do fragmento de ADN sequenciado.

Sequenciação do $(CAG)_n$ no gene SCA1

Preparação do ADN de cadeia simples

Para proceder à sequenciação de um fragmento de ADN pelo método enzimático dos di-desoxinucleótidos é necessário que este exista em quantidade suficiente e se encontre isolado, em cadeia simples.

Reacção de amplificação por PCR

Com a finalidade de obter ADN suficiente para proceder à sequenciação do *repeat* do gene SCA1, foi realizada a amplificação por PCR com os oligonucleótidos Rep-1 e GCT-435 marcado pela biotina, dNTPs, *Taq* polimerase e tampão Taq nas concentrações enunciadas anteriormente. As condições de PCR usadas foram as descritas para a análise da mutação CAG no *locus* SCA1.

Separação dos alelos do locus SCA1 por electroforese em gel não-desnaturante de poliacrilamida

Com o objectivo de isolar o fragmento de ADN a sequenciar, foram separados os dois alelos resultantes da amplificação por PCR do ADN genómico. Foi efectuada uma electroforese em gel de poliacrilamida 15% (permite separar alelos com tamanhos muito próximos). O gel foi preparado com acrilamida (29 partes de acrilamida e uma de N,N' metileno bis-acrilamida) em tampão TBE, por adição de 200 µl de APS (persulfato de amónio) (25%) e de 60 µl de TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etilenodiamina).

A amostra migrou, em paralelo com um marcador de tamanho (*1 Kb DNA Ladder*), até completa separação das bandas. O gel foi então visualizado aos UV. As bandas foram recortadas e introduzidas em dois Eppendorfs contendo lã de vidro e tampão de Maxam (acetato de amónio 0.5 M, EDTA 1mM, a pH 8). Os blocos de acrilamida foram bem triturados com uma pipeta Pasteur, após o que foram deixados a 37°C durante a noite. No dia seguinte, a ponta dos tubos Eppendorfs foi perfurada e estes foram colocados dentro de tubos

maiores e centrifugados. O gel triturado foi lavado com 200 µl de tampão de Maxam e novamente centrifugado. Os eluentes foram separados dos possíveis fragmentos de acrilamida, por centrifugação; depois o ADN foi precipitado com acetato de sódio 3 M (40 µl) e álcool etílico a 95% (900 µl), a -80°C, durante 15 min. Após uma centrifugação de 30 min, a 15 000 rpm, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e o ADN foi colocado a secar à temperatura ambiente. O ADN foi posteriormente conservado em TE (50 µl).

Separação das cadeias de ADN - esferas metálicas revestidas com estreptavidina

O princípio da separação das cadeias de ADN, com esferas metálicas revestidas de *estreptavidina*, baseia-se no facto de esta atrair a si a cadeia de ADN sintetizada a partir do oligonucleótido marcado com biotina. A outra cadeia fica livre, em solução.

Inicialmente, as esferas metálicas (30 µl/ reacção de sequenciação) foram retiradas para um tubo Eppendorf; este foi colocado no suporte metálico, de forma a que as esferas aderissem à parede do tubo e permitissem que fosse retirado o sobrenadante. Posteriormente, as esferas foram lavadas com $LiCl_2$ 2 M (60 µl/ reacção de sequenciação). O sobrenadante foi sempre retirado com a ajuda do suporte metálico. O processo de lavagem das esferas foi repetido mais 2 vezes.

As esferas foram depois suspensas em $LiCl_2$ 2 M (20 µl/ reacção de sequenciação) e adicionadas do ADN de cadeia dupla. A mistura, contendo o ADN, foi incubada a 37°C (homogeneizada a cada 10 min). Após 30 min, o sobrenadante foi retirado pelo processo descrito anteriormente. As esferas foram em seguida lavadas com $LiCl_2$ 2 M (150 µl/ reacção de sequenciação) e isoladas do sobrenadante.

O ADN aderente às esferas metálicas foi desnaturado por adição de NaOH 0.2 M (40µl). As esferas foram colocadas em suporte normal. Ao fim de 5 min, as esferas foram suspensas, colocadas no suporte metálico e o sobrenadante (contendo a outra cadeia de ADN) foi recuperado para um segundo tubo.

O ADN aderente às esferas metálicas foi lavado (3 vezes) com TE (150 µl) e finalmente suspenso, juntamente com as esferas, em 7 µl de H_2O. A outra cadeia foi precipitada com Tris 2 M pH 7 (50µl) e etanol a 95% (330 µl), durante 20 min a -80°C. O

ADN foi recuperado por centrifugação durante 30 min, a 15 000 rpm (4°C). Finalmente, o ADN foi diluído em 7 µl de H_2O.

Sequenciação das cadeias de ADN

As reacções de sequenciação foram executadas em 7 µl de ADN de cadeia simples. O oligonucleótido Rep-1 foi utilizado para a sequenciação da cadeia CAG, enquanto que para a cadeia GCT foi usado o GCT-214.

A primeira etapa consistiu na hibridação do oligonucleótido à sequência de ADN. A 7 µl de ADN foram adicionados 2 µl de tampão (Tris HCl 200 mM, pH 7.5; $MgCl_2$ 100mM; NaCl 250 mM) e 1 µl de oligonucleótido (100 ng/µl). A hibridação decorreu por incubação a 65°C, durante 2 min, seguido de arrefecimento lento. Quando foi atingida uma temperatura inferior a 35°C, a solução foi colocada no gelo. A esta solução, que contém o oligonucleótido hibridado ao ADN, foram adicionados 1µl de DTT 0.1 M, 2 µl de solução de marcação (dGTP 1.5 µM, dCTP 1.5 µM, dTTP 1.5 µM), 1 µl de [^{35}S]dATP e 2 µl de *Sequenase* polimerase diluída (*Sequenase* polimerase 1.6 U/µl, KPO_4 2.5 mM, pH 7.5, DTT 6 mM, EDTA 0.01 mM, glicerol 6%, Tris HCl 10 mM, pH 7.5 e 0.5 mg/ml de BSA). Esta solução foi homogeneizada e colocada à temperatura ambiente durante 5-10 min. Posteriormente foram transferidos 3.5 µl desta mistura reacional para 4 tubos Eppendorf contendo: 1) 2.5 µl de mistura de interrupção ddG (dGTP 80 µM, dATP 80 µM, dCTP 80 µM, dTTP 80 µM, ddGTP 8 µM, NaCl 50 mM); 2) 2.5 µl de mistura de interrupção ddA (dGTP 80 µM, dATP 80 µM, dCTP 80 µM, dTTP 80 µM, ddATP 8 µM, NaCl 50 mM); 3) 2.5 µl de mistura de interrupção ddT (dGTP 80 µM, dATP 80 µM, dCTP 80 µM, dTTP 80 µM, ddTTP 8 µM, NaCl 50 mM); 4) 2.5 µl de mistura de interrupção ddC (dGTP 80 µM, dATP 80 µM, dCTP 80 µM, dTTP 80 µM, ddCTP 8 µM, NaCl 50 mM), previamente aquecidos a 37°C. A solução contida nos tubos foi homogeneizada e incubada por mais 5 min, a 37°C. A cada um dos tubos foi depois adicionado 1.1 µl de solução TdT (terminal transferase 1U/µl, dNTP 14 mM, Tris HCl 40 mM, pH 7.5, $MgCl_2$ 20 mM, NaCl 50 mM) e a incubação prolongada por mais 20 min a 37°C. Finalmente, foram adicionados 4 µl de solução Stop (formamide 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0.05%, xileno cianol FF 0.05%) a cada tubo. Foi usado o *kit* de

sequenciação da *United States Biochemical*. Posteriormente, as reacções de sequenciação foram analisadas por electroforese em gel de poliacrilamida (6%). A leitura, feita após exposição do gel (depois de seco) a um filme Kodak X-AR, representa a composição em bases da sequência complementar do fragmento de ADN sequenciado.

Sequenciação do ADN do fago M13mp18

A determinação do tamanho dos alelos amplificados por PCR foi executada por comparação com a sequência do fago M13mp18. Junto com o *kit* de sequenciação foi fornecido, em quantidade suficiente, ADN deste fago (cadeia simples, ADN control), não sendo por isso necessário proceder à sua amplificação nem à separação de cadeias, antes de o sequenciar. A sequenciação deste ADN foi realizada da mesma forma que a do alelo SCA1 mas, com o respectivo oligonucleótido fornecido pelo *kit*.

Análise de dados

Os programas do LINKAGE

O processo sequencial de detecção de ligação genética foi descrito por Morton, em 1955. A informação fornecida pela análise de cada família vai sendo acumulada até ao momento de ser possível decidir entre a hipótese de independência genética ($\theta=0.5$) e a hipótese alternativa ($0<\theta<0.5$). O *lod score* (Z) (logaritmo dos *odds*) é a razão entre a verosimilhança de ligação - $L(\theta)$ - de que dois *loci* estejam ligados a um dado valor de θ (entre 0 e 0.5) e a verosimilhança de não ligação - $L(0.5)$ - isto é, de que estes dois loci apresentem

segregação independente. Esta razão de verosimilhanças (*odds*) é expressa em logaritmos decimais [Ott, 1985]:

$$Z(\theta) = \log_{10} [\, L(\theta)/L(0.5) \,]$$

O *lod score* (Z) é uma função de θ, definida no intervalo (0, 0.5). A execução deste cálculo necessita do conhecimento do fenótipo e do genótipo de cada indivíduo componente da família, bem como do modo de transmissão da doença. Um *lod score* superior a 3 significa que a hipótese de ligação é 1000 vezes mais provável que a não-ligação. Quando o *lod score* é inferior a -2 a hipótese de não-ligação é 100 vezes mais provável do que a hipótese de ligação. Os limites de decisão do teste foram assim fixados a +3 e -2: se $Z(\theta) > +3$ rejeita-se a hipótese de independência e conclui-se que existe ligação a um valor θ; se $Z(\theta) < -2$, rejeita-se *linkage* a esse valor de θ; se $-2 < Z(\theta) < +3$, não é possível qualquer conclusão.

Os cálculos de *lod-scores* são longos e repetitivos, daí que tenham sido criados programas de informática que permitem efectuá-los, entre eles os programas de LINKAGE [Lathrop & Lalouel, 1984]. Os programas LINKAGE, versão 5.1, utilizados para a análise dos dados no nosso estudo, comportam, entre outros, os seguintes:

- **Makeped**, programa que processa um ficheiro de dados, contendo a informação genealógica familiar, bem como os respectivos fenótipos clínicos e genótipos;

- **Preplink**, programa que permite criar um ficheiro com os parâmetros genéticos da doença (modo de transmissão, penetrância e frequência do gene), bem como os parâmetros relativos aos marcadores em estudo (número de alelos e sua frequência relativa) - o modelo utilizado para o nosso estudo comportava um modo de transmissão autossómico dominante, com penetrância incompleta (98%), tendo sido usadas 5-20 classes de penetrância (devido à penetrância da doença depender da idade), e uma frequência do gene de 0.0007;

- **MLINK,** programa que permite realizar uma análise de ligação entre dois *loci*, com os ficheiros descritos anteriormente, analisando os *lod scores* para taxas de recombinação previamente definidas e permitindo-nos observar toda a curva de *lod scores* para esses valores de θ;

- **ILINK,** programa que realiza análises entre dois *loci (two-point)*, permitindo por iteração calcular o *lod score* máximo e a taxa de recombinação correspondente;

- **LCP** (*linkage control program*), programa que permite especificar um grande número de análises, sem modificar o ficheiro de parâmetros;

- **LRP** (*linkage report program*) programa que permite examinar as análises efectuadas e fazer relatórios;

- **CILINK**, programa que realiza análises entre vários loci (*multi-point)*, permitindo ordenar marcadores estreitamente ligados;

- **CMAP**, programa que permite posicionar um novo marcador em relação a um grupo de marcadores já mapeados;

- **LINKMAP**, programa que possibilita o mapeamento do *locus* de uma doença, em relação a um grupo de marcadores de localização conhecida e fixa, através de análises *multipoint*.

O programa HOMOG

O programa HOMOG permite, perante um resultado positivo de *linkage*, analisar se existe evidência significativa de que em parte das famílias o gene da doença se encontra em ligação com o *locus* em estudo, enquanto na outra parte se encontra ligado a um outro qualquer *locus* (não-ligado ao primeiro), ou seja, se existe heterogeneidade genética.

Este programa executa dois testes estatísticos: um teste de homogeneidade em presença de ligação (*lod score* superior a 3) e um teste de ligação em presença de heterogeneidade.

O teste de homogeneidade em presença de ligação analisa se existe evidência significativa para suportar a hipótese de em certas famílias o gene da doença poder estar ligado a um outro *locus* e não ao *locus* do marcador que exibe ligação, assumindo que entre as famílias em estudo existem dois grupos: umas com $\theta = ½$ e outras com $\theta_1 < ½$, com uma fracção α de famílias que segregam o gene ligado ($\theta = \theta_1$ numa fracção α e $\theta = ½$ numa

fracção 1 - α de famílias) e que a determinação de cada grupo é impossivel *a priori*. Se α representar a fracção das famílias ligadas e θ a sua taxa de recombinação, segundo Smith (1961) existem duas hipóteses nulas para o teste de homogeneidade - H_0: $\alpha = 0$, $\theta = ½$, e H_1: $\alpha = 1$, $\theta < ½$, sendo a hipótese alternativa H_2: $0 < \alpha < 1$, $\theta < ½$, com as correspondentes estimativas máximas de verosimilhança (MLEs) na hipótese H_2 de α_n e θ_n e na hipótese H_1 de α_1 e θ_1. Com estas estimativas o teste da razão das verosimilhanças ou *odds* da hipótese de homogeneidade, H_1, pode ser realizado, calculando:

$$X^2 = 2(\ln 10)\,[Z(\alpha_0,\theta_0) - Z(1,\theta_1)],$$

sendo $Z(\alpha,\theta)$ o somatório dos *lod scores* de todas as famílias analisadas. A hipótese nula H_0 representa ausência de ligação. Quando a hipótese H_1 (homogeneidade) é verdadeira, X^2 segue a distribuição de qui-quadrado com um grau de liberdade. Por outro lado, quando X^2 é significativo (superior a qui-quadradro) a hipótese de H_1 é rejeitada, concluindo-se assim que existe heterogeneidade genética [Ott, 1985; Terwilliger & Ott, 1994].

O teste de ligação em presença de heterogeneidade considera as hipóteses nulas de não-ligação (H_0) de homogeneidade genética em presença de ligação (H_1) e a hipótese alternativa de *linkage* e heterogeneidade; porém, este teste estatístico pode tornar-se muito complicado, razão pela qual foi apenas adoptado um critério em que a razão de verosimilhanças terá de ser superior a 2000:1 para ser declarada evidência significativa de *linkage* em algumas famílias. Este critério baseia-se no critério habituall de ligação de 1000:1 *odds*, permitindo um segundo parâmetro livre (α) no numerador da razão de verosimilhanças [Terwilliger & Ott, 1994].

RESULTADOS

1- HETEROGENEIDADE GENÉTICA DAS ATAXIAS DOMINANTES E MAPEAMENTO CROMOSSÓMICO DA DOENÇA DE MACHADO-JOSEPH

Resumo

A doença de Machado-Joseph é uma degenerescência espinocerebelosa autossómica dominante encontrada predominantemente nos Açores mas, também nas comunidades luso-americanas dos Estados-Unidos e Canadá, no Japão, França, Espanha, Índia e muitas outras populações. A SCA2 é também uma doença degenererativa espinocerebelosa dominante descrita inicialmente na Índia, mas com prevalência elevada entre a população Cubana (região de Holguin), que apresenta uma grande sobreposição clínica com a DMJ, o que dificulta por vezes a distinção entre estas duas formas de ataxia, tendo mesmo sido colocada a hipótese de serem formas alélicas.

O mapeamento da SCA2 (ataxia de Holguin) no cromossoma 12q proporcionou assim uma região candidata para os estudos de ligação na DMJ. Os resultados obtidos em 10 famílias com SCA2 mostraram que o *locus* da fenilalanina hidroxilase humana (FAH) se encontrava a 4 cM da SCA2, na altura o marcador genético mais próximo. Nós excluímos ligação genética a uma região de 15 cM de cada lado do *locus* da FAH em 16 famílias com DMJ, demonstrando que estes dois tipos de ataxia eram geneticamente diferentes e apresentavam diferentes localizações cromossómicas (não alélicas). Posteriormente, o gene da DMJ foi localizado em 14q24.3-q32 em cinco famílias japonesas. Nós estudámos essa região com os polimorfismos de repetição do ADN (STRPs) D14S53, D14S55, D14S48 e D14S45, em 16 famílias portuguesas e obtivemos *lod scores* positivos significativos, indicando que o *locus* DMJ nesta população se encontrava no cromossoma 14q.

Em conclusão, os nossos estudos de mapeamento cromossómico da DMJ permitiram, primeiro, mostrar que esta não é uma forma alélica da SCA2 e, por fim, confirmar a localização desta doença no cromossoma 14q e demonstrar a presença de heterogeneidade genética entre as formas dominantes de ataxia.

ARTIGO I - MACHADO-JOSEPH DISEASE IS GENETICALLY DIFFERENT FROM HOLGUIN DOMINANT ATAXIA (SCA2).

I. Silveira, A. Manaia, J. Melki, C. Magariño, A. Lunkes, A. Hernandez, S. Gispert, P. Burlet, J. Michel-Rozet, P. Coutinho, L. Loureiro, J. Guimarães, G. Auburger, A. Munnich & J. Sequeiros.

Genomics **1993**; 17: 556-559.

GENOMICS 17, 556–559 (1993)

Machado–Joseph Disease Is Genetically Different from Holguin Dominant Ataxia (SCA2)

ISABEL SILVEIRA,*,† ALEXANDRA MANAIA,*,† JUDITH MELKI,† CARLOS MAGARIÑO,‡,§ ASTRID LUNKES,‡ ANA HERNANDEZ,‡,¶ SUZANA GISPERT,‡,§ PHILIPPE BURLET,† JEAN-MICHEL ROZET,† PAULA COUTINHO,*,‖ J. E. LEAL LOUREIRO,⊥ JOÃO GUIMARÃES,** GEORG AUBURGER,‡ ARNOLD MUNNICH,† AND JORGE SEQUEIROS*,†,†,[1]

*UnIGENe, IBMC, and ††Lab. Genética Médica, ICBAS, Univ. Porto; ‖Hosp. St. António, Porto, Portugal; ⊥Hosp. Vila Real and **Hosp. Egas Moniz, Lisbon, Portugal; †INSERM U-12, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France; ‡Department of Neurology, University Hospital, Düsseldorf, Germany; and §Centro Nacional Genética Médica and ¶Inst. Hematologia W. Soler, Havana, Cuba

Received January 15, 1993; revised April 6, 1993

Machado–Joseph disease (MJD) and Holguin ataxia (SCA2) are autosomal dominant multisystem degenerations with spinocerebellar involvement that are predominant among people of Portuguese–Azorean and of Cuban descent, respectively. Their clinical distinction may at times be difficult to make in individual patients, due to significant phenotypic overlapping (similar overall age-of-onset and duration of cerebellar ataxia, eye movement, and, often, other common problems. The recent mapping of SCA2 to chromosome 12q provided another candidate region for linkage studies of MJD. Original data on 10 families with Holguin ataxia show that the locus for phenylalanine hydroxylase (PAH) on chromosome 12q is linked to SCA2 at 4 cM and is thus far its closest marker. The exclusion of linkage 15 cM on each side of PAH in 16 families with MJD shows that these two forms of dominant ataxia are genetically distinct and at different chromosomal locations (nonallelic). © 1993 Academic Press, Inc.

INTRODUCTION

Machado–Joseph disease (MJD) is a dominantly inherited multisystem degeneration of the CNS, characterized by the adulthood onset (mean, 37.4 years; SD, 14.1) of cerebellar ataxia, progressive external ophthalmoplegia, and a variable degree of pyramidal, extrapyramidal, or lower motor neuron signs, often with facial contraction fasciculations and eyelid retraction (Coutinho and Andrade, 1978; Fowler, 1984; Barbeau *et al.*, 1984). It is generally assumed that this phenotypic variability is due to the modification of a single major gene (Sequeiros and Coutinho, 1981). MJD is found mostly in the Portuguese islands of the Azores, as well as in Portuguese Americans from New England and California, with a prevalence of 1:4000 (Sequeiros and Coutinho, 1993), although it may be seen in many other populations (Sequeiros, 1992).

The MJD locus has already been shown to be different from those of Huntington disease (Forse *et al.*, 1989) and spinocerebellar atrophy 1 (SCA1) (Carson *et al.*, 1992), a classical form of olivopontocerebellar atrophy (OPCA) on chromosome 6p (Jackson *et al.*, 1977), but its chromosomal location is still unknown. Another form of OPCA (SCA2) (Orozco *et al.*, 1990) predominant in the Holguin province of Cuba (among families of Spanish origin), has now been found to be linked to PLA2 and D12S58 on chromosome 12q (Kwok *et al.*, 1985). The locus for the human phenylalanine hydroxylase (PAH), on chromosome 12q, is the closest known marker to SCA2 (Auburger *et al.*, pers. comm., Düsseldorf, 1992). We have therefore studied several PAH polymorphisms to test the hypothesis that MJD and Holguin ataxia (SCA2) are genetically distinct and nonallelic, as has been suggested (Carson *et al.*, 1992).

MATERIALS AND METHODS

Subjects. In two field trips (1990 and 1992), a total of 346 persons (22 kindreds from the Azores and 4 from mainland Portugal) were examined and sampled for linkage studies of MJD. DNA was isolated from peripheral blood leukocytes. Due to their size and structure, 17 of these (MJD) families were selected, together with 10 large kindreds (comprising 120 individuals) with dominant ataxia (SCA2), from the Holguin province of Cuba.

Detection of MspI, PvuII, and BglII RFLPs at the PAH locus. Electrophoresis (agarose gel) and Southern blotting were performed (at Généthon) after the first field trip. The PAH probe was then used to detect (1) a two-allele polymorphism after digestion with *Msp*I and (2) two two-allele polymorphisms with *Pvu*II (Woo *et al.*, 1983; Kwok *et al.*, 1985) in the old blots (eight MJD families informative). In the Cuban SCA2 families, RFLPs (*Msp*I, *Pvu*II, and *Bgl*II) at the PAH locus were detected by PCR as reported (Dworniczak *et al.*, 1991a,b; Wedemeyer *et al.*, 1991).

Detection of a VNTR at the PAH Locus. A *Hin*dIII RFLP in the PAH gene (caused by the presence of an AT-rich minisatellite region) determines a six-allele system VNTR that can be recognized by PCR

[1] To whom correspondence should be addressed at Lab. Genética Médica, ICBAS, Lg. Abel Salazar 2, 4000 Porto, Portugal. Telephone/Fax: 351-2-31.75.97.

0888-7543/93 $5.00
Copyright © 1993 by Academic Press, Inc.
All rights of reproduction in any form reserved.

TABLE 1

Linkage Relationships (Lod Scores) between SCA2 and PAH

Polymorphism or haplotype	θ								Z_{max}	(θ)
	0.00	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10	0.15	0.20		
*Msp*I/*Pvu*II/*Bgl*II	1.55	1.73	1.90	1.98	1.99	1.95	1.72	1.39	2.00	(0.07)
VNTR	4.11	5.85	6.23	6.33	6.18	5.99	5.36	4.47	6.41	(0.05)
*Bgl*II/VNTR	8.25	10.97	11.01	10.80	10.46	10.05	8.83	7.44	11.04	(0.03)

(Goltsov *et al.*, 1992). This was studied in all 17 MJD families (16 informative) and the 10 SCA2 kindreds. Using the primer sequence described, PCR was carried out under slightly modified conditions in a total volume of 20 μl, with 400 ng genomic DNA, 1 μM of each primer, 200 μM dGTP, dCTP, dTTP, and dATP, and 1 unit of *Taq* polymerase. Samples were processed through 30 cycles, each consisting of 30 s denaturation at 94°C, 30 s annealing at 51°C, and 1 min elongation at 72°C. PCR products were analyzed on a 2% Seaplaque gel. Gels were exposed to UV light and then photographed.

Haplotypes and multipoint analyses. There was evidence for strong linkage disequilibrium between SCA2 and the PAH polymorphisms. Haplotypes were thus constructed and their frequency calculated in founders, taken as representative of that Cuban population. Haplotypes in the MJD families were not helpful, however, as few individuals had been typed for all four PAH polymorphisms. Alternatively, a "multipoint" analysis was performed with all polymorphisms, with $\theta = 0$ for each "dummy" interval.

Linkage analyses. Genetic linkage analyses were performed with the programs of LINKAGE, version 5.10 (Lathrop and Lalouel, 1984). For the MJD families, the cumulative distribution of age-of-onset (377 patients; onset range, 1–73 years) (Sequeiros, 1992) was used to draw 20 liability (penetrance) classes; a high-age penetrance of 98% and a frequency of 0.0007 (Sequeiros, 1992) were used for the disease gene; in the absence of specific population data, the published allele frequencies of the PAH polymorphisms were used, as well as those estimated in founders. In the SCA2 families, a disease frequency of 0.001 and the penetrance classes were used as described previously (Auburger *et al.*, 1990).

RESULTS

Linkage of SCA2 to PAH

The results from the linkage studies in the Cuban families are shown in Table 1. The estimated recombination fraction between the SCA2 and the PAH loci was $\theta = 0.03$ ($Z_{max} = 11.040$), corresponding to a map distance of $x_{HAL} = 0.031$ or $x_{KOS} = 0.030$ (according to the Haldane or the Kosambi mapping functions), with a 95% support interval of [0.01, 0.10].

Exclusion of Linkage between MJD and PAH

Linkage relationships between MJD and PAH are summarized in Table 2. The lod scores for the VNTR alone enabled us to exclude linkage of MJD to PAH at $\theta \leq 0.122$ (up to $x_{HAL} = 0.140$ or $x_{KOS} = 0.125$ from PAH). The other PAH polymorphisms (lod scores shown only for the total over families) confirmed this exclusion but, when combined, added little information: exclusion at $\theta \leq 0.127$ ($x_{HAL} = 0.147$ or $x_{KOS} = 0.130$).

Tests of Heterogeneity

The lack of informativeness alone, however, seems to account for the weakly positive lod scores (with very flat curves) with the *Pvu*II markers in the MJD families (Table 2), as shown with the MTEST (implementation, in the HOMOG package, of the Morton test of heterogeneity): $\chi^2_7 = 0.46$ ($P = 0.9996$) for *Pvu*II polymorphisms only, and $\chi^2_{15} = 5.30$ ($P = 0.9893$) with all PAH polymorphisms together. On the other hand, when all 26 (Cuban and Portuguese) families were combined, $\chi^2_{25} = 30.12$ ($P = 0.2199$), and when the two sets of families were compared, evidence for heterogeneity between the Portuguese and Cuban families was highly significant: $\chi^2_1 = 12.43$ ($P = 0.0004$).

DISCUSSION

It has been our opinion that SCA2 and MJD can be clinically differentiated (Sequeiros and Coutinho, 1993): Cuban patients often have marked cerebellar tremor, no dystonia, and less pyramidal and peripheral signs; lid retraction and limitation of the upward gaze are less frequent; and their eye movements are particularly slow. These differences, however, are slight and inconsistent, leaving room for many clinical similarities that can make the distinction uncertain in individual patients. Due to this phenotypic overlapping, the distinction between MJD and the OPCAs as clinically separate entities has not been generally accepted (Harding, 1981). The finding that SCA2 was linked to D12S58 and PLA2 on chromosome 12q (Gispert *et al.*, 1993) led to the study of that region to exclude the possibilities that SCA2 and MJD were the result either of phenotypic variability of the same gene in different populations or of different alleles at the same locus.

Through the study of several polymorphisms at the PAH locus, a marker closer to SCA2 than those previously studied, we were able to demonstrate the absence of linkage to the chromosome 12q region containing SCA2 in our kindreds with MJD. We were thus able to show that MJD and SCA2 are indeed different genetic entities. This step will help to refine the diagnosis and management of families with dominant ataxia, particularly those without Cuban or Azorean ancestry. It also helps to clarify the classification of the dominant ataxias, which has begun to reflect genetic as well as clinical differences (R. D. Currier, pers. comm., Havana, 1992).

TABLE 2

Linkage Relationships (Lod Scores) between MJD and PAH

	θ									$Z \leq -2$
	0.000	0.001	0.005	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40	at $\theta \leq$
*Msp*I	−4.69	−3.29	−2.55	−2.20	−1.17	−0.64	−0.18	−0.02	0.02	0.014
*Pvu*II[a]	0.41	0.41	0.40	0.39	0.33	0.26	0.15	0.08	0.03	—
*Pvu*II[b]	0.08	0.08	0.07	0.07	0.06	0.05	0.03	0.01	0.01	—
VNTR	−35.61	−25.02	−18.31	−14.83	−6.26	−2.84	−0.28	0.38	0.30	0.122
	*Msp*I + *Pvu*II[a] + VNTR combined									
Pedigree										
1	−2.52	−1.01	−0.33	−0.04	0.56	0.71	0.62	0.39	0.16	
3	0.10	0.10	0.11	0.11	0.12	0.12	0.09	0.03	−0.01	
4	0.21	0.21	0.21	0.21	0.17	0.14	0.07	0.03	0.01	
8	−8.25	−5.34	−4.05	−3.36	−1.43	−0.55	0.12	0.26	0.18	
14	−2.64	−1.97	−1.35	−1.05	−0.33	−0.05	0.13	0.13	0.06	
16	−2.17	−1.56	−0.97	−0.69	−0.09	0.10	0.19	0.16	0.09	
17	−6.02	−5.57	−4.63	−3.89	−1.94	−1.13	−0.43	−0.13	−0.02	
21	−2.83	−2.26	−1.67	−1.39	−0.72	−0.44	−0.19	−0.08	−0.02	
25	−3.18	−2.06	−1.40	−1.11	−0.49	−0.27	−0.11	−0.05	−0.01	
26	−3.98	−2.47	−1.77	−1.46	−0.72	−0.39	−0.12	−0.02	0.01	
33	−0.45	−0.45	−0.44	−0.44	−0.37	−0.29	−0.15	−0.06	−0.01	
34	−0.05	−0.05	−0.05	−0.05	−0.04	−0.03	−0.02	−0.01	−0.00	
35	−0.30	−0.29	−0.29	−0.28	−0.22	−0.17	−0.09	−0.04	−0.01	
36	−3.90	−2.29	−1.60	−1.31	−0.64	−0.37	−0.15	−0.05	−0.01	
41	−0.07	−0.07	−0.07	−0.07	−0.06	−0.05	−0.03	−0.02	−0.00	
44	−3.29	−2.32	−1.67	−1.37	−0.70	−0.43	−0.19	−0.08	−0.02	
Total	−39.33	−27.41	−19.97	−16.20	−6.89	−3.11	−0.25	0.48	0.38	0.127

[a, b] Two different PAH polymorphisms generated with *Pvu*II.

Genetic heterogeneity of dominant ataxia, increasingly being found, can now be better compared with clinical heterogeneity.

MJD is thus genetically distinct from SCA1 (chromosome 6p) and SCA2 (chromosome 12q). Other forms of classic OPCA, unlinked to chromosomes 6p and 12q, will certainly also prove to be different from MJD. Linkage studies between MJD and other genetic markers are still being pursued to find its chromosomal location.

ACKNOWLEDGMENTS

The studies in MJD families were supported in part by a grant from the Association Française contre les Myopathies (AFM) and the EC program STRIDE (JNICT); I.S. is the recipient of a scholarship from JNICT (programme CIÊNCIA). We thank the Cuban Ministry of Health, the Deutsche Heredo Ataxie Gesellschaft, the Deutsche Forschungsgemeinschaft, and the Alexander von Humboldt Gesellschaft for support and funding of the studies in the Holguin families.

Note added in proof. While this paper was in press the MJD locus was assigned to chromosome 14 in five Japanese families by Takiyama *et al.* (*Nature Genet.* **4:** 300–304, 1993). In a collaborative study begun with these authors we were able to confirm this localization in 16 Portuguese kindreds (Sequeiros *et al.*, *Genomics*, in press).

REFERENCES

Auburger, G., Orozco, G., Ferreira, R., Gispert, S., Paradoa, M., Estrada, M., Garcia, M., Farral, M., Williamson, R., Chamberlain, S., and Heredero, L. (1990). Autosomal dominant ataxia: Genetic evidence for locus heterogeneity from a Cuban founder effect population. *Am. J. Hum. Genet.* **46:** 1163–1177.

Barbeau, A., Roy, M., Cunha, L., Vicente, A. N., Rosenberg, R. N., Nyhan, W. L., MacLeod, P. M., Chazot, G., Langston, L. B., Dawson, D. M., and Coutinho, P. (1984). The natural history of Machado–Joseph disease: An analysis of 138 personally examined cases. *Can. J. Neurol. Sci.* **11:** 510–525.

Carson, W. J., Radvany, J., Farrer, L. A., Vincent, D., Rosenberg, R. N., MacLeod, P. M., and Rouleau, G. A. (1992). The Machado–Joseph disease locus is different from the spinocerebellar ataxia locus (SCA1). *Genomics* **13:** 852–855.

Coutinho, P., and Andrade, C. (1978). Autosomal dominant system degeneration in Portuguese families of the Azores Islands: A new genetic disorder involving cerebellar, pyramidal, extrapyramidal and spinal cord motor functions. *Neurology* **28:** 703–709.

Dworniczak, B., Wedemeyer, N., Eigel, A., and Horst, J. (1991a). PCR detection of the PvuII (Ea) RFLP at the human phenylalanine hydroxylase (PAH) locus. *Nucleic Acids Res.* **19:** 1958.

Dworniczak, B., Wedemeyer, N., and Horst, J. (1991b). PCR detection of the BglII RFLP at the human phenylalanine-hydroxylase (PAH) locus. *Nucleic Acids Res.* **19:** 1958.

Forse, R. A., MacLeod, P. M., Holden, J. J. A., and White, B. N. (1989). DNA marker studies show that Machado–Joseph disease is not an allele of the Huntington disease locus. *J. Neurogenet.* **5:** 155–158.

Fowler, H. L. (1984). Machado–Joseph–Azorean disease: A ten-year study. *Arch. Neurol.* **41:** 921–925.

Gispert, S., Twells, R., Orozco, G., Brice, A., Weber, J., Heredero, L., Scheufler, K., Riley, B., Allotey, R., Nothers, C., Hillermann, R., Lunkes, A., Khati, C., Stevanin, G., Hernandez, A., Magarino, C., Klockgether, T., Durr, A., Chneiweiss, H., Enczmann, J., Farrall, M., Beckmann, J., Mullan, M., Wernet, P., Agid, Y., Freund, H.-J.,

Williamson, R., Auburger, G., and Chamberlain, S. (1993). Chromosomal assignment of the second (Cuban) locus for autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA2) to human chromosome 12q23–24.1. *Nature Genet.*, in press.

Goltsov, A. A., Eisensmith, R. C., Konecki, D. S., Lichter-Konecki, U., and Woo, S. L. C. (1992). Associations between mutations and a VNTR in the human phenylalanine hydroxylase gene. *Am. J. Hum. Genet.* **51:** 627–636.

Harding, A. E. (1981). Genetic aspects of autosomal dominant late onset cerebellar ataxia. *J. Med. Genet.* **18:** 436–441.

Jackson, J. F., Currier, R. D., Terasaki, P. I., and Morton, N. E. (1977). Spinocerebellar ataxia and HLA linkage: Risk prediction by HLA typing. *N. Engl. J. Med.* **296:** 1138–1141.

Kwok, S. C. M., Ledley, F. D., DiLella, A. G., Robson, K. J. H., and Woo, S. L. C. (1985). Nucleotide sequence of a full-length complimentary DNA clone and amino-acid sequence of human phenylalanine hydroxylase. *Biochemistry* **24:** 556–561.

Lathrop, G. M., and Lalouel, J. M. (1984). Easy calculations of lod scores and genetic risks on small computers. *Am. J. Hum. Genet.* **36:** 460–465.

Orozco, G., Nodarse, A., Cordovés, R., and Auburger, G. (1990). Autosomal dominant cerebellar ataxia: Clinical analysis of 263 patients from a homogeneous population in Holguín, Cuba. *Neurology* **40:** 1369–1375.

Sequeiros, J. (1992). Machado–Joseph disease: Epidemiology, genetics and genetic epidemiology. *In* "Handbook of Cerebellar Diseases" (R. Lechtenberg, Ed.), pp. 345–351, Dekker, New York.

Sequeiros, J., and Coutinho, P. (1981). Genetic aspects of Machado–Joseph disease. *Broteria Genet.* **77:** 137–147.

Sequeiros, J., and Coutinho, P. (1993). Epidemiology and clinical aspects of Machado–Joseph disease. *In* "Hereditary Ataxias" (A. Harding, T. Deufel, and S. Chamberlain, Eds.), "Advances in Neurology," Vol. 61, pp. 139–153, Raven Press, New York.

Wedemeyer, N., Dworniczak, B., and Horst, J. (1991). PCR detection of the MspI (Aa) RFLP at the human phenylalanine-hydroxylase (PAH) locus. *Nucleic Acids Res.* **19:** 1959.

Woo, S. L. C., Lidsky, A. S., Güttler, F., Chandra, T., and Robson, K. J. H. (1983). Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria. *Nature* **306:** 151–155.

ARTIGO II - GENETIC LINKAGE STUDIES OF MACHADO-JOSEPH DISEASE WITH CROMOSOME 14 STRPS IN 16 PORTUGUESE AZOREAN KINDREDS

J. Sequeiros, **I. Silveira**, P. Maciel, P. Coutinho, A. Manaia, C. Gaspar, P. Burlet, L. Loureiro, J. Guimarães, H. Tanaka, Y. Takiyama, H. Sakamoto, M. Nishizawa, Y. Nomura, M. Segawa, S. Tsuji, J. Melki & A. Munnich.

Genomics **1994**; 21: 645-648.

SHORT COMMUNICATION

Genetic Linkage Studies of Machado–Joseph Disease with Chromosome 14q STRPs in 16 Portuguese-Azorean Kindreds

JORGE SEQUEIROS,*,†,[1] ISABEL SILVEIRA,*,‡ PATRÍCIA MACIEL,*,‡ PAULA COUTINHO,*,§ ALEXANDRA MANAIA,*,‡ CLÁUDIA GASPAR,*,‡ PHILIPPE BURLET,‡ LEAL LOUREIRO,¶ JOÃO GUIMARÃES,‖ HAJIME TANAKA,** YOSHIHISA TAKIYAMA,†† HIROSUKE SAKAMOTO,†† MASATOYO NISHIZAWA,†† YOSHIKO NOMURA,‡‡ MASAYA SEGAWA,‡‡ SHOJI TSUJI,** JUDITH MELKI,‡ AND ARNOLD MUNNICH‡

*UnIGENe, IBMC, and †Lab. Genética Médica, ICBAS, Univ. Porto; §Hosp. St. António, Porto; ¶Hosp. Vila Real; and ‖Hosp. Egas Moniz, Lisbon, Portugal; ‡INSERM U-12, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France; and **Department of Neurology, Brain Research Institute, University of Niigata; ††Department of Neurology, Jichi Medical School, Toshigi; and ‡‡Segawa Neurology Clinic Child., Tokyo, Japan

Received June 10, 1993; revised March 22, 1994

Machado–Joseph disease (MJD) is a dominant multisystem degeneration found mostly among Azoreans and characterized by the adulthood onset of cerebellar, ocular, pyramidal, extrapyramidal, and/or peripheral signs. MJD has been recorded in many other populations, particularly in the United States and Japan. Using the microsatellite DNA polymorphisms (STRPs) D14S53, D14S55, D14S48, and D14S45, we found significantly positive lod scores in 16 Portuguese kindreds, suggesting that the MJD locus is linked to chromosome 14q in this population. Differences in age-at-onset and many untyped individuals seem to explain the lower lod scores. Using HOMOG, no evidence was found for heterogeneity with the five Japanese families in whom linkage was reported.

© 1994 Academic Press, Inc.

Machado–Joseph disease (MJD) is a dominantly inherited multisystem degeneration of the CNS that affects mostly Azoreans (1:4000 affected) (11). Most of its present world distribution could result from the spread of an original Portuguese mutant. The mid-Atlantic islands of the Azores, colonized after 1439, operated as essential base for the sea explorations that followed. In particular, the Portuguese arrived in Japan in 1543 and kept trading posts in Kyushu for almost 100 years. Recently, linkage to chromosome 14 was found in Japan (13). We have thus sought to confirm that linkage in our large and clinically homogeneous set of Portuguese kindreds.

The relevant portion of the 16 pedigrees studied included 435 persons, 166 of whom were "affected" and 14 "unknown." Blood samples were drawn and used for DNA extraction, following standard procedures (6). Primers for D14S53, D14S55, D14S48, and D14S45 were obtained using an oligonucleotide synthesizer (Applied Biosystems 381A) and the published sequences (5, 14). PCR analyses were performed with a Perkin–Elmer Cetus gene amplifier as described (15). DNAs from Japanese kindreds were provided by the Niigata group and used to compare allele sizes.

Linkage analyses were performed with the programs of LINKAGE Version 5.10 (3) on a 486/66 PC. For the MJD locus, we used previously estimated parameters (12) and an autosomal dominant model with 5-20 liability classes to correct for age-dependent penetrance and greater liability for MJD homozygotes (10). The number of liability classes did not significantly alter the results. For multipoint lod and location scores (LINKMAP), the marker alleles were recoded to a maximum of 4, using the strategies recommended (8). We also reduced 100-fold the liability for each class, to perform "affecteds-only" analyses. For each marker, allele frequencies were estimated from a pool of spouses (60 chromosomes), in the absence of larger data from our population.

The programs of HOMOG (8) Version 3.33 were used to test for heterogeneity in 14 Portuguese and 5 Japanese families informative for D14S48. The MTEST was used to compare the two groups and when making each family one group (8).

A total of 346 persons, belonging to 26 kindreds, were examined by the same team and sampled for linkage analysis. According to the clinical criteria (4), 106 were affected and 19 were coded as unknown because, even though still at risk and asymptomatic, they presented at least two of the following signs: hyperreflexia, clonus, Babinski sign, nystagmus, or lid retraction. A set of the 16 largest families (data reviewed but not shown) was selected for the study of 14q markers.

[1] To whom correspondence should be addressed at Lab. Genética Médica, ICBAS, Univ. Porto, Lg. Abel Salazar 2, 4000 Porto, Portugal. Telephone: +351-2-31.75.97 (direct) or −31.03.59 (general ICBAS). Fax: +351-2-31.75.97 (direct) or −200.19.18 (general ICBAS).

GENOMICS 21, 645–648 (1994)
0888-7543/94 $6.00
Copyright © 1994 by Academic Press, Inc.
All rights of reproduction in any form reserved.

TABLE 1

Linkage Relationships between MJD and Chromosome 14q STRPs

Locus	Lod scores at θ values of							Z_{max} (θ)
	0.00	0.01	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	
	All individuals, 5*–10 equifrequent alleles, 5 liability classes							
D14S53	−24.97	−8.18	−2.22	0.06	1.35	1.18	0.58	1.39 (0.226)
D14S55*	−4.75	−2.23	−0.15	0.63	0.86	0.55	0.19	0.89 (0.171)
D14S48	−5.98	0.59	3.23	3.80	3.24	2.02	0.81	3.81 (0.110)
D14S45	−22.13	−6.59	−0.66	1.33	1.97	1.23	0.30	2.01 (0.177)
	Affecteds only, 5*–10 equifrequent alleles, 5 liability classes							
D14S53	−7.61	−2.53	1.28	2.39	2.38	1.55	0.65	2.58 (0.144)
D14S55*	1.67	1.97	2.23	2.14	1.49	0.76	0.24	2.23 (0.059)
D14S48	1.61	3.26	4.57	4.66	3.62	2.15	0.83	4.72 (0.079)
D14S45	−10.52	−4.58	−0.28	1.26	1.69	1.00	0.22	1.75 (0.169)
	Affecteds only, 5*–10 allele frequencies estimated, 5 liability classes							
D14S53	−8.78	−3.90	0.02	1.41	1.83	1.30	0.58	1.87 (0.175)
D14S55*	−4.36	−3.26	−1.55	−0.60	0.08	0.18	0.11	0.18 (0.285)
D14S48	−3.02	−1.27	0.46	1.10	1.14	0.71	0.26	1.23 (0.147)
D14S45	−13.83	−7.82	−2.92	−0.90	0.28	0.22	−0.05	0.28 (0.200)
	Affecteds only, 5*–10 allele frequencies estimated, 20 liability classes							
D14S53	−9.04	−4.01	−0.01	1.40	1.84	1.31	0.58	1.86 (0.176)
D14S55*	−4.48	−3.37	−1.62	−0.64	0.06	0.17	0.10	0.17 (0.289)
D14S48	−3.13	−1.35	0.45	1.10	1.14	0.71	0.26	1.23 (0.147)
D14S45	−14.10	−7.92	−2.95	−0.91	0.28	0.22	−0.05	0.28 (0.200)

Some pairwise analyses are shown in Table 1. Lod scores were generally higher with D14S48, the closest marker. Table 2 shows the lod scores with D14S48 by family, for 20 liability classes, estimated allele frequencies, and affecteds only. In multipoint analysis, Z_{max} = 3.19 was obtained in the interval between D14S48 and D14S45 (reviewed but not shown), although the odds could not exclude the other locations.

The use of HOMOG showed no evidence for heterogeneity (χ^2_1 = 0.62, P = 0.43, L ratio = 1.36). With the MTEST, χ^2_{18} = 18.28 (P = 0.44) when each family was a group and χ^2_1 = 5.33 (P = 0.02) when the Japanese were compared with the Portuguese families, but χ^2_1 = 4.03 (P = 0.04) when the Japanese pedigree 1 (with the highest lods) was compared alone with all other Portuguese and Japanese families.

TABLE 2

Lod Scores for Informative Families with D14S48

Pedigree	θ							Z_{max} (θ)
	0.0	0.01	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	
1	−0.36	−0.32	0.10	0.35	0.40	0.28	0.13	
8	0.64	0.62	0.55	0.46	0.31	0.17	0.06	
10	−0.01	−0.01	−0.01	−0.01	−0.00	−0.00	−0.00	
14	−1.46	−0.71	−0.17	−0.01	0.06	0.05	0.02	
16	0.72	0.71	0.63	0.53	0.34	0.17	0.04	
17	0.55	0.54	0.48	0.40	0.25	0.13	0.04	
21	−0.12	−0.11	−0.09	−0.07	−0.04	−0.02	−0.00	
25	−0.23	−0.22	−0.15	−0.1	−0.04	−0.01	−0.00	
26	−1.40	−1.17	−0.75	−0.50	−0.25	−0.12	−0.04	
33	0.18	0.18	0.15	0.13	0.08	0.03	0.01	
35	0.17	0.17	0.14	0.12	0.07	0.03	0.01	
36	−2.03	−1.21	−0.60	−0.35	−0.13	−0.04	−0.01	
44	0.21	0.20	0.17	0.14	0.09	0.04	0.01	
Total	−3.13	−1.35	0.45	1.10	1.14	0.71	0.26	1.23 (0.147)

Based on both historical (11) and clinical (16) findings, we had reason to believe that the MJD locus, recently found to map to chromosome 14q in five Japanese kindreds (13), could map to the same location in our Portuguese-Azorean families. Familial amyloid neuropathy (type 1, Portuguese) has a similar world distribution and is seen in the same areas of Japan as MJD, suggesting that both diseases may have been introduced from Portugal; one Japanese family seems to express both diseases (1). Our present results offer preliminary confirmation of linkage to 14q, suggesting that the mutation in Portuguese kindreds is indeed at the same locus as in the Japanese.

The lod scores obtained, however, were surprisingly low. Some differences in age-at-onset and subphenotype distributions may partly explain the lower lods: earlier, more severely dystonic presentations (type 1) are more frequent among the Japanese, whereas types 2 and 3 (posing the greatest diagnostic problems in the milder or incipient cases) are present in over 80% of the Portuguese patients (often, older individuals were difficult to diagnose as affected and were coded as unknown).

The distribution of age-at-onset is much wider and has a significantly later mean in the Portuguese (39.1 $\pm$ 0.8) than in the Japanese (26.5 $\pm$ 3.3 years) (11). Penetrance was complete by age 46 in the five Japanese families, while some obligate gene carriers are still unaffected at ages 73–90 among the Portuguese. To account for this, we constructed 20 liability classes, using a maximum penetrance of 0.98, and performed affected-only analyses. Higher lods, as well as estimates of θ closer to those obtained in the Japanese, were achieved with affecteds only. The difficulty of finding live affected parents and affected offspring, due to age-dependent penetrance and the duration of the disease, and the many individuals not sampled (often deceased or emigrated) were further drawbacks in our kindreds. Untyped individuals (insufficient DNA, family inconsistencies, occasional difficulties reading the autoradiographs with these highly polymorphic markers) further increased the number of "missings."

As expected, the frequency of the MJD gene did not have a significant impact on the results. The absence of marker allele frequencies for this population, on the other hand, presented a serious problem. The lower lods found after the marker allele frequencies were corrected reflect the fact that the marker allele cosegregating with the disease gene was often a common one in the population. Two-point lod scores are very much dependent on marker allele frequencies, when many individuals in large pedigrees are untyped (2, 7, 9). Despite our large number of pedigrees, that effect was still considerable. We need now to resample and type as many missing individuals as possible, particularly those at key positions in the pedigrees, to determine the population frequencies of the marker alleles more accurately and to study other markers of the region to analyze haplotypes and perform multipoint linkage analyses. In addition, recombinants should be clinically reevaluated and possible misdiagnoses of affecteds reviewed; changes in disease phenotype over time (particularly in older individuals at risk) should be assessed.

Different haplotypes segregating in different branches of some pedigrees tended to lower the lod scores. Several obligate (affected) recombinants in pedigrees producing negative lods may be explained by recombination events in the interval between D14S48 and D14S45 (θ = 0.19). The study of markers in this interval and of a flanking marker telomeric to D14S45 will be helpful in more accurately determining the location of the MJD locus.

The localization of the MJD locus in Japanese and Portuguese kindreds confirms the claim that, despite large phenotypic overlapping, MJD can be clinically differentiated from other dominant ataxias, even in different populations. Whether MJD itself will prove to be genetically heterogeneous and whether the analysis of haplotypes will corroborate a common origin of the mutation in Portuguese and Japanese, as well as in other affected populations, remain to be determined.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all those who donated blood samples; Drs. Rui Graça, Vasco Rodrigues, João Gouveia, Nurse Luísa Moreira, and all other local health professionals; the Direcção Regional da Saúde (Azores) and Dr. Margarida Ferreira for help with our trips to the Azores; and Jean-Michel Rozet for his technical help. We also thank Jean Louis Guénet, Marie Claude Babron, Françoise Clerget-Darpoux, Chantal Mérette, Joe Terwilliger, and Jurg Ott for many helpful discussions. These studies were supported in part by a grant and a scholarship (A.M.) from the Association Française contre les Myopathies (AFM), by a grant (program STRIDE) and a scholarship (program CIÊNCIA) (I.S.) from JNICT, and by the Coopération Scientifique et Technique INIC-INSERM (Ambassade de France au Portugal).

REFERENCES

1. Coutinho, P., and Sequeiros, J. (1989). Familial amyloidotic polyneuropathy and Machado–Joseph disease: Two rare autosomal dominant neurologic diseases in the same family—The "Iiyama type" of FAP? (Abstr.) *Am. J. Hum. Genet.* **45:** A43.
2. Knowles, J., Vieland, V. J., and Gilliam, T. C. (1992). Perils of gene mapping with microsatellite markers (Letter). *Am. J. Hum. Genet.* **51:** 905–909.
3. Lathrop, G. M., and Lalouel, J. M. (1984). Easy calculations of lod scores and genetic risks on small computers. *Am. J. Hum. Genet.* **36:** 460–465.
4. Lima, L., and Coutinho, P. (1980). Clinical criteria for diagnosis of Machado–Joseph disease: Report of a non-Azorean Portuguese family. *Neurology* **30:** 319–322.
5. Luty, J. A., and Litt, M. (1991). Dinucleotide repeat polymorphism at the D14S45 locus. *Nucleic Acids Res.* **19:** 4308.
6. Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1989). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
7. Nechiporuk, A., Fain, P., Kort, E., Nee, L. E., Frommelt, E., Polinsky, R. J., and Korenberg, J. R. (1993). Linkage of familial Alzheimer disease to chromosome 14 in two large early-onset pedigrees: Effects of marker allele frequencies on lod scores. *Am. J. Med. Genet. (Neuropsychiat. Genet.)* **48:** 63–68.

ICBAS

8. Ott, J. (1991). "Analysis of Human Genetic Linkage" (revised ed.), Johns Hopkins Univ. Press, Baltimore.

9. Ott, J. (1992). Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. *Am. J. Hum. Genet.* **51:** 283–290.

10. Sequeiros, J. (1993). Machado–Joseph disease: Epidemiology, genetics and genetic epidemiology. *In* "Handbook of Cerebellar Diseases" (R. Lechtenberg, Ed.), pp. 345–351, Dekker, New York.

11. Sequeiros, J., and Coutinho, P. (1993). Epidemiology and clinical aspects of Machado–Joseph disease. *In* "Hereditary Ataxias," (A. Harding, T. Deufel, and S. Chamberlain, Eds.), Advances in Neurology, Vol. 61, pp. 139–153, Raven Press, New York.

12. Silveira, I., Manaia, A., Melki, J., Magariño, C., Lunkes, A., Hernandez, A., Gispert, S., Burlet, P., Rozet, J. M., Coutinho, P., Loureiro, J. M. L., Guimarães, J., Auburger, G., Munnich, A., and Sequeiros, J. (1993). Machado–Joseph disease is genetically different from Holguin's dominant ataxia (SCA2). *Genomics* **17:** 556–559.

13. Takiyama, Y., Nishizawa, M., Tanaka, H., Kawashima, S., Sakamoto, H., Karube, Y., Shimazaki, H., Soutome, M., Endo, K., Ohta, S., Kagawa, Y., Kanazawa, I., Mizuno, Y., Yoshida, M., Yuasa, T., Horikawa, Y., Oyanagi, K., Nagai, H., Kondo, T., Inuzuka, T., Onodera, O., and Tsuji, S. (1993). The gene for Machado–Joseph disease is mapped to human chromosome 14q. *Nature Genet.* **4:** 300–304.

14. Wang, Z., and Weber, J. L. (1992). Continuous linkage map of chromosome 14 short tandem repeat polymorphisms. *Genomics* **13:** 532–536.

15. Weber, J. L., and May, P. E. (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* **44:** 388–396.

16. Yuasa, T., Miyatake, T., Ohama, E., Coutinho, P., Sequeiros, J., Leite, I., and Andrade, C. (1990). A comparative study of Machado–Joseph disease in Portuguese and Japanese. *Shinkei Kenkyu no Shinpo* **34:** 102–112.

2- FREQUÊNCIA DAS MUTAÇÕES CAUSADORAS DE ATAXIA DOMINANTE

Resumo

As ataxias espinocerebelosas (SCAs) são um grupo muito heterogéneo de doenças degenerativas do sistema nervoso, apresentando manifestações clínicas variáveis com grande sobreposição fenotípica entre si, podendo ser herdadas de modo autossómico dominante, autossómico recessivo ou aparecer como casos isolados. Estão mapeados oito genes responsáveis por ataxias autossómicas dominantes: SCA1, SCA2, DMJ/SCA3, SCA4, SCA5, SCA6, SCA7 e DRPLA.

Estudámos um grupo de 92 doentes não-aparentados com ataxia de várias origens geográficas e étnicas e com diferentes modos de transmissão, e um grupo de 48 famílias portuguesas com ataxia. Determinámos a frequência das mutações SCA1, DRPLA e DMJ, que resultam da expansão de um trinucleótido CAG repetitivo nos genes respectivos e podiam assim ser detectadas directamente sem depender de grandes famílias informativas para análise de ligação. Os resultados obtidos no primeiro estudo revelaram que a mutação SCA1 se encontrava presente em 3% dos doentes do grupo total e em 10% do subgrupo constituído pelos doentes sem origem portuguesa com SCA dominante; a mutação DRPLA foi encontrada apenas num doente japonês, previamente diagnosticado com esta doença; a mutação DMJ representava 41% de todo o grupo (que incluía 38 famílias com hereditariedade dominante e com ascendência portuguesa) e 17% das formas dominantes sem origem portuguesa. Um caso "isolado" brasileiro apresentou a mutação DMJ. Os resultados do segundo estudo mostraram que as mutações SCA1 e DRPLA não estavam presentes neste grupo de famílias portuguesas, enquanto a mutação DMJ foi encontrada em 74% das ataxias dominantes portuguesas. Foram ainda identificados um total de 60 casos de ataxia sem expansão em qualquer dos três genes estudados, incluindo 34 formas dominantes, entre as quais 12 famílias portuguesas (2 açorianas e 10 continentais) e duas brasileiras de origem portuguesa.

Estes resultados permitem concluir que a mutação DMJ se apresenta como a causa mais comum de SCA, por vezes, causada pela mutação SCA1 e só muito raramente causada pela DRPLA. Contudo, nas famílias estudadas, 37% das SCA dominantes não são causadas por expansões nestes três genes.

ARTIGO III - FREQUENCY OF SPINOCEREBELLAR ATAXIA TYPE 1, DENTATORUBROPALLIDOLUYSIAN ATROPHY, AND MACHADO-JOSEPH DISEASE MUTATIONS IN A LARGE GROUP OF SPINOCEREBELLAR ATAXIA PATIENTS.

I. Silveira, I. Lopes-Cendes, S. Kish, P. Maciel, C. Gaspar, P. Coutinho, M.I. Botez, H. Teive, W. Arruda, C.E. Steiner, W. Pinto-Júnior, J.A. Maciel, S. Jain, G. Sack, E. Andermann, L. Sudarsky, R.N. Rosenberg, P. MacLeod, D. Chitayat, R. Babul, J. Sequeiros & G.A. Rouleau.

Neurology 1996; 46:214-218.

Frequency of spinocerebellar ataxia type 1, dentatorubropallidoluysian atrophy, and Machado-Joseph disease mutations in a large group of spinocerebellar ataxia patients

I. Silveira, PharmD; I. Lopes-Cendes, MD; S. Kish, PhD; P. Maciel, BSc; C. Gaspar, BSc; P. Coutinho, MD, PhD; M.I. Botez, MD, PhD; H. Teive, MD; W. Arruda, MD; C.E. Steiner, MD; W. Pinto-Junior, MD, PhD; J.A. Maciel, MD, PhD; S. Jain, MD; G. Sack, MD, PhD; E. Andermann, MD, PhD; L. Sudarsky, MD; R. Rosenberg, MD; P. MacLeod, MD; D. Chitayat, MD; R. Babul MSc; J. Sequeiros, MD, PhD; and G.A. Rouleau, MD, PhD

Article abstract—The spinocerebellar ataxias (SCAs) are a heterogeneous group of neurodegenerative disorders varying in both clinical manifestations and mode of inheritance. Six different genes causing autosomal dominant SCA are mapped: *SCA1*, *SCA2*, Machado-Joseph disease *(MJD)/SCA3*, *SCA4*, *SCA5*, and dentatorubropallidoluysian atrophy (DRPLA). Expansions of an unstable trinucleotide CAG repeat cause three of these disorders: SCA type 1 (SCA1), MJD, and DRPLA. We determined the frequency of the *SCA1*, DRPLA, and *MJD* mutations in a large group of unrelated SCA patients with various patterns of inheritance and different ethnic backgrounds. We studied 92 unrelated SCA patients. The frequency of the *SCA1* mutation was 3% in the overall patient group and 10% in the non-Portuguese dominantly inherited SCA subgroup. We found the DRPLA mutation in only one Japanese patient, who was previously diagnosed with this disease. We identified the *MJD* mutation in 41% of the overall patient group, which included 38 autosomal dominant kindreds of Portuguese origin; the frequency of the MJD mutation among the non-Portuguese dominantly inherited cases was 17%. These results suggest that SCA may be occasionally caused by the *SCA1* mutation and rarely caused by the DRPLA mutation and that, to date, the *MJD* mutation seems to be the most common cause of dominantly inherited SCA. Finally, our results suggest that recessively inherited cases of SCA are not caused by the known trinucleotide repeat expansions.

NEUROLOGY 1996;46:214–218

The spinocerebellar ataxias (SCAs) are a heterogeneous group of neurodegenerative disorders characterized by symptoms and signs of degeneration in the cerebellum, spinal cord, and brainstem. Genetically, these disorders can be divided into autosomal recessive, autosomal dominant, and isolated cases. For the autosomal recessive SCAs, two loci are localized—on chromosome 9q[1] and on chromosome 8q.[2] To date, six different loci causing autosomal dominant SCA have been mapped: the *SCA1* locus on chromosome 6p,[3-5] the *SCA2* locus on chromosome 12q,[6-7] the Machado-Joseph disease *(MJD)/SCA3* lo-

See also pages 4 and 208

From the Centre for Research in Neurosciences (I. Silveira, P. Maciel, C. Gaspar, and Drs. Lopes-Cendes and Rouleau), McGill University and The Montréal General Hospital Research Institute, Montréal, Québec, Canada; UnIGENe, IBMC, Universidade do Porto (I. Silveira, P. Maciel, C. Gaspar, and Drs. Coutinho and Sequeiros), Porto, Portugal; Neurogenetics Unit (Drs. Lopes-Cendes and Andermann), Montréal Neurological Institute and Hospital, McGill University, Montréal, Québec, Canada; Human Neurochemical Pathology Laboratory (Dr. Kish), Clarke Institute of Psychiatry, Toronto, Ontario, Canada; Departamento de Neurologia (Dr. Coutinho), Hospital de Santo António, Porto, Portugal; Department of Neurology (Dr. Botez), Hôtel Dieu de Montréal, Montréal, Québec, Canada; Sociedade Paranaense de Ciências Neurológicas (Drs. Teive and Arruda), Curitiba, PR, Brasil; Departamento de Genética Médica (Drs. Steiner and Pinto-Junior) and Departamento de Neurologia (Dr. Maciel), FCM-UNICAMP, Campinas, SP, Brasil; Department of Neurology (Dr. Jain), Neurosciences Centre, All India Institute of Medical Sciences, New Delhi, India; Center for Medical Genetics (Dr. Sack), The Johns Hopkins Hospital, Baltimore, MD; Neurology Division (Dr. Sudarsky), Brigham and Women's Hospital, West Roxbury, MA; Department of Neurology (Dr. Rosenberg), University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX; Section of Genetics (Dr. MacLeod), Department of Laboratory Medicine, Victoria General Hospital, Victoria, British Columbia, Canada; Division of Clinical Genetics (Dr. Chitayat, and R. Babul), The Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario, Canada; and Laboratório de Genética Médica (Dr. Sequeiros), ICBAS, Universidade do Porto, Porto, Portugal.

Supported by the joint program FRSQ-ACAF (Fonds de la Recherche en Santé du Québec and Association Canadienne de l'Ataxie de Friedreich), the NIH (grant NS 31687), and the Network of Centres of Excellence (Canadian Genetic Disease Network). I.S., P.M., and C.G. are recipients of a scholarship from JNICT (Junta Nacional de Investigação Cientifica e Tecnológica), Portugal; I.L.-C. is supported by a fellowship from the Savoy Foundation for Epilepsy; S.K. is supported by NINDS #20634; and G.A.R. is supported by the Medical Research Council of Canada and Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

Received March 7, 1995. Accepted in final form May 20, 1995.

Address correspondence and reprint requests to Dr. G.A. Rouleau, Room L7-224, Montreal General Hospital, 1650 Cedar Ave, Montreal, Quebec, Canada, H3G 1A4.

 Copyright © 1996 by the American Academy of Neurology

cus on chromosome 14q,[8-10] the *SCA4* locus on chromosome 16q,[11] the *SCA5* locus on the centromeric region of chromosome 11,[12] and the dentatorubropallidoluysian atrophy (DRPLA) locus on chromosome 12p.[13] The mutations causing three of these disorders, SCA type 1 *(SCA1)*,[14] *MJD*,[15] and *DRPLA*,[13] have already been identified. In all three instances, affected individuals have an expansion of a trinucleotide CAG repeat in the coding region of the disease genes.

The clinical classification of the autosomal dominant SCAs has been difficult due to variation and overlapping in clinical signs, age at onset, and duration of the disease both among and within families. The variable pathology has also made classification based on postmortem findings difficult. A rational classification scheme must also be based on genetics.

The identification of three mutations responsible for SCA allows us to recognize families that segregate *SCA1*, DRPLA, or *MJ*D, thus providing us with means for accurate classification and diagnosis of these disorders. We studied a group of 92 unrelated SCA patients showing various patterns of inheritance and different ethnic backgrounds to determine the frequency of the *SCA1*, DRPLA, and *MJD* mutations.

Methods. *Patients.* We have identified a total of 92 unrelated individuals from various ethnic backgrounds affected with different types of SCA. (For a table containing ethnic, clinical, and genetic findings in the 92 unrelated SCA patients studied, see Note at the end of article.) Progressive ataxia was the main clinical finding in all of these patients. Associated features, such as abnormal eye movements and pyramidal signs, were present in the majority of the patients. A few cases with dementia and extrapyramidal signs were also found. The ages at onset were extremely variable, ranging from 3 to 60 years. Patients were recruited in 13 different clinics: one in India, one in Portugal, two in Brazil, and nine in North America. Individuals with progressive ataxia, aged 20 and over, who presented to the clinical centers from January 1991 through December 1994 were included in this study. In the majority of the recruiting centers, patients were seen in genetic clinics; only four centers were also recruiting isolated cases. This may have biased our sample toward familial cases. Family history and pedigrees of families from the same geographic area, particularly Portuguese, were exhaustively studied and no relationship among them was detected. However, the possibility that these families may have been related many generations ago cannot be definitively excluded.

Sixty-seven cases showed clear autosomal dominant inheritance. Of these, 43 cases had a clinical diagnosis of MJD based on previously described criteria.[16] Nineteen of the MJD families were previously reported: 15 Azorean,[17] one Portuguese,[16] two Indian,[18-19] and one Sicilian-American.[20] In seven of the autosomal dominant cases autopsy was performed, with the following diagnoses: olivopontocerebellar atrophy (OPCA) (four cases), spinopontine atrophy (two cases), and spinopontocerebellar atrophy (one case). Of these, two patients were part of two families previously reported.[21,22] Neuroimaging studies were performed in six autosomal dominant patients and suggested the following: four cases of OPCA, one case of cerebellar atrophy, and one case of predominantly cerebellar atrophy with discrete brainstem involvement. One Japanese autosomal dominant patient had a clinical diagnosis of DRPLA.

Twelve patients with suspected autosomal recessive forms were included in the study. All had at least one affected sibling. Both parents were clinically normal in all cases; however, in some instances parents had died at a young age. Imaging studies performed in seven autosomal recessive patients were consistent with OPCA. Two patients with suspected autosomal recessive inheritance had a late-onset and slowly progressive form of Friedreich ataxia-like disease diagnosed as Acadian subtype.[23] One patient with suspected autosomal recessive inheritance was clinically diagnosed with spastic ataxia of the Charlevoix-Saguenay type.[24]

Thirteen isolated cases were also studied. In all of these patients there was no family history for SCA. However, in a few cases, parents were deceased at a young age. OPCA was the diagnosis in six patients, three of these by autopsy and the remaining three by imaging studies. In one patient imaging only showed evidence of cerebellar atrophy.

DNA isolation. Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes, from lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus,[25] or from autopsy material following standard techniques.[26]

PCR analysis. The following published primer sequences were used for detection of the mutations: Rep1 and Rep2 for the *SCA1* mutation,[14] MJD52 and MJD25 for the MJD mutation,[15] and B37 CAG repeat primer sequences for the DRPLA mutation.[27] Polymerase chain reaction (PCR) was carried out in a total volume of 12.5 μl, with 100 ng of genomic DNA; 1 μM of each primer; 200 μM of dGTP, dCTP, dTTP, and dATP; 1 U of *Taq* polymerase, and 2% formamide. Samples were processed through 30 to 32 cycles of denaturation, annealing, and elongation at different temperatures, as described previously.[13-15] PCR products were separated in 6% polyacrylamide gels. Gels were transferred into Hybond N+ nylon membranes and hybridized with an α-^{32}P 3′–end-labeled $(CAG)_{15}$ probe. Allele sizes were determined by comparing migration relative to an M13 sequencing ladder. Patients previously identified with the SCA1, DRPLA, and MJD mutations were used as positive controls in all analyses.

As previously reported for the SCA1 locus, normal alleles have a size range of 16 to 36 CAG repeats, while affected alleles have 42 to 81 CAG repeats.[28] The normal DRPLA allele size ranges from 8 to 25 CAGs, while affected DRPLA alleles have 54 to 68 CAG repeats.[13] In normal individuals the MJD gene contains 12 to 37 CAG repeats, while in affected patients the repeat number ranges from 66 to 84.[29]

Results. Of the 92 individuals analyzed, three had an expanded CAG repeat at the *SCA1* gene (figure 1). An expanded CAG repeat at the DRPLA gene was found in only one patient, a Japanese subject who was previously diagnosed with DRPLA by clinical criteria. In 38 individuals an expanded CAG repeat at the *MJD* gene was found (figure 2).

The overall frequency of the *SCA1* mutation was 3%. When considering only the non-Portuguese dominantly inherited cases, the frequency was 10%. The overall fre-

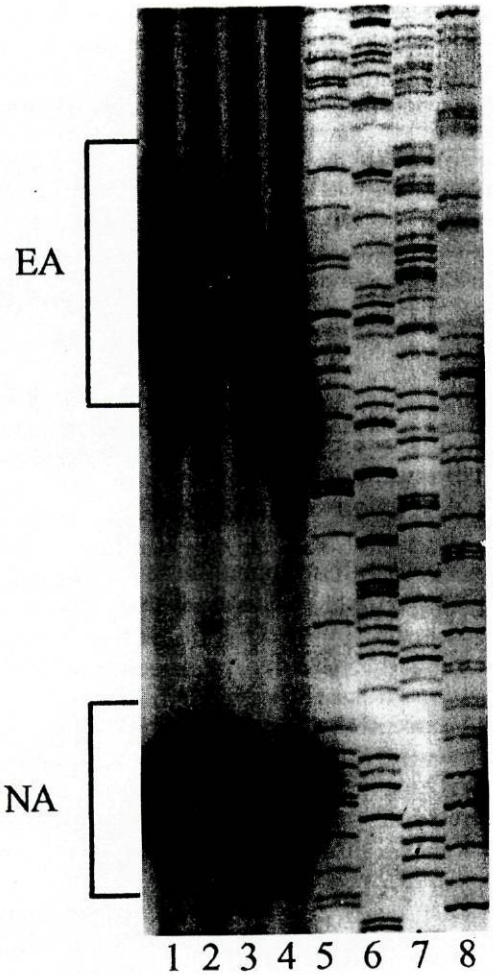


Figure 1. Analysis of polymerase chain reaction (PCR) products containing the expanded CAG repeat at the SCA1 *locus. Genomic DNA was amplified using primers Rep1 and Rep2. PCR products were analyzed on 6% polyacrylamide gels. Lane 1 = positive control; lane 2 = case 53; lane 3 = case 54; lane 4 = case 65; lanes 5 through 8 = M13 sequencing ladder. EA = expanded allele; NA = normal allele.*

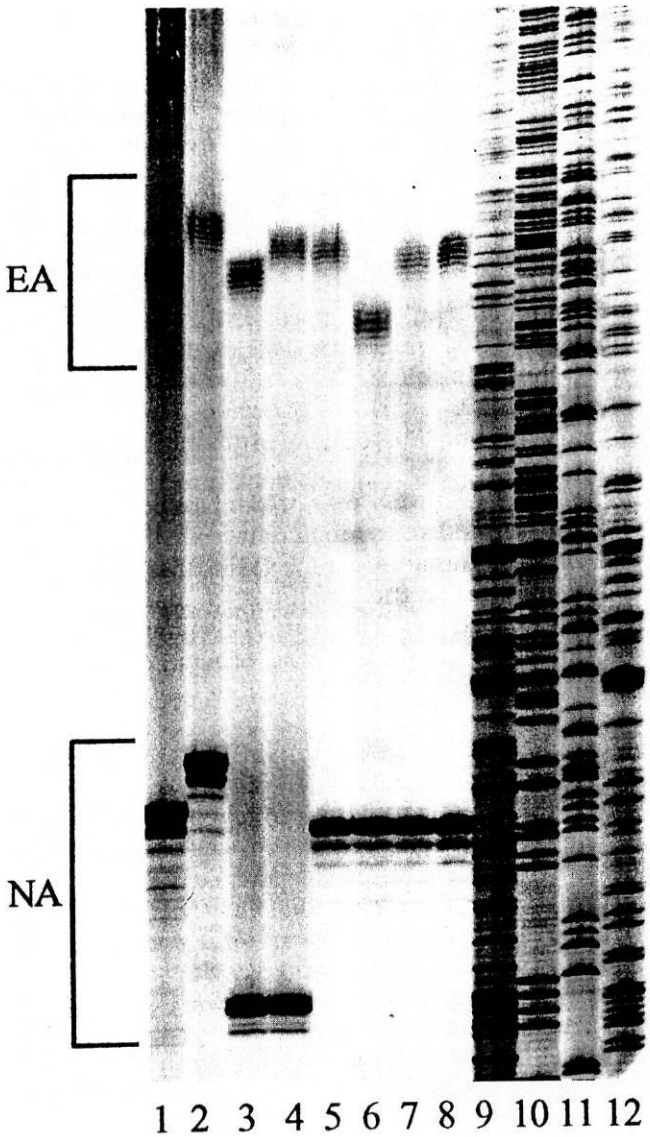


Figure 2. Analysis of polymerase chain reaction (PCR) products containing the expanded CAG repeat at the MJD *locus obtained by amplification of genomic DNA using primers MJD52 and MJD25. PCR products were analyzed on 6% polyacrylamide gels. Lane = 1 positive control; lane 2 = case 34; lane 3 = case 29; lane 4 = case 32; lane 5 = case 30; lane 6 = case 31; lane 7 = case 28; lane 8 = case 26; lanes 9 through 12 = M13 sequencing ladder. EA = expanded allele; NA = normal allele.*

quency of the DRPLA mutation was 1%; the frequency was 3% among the non-Portuguese dominantly inherited subgroup. The *MJD* mutation was found in 41% of our SCA group and in 17% of the non-Portuguese dominantly inherited SCA subgroup. The table shows the frequency of the three mutations in each of the subgroups studied.

Normal alleles were always smaller than 36 CAG repeat units at the *SCA1* gene, 25 CAG units at the DRPLA gene, and 37 CAG repeat units at the *MJD* gene. No alleles of intermediate size were found (37 to 41 repeats for the *SCA1* gene, 26 to 53 repeats for the DRPLA gene, and 38 to 65 repeats for the *MJD* gene). Abnormal alleles showed 50 to 57 CAG repeat units in the *SCA1* gene, 68 CAG repeat units in the DRPLA gene, and 66 to 81 CAG repeat units in the *MJD* gene. No expanded CAG repeats were found in the suspected autosomal recessive or in the isolated cases at the *SCA1* or DRPLA loci. An expanded CAG repeat at the *MJD* locus was found in one patient with no family history of the disease.

Discussion. The cloning of the *SCA1*, DRPLA, and *MJD* genes and the identification of the causative mutations in each of these disorders allows for the definitive diagnosis of these three types of SCA by testing individual subjects. We wanted to obtain an estimate of the relative frequency of these types by studying a large group of SCA patients, but because our sampling was biased in favor of Portuguese kindreds, we used the ethnic origins of the families to define more representative subgroups. This study is the first report of screening for the presence of the *SCA1*, DRPLA, and *MJD* mutations in a large group of SCA patients with various patterns of inheritance and different ethnic backgrounds. We found that the

Table Frequency of the SCA1, DRPLA, and MJD mutations in each of the SCA subgroups studied

Mutation type	Overall (n = 92)	Autosomal dominant subgroup (n = 67)	Autosomal dominant non-Portuguese subgroup (n = 29)	Autosomal dominant Portuguese-origin subgroup (n = 38).
SCA1	3 (3%)	3 (5%)	3 (10%)	0
DRPLA	1 (1%)	1 (2%)	1 (3%)	0
MJD	38 (41%)	37 (55%)	5 (17%)	32 (84%)

most common cause of non-Portuguese autosomal dominant SCA was mutation at the *MJD* locus (17%); this was followed by mutation at the *SCA1* locus (10%). However, the genes responsible for the majority of non-Portuguese autosomal dominant SCAs (70%) remain to be identified.

The *SCA1* mutation was present in populations of different ethnic backgrounds, such as Dutch-American, Chinese-Canadian, and Italo-Brazilian. These results may favor the existence of many ancestral *SCA1* chromosomes. The overall frequency of *SCA1* was similar to that reported by others.[28]

Smith[30] described DRPLA in an isolated patient with late-onset ataxia on the basis of neuropathologic findings. Naito and Oyanagi[31] later reported the DRPLA phenotype in several Japanese families. Although this condition is found mainly in Japanese families, Warner et al[32] reported the DRPLA mutation in two European families and Burke et al[33] identified the same mutation in one African-American family. We found an expanded CAG repeat at the DRPLA locus in only one patient, a Japanese subject, suggesting that DRPLA is indeed very rare in non-Japanese populations.

Four different groups—Nakano et al, Woods and Schaumburg, Rosenberg et al, and Coutinho and Andrade—described MJD in patients originating from the Portuguese Azores islands,[17,34-36] and other groups subsequently reported MJD in one mainland Portuguese kindred,[16] as well as in African-American,[37] Japanese,[38-40] Indian,[18,19,41] Italian,[20,42] French,[43] Spanish,[44] Australian,[45] and Chinese[46] families. Our results confirm that MJD is common in SCA patients of Portuguese origin (84%), but MJD was not responsible for all cases of SCA in this population (16% were non-MJD). Furthermore, we showed that the *MJD* mutation was present in populations of non-Portuguese ethnic origin, such as African-American, Chinese, and white North American. Of particular interest is our finding of the *MJD* mutation in two patients with the pathologic diagnosis of spinopontine atrophy, confirming previous impressions that most of those cases were indeed MJD cases.[47] The *MJD* mutation was also found in one patient with the pathologic diagnosis of spinopontocerebellar atrophy. Three patients with the *MJD* mutation had a diagnosis of spinocerebellar ataxia and one of spastic ataxia, indicating that the clinical diagnosis of MJD may sometimes be difficult in non-Portuguese families, or even in some patients of Portuguese extraction, with or without family history. Finally, the several instances in which no *MJD* mutation was found in patients diagnosed clinically as having MJD underscore the difficulties involved in the clinical classification of the SCAs. However, it is important to emphasize that with better delineation of clinical phenotype in different families, a reasonable prediction of the underlying genotype may become possible.

Stevanin et al[48] mapped another spinocerebellar ataxia locus *(SCA3)* to the same 3-cM region of chromosome 14q as the *MJD* gene. More recently, Higgins et al[49] established that affected individuals in SCA3 families also showed amplification of the CAG repeat on chromosome 14q.

Our results suggest that recessively inherited cases of SCA were not caused by any of these three types of CAG repeat expansions. In one instance a patient with no family history of the disease had an expanded CAG repeat at the *MJD* locus. Although this could indicate the presence of a de novo mutation, we believe that in this case the absence of family history might be attributable to the young age at death of the patient's presumably unaffected father.

In conclusion, the *SCA1* mutation was responsible for some of our autosomal dominant SCA cases (5% of all autosomal dominant patients and 10% of the non-Portuguese autosomal dominant cases), while the DRPLA mutation was not present among non-Japanese patients. The *MJD* mutation seemed to be the most frequent cause of autosomal dominant SCA in our Portuguese patients, among whom it accounted for 84% of cases, and in our non-Portuguese patients, among whom it accounted for 17% of cases.

Acknowledgments

We wish to thank Dr. H.Y. Zoghbi for providing a positive control for the SCA1 mutation, Dr. J. Stewart for referring patients, and the patients and their families for their cooperation.

Note. Readers can obtain 4 pages of supplementary material from the National Auxiliary Publications Service, c/o Microfiche Publications, PO Box 3513, Grand Central Station, New York, NY 10163-3513. Request document no. 05228. Remit with your order (not under separate cover), in US funds only, $7.75 for photocopies or $4.00 for microfiche. Outside the United States and Canada, add postage of $4.50 for the first 20 pages and $1.00 for each 10 pages of material thereafter, or $1.75 for the first microfiche and $.50 for each fiche thereafter. *There is a $15.00 invoicing charge on all orders filled before payment.*

References

1. Chamberlain S, Shaw J, Rowland LP, et al. Mapping of the mutation causing Friedreich's ataxia to human chromosome 9. Nature 1988;21:248–250.
2. Ben Hamida C, Doerflinger N, Belal S, et al. Localization of

Friedreich ataxia phenotype with selective vitamin E deficiency to chromosome 8q by homozygosity mapping. Nat Genet 1993;5:195–200.
3. Yákura H, Wakisawa A, Fujimoto S, Itakura K. Hereditary ataxia and HL-A genotypes. New Engl J Med 1974;291:154–155.
4. Jackson JF, Currier RD, Terasaki PI, Mortan NE. Spinocerebellar ataxia and HLA linkage. New Engl J Med 1977;296:1138–1141.
5. Zoghbi HY, Pollack MS, Lyons LA, Ferrell RE, Daiger SP, Beaudet AL. Spinocerebellar ataxia: variable age of onset and linkage to human leukocyte antigen in a large kindred. Ann Neurol 1988;23:580–584.
6. Gispert S, Twells R, Orozco G, et al. Chromosomal assignment of the second locus for autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA2) to chromosome 12q23-24.1. Nat Genet 1993;4:295–299.
7. Lopes-Cendes I, Andermann E, Attig E, et al. Confirmation of the SCA-2 locus as an alternative locus for dominantly inherited spinocerebellar ataxias and refinement of the candidate region. Am J Hum Genet 1994;54:774–781.
8. Takiyama Y, Nishizawa M, Tanaka H, et al. The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q. Nat Genet 1993;4:300–304.
9. Sequeiros J, Silveira I, Maciel P, et al. Genetic linkage studies of Machado-Joseph disease with chromosome 14q STRPs in 16 Portuguese-Azorean kindreds. Genomics 1994;21:645–648.
10. Twist EC, Casaubon LK, Ruttledge MH, et al. Machado-Joseph disease maps to the same region of chromosome 14 as the spinocerebellar ataxia type 3 locus. Am J Med Genet 1995;32:25–31.
11. Gardner K, Alderson K, Galster B, Kaplan C, Leppert M, Ptacek L. Autosomal dominant spinocerebellar ataxia: clinical description of a distinct hereditary ataxia and genetic localization to chromosome 16 (SCA4) in a Utah kindred [abstract]. Neurology 1994;44(suppl 2):A361.
12. Ranum LPW, Schut LJ, Lundgren JK, Orr HT, Livingston DM. Spinocerebellar ataxia type 5 in a family descended from the grandparents of President Lincoln maps to chromosome 11. Nat Genet 1994;8:280–284.
13. Koide R, Ikeuchi T, Onodera O, et al. Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA). Nat Genet 1994;6:9–13.
14. Orr HT, Chung M, Banfi S, et al. Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. Nat Genet 1993;4:221–226.
15. Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, et al. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. Nat Genet 1994;8:221–228.
16. Lima L, Coutinho P. Clinical criteria for diagnosis of Machado-Joseph disease: report of a non-Azorean Portuguese family. Neurology 1980;30:319–322.
17. Coutinho P, Andrade C. Autosomal dominant system degeneration in Portuguese families of the Azores Islands. Neurology 1978;28:703–709.
18. Jain S, Maheshwari MC. Joseph disease in India: report of two families. J Neurogenet 1986;3:61–73.
19. Jain S, Maheshwari MC. Eight families with Joseph's disease in India. Neurology 1990;40:128–131.
20. Suite NDA, Sequeiros J, McKhann GM. Machado-Joseph disease in a Sicilian-American family. J Neurogenet 1986;3:177–182.
21. Ranum LPW, Rich SS, Nance MA, et al. Autosomal dominant spinocerebellar ataxia: locus heterogeneity in a Nebraska kindred. Neurology 1992;42:344–347.
22. Bebin EM, Bebin J, Currier RD, Smith EE, Perry TI. Morphometric studies in dominant olivopontocerebellar atrophy: comparison of cell losses with amino acid decreases. Arch Neurol 1990;47:188–192.
23. Barbeau A. Distribution of ataxias in Quebec. In: Sobin I, ed. Spinocerebellar degenerations. Tokyo: University of Tokyo Press, 1980:121–141.
24. Bouchard JP, Barbeau A, Bouchard R, Bouchard RW. Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. Can J Neurol Sci 1978;5:61–69.
25. Anderson MA, Gusella JF. Use of cyclosporin A in establishing Epstein-Barr virus-transformed human lymphoblastoid cell lines. In Vitro 1984;20:856–858.
26. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
27. Li SH, McInnis MG, Margolis RL, Antonarakis S9, 8oss CA. Novel triplet repeat containing genes in human brain: cloning, expression, and length polymorphisms. Genomics 1993;16:572–579.
28. Ranum LPW, Chung M, Banfi S, et al. Molecular and clinical correlations in spinocerebellar ataxia type 1: evidence for familial effects on the age at onset. Am J Hum Genet 1994;55:244–252.
29. Maciel P, Gaspar C, DeStefano A, et al. Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. Am J Hum Genet 1995;57:54–61.
30. Smith JK. Dentatorubropallidoluysian atrophy. In: Vinken PJ, Bruyn GW, eds. Handbook of clinical neurology. Amsterdam: North Holland, 1975;21:519–534.
31. Naito H, Oyanagi S. Familial myoclonus epilepsy and choreoathetosis: hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy. Neurology 1982;32:798–807.
32. Warner TT, Williams L, Harding AE. DRPLA in Europe [letter]. Nat Genet 1994;6:225.
33. Burke JR, Wingfield MS, Lewis KE, et al. The Haw River syndrome: dentatorubropallidoluysian atrophy (DRPLA) in an African-American family. Nat Genet 1994;7:521–524.
34. Nakano KK, Dawson DM, Spence A. Machado disease: a hereditary ataxia in Portuguese immigrants to Massachusetts. Neurology 1972;22:49–55.
35. Woods BT, Schaumburg HH. Nigro-spino-dentatal degeneration with nuclear ophthalmoplegia: a unique and partially treatable clinicopathological entity. J Neurol Sci 1972;17:149–166.
36. Rosenberg RN, Nyhan WL, Bay C. Autosomal dominant striatonigral degeneration: a clinical, pathological, and biochemical study of a new genetic disorder. Trans Am Neurol Assoc 1976;101:1–3.
37. Healton EB, Brust JCM, Kerr DL, Resor S, Penn A. Familial cerebellar ataxia, dystonia, and abnormal eye movements in a non-Portuguese family. Neurology 1979;29:559–560.
38. Sakai T, Ohta M, Ishino H. Joseph disease in a non-Portuguese family. Neurology 1983;33:74–80.
39. Yuasa T, Ohama E, Harayama H, Yamada M, Miyatake T. Joseph's disease: clinical and pathological studies in a Japanese family. Ann Neurol 1986;19:152–157.
40. Takiyama Y, Tanaka Y, Mizuno Y, Yoshida M. Clinical studies on a large family of probable Machado-Joseph disease in Japan. Rinsho Shinkeigaku 1987;27:569–578.
41. Bharucha NE, Bharucha EP, Bhabha SK. Machado-Joseph disease in India. Arch Neurol 1986;43:142–144.
42. Linvingstone IR, Sequeiros J. Machado-Joseph disease in an American-Italian family. J Neurogenet 1984;1:185–188.
43. Chazot G, Kopp N, Barbeau A, Trillet M, Schott B. La maladie de Joseph (deux cas dans une famille française) [abstract]. Actes de la Société Française de Neurologie. Rev Neurol (Paris) 1983;139:228.
44. Pou-Serradell A, Russi A, Ferrer I, Galofre E, Escudero D. Maladie de Machado-Joseph dans une famille d'origine espagnole. Rev Neurol (Paris) 1987;143:520–525.
45. Burt T, Blumbergs P, Currie B. A dominant hereditary ataxia resembling Machado-Joseph disease in Arnhem Land, Australia. Neurology 1993;43:1750–1752.
46. Guo-Xiang W. A six-year study of Machado-Joseph disease of non-Portuguese families in China. 3rd International Workshop on Machado-Joseph Disease; 1994 Apr 7–9; Azores.
47. Sequeiros J, Suite NDA. Spinopontine atrophy disputed as a separate entity [letter]. Neurology 1986;36:1408.
48. Stevanin G, Sousa PS, Cancel G, et al. The gene for Machado-Joseph disease maps to the same 3-cM interval as the spinal cerebellar ataxia 3 gene on chromosome 14q. Neurobiol Dis 1994;1:79–82.
49. Higgins JJ, Polymeropoulos MH, Nee LE, et al. Mutations in American families with spinocerebellar ataxia type 3: SCA3 is allelic to Machado-Joseph disease. Neurology 1996;46:208–213.

ANEXO AO ARTIGO III

Summary of ethnic, clinical and genetic findings in 92 unrelated SCA patients

Case number	Clinical centers	Ethnic origin	Inheritance	Age at onset (yr)	First symptoms	Diagnosis"	CAG repeat		
							SCA1	DRPLA	MJD
1	Portugal	Portuguese-Azorean	AD	39	ataxia	Machado Joseph disease	N	N	E (73)
2	Portugal	Portuguese-Azorean	AD	48	ataxia	Machado Joseph disease	N	N	E (70)
3	Portugal	Portuguese-Azorean	AD	-	-	Machado Joseph disease	N	N	E (76)
4	Portugal	Portuguese-Azorean	AD	35	ataxia	Machado Joseph disease	N	N	E (76)
5	Portugal	Portuguese-Azorean	AD	33	ataxia	Machado Joseph disease	N	N	E (74)
6	Portugal	Portuguese-Azorean	AD	60	ataxia	Machado Joseph disease	N	N	E (69)
7	Portugal	Portuguese-Azorean	AD	24	ataxia	Machado Joseph disease	N	N	E (76)
8	Portugal	Portuguese-Azorean	AD	26	ataxia	Machado Joseph disease	N	N	E (74)
9	Portugal	Portuguese-Azorean	AD	-	-	Machado Joseph disease	N	N	E (73)
10	Portugal	Portuguese-Azorean	AD	-	-	Machado Joseph disease	N	N	N
11	Portugal	Portuguese-Azorean	AD	36	ataxia	Machado Joseph disease	N	N	N
12	Portugal	Portuguese-Azorean	AD	43	ataxia	Machado Joseph disease	N	N	E (70)
13	Portugal	Portuguese-Azorean	AD	31	-	Machado Joseph disease	N	N	E (76)
14	Portugal	Portuguese-Azorean	AD	48	ataxia	Machado Joseph disease	N	N	E (70)
15	Portugal	Portuguese-Azorean	AD	43	-	Machado Joseph disease	N	N	E (73)
16	Portugal	Portuguese-Azorean	AD	-	-	Machado Joseph disease	N	N	E (66)
17	Portugal	Portuguese-Azorean	AD	50	ataxia	Machado Joseph disease	N	N	E (70)
18	Portugal	Portuguese	AD	-	-	Machado Joseph disease	N	N	E (73)
19	Portugal	Portuguese	AD	-	-	Machado Joseph disease	N	N	E (72)
20	Portugal	Portuguese	AD	-	-	Machado Joseph disease	N	N	E (72)
21	Portugal	Portuguese	AD	20	ataxia	Machado Joseph disease	N	N	E (76)
22	Portugal	Portuguese	AD	-	-	Machado Joseph disease	N	N	N
23	Portugal	Portuguese	AD	45	ataxia	Machado Joseph disease	N	N	N
24	Portugal	Portuguese	AD	51	ataxia	Machado Joseph disease	N	N	E (70)
25	North-America	Portuguese-American	AD	-	-	Machado Joseph disease	N	N	E (73)

Summary of ethnic, clinical and genetic findings in 92 unrelated SCA patients

Case number	Clinical centers	Ethnic origin	Inheritance	Age at onset (yr)	First symptoms	Diagnosis"	CAG repeat SCA1	CAG repeat DRPLA	CAG repeat MJD
26	North-America	Portuguese-American	AD	-	-	Machado Joseph disease	N	N	E (76)
27	North-America	Portuguese-American	AD	42	-	Machado Joseph disease	N	N	E (75)
28	North-America	Portuguese-American	AD	-	-	Machado Joseph disease	N	N	E (76)
29	North-America	Portuguese-American	AD	38	-	Machado Joseph disease	N	N	E (73)
30	North-America	Portuguese-American	AD	29	-	Machado Joseph disease	N	N	E (76)
31	North-America	Portuguese-American	AD	45	-	Machado Joseph disease	N	N	E (66)
32	North-America	Portuguese-American	AD	-	-	Machado Joseph disease	N	N	E (76)
33	North-America	Portuguese-American	AD	-	-	Machado Joseph disease	N	N	E (76)
34	North-America	Portuguese-American	AD	17	-	Machado Joseph disease	N	N	E (81)
35	North-America	Sicilian-American	AD	45	ataxia	Machado Joseph disease	N	N	N
36	India	Indian	AD	33	ataxia	Machado Joseph disease	N	N	N
37	India	Indian	AD	31	ataxia	Machado Joseph disease	N	N	N
38	India	Indian	AD	32	ataxia	Machado Joseph disease	N	N	N
39	India	Indian	AD	34	ataxia	Machado Joseph disease	N	N	N
40	India	Indian	AD	56	ataxia	Machado Joseph disease	N	N	N
41	India	Indian	AD	29	ataxia	Machado Joseph disease	N	N	N
42	India	Indian	AD	56	ataxia	Machado Joseph disease	N	N	N
43	India	Indian	AD	25	ataxia	Machado Joseph disease	N	N	N
44	Brazil	Portuguese-Brazilian	AD	-	-	Spinocerebellar ataxia	N	N	E (70)
45	Brazil	Portuguese-Brazilian	AD	35	ataxia	Spinocerebellar ataxia	N	N	N
46	Brazil	Portuguese-Brazilian	AD	25	ataxia	Spastic ataxia* *	N	N	E (76)
47	Brazil	Portuguese-Brazilian	AD	36	ataxia	Spinocerebellar ataxia	N	N	N
48	Brazil	Brazilian	AD	43	ataxia	Spinocerebellar ataxia	N	N	N
49	North-America	African-American	AD	40	-	Spinocerebellar ataxia	N	N	E (66)
50	North-America	Chinese	AD	29	-	Spinocerebellar ataxia	N	N	E (74)

Summary of ethnic, clinical and genetic findings in 92 unrelated SCA patients

Case number	Clinical centers	Ethnic origin	Inheritance	Age at onset (yr)	First symptoms	Diagnosis"	CAG repeat		
							SCA1	DRPLA	MJD
51*	North-America	American	AD	30's	-	Spinopontine atrophy	N	N	E (72)
52*	North-America	Hispanic-American	AD	40's	-	Olivopontocerebellar atrophy	N	N	N
53*	North-America	Dutch-American	AD	20's	-	Olivopontocerebellar atrophy	E (57)	N	N
54*	North-America	Chinese-Canadian	AD	30's	-	Olivopontocerebellar atrophy	E (56)	N	N
55*	North-America	German-American	AD	40's	-	Spinopontine atrophy	N	N	E (69)
56*	North-America	American	AD	20's	-	Spinopontocerebellar atrophy	N	N	E (73)
57*	North-America	Swedish-American	AD	30's	-	Olivopontocerebellar atrophy	N	N	N
58	North-America	French-Canadian	AD	45	dysartria	Olivopontocerebellar atrophy	N	N	N
59	North-America	French-Canadian	AD	20	ataxia	Olivopontocerebellar atrophy	N	N	N
60	North-America	French-Canadian	AD	23	ataxia	Spinocerebellar ataxia	N	N	N
61	North-America	French-Canadian	AD	40	ataxia	Olivopontocerebellar atrophy	N	N	N
62	North-America	Austrian-Canadian	AD	25	-	Olivopontocerebellar atrophy	N	N	N
63	North-America	French-Canadian	AD	26	ataxia	Spinocerebellar ataxia	N	N	N
64	North-America	French-Canadian	AD	28	ataxia	Cerebellar atrophy	N	N	N
65	Brazil	Italo-Brazilian	AD	41	ataxia	Spinocerebellar ataxia	E (50)	N	N
66	Brazil	Japanese-Brazilian	AD	50	-	Cerebellar atrophy	N	N	N
67	North-America	Japanese	AD	-	-	Dentatorubropallidoluysian atrophy	N	E (68)	N
68	North-America	French-Canadian	AR	15	-	Acadian ataxia	N	N	N
69	North-America	French-Canadian	AR	-	-	Olivopontocerebellar atrophy	N	N	N
70	North-America	French-Canadian	AR	19	ataxia	Olivopontocerebellar atrophy	N	N	N
71	North-America	French-Canadian	AR	16	ataxia	Acadian ataxia	N	N	N
72	North-America	French-Canadian	AR	16	ataxia	Olivopontocerebellar atrophy	N	N	N
73	North-America	French-Canadian	AR	-	-	Charlevoix-Saguenay ataxia	N	N	N
74	North-America	French-Canadian	AR	-	-	Olivopontocerebellar atrophy	N	N	N
75	North-America	French-Canadian	AR	40	ataxia	Olivopontocerebellar atrophy	N	N	N

Summary of ethnic, clinical and genetic findings in 92 unrelated SCA patients

Case number	Clinical centers	Ethnic origin	Inheritance	Age at onset (yr)	First symptoms	Diagnosis"	CAG repeat SCA1	CAG repeat DRPLA	CAG repeat MJD
76	North-America	French-Canadian	AR	12	ataxia	Olivopontocerebellar atrophy	N	N	N
77	North-America	Iranian	AR	16	inv. mov.	Spinocerebellar ataxia	N	N	N
78	Brazil	Portuguese-Brazilian	AR	24	ataxia	Olivopontocerebellar atrophy	N	N	N
79	Brazil	Brazilian	AR	18	ataxia	Spastic ataxia* *	N	N	N
80	North-America	French-Canadian	I	30	ataxia	Olivopontocerebellar atrophy	N	N	N
81	North-America	French-Canadian	I	34	dysartria	Olivopontocerebellar atrophy	N	N	N
82	North-America	French-Canadian	I	41	ataxia	Olivopontocerebellar atrophy	N	N	N
83	North-America	French-Canadian	I	15	ataxia	Spinocerebellar ataxia	N	N	N
84*	North-America	Canadian	I	50's	-	Olivopontocerebellar atrophy	N	N	N
85*	North-America	Scandinavian-Canadian	I	50's	-	Olivopontocerebellar atrophy	N	N	N
86*	North-America	Canadian	I	50's	-	Olivopontocerebellar atrophy	N	N	N
87	North-America	Moroccan	I	16	-	Spinocerebellar ataxia	N	N	N
88	North-America	French-Canadian	I	3	ataxia	Multisystem degeneration	N	N	N
89	Brazil	Portuguese-Brazilian	I	35	ataxia	Spinocerebellar ataxia	N	N	N
90	Brazil	Italo-Brazilian	I	58	ataxia	Spinocerebellar ataxia	N	N	N
91	North-America	French-Canadian	I	52	ataxia	Cerebellar atrophy	N	N	N
92	Brazil	Portuguese-Brazilian	I	31	ataxia	Spinocerebellar ataxia	N	N	E (73)

* Autopsy material
* * SCA with marked spasticity
" Diagnosis based on clinical, neuropathological or imaging criteria

A dach indicates information not available
AD-Autosomal dominant
AR-Autosomal recessive

I- Isolated case
N-Two normal alleles
E-Expanded allele (the number of CAG repeat units is represented in brackets)

ARTIGO IV - ANALYSIS OF SPINOCEREBELLAR ATAXIA TYPE 1, DENTATORUBROPALLIDOLUYSIAN ATROPHY AND MACHADO-JOSEPH DISEASE CAG REPEATS IN 48 PORTUGUESE ATAXIA FAMILIES.

I. Silveira, P. Coutinho, C. Gaspar, J. Guimarães, L. Loureiro, P. Maciel, J. Sequeiros & G.A. Rouleau.

(Submetido para publicação)

Analysis of spinocerebellar ataxia type 1, dentatorubropallidoluysian atrophy and Machado-Joseph disease CAG repeats in 48 Portuguese ataxia families

I. Silveira[1,2], P. Coutinho[3], C. Gaspar[1,2], J. Guimarães[4], L. Loureiro[5], P. Maciel[1,2], J. Sequeiros[2,6], and G.A. Rouleau[1]

1. Centre for Research in Neurosciences, McGill University and The Montreal General Hospital Research Institute, Montréal, Québec, Canada.
2. UnIGENe, IBMC, Universidade do Porto, Portugal.
3. Serviço de Neurologia, Hospital de Santo António, Porto, Portugal.
4. Serviço de Neurologia, Hospital Egas Moniz, Lisboa, Portugal.
5. Serviço de Neurologia, Hospital de São Pedro, Vila Real, Portugal.
6. Laboratório de Genética Médica, ICBAS, Universidade do Porto, Portugal.

Key Words: SCA1, DRPLA, MJD, dominant ataxia.

Running head: Analysis of SCA1, DRPLA and MJD CAG repeats

Correspondence to: Dr. Jorge Sequeiros
Laboratório de Genética Médica, ICBAS
Largo do Prof. Abel Salazar, 2
4000 Porto, Portugal
Tel: + 351 2 317597,
Fax: + 351 2 317597

ABSTRACT

The spinocerebellar ataxias (SCAs) are clinically and genetically a heterogeneous group of neurodegenerative disorders. To date, seven different loci causing SCA have been identified: SCA1, SCA2, Machado-Joseph disease (MJD)/SCA3, SCA4, SCA5, SCA7 and dentatorubropallidoluysian atrophy (DRPLA). The gene has been identified, and an expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in the coding region of the disease genes have been found in three of these disorders: SCA1, DRPLA and MJD. To estimate the relative frequencies of the SCA1, DRPLA and MJD mutations among Portuguese ataxia patients we collected DNA samples from 48 Portuguese ataxia families and screened the affected individuals for expansions in the SCA1, DRPLA and MJD genes. We did not find the SCA1 or the DRPLA mutations in our Portuguese group of families. The MJD mutation was found in 74% of the Portuguese autosomal dominant ataxia families. For 45 patients with the expanded MJD allele a strong inverse correlation between CAG repeat size and age at onset was observed ($r = -.72$). Among the MJD patients, the normal allele size ranged from 13 to 41 CAG repeats, whereas the affected alleles contained 65 to 80 repeats. In conclusion, while MJD remains the most common cause of SCA in Portugal, 26% of cases are caused by another, as yet unidentified, gene.

INTRODUCTION

The autosomal dominantly inherited spinocerebellar ataxias (SCAs) are a heterogeneous group of late onset neurodegenerative disorders with variable clinical phenotype that includes ataxia, dysarthria, dysmetria and intention tremor resulting from the involvement of the cerebellum and its afferent and efferent pathways. Although the symptoms and signs of degeneration in the cerebellum, spinal cord, and brainstem are predominant, changes in the basal ganglia, optic nerves, retina and peripheral nerve may also be present. Rarely, dementia may occur as well. To date, seven different loci responsible for SCA have been mapped: the SCA1 locus on chromosome 6p [Yakura et al., 1974; Jackson et al., 1977; Zoghbi et al., 1988], the SCA2 locus on chromosome 12q [Gispert et al., 1993; Lopes-Cendes et al., 1994a], the Machado-Joseph disease (MJD)/SCA3 locus on 14q [Takiyama et al., 1993; Sequeiros et al., 1994; Twist et al., 1995], the SCA4 locus on 16q [Gardner et al., 1994], the SCA5 locus on the centromeric region of chromosome 11 [Ranum et al., 1994b], the SCA7 locus on 3p [Benomar et al., 1995; Gouw et al., 1995] and dentatorubropallidoluysian atrophy (DRPLA) locus on 12p [Koide et al., 1994; Nagafuchi et al., 1994]. However, the disease trait in some families is not linked to any of these loci [Twells et al., 1994]. Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in the coding region of the disease genes cause at least three of these disorders: SCA1 [Orr et al., 1993], MJD/SCA3 [Kawaguchi et al., 1994] and DRPLA [Koide et al., 1994; Nagafuchi et al., 1994]. Screening for these trinucleotide repeat mutations allows us to recognize single individuals who carry the SCA1, DRPLA and MJD mutations, allowing accurate classification and diagnosis of these disorders. The extend

of the trinucleotide CAG expansion also explains some of the variation in age at onset and disease severity. We have screened a large group of Portuguese ataxia patients for the SCA1, DRPLA and MJD mutations to classify them, and to estimate the relative frequency of the SCAs in this population.

SUBJECTS AND METHODS

Patients

We have identified and collected 68 affected and 24 at risk individuals from 48 Portuguese families (22 previously reported, and 26 newly identified) with cerebellar ataxia. Eighteen families were from the Portuguese islands of Azores and 30 from mainland Portugal. Age at onset ranged from 13 to 60 years. Patients were ascertained from 1990 to 1995 in five Azorean and four continental field trips. Family history and pedigrees of families were exhaustively studied and no relationship among them was found. Forty-six families (96%) presented an autosomal dominant pattern of inheritance; one ataxia family with a suspected recessive pattern of inheritance, as well as one apparently isolated case, were also included in this study.

All of the 68 patients presented a progressive form of cerebellar ataxia often, but not always, associated with pyramidal signs (such as hyperreflexia, Babinski's sign, ankle clonus and spasticity), extrapyramidal signs (e.g. dystonia, parkinsonian features), ocular findings (ophtalmoplegia, nystagmus) and dementia.

DNA isolation

Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes following standard techniques [Sambrook et al., 1989]. Lymphoblastoid cell lines were established by transformation with the Epstein-Barr virus [Anderson and Gusella, 1984].

PCR analysis

The following published primer sequences were used for polymerase chain reaction (PCR) analysis: Rep1 and Rep2 [Orr et al., 1993] for the SCA1 mutation; B37 CAG repeat primer sequences [Li et al., 1993] for the DRPLA mutation; and MJD52 and MJD25 [Kawaguchi et al., 1994] for the MJD mutation. PCR was carried out in a total volume of 12.5 μl, with 100 ng of genomic DNA; 1 μM of each primer; 200μM of dGTP, dCTP, dTTP, and dATP; 1 unit of Taq polymerase and 2% formamide. Samples were processed through 30 to 32 cycles of denaturation, annealing and elongation at different temperatures, as described previously [Orr et al., 1993; Koide et al., 1994; Kawaguchi et al., 1994]. PCR products were separated in 6% polyacrylamide gels. Gels were transferred onto Hybond N+ nylon membranes and hybridized with a α-^{32}P 3'-end-labeled $(CAG)_{15}$ probe. The size of alleles were determined by comparing migration relative to an M13 sequencing ladder. Patients previously identified for each of the three mutations were used as controls in all analyses.

According to previous reports, normal SCA1 alleles have a size range of 16-36 CAG repeats, while affected SCA1 alleles have 42-81 CAG repeats [Ranum et al.,

1994a); for the DRPLA locus, normal allele size ranges from 8-25 CAGs, while in patients, alleles with 54-68 CAG units are found [Koide et al., 1994]; in normal chromosomes the MJD gene contains 12-40 CAG repeats, while in those affected the repeat number ranges from 62-84 [Maciel et al., 1995; Ranum et al., 1995].

DNA sequencing of the SCA1 intermediate allele

To accurately assess the size of the intermediate allele as well as the presence of a CAT interruption, DNA sequencing was performed. DNA was amplified using primers Rep1 [Orr et al.,1993] and GCT-435 [Chung et al., 1993] in a 50 μl PCR reaction with the same conditions as that used in PCR analysis. The PCR products were run on 15% nondenaturing polyacrylamide gel, and bands cut out. DNA was removed from the gel using Maxam buffer. Sequencing reactions were performed using 7 μl DNA and a Sequenase Version 2.0 DNA sequencing Kit (USB). Primers Rep2 [Orr et al., 1993] and GCT-214 [Chung et al., 1993] were used for CAG and GCT strand sequencing, respectively.

Statistical analysis

Linear regression analysis was used to determine the correlation between CAG repeat number and the age at onset of disease.

RESULTS

Analysis of the SCA1 CAG repeat

Among the 48 families examined for the presence of CAG expansions at the SCA1 locus, one apparently isolated patient showed an SCA1 allele in the intermediate size range (36-41 repeats) [Ranum et al., 1994a], with 37 CAG units. The DNA from this patient was sequenced in order to characterize this SCA1 allele. Sequence analysis showed an interrupted repeat configuration of $(CAG)_{16}CATCAGCAT(CAG)_{18}$. In spite of its overall longer size this was consistent with a normal allele since the CAG repeat had two CAT interruptions [Chung et al., 1993]. Reports of intermediate SCA1 normal alleles of 39 [Genis et al., 1995] and 38 [Ranum et al., 1995] CAGs have been published, while the smallest SCA1 affected allele reported to date has 40 CAG repeats (Ranum et al., 1995]. In our data the range for the SCA1 alleles in normal chromosomes was 24-37 CAGs. No SCA1 expanded alleles in the affected range were found.

Analysis of the DRPLA CAG repeat

No expanded alleles at the DRPLA locus were found among the 48 families tested. The normal alleles had between 7 and 23 CAG repeats.

Analysis of the MJD CAG repeat

In contrast to the SCA1 and DRPLA results, we found a high number of families with an expanded CAG repeat at the MJD locus. Table I shows the frequency of the MJD mutation in these families by geographic area. Among 46 dominant ataxia

families tested, 55 individuals (48 affected and seven asymptomatic) from 34 families (74%) had a CAG repeat in the affected range. Each affected individual had a normal allele ranging from 13 to 41 repeats thus increasing the normal MJD range previously reported, and an expanded allele with 65-80 CAGs. Seven asymptomatic individuals inherited the MJD mutant gene containing 66-75 repeats. No expansions were found in the recessive and isolated cases. Instability was seen in 4 of 6 transmissions where the (CAG) tract changed in size from -2 to +3 CAG units. Figure 1 shows the correlation on the age at onset of disease and the number of CAG repeats in 45 MJD patients. There was a linear correlation between the number of CAGs and the age at onset of symptoms with $r = -.72$ ($p<.001$), indicating that 52% ($r^2 = .52$) of the variation in age at onset may be explained by the number of CAG repeat units on the affected chromosomes.

DISCUSSION

The clinical classification of the autosomal dominant ataxias has been difficult due to variability and overlap in clinical signs, age at onset and duration of the disease, both among and within families. It is generally perceived that a rational classification scheme must also be based on genetics. In order to determine the types, and the relative frequency of the SCAs in Portugal, where MJD is known to be highly prevalent, we have assembled 22 previouly reported Portuguese ataxia families [Maciel et al., 1995; Silveira et al., 1996] in addition with 26 newly identified Portuguese ataxia kindreds and screened the affected individuals for the SCA1, DRPLA and MJD

mutations. We found that the MJD mutation was very common in Portuguese SCA patients (74%). In contrast, we did not find any SCA1 or DRPLA mutations in this population. However, the genes responsible for 26% of Portuguese autosomal dominant SCAs remain to be identified suggesting the existence of other SCA loci, and consequently locus heterogeneity, even in Portugal. Genetic heterogeneity is common among the dominant forms of SCAs [Silveira et al., 1993; Khati et al., 1993; Lopes-Cendes et al., 1994b; Twells et al., 1994].

The previously published normal size range for MJD alleles was 12-40 repeats [Maciel et al., 1995; Ranum et al., 1995]. We have found an unaffected allele of 41 repeats increasing the size range of normal MJD alleles to 12-41 repeats. In comparison with SCA1, there is still a wide gap between the affected and unaffected allele size ranges for MJD. In spinobulbar muscular atrophy (SBMA), Huntington disease (HD), DRPLA and SCA1 an uninterrupted CAG expansion of 37 or more repeats causes disease. In MJD it seems that larger expansions are needed suggesting that sequences flanking the CAG tract may modify the mutation effect on the protein. In SCA1 both the size of the CAG repeat tract and the presence of a CAT interruption distinguish a normal from an affected allele [Chung et al., 1993], whereas in MJD an expansion of the affected alleles seems to be the only major determinant [Kawaguchi et al., 1994]. Recently, Quan et al. [1996] reported a normal SCA1 allele containing 44 CAG repeat units (within the affected range) interrupted in two places, each with two CAT triplets separated by a single CAG. This indicates that, in contrast with DRPLA and MJD, the molecular diagnosis of SCA1 cannot always be made based solely on the size of the CAG repeat.

Our results showed a strong inverse correlation (r = .72) between the size of the MJD $(CAG)_n$ and the age at onset, with repeat size explaining approximately 50% of the variation in age at onset. Identical correlation has been shown in other neurodegenerative diseases caused by trinucleotide repeats [Snell et al., 1993; Orr et al., 1993; Koide et al., 1994; Nagafuchi et al.,1994]. However, the repeat size cannot be used to accurately predict the age at onset; for example, in the group of MJD patients studied, two subjects had repeat sizes of 70 CAGs with ages at onset of 38 and 55 years.

Instability in transmission and somatic mosaicism are characteristic features of disorders caused by trinucleotide repeat expansions [Duyao et al., 1993; Snell et al., 1993; Telenius et al., 1994; Ueno et al., 1995]. Among our MJD families we had six parent to child transmissions with a mean increase of 0.67 CAGs showing instability in transmission identical to that reported by Maciel et al. [1995]. Our data is also in agreement with previous reports [Cancel et al., 1995] showing that the MJD normal alleles appear always as a single major band, while the MJD expanded alleles show numerous bands, indicating the presence of somatic mosaicism.

There are many common features between SCA1, DRPLA, MJD, SBMA and HD. They are all neurodegenerative diseases caused by the expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat that codes for polyglutamine tracts within the protein causing disease [Orr et al., 1993; Koide et al., 1994; Nagafuchi et al., 1994; Kawaguchi et al., 1994; La Spada et al., 1991; The Huntington's Disease Collaborative Research Group 1993]. In SCA1, DRPLA, and HD the size ranges for normal and expanded alleles are almost identical [Orr et al., 1993; Koide et al. 1994; Nagafuchi et

al., 1994; The Huntington's Disease Collaborative Research Group 1993]; the effect of paternal transmission of the mutant alleles also show higher rates of increase in size and a larger average size of expansion with consequently decrease in age at onset (anticipation) [Chung et al., 1993; Nagafuchi et al., 1994; Snell et al., 1993]. In contrast, for MJD there is a large gap between normal and expanded alleles and there is no clear evidence of a parental bias in the transmission of large expansions [Maciel et al., 1995; Cancel et al., 1995]. However, in our group of MJD patients, the largest anticipation observed (18 years) was in a father-son transmission resulting from an increase of 3 CAG units; and also the only juvenile case (13 years) received the mutant allele from the father (not typed).

Recently, Trottier et al. [1995] reported a monoclonal antibody that selectively recognizes polyglutamine expansion (the expression of the CAG repeat) in the proteins implicated in autosomal dominant cerebellar ataxias. In our cerebellar ataxia families lacking the SCA1, DRPLA or MJD mutations this antibody should allow us to establish whether there is a polyglutamine expansion in the proteins causing disease.

In conclusion, the SCA1 and DRPLA mutations were not responsible for autosomal dominant SCA in our population of Portuguese families. The MJD mutation caused 74% of autosomal dominant SCA in our Portuguese patients, while the genes responsible for 26% of the Portuguese dominant SCAs remain to be identified.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Dr. H. Y. Zogbi and Dr. S. Tsuji for providing positive controls for the SCA1 and DRPLA mutations, respectively; and the patients and their families for their cooperation. This work was supported by: the joint Program FRSQ-ACAF (Fonds de la Recherche en Santé du Québec and Association Canadienne de l'Ataxie de Friedreich), the NIH (grant NS 31687), the Network of Centres of Excellence (Canadian Genetic Disease Network) and the Financiamento Plurianual de Unidades de Investigação from JNICT (Junta Nacional de Investigação Cientifica e Tecnológica), Portugal. I.S., C.G. and P.M. are recipients of a scholarship from the Praxis Programme, JNICT, Portugal.

Figure 1 Relationship between age at onset of clinical disease (years) and the repeat length of the expanded allele, in 45 MJD patients. A strong inverse correlation ($r = -.72$) was observed with repeat size explaining approximately 50% ($r^2 = .52$) of variation in age at onset.

REFERENCES

Anderson MA, Gusella JF (1984): Use of cyclosporin A in establishing Epstein-Barr virus-transformed human lymphoblastoid cell lines. In Vitro 20:856-858

Benomar A, Krols L, Stevanin G, Cancel G, LeGuern E, David G, Ouhabi H, Martin JJ, Dürr A, Zaim A, Ravisé N, Busque C, Penet C, Regemorter NV, Weissenbach J, Yahyaoui M, Chkili T, Agid Y, Broeckhoven CV, Brice A (1995): The gene for autosomal dominant cerebellar ataxia with pigmentary macular dystrophy maps to chromosome 3p12-p21.1. Nature Genet 10:84-88

Cancel G, Abbas N, Stevanin G, Dürr A, Chneiweiss H, Neri C, Duyckaerts C, Penet C, Cann HM, Agid Y, Brice A (1995): Marked phenotypic heterogeneity associated with expansion of a CAG repeat sequence at the spinocerebellar ataxia 3/Machado-Joseph disease locus. Am J Hum Genet 57:809-816

Chung MY, Ranum LP, Duvick LA, Servadio A, Zoghbi HY, Orr HT (1993): Evidence for a mechanism predisposing to intergenerational CAG repeat instability in spinocerebellar ataxia type 1. Nature Genet 5:254-258

Duyao M, Ambrose C, Myers R, Novelletto A, Persichetti F, Frontali M, Folstein S, Ross C, Franz M, Abbott M, Gray J, Conneally P, Young A, Penney J, Hollingsworth Z, Shoulson I, Lazzarini A, Falek A, Koroshetz W, Sax D, Bird E, Vonsattel J, Bonilla E, Alvir J, Bickham Conde J, Cha J-H, Dure L, Gomez F,

Ramos M, Sanchez-Ramos J, Snodgrass S, Young M, Wexler N, Moscowitz C, Penchaszadeh G, MacFarlane H, Anderson M, Jenkins B, Srinidhi J, Barnes G, Gusella J, MacDonald M (1993): Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. Nature Genet 4:387-392

Gardner K, Alderson K, Galster B, Kaplan C, Leppert M, Ptácek L (1994): Autosomal dominant spinocerebellar ataxia: clinical description of a distinct hereditary ataxia and genetic localization to chromosome 16 (SCA4) in a Utah kindred. Neurology (suppl 2) 44:A361

Genis D, Matilla T, Volpini V, Rosell J, Davalos A, Ferrer I, Molins A, Estivill X (1995): Clinical, neuropathologic, and genetic studies of a large spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) kindred: (CAG)n expansion and early premonitory signs and symptoms. Neurology 45:24-30

Gispert S, Twells R, Orozco G, Brice A, Weber J, Heredero L, Scheufler K, Riley B, Allotey R, Nothers C, Hillermann R, Lunkes A, Khati C, Stevanin G, Hernandez A, Magarino C, Klockgether A, Dürr A, Chneiweiss H, Enczmann J, Farrall M, Beckmann J, Mullan M, Wernet P, Agid Y, Freund H-J, Williamson R, Auburger G, Chamberlain S (1993): Chromosomal assignment of the second locus for autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA2) to chromosome 12q23-24.1. Nature Genet 4:295-299

Gouw LG, Kaplan CD, Haines JH, Digre KB, Rutledge SL, Matilla A, Leppert M, Zoghbi HY, Ptácek LJ (1995): Retinal degeneration characterizes a spinocerebellar ataxia mapping to chromosome 3p. Nature Genet 10:89-93

Jackson JF, Currier RD, Terasaki PI, Morton NE (1977): Spinocerebellar ataxia and HLA linkage: risk prediction by HLA typing. N Engl J Med 296:1138-1141

Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S, Kawakami H, Nakamura S, Nishimura M, Akiguchi I, Kimura J, Narumiya S, Kakizuka A (1994): CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. Nature Genet 8:221-228

Khati C, Stevanin G, Dürr A, Chneiweiss H, Belal S, Seck A, Cann H, Brice A, Agid Y (1993): Genetic heterogeneity of autosomal dominant cerebellar ataxia type 1: clinical and genetic analysis of 10 French families. Neurology 43:1131-1137

Koide R, Ikeuchi T, Onodera O, Tanaka H, Igarashi S, Endo K, Takahashi H, Kondo R, Ishikawa A, Hayashi T, Saito M, Tomoda A, Miike T, Naito H, Ikuta F, Tsuji S (1994): Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA). Nature Genet 6:9-13

La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fishbeck H (1991): Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. Nature 352:77-79

Li SH, McInnis MG, Margolis RL, Antonarakis SE, Ross CA (1993): Novel triplet repeat containing genes in human brain: cloning, expression, and length polymorphisms. Genomics 16:572-579

Lopes-Cendes I, Andermann E, Attig E, Cendes F, Bosch S, Wagner M, Gerstenbrand F, Andermann F, Rouleau GA (1994a): Confirmation of the SCA-2 locus as an alternative locus for dominantly inherited spinocerebellar ataxias and refinement of the candidate region. Am J Hum Genet 54:774-781

Lopes-Cendes I, Andermann E, Rouleau GA (1994b): Evidence for the existence of a fourth dominantly inherited spinocerebellar ataxia locus. Genomics 21:270-274

Maciel P, Gaspar C, DeStefano AL, Silveira I, Coutinho P, Radvany J, Dawson DM, Sudarsky L, Guimarães J, Loureiro JE, Nezarati MN, Corwin LI, Lopes-Cendes I, Rooke K, Rosenberg RN, MacLeod P, Farrer LA, Sequeiros J, Rouleau GA (1995): Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. Am J Hum Genet 57:54-61

Nagafuchi S, Yanagisawa H, Sato K, Shirayama T, Ohsaki E, Bundo M, Takeda T, Tadokoro K, Kondo I, Murayama N, Tanaka Y, Kikushima H, Umino K, Kurosawa H, Furukawa T, Nihei K, Inoue T, Sano A, Komure O, Takahashi M, Yoshizawa T, Kanazawa I, Yamada M (1994): Dentatorubral and pallidoluysian atrophy expansion of an unstable CAG trinucleotide on chromosome 12p. Nature Genet 6:14-18

Orr HT, Chung MY, Banfi S, Kwiatkowski TJ, Jr., Servadio A, Beaudet AL, McCall AE, Duvick LA, Ranum LP, Zoghbi HY (1993): Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. Nature Genet 4:221-226

Quan F, Janas J, Popovich BW (1995): A novel CAG repeat configuration in the SCA1 gene: implications for the molecular diagnostics of spinocerebellar ataxia type 1. Hum Mol Genet 4:2411-2413

Ranum LP, Chung MY, Banfi S, Bryer A, Schut LJ, Ramesar R, Duvick LA, McCall A, Subramony SH, Goldfarb L, Gomez C, Sandkuijl LA, Orr HT, Zoghbi HY (1994a): Molecular and clinical correlations in spinocerebellar ataxia type 1: evidence for familial effects on the age at onset. Am J Hum Genet 55:244-252

Ranum LP, Schut LJ, Lundgren JK, Orr HT, Livingston DM (1994b): Spinocerebellar ataxia type 5 in a family descended from the grandparents of President Lincoln maps to chromosome 11. Nature Genet 8:280-284

Ranum LP, Lundgren JK, Schut LJ, Ahrens MJ, Perlman S, Aita J, Bird TD, Gomez C, Orr HT (1995): Spinocerebellar ataxia type 1 and Machado-Joseph disease: incidence of CAG expansions among adult-onset ataxia patients from 311 families with dominant, recessive, or sporadic ataxia. Am J Hum Genet 57:603- 608

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989): Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sequeiros J, Silveira I, Maciel P, Coutinho P, Manaia A, Gaspar C, Burlet P, Loureiro L, Guimarães J, Tanaka H, Takiyama Y, Sakamoto H, Nishizawa M, Nomura Y, Segawa M, Tsuji S, Melki J, Munnich A (1994): Genetic linkage studies of Machado-Joseph disease with chromosome 14q STRPs in 16 Portuguese-Azorean kindreds. Genomics 21:645-648

Silveira I, Manaia A, Melki J, Magarino C, Lunkes A, Hernandez A, Gispert S, Burlet P, Rozet JM, Coutinho P, Loureiro JE, Guimarães J, Auburger G, Munnich A, Sequeiros J (1993): Machado-Joseph disease is genetically different from Holguin dominant ataxia (SCA2). Genomics 17:556-559

Silveira I, Lopes-Cendes I, Kish S, Maciel P, Gaspar C, Coutinho P, Botez MI, Teive H, Arruda W, Steiner CE, Pinto-Junior W, Maciel JA, Jain S, Sack G, Andermann E, Sudarsky L, Rosenberg RN, MacLeod P, Chitayat D, Babul R, Sequeiros J,

Rouleau GA (1996): Frequency of spinocerebellar ataxia type 1, dentatorubropallidoluysian atrophy, and Machado-Joseph disease mutations in a large group of spinocerebellar ataxia patients. Neurology 46:214-218

Snell RG, MacMillan JC, Cheadle JP, Fenton I, Lazarou LP, Davies P, MacDonald ME, Gusella JF, Harper PS, Shaw DJ (1993): Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease. Nature Genet 4:393-397

Takiyama Y, Nishizawa M, Tanaka H, Kawashima S, Sakamoto H, Karube Y, Shimazaki H, Soutome M, Endo K, Ohta S, Kagawa Y, Kanazawa I, Mizuno Y, Yoshida M, Yuasa T, Horikawa Y, Oyanagi K, Nagai H, Kondo T, Inuzuka T, Onodera O, Tsuji S (1993): The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q. Nature Genet 4:300-304

Telenius H, Kremer B, Goldberg YP, Theilmann J, Andrew SE, Zeisler J, Adam S, Greenberg C, Ives EJ, Clarke LA, Hayden MR (1994): Somatic and gonadal mosaicism of the Huntington disease gene CAG repeat in brain and sperm. Nature Genet 6:409-414

The Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993): A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. Cell 72:971-983

Trottier Y, Lutz Y, Stevanin G, Imbert G, Devys D, Cancel G, Saudou F, Weber C, David G, Tora L, Agid Y, Brice A, Mandel JL (1995): Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and for dominant cerebellar ataxias. Nature 378:403-406

Twells R, Yenchitsomanus PT, Sirinavin C, Allotey R, Poungvarin N, Viriyavejakul A, Cemal C, Weber J, Farrall M, Rodprasert P, Prayoonwiwat N, Williamson R, Chamberlain S (1994): Autosomal dominant cerebellar ataxia with dementia: evidence for a fourth disease locus. Hum Mol Genet 3:177-180

Twist EC, Casaubon LK, Ruttledge MH, Rao VS, Macleod PM, Radvany J, Zhao Z, Rosenberg RN, Farrer LA, Rouleau GA (1995): Machado Joseph disease maps to the same region of chromosome 14 as the spinocerebellar ataxia type 3 locus. J Med Genet 32:25-31

Ueno S, Kondoh K, Kotani Y, Komure O, Kuno S, Kawai J, Hazama F, Sano A (1995): Somatic mosaicism of CAG repeat in dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA). Hum Mol Genet 4:663-666

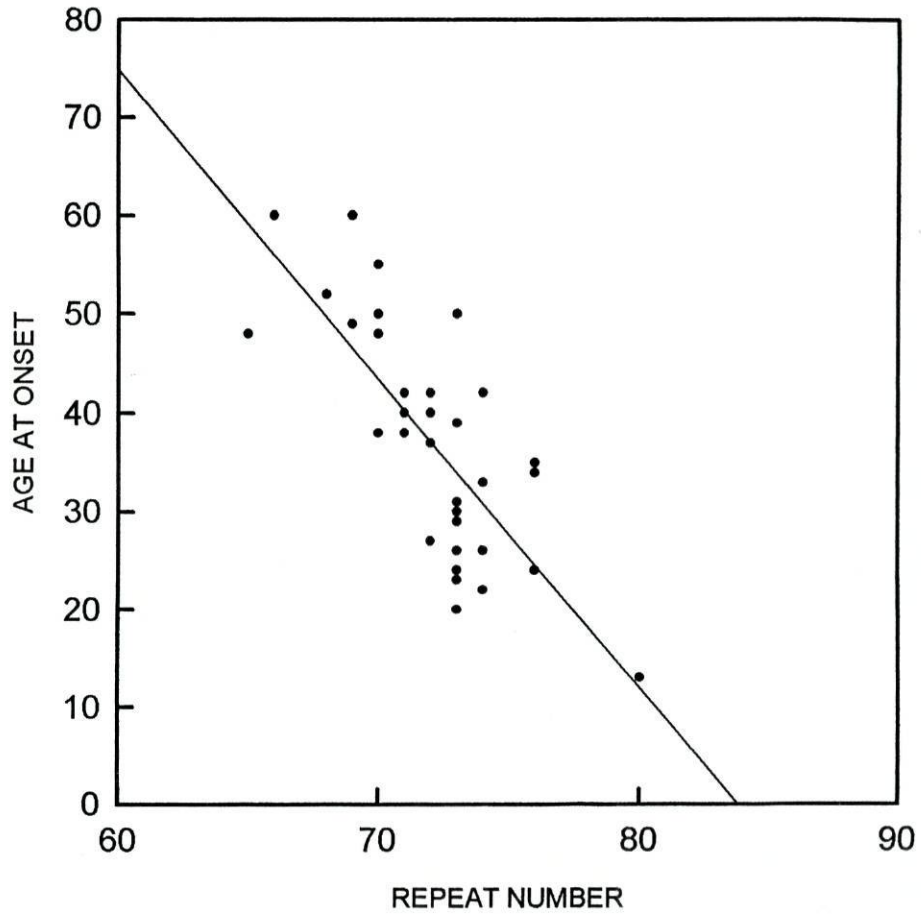
Yakura H, Wakisaka A, Fujimoto S, Itakura K (1974): Hereditary ataxia and HL-A. N Engl J Med 291:154-155

Zoghbi HY, Pollack MS, Lyons LA, Ferrell RE, Daiger SP, Beaudet AL (1988): Spinocerebellar ataxia: variable age of onset and linkage to human leukocyte antigen in a large kindred. Ann Neurol 23:580-584

Table I *Frequency of SCA1, DRPLA and MJD mutations in families, by geographic area.*

	Total	SCA1	DRPLA	MJD	None
Portugal, Azores					
São Miguel	7	-	-	5	2
Flores	10	-	-	10	-
Graciosa	1	-	-	1	-
Subtotal	**18**	**-**	**-**	**16**	**2**
Portugal, mainland					
Vila Real	4	-	-	3	1
Porto	4	-	-	1	3
Coimbra	3	-	-	3	-
Lisboa	19	-	-	11	8
Subtotal	**30**	**-**	**-**	**18**	**12**
Total	**48**	**-**	**-**	**34**	**14**

Figure 1



3- DIAGNÓSTICO MOLECULAR E CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO NAS ATAXIAS DOMINANTES

Resumo

As ataxias espinocerebelosas dominantes de início na idade adulta são um grupo muito heterogéneo de degenerescências hereditárias do sistema nervoso com manifestações clínicas variáveis e apresentando uma grande sobreposição fenotípica, dificultando o diagnóstico clínico diferencial entre os diferentes tipos.

O diagnóstico molecular das 109 famílias reunidas para a realização deste trabalho permitiu identificar quatro famílias de diferentes origens étnicas e geográficas com a mutação DMJ e uma família brasileira com a mutação SCA1, todas elas sem diagnóstico clínico prévio do respectivo tipo de ataxia. Assim, comparámos as características étnicas, clínicas e moleculares de 19 indivíduos portadores da mutação DMJ (pertencentes a essas quatro famílias) com um grupo de 32 famílias clinicamente diagnosticadas com DMJ e portadoras da mutação. Paralelamente, analisámos as características clínicas e moleculares da família brasileira com SCA1, não diagnosticada clinicamente. Os nossos resultados mostraram que vários factores se revelam importantes na elaboração de um diagnóstico clínico seguro de DMJ: a origem étnica, o número de doentes disponível para o exame em cada família, a ausência de doentes com sintomas clínicos mais específicos, como os sinais extrapiramidais (distonia), e ainda o tamanho do $(CAG)_n$ no gene DMJ. Os três doentes da família SCA1 apresentavam ataxia da marcha de evolução lenta ao longo dos anos. A análise molecular revelou seis indivíduos com expansão do gene SCA1, tendo sido observada instabilidade genética do $(CAG)_n$ nas duas transmissões existentes (mãe-filha) que resultaram em contracção no tamanho do $(CAG)_n$.

A análise destas cinco famílias conduz a uma conclusão evidente sobre a necessidade de realização do diagnóstico molecular em todos os doentes com diagnóstico clínico de ataxia espinocerebelosa, independentemente da origem étnica ou geográfica das famílias, qualquer que seja a forma clinicamente diagnosticada, e mesmo em casos sem história familiar.

ARTIGO V - LIMITS OF CLINICAL ASSESSMENT IN THE ACCURATE DIAGNOSIS OF MACHADO-JOSEPH DISEASE.

I. Lopes-Cendes, **I. Silveira,** P. Maciel, C. Gaspar, J. Radvany, D. Chitayat, R. Babul, J. Stewart, M. Dolliver, Y. Robitaille, G.A. Rouleau & J. Sequeiros.

Archives of Neurology 1996; 53: 1168-1174.

Reprinted from the Archives of Neurology November, 1996 Volume 53 Copyright 1996, American Medical Association

ORIGINAL CONTRIBUTION

Limits of Clinical Assessment in the Accurate Diagnosis of Machado-Joseph Disease

Iscia Lopes-Cendes, MD; Isabel Silveira, PharmD; Patrícia Maciel; Claudia Gaspar; João Radvany, MD; David Chitayat, MD; Riyana Babul, MSc; John Stewart, MD; Michele Dolliver, MSc; Yves Robitaille, MD; Guy A. Rouleau, MD, PhD; Jorge Sequeiros, MD, PhD

Background: Machado-Joseph disease (MJD) is a type of autosomal dominant spinocerebellar ataxia for which molecular diagnosis is available. We identified 4 families segregating the *MJD* mutation in which no unequivocal clinical diagnosis could be established prior to molecular testing. Ethnic background, clinical, and molecular characteristics of 19 individuals carrying the *MJD* mutation in these 4 families were compared with a group of 32 Portuguese families who were clinically diagnosed as having MJD and were found to carry the *MJD* mutation.

Results: Several factors seemed to have an impact in the accuracy of the clinical diagnosis, such as ethnic origin; the number of affected individuals available for examination in each family; the absence of patients showing specific clinical features, such as extrapyramidal signs; and the size of the expanded CAG repeat in the *MJD* gene.

Conclusion: Since the recognition of MJD based solely on clinical grounds might sometimes be misleading, a search for the *MJD* mutation should be performed in patients with a clinical diagnosis of spinocerebellar degeneration.

Arch Neurol. 1996;53:1168-1174

From the Centre for Research in Neuroscience, The Montreal General Hospital Research Institute, McGill University, Montreal, Quebec (Drs Lopes-Cendes, Silveira, and Rouleau and Mss Maciel and Gaspar); UnIGENe, IBMC, and Laboratório de Genética Médica, ICBAS and Universidade do Porto, Porto, Portugal (Drs Silveira and Sequeiros and Mss Maciel and Gaspar); Neurologia, Hospital Albert Einstein, São Paulo, Brazil (Dr Radvany); Division of Clinical Genetics, Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario (Dr Chitayat and Ms Babul); Montreal Neurological Institute and Hospital, McGill University, Montreal (Dr Stewart); Department of Genetics, Kaiser Hospital, Sacramento, Calif (Ms Dolliver); and University of Montreal, Montreal (Dr Robitaille).

MACHADO-JOSEPH disease (MJD) is an autosomal dominant multisystem degeneration manifested as a form of spinocerebellar ataxia (SCA). It was first reported in North American families of Portuguese-Azorean descent[1-4] and has been shown to occur mainly in families with Portuguese background in different parts of the world.[5] Other clusters have been reported in Japan, China, India, Australia, France, and Germany.[6] Clinically, MJD is characterized by a progressive cerebellar ataxia with associated features, such as external ophthalmoplegia, pyramidal signs, dystonic postures, distal muscular atrophies, eyelid retraction, faciolingual fasciculations, and no mental impairment.[7] In Portuguese patients the mean age at onset is 40.5 years and the mean duration of the disease is 15.6 years, ranging from 7 to 29 years.[6,8] The different clinical expressions of MJD resulted in its classification into 3 clinical subtypes[9]: type 1 shows an earlier onset and a rapid course, and patients have marked pyramidal signs and extrapyramidal signs besides the common features of ataxia and ophthalmoplegia; type 2, the most common subtype, is a more benign form with clinical manifestation limited to cerebellar ataxia, pyramidal signs, and ophthalmoplegia; and type 3 shows a later onset and a very slow progression of the disease, which is characterized mainly by peripheral signs in addition to the features of type 2.

The *MJD* locus was first mapped to chromosome 14q in Japanese pedigrees.[10] It was also found to assign to the same chromosomal region in Portuguese families.[11,12] Recently, the expansion of a trinucleotide CAG repeat localized in the coding region of the *MJD* gene was identified as the causative mutation.[13] Therefore, it is now possible to identify patients with MJD by direct molecular testing.

It has been debated whether MJD could be clinically distinguished from other autosomal dominant SCAs.[14-19] We have now identified 4 families segregating the *MJD* mutation. In 3 of these families there was no clinical diagnosis of MJD and in the fourth it was equivocal. The aim of this study was to compare the ethnic origin and the clinical and molecular characteristics in these 4 families with a group of 32 families of

See Patients and Methods on next page

PATIENTS AND METHODS

A total of 31 individuals belonging to 4 unrelated kindreds were examined, 19 of whom were considered affected based on neurological examination. Blood samples from 27 individuals were collected for molecular genetic studies. The **Table** summarizes the main clinical findings, and **Figure 1** shows reduced pedigrees of the families studied.

FAMILY B3

This is a Brazilian family of Portuguese ancestry with origin in the central region of mainland Portugal. We examined 8 patients as well as 11 relatives at risk. Clinical presentation was homogeneous within this family, with onset between ages 42 and 55 years. All patients began with gait ataxia, followed several years later by limb incoordination, dysarthria, and dysphagia. Nystagmus was present in 7 patients, 2 of whom also had limitation of the upward gaze (III-8 and IV-1) and bulging eyes (III-8 and III-9). Distal amyotrophies were seen in 1 patient only (III-8), who also showed muscle fasciculations in his trunk and limbs. Bilateral Babinski signs were present in 6 individuals. Deep tendon reflexes were globally absent in the lower limbs of 4 patients, whereas 1 patient had absent ankle jerk with preservation of the other deep tendon reflexes in lower limbs (III-9). Decreased joint and position senses were seen in 7 individuals. Patient III-8 had also some mild dystonic posturing. Magnetic resonance imaging (MRI) showed cerebellar atrophy as well as multiple lacunes in the basal ganglia. Patient III-9 had a computed tomographic scan showing cerebellar atrophy.

FAMILY C1

This is a Chinese family with 8 affected individuals identified in 3 generations. Ages at onset varied from 28 to 40 years. Gait ataxia was the first symptom in all patients and progression of the disease has been relatively slow. One patient had the onset of gait ataxia at 28 years of age (III-1) and developed limb ataxia after 6 years of evolution. Patient III-4 is wheelchair bound with severe ataxia. He also showed discrete lid retraction and slowing of horizontal saccades, with limitation of the upward gaze and horizontal nystagmus. Bilateral Babinski signs were present. An MRI performed in the first year of symptoms showed mild cerebellar atrophy. Patient III-3 had normal neurological examination but the MRI scan showed cerebellar atrophy.

FAMILY C2

This is a Canadian family originally from the British West Indies, with mixed Dutch, French, and African ancestry. We examined 3 affected individuals,with ages at onset of 40, 50, and 65 years. Gait ataxia was the first complaint in all 3 patients. Two individuals had a slow progression of their symptoms (II-1 and III-1), whereas patient II-4 had a slightly more severe disease and died recently after 35 years of disease evolution. His neurological examination 20 years after disease onset showed marked gait and limb ataxia, dysarthria, ocular dysmetria, amyotrophies of both hands, globally absent tendon reflexes in lower limbs, and decreased vibration sense in all extremities. Autopsy was performed and the results showed mild to moderate involvement of the subthalamic nucleus, substantia nigra, principal olivary nucleus, and cerebellar cortex, as well as severe atrophy of the pontine nuclei, middle cerebellar peduncules, 3rd and 12th nerve nuclei, and severe loss of motor neurons at the cervical and lumbosacral enlargements (**Figure 2** and **Figure 3**). On clinical examination, patient II-1 showed severe gait and limb ataxia, dysarthria, horizontal nystagmus, impaired upward gaze, tendon reflexes that were globally absent, and vibration and position senses that were decreased in lower limbs; MRI showed marked atrophy of the pons and brain stem, moderate atrophy of cerebellar vermis and hemispheres, and mild atrophy of inferior olives (**Figure 4** and **Figure 5**).

FAMILY G1

This is an American family of German background. Blood samples were obtained from 1 living affected individual in this family; however, clinical information was available also for her dead mother. Two siblings had normal neurological examinations (III-2 and III-3). Their affected mother died at 54 years of age, very disabled, after 20 years of disease evolution (II-1). She developed progressive ataxia at 35 years. A neurological examination 10 years after onset of the disease showed gait and limb ataxia, as well as severe dysarthria. Reflexes were brisk in the upper extremities, decreased in the knees, and absent in the ankles. Vibration and joint position sense were normal. Her daughter (III-1) began to have gait ataxia at 35 years of age; the results of an MRI performed 1 year after the onset of symptoms were considered normal.

MOLECULAR STUDIES

Genomic DNA was obtained by direct extraction from lymphocytes of fresh blood samples.[21]

The primer sequences MJD 52 and MJD 25[13] were used for detection of the CAG repeat in the *MJD* gene. Polymerase chain reaction was performed in a total volume of 20 μL, with 100 ng of genomic DNA; 120 ng of each primer; 200-μm deoxyguanosine triphosphate, deoxycytidine triphosphate, and deoxythymidine triphosphate; 25-μm deoxyadenosine triphosphate; 92 500 Bq[^{35}S] deoxyadenosine triphosphate; 3 U of *Taq* DNA polymerase (Perkin-Elmer, Foster City, Calif) and 2.0 μL of ×10 buffer with magnesium chloride included in the final concentration of 1.5 mmol/L; and 10% dimethyl sulfoxide and 0.1% Triton X-100. Samples were processed throughout 32 cycles of denaturation, annealing, and elongation at different temperatures.[13] Polymerase chain reaction products were analyzed on 6% denaturing polyacrylamide gel. Gels were dried and exposed to x-ray films at room temperature for 48 hours. Allele sizes were determined by comparing migration relatively with an M13 sequencing ladder.

The number of CAG repeats in the *MJD* gene in the affected individuals and individuals at risk in the 4 families was compared with a group of 150 MJD chromosomes identified in 32 previously reported families of Portuguese ancestry who had been clinically recognized with MJD.[20] Normal chromosomes contain between 12 to 37 CAG units, whereas *MJD* gene carriers have alleles with 62 to 84 CAG repeats.[20] Linear regression analysis was used to determine the relationship between repeat number and the age at onset of the disease. Differences in size of the CAG repeat among groups were assessed by analysis of variance and post hoc tests.

Main Clinical Features of the 4 Families (B3, C1, C2, and G1) and the Patients With MJD and "SCA 3"*

Families and Patients	No.	Mean Age at Onset, y	Clinical Features, %								
			Cerebellar Ataxia	Abnormal Eye Movements	Faciolingual Fasciculations	Amyotrophy	Dystonic Movements	Pyramidal Signs	Impairment of Vibration	Dementia	Parkinsonian Features
Family											
B3	8	47	100	100	0	12	12	75	12	0	0
C1	4	33	75	75	0	0	0	75	0	0	0
C2	3	53	100	67	0	67	0	33	67	0	0
G1	2	35	100	100	0	0	0	100	0	0	0
Patient disease (origin)											
MJD (Portuguese)[6]†	143	40	98	91	54	28	29	79	29	0	3
MJD (Japanese)[24]	69	36	99	57	51	26	28	75	36	6	?
"SCA 3" (French)[15]	28	36	100	43	4	11	7	50	62	11	7
"SCA 3" (German)[27]	30	37	100	37	10	23	3	40	70	10	?

*No. indicates number of affected individuals examined; MJD, Machado-Joseph disease; and SCA 3, spinocerebellar ataxia type 3. For explanations of B3, C1, C2, and G1, see the "Patients and Methods" section.

†Data presented in reference 6 were partially revised by Sequeiros and Coutinho.

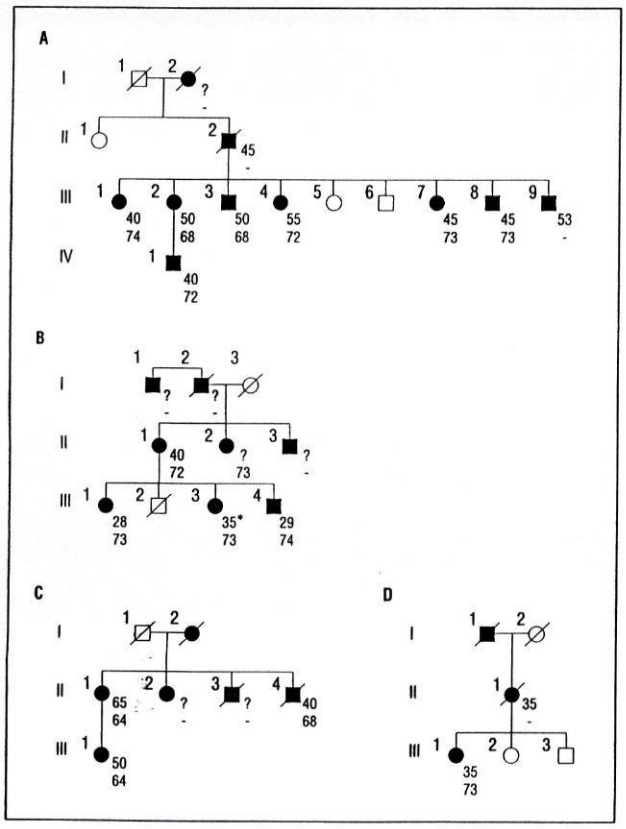


Figure 1. *Reduced pedigrees of the 4 families carrying the Machado-Joseph disease mutation. A indicates family B3; B, family C1; C, family C2; and D, family G1. Blackened symbols indicate affected individuals; hatched symbols, possibly affected individuals based on clinical examination; diagonal lines, dead individuals; numbers below symbols, age at onset of symptoms and number of expanded CAG repeats found in the Machado-Joseph disease gene, respectively; question marks, information not available; dash, CAG typing was not performed; and asterisk, patient III-3 in family C1 had normal neurological examination results; however, magnetic resonance imaging showed cerebellar atrophy.*

Portuguese extraction who had been previously diagnosed as having MJD and found to carry the *MJD* mutation.[20] This is likely to shed new light into the clinical differential diagnosis among the various SCAs, which share many of their clinical features.

RESULTS

The 4 families studied were from different ethnic origins; none of them had Azorean ancestry and only family B3 was of Portuguese (mainland) background.

All patients examined could be classified as MJD type 2 or 3. In family B3, 4 individuals showed clinical characteristics of type 3, with the presence of peripheral signs and an older age at onset; however, only 1 patient (III-8) could be unequivocally classified as type 3; the other 3 patients will require a longer follow-up for confirmation of the clinical subtype. In family C1, all 3 clinically affected individuals, from whom good clinical information was available, were classified as MJD type 2; however, there were 2 patients who had the disease onset approximately 5 years ago (III-1 and III-4) and will require a longer follow-up for confirmation. Two patients in family C2 (II-1 and II-4) were classified as type 3; the third patient (III-1), who had the onset of the disease very recently, was classified as MJD type 2. In family G1, the 2 patients were classified as type 2. There were no patients who could be classified as type 1 in any of the families.

In 13 transmissions, ages at onset were known in both parent and offspring, and anticipation occurred in 5 (46%) of them.

Nineteen individuals (6 men and 13 women) had an expanded CAG repeat in the *MJD* gene (range, 64-74 CAGs); 15 of them were clinically affected. The number of CAG repeats for all patients tested is shown in the respective pedigrees (Figure 1). Three relatives at risk (not shown) in 1 of the families also had an expanded allele (range, 72-74 CAGs). The mean number of repeats was 71.3 (71.2 for men and 71.3 for women). Mild instability of the CAG tract was seen in 5 of 8 transmissions (all of which were maternal): the CAG tract increased in size from 1 to 4 CAG units (mean change, +1.50 units). There was an inverse correlation between the number of CAGs and the age at onset of symptoms (r, −0.69; R^2, 0.48; P=.006), as shown in **Figure 6**.

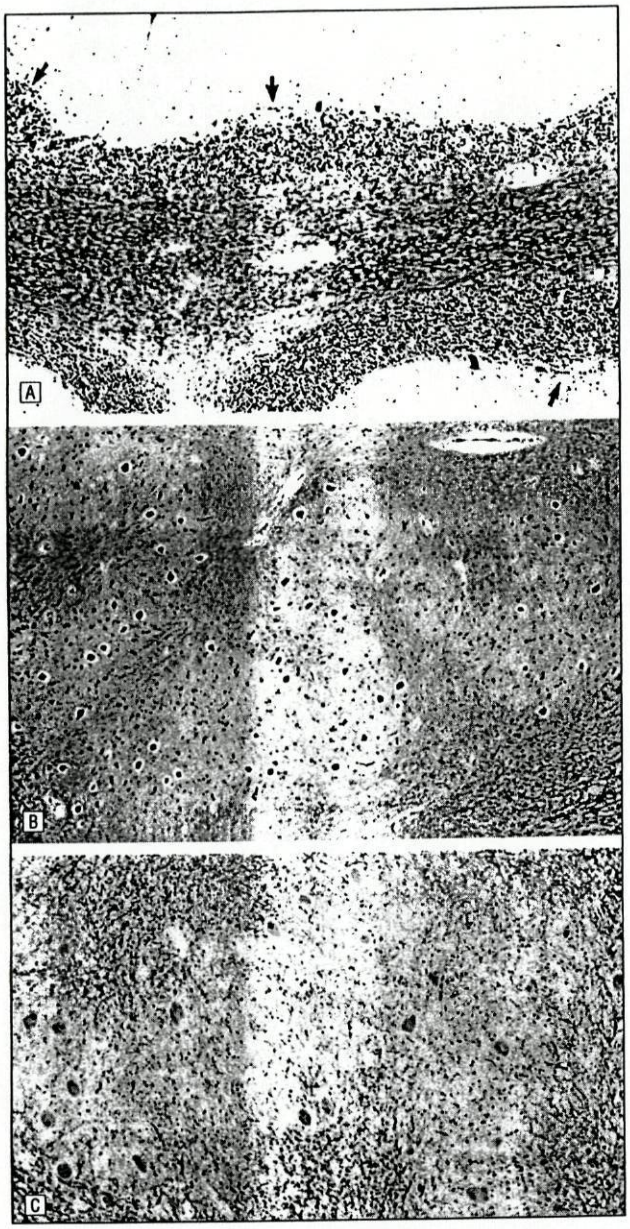


Figure 2. *Representative sections of rhombencephalon from patient II-4 with Machado-Joseph disease from family C2. A, Klüver-Barrera stain of lateral cerebellar cortex; there is mild to moderate depletion of Purkinje cells associated with multifocal hypertrophy of Bergmann glia (arrows). The folial white matter shows focal wallerian degeneration with myelin loss. Perifolial sulci were only marginally enlarged. B, Klüver-Barrera stain of ipsilateral main olivary nucleus. Mild neuronal loss is observed, with a prominent dark neuron effect. C, Klüver-Barrera stain of ipsilateral dentate nucleus. Mild loss of neurons is observed (A-C, magnification ×100).*

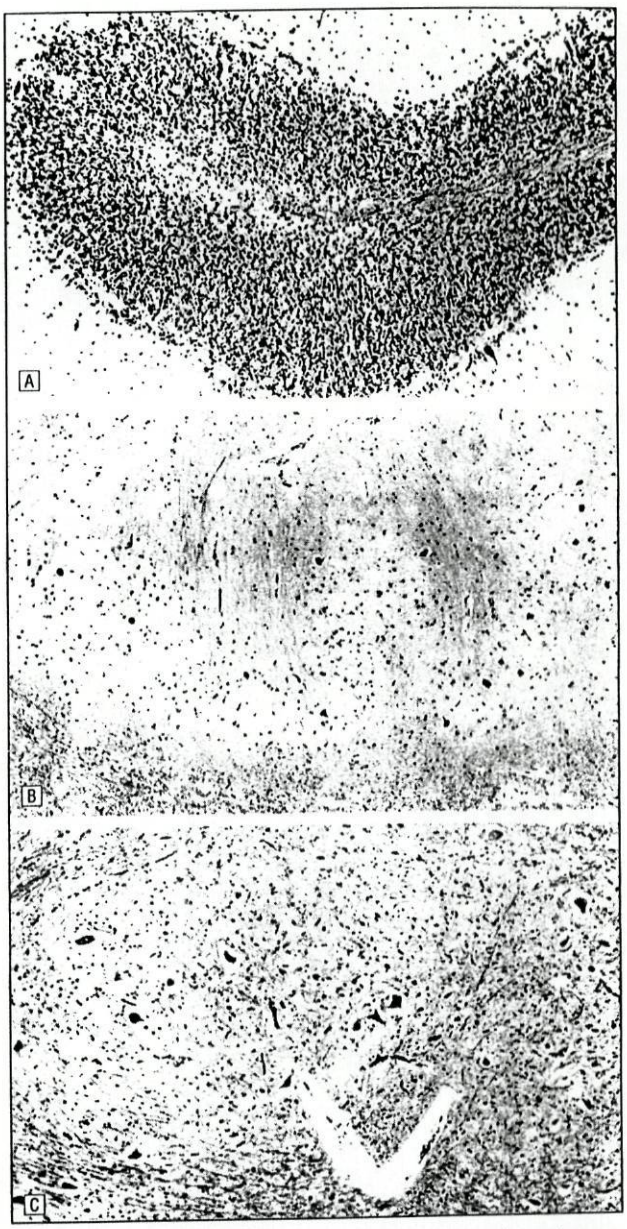


Figure 3. *Representative sections of rhombencephalon in olivopontocerebellar degeneration (patient with spinocerebellar ataxia 1 from the Schut kindred). A, Klüver-Barrera stain of lateral cerebellar cortex. A marked, diffuse loss of Purkinje cells, largely sparing the granule cell layer, is observed. A continuous, strong hypertrophy of Bergmann glia is noticed. There is extensive and severe wallerian degeneration of folial white matter. Perifolial sulci were enlarged in a diffuse manner spanning all lateral cerebellar hemispheres, with partial sparing of the flocculonodular lobule. B, Klüver-Barrera stain of ipsilateral main olivary nucleus. Severe neuronal loss and gliosis is obvious. C, Klüver-Barrera stain of ipsilateral dentate nucleus. A marked loss of neurons with reactive gliosis is observed, with a prominent dark neuron effect involving the few preserved neuronal cell bodies (A-C, magnification ×100).*

The control group of 150 MJD chromosomes showed a mean size of 73.43 CAGs, with different means for type 1, 76.2; type 2, 73.3; and type 3, 72.1 ($P=.02$).[20] Pairwise comparisons showed that the CAG tract in types 2 and 3 was significantly different from that in type 1 ($P=.05$ and $P=.008$, respectively); however, types 2 and 3 showed no significant difference between them ($P=.31$).

Comparison of the mean size of the CAG tract between the group of 19 individuals carrying the *MJD* mutation in the 4 families and the 150 MJD chromosomes of the control group showed a significant difference ($P=.02$). In addition, when we performed pairwise comparisons between the group of 14 clinically affected individuals (for whom detailed clinical information was available), all of whom could be classified as type 2 or 3, and in the 3 clinical subtypes of the control group, significant differences were seen with control type 1 ($P=.001$), but not with control type 2 or 3 ($P>.05$ and $P=.54$, respectively).

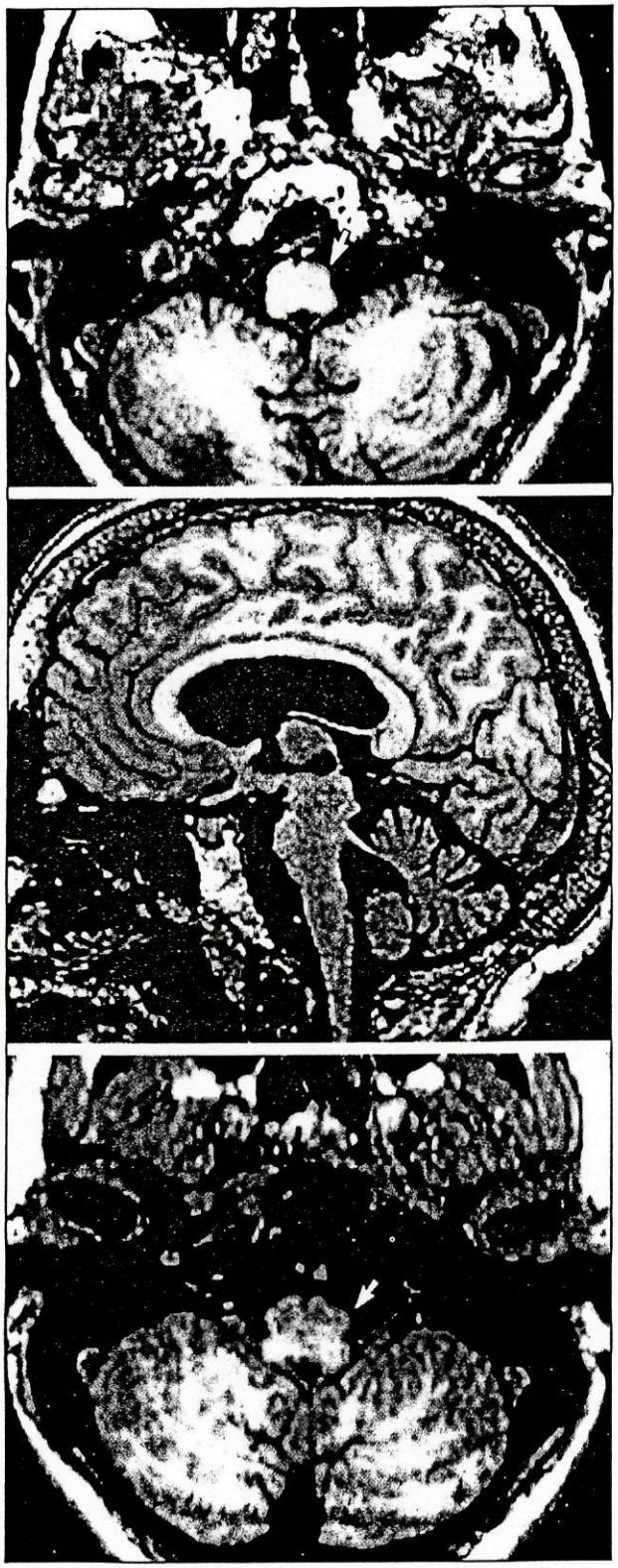


Figure 4. *Magnetic resonance imaging scans obtained using T_1-weighted gradient-echo volume acquisition (repetition time, 18 milliseconds; echo time, 10 milliseconds; $\alpha=30°$) with contiguous 1-mm sagittal images. Top, Axial view and center, sagittal view from patient II-1, family C2; and bottom, axial view from a normal subject. Top, The axial plane at the level of the brain stem shows a mild atrophy of inferior olives (arrow) and a significant reduced diameter of the brain stem compared with the normal subject (bottom). The arrows on the top and bottom indicate left inferior olives. Center, The sagittal view shows a moderate cerebellar atrophy involving vermis and hemispheres as well as severe atrophy of the pons and brain stem. There is also some degree of diffuse cortical cerebral atrophy.*

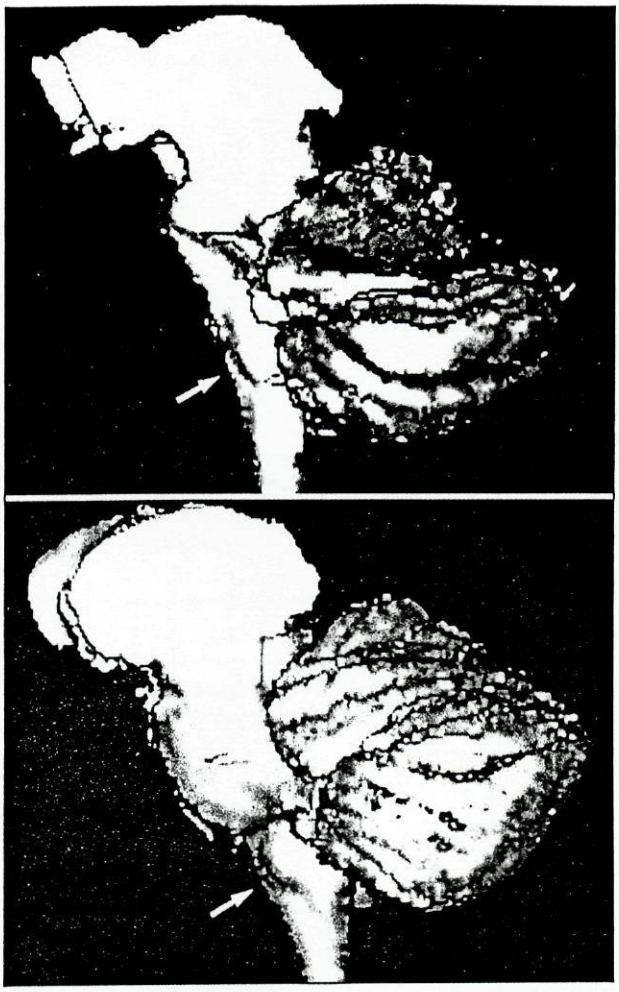


Figure 5. *Three-dimensional reconstructions from magnetic resonance imagings shown in Figure 4, using a Gyroview graphic workstation (Philips Medical Systems, Best, the Netherlands). Top, Patient II-1 from family C2; bottom, normal subject. Arrows indicate the inferior olives. It is clear that the olivary atrophy is less pronounced compared with the degree of atrophy of the surrounding structures, ie, pons, brain stem, and cerebellum. Note that the inferior olive (top) has an apparent greater cranial-caudal extension. This is because the pronounced atrophy of the pons (top) permits the visualization of the most cranial aspect of the inferior olive, which is normally hidden by the bulk of the pons (bottom).*

COMMENT

It has been well established that the geographical or ethnic origin of patients plays an important role in the clinical diagnosis of several disorders that affect preferentially certain ethnic groups. Machado-Joseph disease is a good example of such a disorder, since it has been strongly associated with the Azorean populations.[4,7] Only 1 of the families presented herein was of Portuguese, but not of Azorean, origin (family B3). In this family the initial clinical diagnosis was presumed to be MJD[22] and later easily challenged when linkage analysis with markers surrounding the SCA 1 locus on chromosome 6p resulted in low-positive lod scores (maximum lod score, 0.835 at $\theta=0.0$ with marker D6S89 and z max, 1.925 at $\theta=0.0$ with marker D6S260).[23] The other 3 families were from ethnic groups in which no cases (or at most only a few suspected cases) had been reported in the literature at the time of their clinical diagnosis.[6]

The majority of patients with MJD can be classified as type 2.[6,9,24] Less than one third of patients with MJD have predominant extrapyramidal or peripheral signs, which characterize types 1 and 3, respectively.[6,9] Type 2 may be transitional, since all patients start as type 2; some later evolve to either type 1 or 3, while the majority remain as type 2 all their lives. Type 2 MJD is the most frequent, but the less characteristic form of the disease, since it shares most of its clinical features (ie, cerebellar ataxia, ophthalmoplegia, and pyramidal signs) with the other SCAs.[25] All 14 patients in the 4 families, from whom good clinical information was available, could be classified as type 2 or 3.

There are other clinical features that may be less frequent but are more characteristic of MJD. One of those findings, which occurs in about one fourth of the Portuguese patients, is the staring aspect of the eyes associated with retraction of the eyelids and leading to the characteristic appearance of bulging eyes.[9] We detected this feature in 4 individuals of 3 different families (III-8 and III-9 in family B3; III-4 in family C1; and II-1 in family C2). Dystonic posturing is seen in less than 30% of patients with MJD[6,9,24] (Table) and could be detected in only 1 patient in the 4 families studied (III-8, family B3). Another typical feature of some patients with MJD, faciolingual fasciculations[6,9,24] (Table), was not found in any of the 14 patients studied.

We found pathological and MRI evidence of mild to moderate atrophy in the cerebellar cortex and inferior olives of 2 patients from the C2 family (Figures 2 through 5). These findings are not considered to be typical of MJD and most authors[14,25] would exclude this diagnosis in the presence of olivary atrophy. It may be just a matter of duration of the disease whether one can detect some degree of atrophy by MRI or pathological features. Indeed, both our patients showed a long evolution of MJD type 3. The cortical cerebellar and olivary atrophies seen were much less severe than what is usually observed in patients with typical olivopontocerebellar atrophy (Figures 2 and 3).[26]

There have been reports[15,16,27] of French and German families who carry the *MJD* mutation but who, according to the authors, present a different phenotype (SCA 3) when compared with patients with MJD. Three major features are said to differentiate these "2" disorders: the absence of Portuguese ancestry, the absence of extrapyramidal features, and the atrophy of the inferior olives in patients with "SCA 3." With the availability of direct testing for the *MJD* mutation, many patients from different origins have been found to carry the *MJD* mutation,[5,28] showing clearly that MJD is not limited to the Portuguese population. Extrapyramidal features, mainly dystonic posturing, occur in a relatively small percentage of Portuguese and Japanese patients with MJD (<30%); thus, the clinical diagnosis of MJD should not be excluded by the absence of such features. Furthermore, we have shown that 2 patients carrying the *MJD* mutation and presenting clinically with MJD type 3 had mild to moderate atrophy of their inferior olives. Therefore, we believe that there is no reason for continuing to differentiate "SCA 3" from MJD both on clinical and genetic grounds.

In our study, the mean number of CAG repeats in the MJD chromosomes of the 19 individuals carrying the mutation was smaller compared with the group of 150 Portuguese MJD chromosomes (mean, 71.3 and 73.4, respectively). Since the number of CAG repeats in the *MJD* gene is inversely correlated with age at onset and severity of the disease,[20] smaller expanded alleles could have resulted in a milder disease presentation in our patients, making the clinical diagnosis more difficult. In addition, pairwise comparisons according to clinical subtype in 14 patients showed differences with controls who had MJD type 1, but not with types 2 and 3. These results are consistent with the clinical features of our patients (all type 2 or 3) and confirm previous findings of a relationship between the size of the expanded CAG repeat and MJD subtypes.[20]

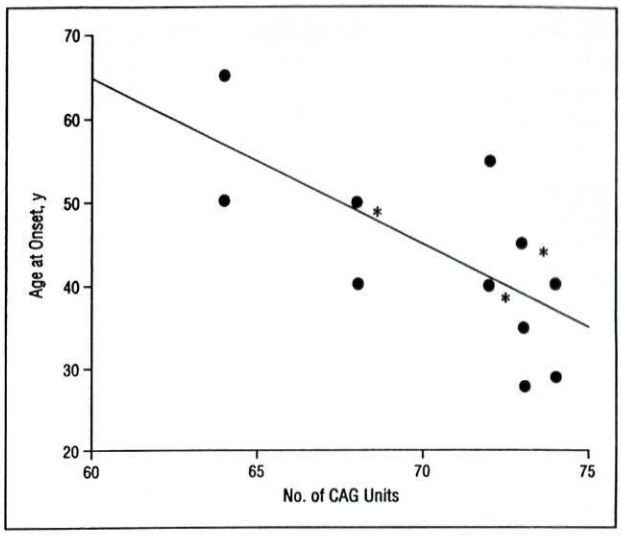


Figure 6. *Correlation of CAG repeat length in the Machado-Joseph disease chromosomes of 14 affected individuals in the 4 families with age at onset of the disease (r, −0.69; R^2, 0.48; P=.006). Asterisks indicate that there are 2 points superimposed. Note that patient III-3 from family C1 was excluded from this analysis.*

Interestingly, the percentage of variability in age at onset that could be explained by the size of the expanded CAG repeat in the *MJD* genes of our 14 patients was similar to that found in our control group (48% and 46%, respectively),[20] suggesting that other genetic or environmental factors may also be involved in determining the clinical presentation and evolution of the disease in patients with MJD.

We[5] and others[29] believe that MJD is a well-defined clinical entity that often can be differentiated from other cases of dominant ataxias. This is particularly true when its full-blown clinical picture is present in 1 or more patients of the same family. Diagnosis is usually easier in MJD type 1; in patients with dystonic posturing, bulging eyes, and faciolingual fasciculations; in larger families; and in patients originating from regions where MJD has a higher prevalence. Some cases of types 2 and 3, particularly in the early stages of the disease and when the minor but more specific signs are missing, may be more difficult to distinguish from other SCAs, particularly if the ethnic or geographical origin is thought to be unusual and if they are isolated or belong to a small family. In some of these cases the clinical diagnosis of MJD cannot be made and may not be suspected.

In conclusion, although most patients with SCA will have some clinical characteristics in common, the occurrence of at least 2 different clinical subtypes, and some minor but more specific findings (ie, bulging eyes, dystonic posture, and faciolingual fasciculations), will help make the clinical diagnosis of MJD possible. In addition, we believe that in patients with spinocerebellar degeneration with no previous molecular diagnosis, a test for the *MJD* mutation should be performed regardless of geographical or ethnic origin.

Accepted for publication July 9, 1996.

This study was supported by the Joint Program FRSQ-ACAF (Fonds de la Recherche en Santé du Québec and Association Canadienne de l'Ataxie de Friedreich), the National Institutes of Health, Bethesda, Md (grant NS 31687), and the Network of Centres of Excellence (Canadian Genetic Disease Network, Vancouver, British Columbia). Dr Lopes-Cendes is supported by a fellowship from the Savoy Foundation, Montreal, Quebec. Dr Silveira and Mss Maciel and Gaspar are recipients of a scholarship from Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica, Lisbon, Portugal. Dr Rouleau is supported by the Medical Research Council of Canada and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. We are grateful to Stephen Kish, PhD, Clarke Institute of Psychiatry, Toronto, Ontario, for his wholehearted support of this work, which was, for neuropathological evaluations, covered by grant 26034 from the National Institute of Neurological Disorders and Stroke, Bethesda.

We thank Alexandre Bastos, MD, and Fernando Cendes, MD, for providing the MRI photographs and Paula Coutinho, MD, PhD, for a careful review of the manuscript.

Reprints: Iscia Lopes-Cendes, MD, Centre for Research in Neuroscience, The Montreal General Hospital Research Institute, Room L12-132, 1650 Cedar Ave, Montreal, Quebec, Canada H3G 1A4.

REFERENCES

1. Nakano KK, Dawson DM, Spence A. Machado disease: a hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. *Neurology.* 1972;22:49-55.
2. Woods BT, Schaumburg HH. Nigro-spino-dentatal degeneration with nuclear ophtalmoplegia: a unique and partially treatable clinicopathological entity. *J Neurol Sci.* 1972;17:149-166.
3. Rosenberg RN, Nyhan WL, Bay C, Shore P. Autosomal dominant striato-nigral degeneration: a clinical, pathological and biochemical study of a new genetic disorder. *Neurology.* 1976;26:703-714.
4. Romanul FCA, Fowler HL, Radvany J, Feldman RG, Feingold M. Azorean disease of the nervous system. *N Engl J Med.* 1977;296:1505-1508.
5. Silveira I, Lopes-Cendes I, Kish S, et al. Frequency of spinocerebellar ataxia type 1, dentatorubropallidoluysian atrophy and Machado-Joseph disease mutations in a large group of spinocerebellar ataxia patients. *Neurology.* 1996; 46:214-218.
6. Sequeiros J, Coutinho P. Epidemiology and clinical aspects of Machado-Joseph disease. In: Harding AE, Deufel T, eds. *Inherited Ataxias.* New York, NY: Raven Press; 1993;61:139-153.
7. Coutinho P, Andrade C. Autosomal dominant system degeneration in Portuguese families of the Azores islands: a new genetic disorder involving cerebellar, pyramidal, extrapyramidal and spinal cord motor functions. *Neurology.* 1978;28:703-709.
8. Sequeiros J. Machado-Joseph disease: epidemiology, genetics, and genetic epidemiology. In: Lechtenberg R, ed. *Handbook of Cerebellar Diseases.* New York, NY: Marcel Dekker Inc; 1993:345-351.
9. Lima L, Coutinho P. Clinical criteria for diagnosis of Machado-Joseph disease: report of a non-Azorean Portuguese family. *Neurology.* 1980;30:319-322.
10. Takiyama Y, Nishizawa M, Tanaka M, et al. The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q. *Nature Genet.* 1993;4:300-304.
11. Sequeiros J, Silveira I, Maciel P, et al. Genetic linkage studies of Machado-Joseph disease with chromosome 14q STRPs in 16 Portuguese-Azorean kindreds. *Genomics.* 1994;21:645-648.
12. Twist EC, Casaubon LK, Ruttledge MH, et al. Machado-Joseph disease maps to the same region of chromosome 14 as the spinocerebellar ataxia type 3 locus. *Am J Med Genet.* 1995;32:25-31.
13. Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, et al. (CAG) expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature Genet.* 1994;8: 221-228.
14. Rosenberg RN. Autosomal dominant cerebellar phenotypes: the genotype has settled the issue. *Neurology.* 1995;45:1-5.
15. Cancel G, Abbas N, Stevanin G, et al. Marked phenotypic heterogeneity associated with expansion of a (CAG) repeat sequence at the spinocerebellar ataxia 3/Machado-Joseph disease locus. *Am J Hum Genet.* 1995;57:809-816.
16. Haberhausen G, Damian MS, Leweke F, Müller U. Spinocerebellar ataxia type 3 (SCA 3) is genetically identical to Machado-Joseph disease (MJD). *J Neurol Sci.* 1995;132:71-75.
17. Harding AE. Clinical features and classification of inherited ataxias. In: Harding AE, Deufel T, eds. *Inherited Ataxias.* New York, NY: Raven Press; 1993:1-14.
18. Currier RD, Subramony SH. Is it possible to differentiate clinically the ataxias? Presented at the Third International Workshop on Machado-Joseph Disease; April 8, 1994; Furnas, São Miguel, Azores.
19. Dürr A, Stevanin G, Chneiweiss H, et al. ADCA type I: mapping of the third locus SCA3 and absence of genotype-phenotype correlation. Presented at the Third International Workshop on Machado-Joseph Disease; April 9, 1994; Furnas, São Miguel, Azores.
20. Maciel P, Gaspar C, DeStefano A, et al. Correlation between (CAG) repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *Am J Hum Genet.* 1995;57: 54-61.
21. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
22. Radvany J, Avila JO, Gabbai AA, Bacheschi LA. Doenca de Machado-Joseph no Brasil: o relato das primeiras duas familias. *Arq Neuropsiquiatr (Sao Paulo).* 1988;46(suppl 1):46B.
23. Radvany J, Camargo CHP, Costa ZM, Fonseca NC, Nascimento ED. Machado-Joseph disease of Azorean ancestry in Brazil: the Catarina kindred. *Arq Neuropsiquiatr (Sao Paulo).* 1993;51:21-30.
24. Sasaki H, Wakisaka A, Takada A, et al. Mapping of the gene for Machado-Joseph disease within a 3.6-cm interval flanked by D14S291/D14S280 and D14S81, on the basis of studies of linkage and linkage disequilibrium in 24 Japanese families. *Am J Hum Genet.* 1995;56:231-242.
25. Harding AE. *The Hereditary Ataxias and Related Disorders.* New York, NY: Churchill Livingstone Inc; 1984.
26. Robitaille Y, Schut L, Kish SJ. Structural and immunocytochemical features of olivopontocerebellar atrophy caused by the SCA1 mutation define a unique phenotype. *Acta Neuropathol.* 195;90:572-581.
27. Schöls L, Vieira-Saecker AMM, Schöls S, et al. Trinucletide expansion within the MJD1 gene presents clinically as spinocerebellar ataxia and occurs most frequently in German SCA patients. *Hum Mol Genet.* 1995;6:1001-1005.
28. Ranum LPW, Lundgren JK, Schut LJ, et al. Spinocerebellar ataxia type 1 and Machado-Joseph disease: incidence of (CAG) expansions among adult-onset ataxia patients from 311 families with dominant, recessive and sporadic ataxia. *Am J Hum Genet.* 1995;57:603-608.
29. Currier RD, Subramony SH. Distinguishing between the adult ataxias. In: Lechtenberg R, ed. *Handbook of Cerebellar Diseases.* New York, NY: Marcel Dekker Inc; 1993:337-343.

Printed and Published in the United States of America

ARTIGO VI - CLINICAL AND MOLECULAR CHARACTERISTICS OF A BRAZILIAN FAMILY WITH SPINOCEREBELLAR ATAXIA TYPE 1 (SCA1).

I. Lopes-Cendes, C.E. Steiner, **I. Silveira**, W. Pinto-Júnior, J.A. Maciel & G.A. Rouleau.

Arquivos de Neuro Psiquiatria 1996; 54:412-418.

Arq Neuropsiquiatr 1996;54(3): 412-418

CLINICAL AND MOLECULAR CHARACTERISTICS OF A BRAZILIAN FAMILY WITH SPINOCEREBELLAR ATAXIA TYPE 1

ISCIA LOPES-CENDES, CARLOS E. STEINER**, ISABEL SILVEIRA***, WALTER PINTO-JÚNIOR****, JAYME A. MACIEL*****, GUY A. ROULEAU*******

ABSTRACT - The spinocerebellar ataxias (SCAs) are a clinically and genetically heterogeneous group of late onset neurodegenerative disorders. To date, seven different genes causing autosomal dominant SCA have been mapped: *SCA1*, *SCA2*, *Machado-Joseph disease* (*MJD*)/*SCA3*, *SCA4*, *SCA5*, *SCA7* and *dentatorubropallidoluysian atrophy* (*DRPLA*). Expansions of an unstable trinucleotide CAG repeat cause three of these disorders: *SCA1*, *MJD/SCA3* and *DRPLA*. We studied one Brazilian family segregating an autosomal dominant type of SCA. A total of ten individuals were examined and tested for the presence of the *SCA1*, *MJD* and *DRPLA* mutations. Three individuals, one male and two females, were considered affected based on neurological examination; ages at onset were: 32, 36 and 41 years. The first complaint in all three patients was gait ataxia which progressed slowly over the years. Six individuals showed one allele containing an expanded CAG repeat in the *SCA1* gene. The mean size of the expanded allele was 48.2 CAG units. Instability of the expanded CAG tract was seen in the two transmissions that were observed in this family. In both occasions there was a contraction of the CAG tract. Our study demonstrates that SCA1 occurs in the Brazilian population. In addition, our results stress the importance of molecular studies in the confirmation of diagnosis and for pre-symptomatic testing in SCAs.

KEY WORDS: neurodegenerative disease, spinocerebellar ataxia, trinucleotide expansion.

Características clínicas e moleculares de uma família brasileira com ataxia espinocerebelar tipo 1

RESUMO - As ataxias espinocerebelares (AECs) fazem parte de um grupo de doenças neurodegenerativas que apresentam grande heterogeneidade clínica e genética. Existem até o momento sete genes mapeados responsáveis pelas AECs de transmissão autossômica dominante: *SCA1*, *SCA2*, *doença de Machado-Joseph* (*DMJ*) ou *SCA3*, *SCA4*, *SCA5*, *SCA7* e *atrofia dentatorubropalidoluisiana* (*ADRPL*). Uma expansão de um trinucletídeo CAG foi identificada como a mutação responsável na *SCA1*, *DMJ* e *ADRPL*. Estudamos uma família brasileira com uma forma autossômica dominante de AEC. Dez indivíduos foram examinados e amostras de sangue foram colhidas para os estudos moleculares das mutações causadoras da SCA1, DMJ e ADRPL. Três membros da família foram considerados clinicamente afetados, um indivíduo do sexo masculino e dois do sexo feminino. A idade de início dos sintomas foi 32, 36 e 41 anos. Ataxia da marcha, lentamente progressiva, foi a primeira manifestação da doença nos três pacientes. Em seis indivíduos os estudos moleculares mostraram um alelo com expansão da sequência CAG contida no gene *SCA1*. O tamanho médio do alelo CAG expandido foi 48,2 unidades. O alelo *SCA1* expandido apresentou instabilidade nas duas trasmissões observadas, nas quais ocorreram contrações de uma e de seis unidades CAG. O nosso estudo mostra que a SCA1 ocorre na população brasileira. Além disso, os nossos resultados reforçam a importância dos estudos moleculares na confirmação diagnóstica e no diagnóstico pré-sintomático de pacientes com AEC.

PALAVRAS-CHAVE: doença neurodegnerativa, ataxia espinocerebelar, expansão de trinucleotídeo.

* MD, Centre for Research in Neuroscience, McGill University and The Montreal General Hospital Research Institute, Montreal (CRN-MGHRI), Quebec, Canada; MD, Departamento de Genética Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (FCM-UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil, *** Pharm D, CRN-MGHRI; **** MD, PhD, Departamento de Genética Médica, FCM-UNICAMP; ***** MD, PhD, Departamento de Neurologia, FCM-UNICAMP; ****** Md, PhD, CRN-MGHRI. Aceite: 10-maio-1996.

Dr. Iscia Lopes-Cendes - Centre for Research in Neuroscience, The Montreal General Hospital Research Institute, Room L12-132 - 1650 Cedar Ave.-Montreal, Quebec, Canada H3G 1A4. FAX 15514 9348265. E-mail: bke6@musicb.mcgill.ca

The spinocerebellar ataxias (SCAs) are a heterogeneous group of adult onset neurodegenerative disorders characterized clinically by progressive cerebellar ataxia with variable associated features including ophthalmoplegia, dysarthria, dysphagia, pyramidal and extrapyramidal signs. Genetically, these disorders can be divided into: autosomal recessive, autosomal dominant, and isolated cases. To date, seven different loci causing autosomal dominant SCA are mapped: the *SCA1* locus on chromosome 6p[12,39], the *SCA2* locus on chromosome 12q[7,16,21], the *Machado-Joseph disease* (*MJD*)/ *SCA3* locus on chromosome 14q[30,33,36,38], the *SCA4* locus on chromosome 16q[6], the *SCA5* locus on the centromeric region of chromosome 11[25], the *SCA7* locus on chromosome 3p[2,9] and the *dentatorubropallidoluysian atrophy* (*DRPLA*) locus on chromosome 12p[15]. However, there are families that do not map to any of these locations[17,37]. The mutations causing three of these disorders, *SCA1*[22], *MJD/SCA3*[3,14,19] and *DRPLA*[15], have been identified. In all three instances affected individuals have an expansion of a trinucleotide CAG repeat in the coding region of the disease genes.

The identification of these three mutations responsible for SCA allows us to recognize families that segregate *SCA1*, *MJD* or *DRPLA*, thus providing means for accurate classification and diagnosis of these disorders. We undertook this study in order to determine whether a mutation in one of the SCA genes identified (*SCA1*, *MJD* and *DRPLA*) was responsible for the disease in a Brazilian family with autosomal dominant SCA.

SUBJECTS

A total of ten individuals were examined and bloods were collected for molecular studies. All individuals in this family were enrolled in a genetic counseling program prior to the study and received supportive counseling throughout the clinical evaluation and molecular testing.

METHODS

DNA isolation

Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes using standard manual techniques[28].

PCR analysis

The published primer sequences: Rep1 and Rep2[22], MJD52 and MJD25[14], and B37 CAG repeat primer sequences[15] were used for detection of the *SCA1*, *MJD*, and *DRPLA* mutations, respectively. Polymerase chain reaction (PCR) was carried out in a total volume of 12.5µl, with 100ng of genomic DNA; 1µM of each primer; 200µM of dGTP, dCTP, dTTP and dATP; 1 unit of Taq polymerase and 2% formamide. Samples were processed through 30 to 32 cycles of denaturation, annealing, and elongation at different temperatures, as described previously[32]. PCR products were separated in 6% polyacrylamide gels. Gels were transferred into Hybond N+ nylon membranes and hybridized with a α-^{32}P 3'-end labelled $(CAG)_{15}$ probe. Allele sizes were determined by comparing migration relative to an M13 sequencing ladder. Patients previously identified with the *SCA1*, *MJD* and *DRPLA* mutations were used as positive controls in all analyses.

As previously reported for the *SCA1* gene, normal alleles have a size range of 6 to 39 CAG repeats, while affected alleles have 40 to 81 CAG repeats[4,8,13,20,23]. The normal *DRPLA* allele ranges from 8 to 25 CAGs, while in affected *DRPLA* alleles 54 to 68 CAGs are found[15]. In normal individuals the *MJD* gene contains 12 to 37 CAG repeats, while in affected patients the repeat number ranges from 62 to 84[3,19].

RESULTS

This Brazilian family is probably of Italian origin; however Portuguese background cannot be completely excluded. Of the ten family members examined there were three clinically affected individuals, one male and two females. The Figure shows the reduced pedigree of the family and the Table summarizes the demographic and molecular information obtained in the study.

Individual II-1 began to develop gait ataxia at age 41, neurological examination after 5 years of disease onset showed moderate gait ataxia, incoordination in upper limbs, globally increased deep tendon reflexes and pyramidal signs. A CT scan at the time of examination revealed cerebellar atrophy. Individual II-4 began to have gait ataxia at age 32. The disease has progressed slowly and

Table. Demographic data and molecular characteristics of ten individuals studied in the Brazilian family segregating the SCA1 *mutation.*

Pedigree Number	Age at Examination (years)	Age at Onset (years)	Normal Allele (CAG units)	Expanded Allele (CAG units)
II-1	46	41	31	50
II-4	36	32	30	51
II-5	37	36	30	48
III-1	23	-	32	49
II-2	24	-	30	47
III-3	26	-	32	44
II-3	43	-	31/32	-
III-2	19	-	31/33	-
II-6	47	-	31/32	-
II-7	40	-	31/32	-

Note: Double entries for normal alleles indicate the sizes of the two normal alleles found.
A dash (-) in the expanded allele column indicates that no abnormal allele was found.

after 4 years of disease evolution he presented mild gait ataxia, incoordination in upper limbs and increased knee jerk. A CT scan was considered normal. Individual II-5 started symptoms about one year before examination at age 36 and showed only mild gait ataxia. Other clinical findings including cognitive impairment, optic atrophy, ophthalmoplegia, dysphagia, dystonia and Parkinsonian features were not seen in this family. All remaining individuals examined were clinically normal.

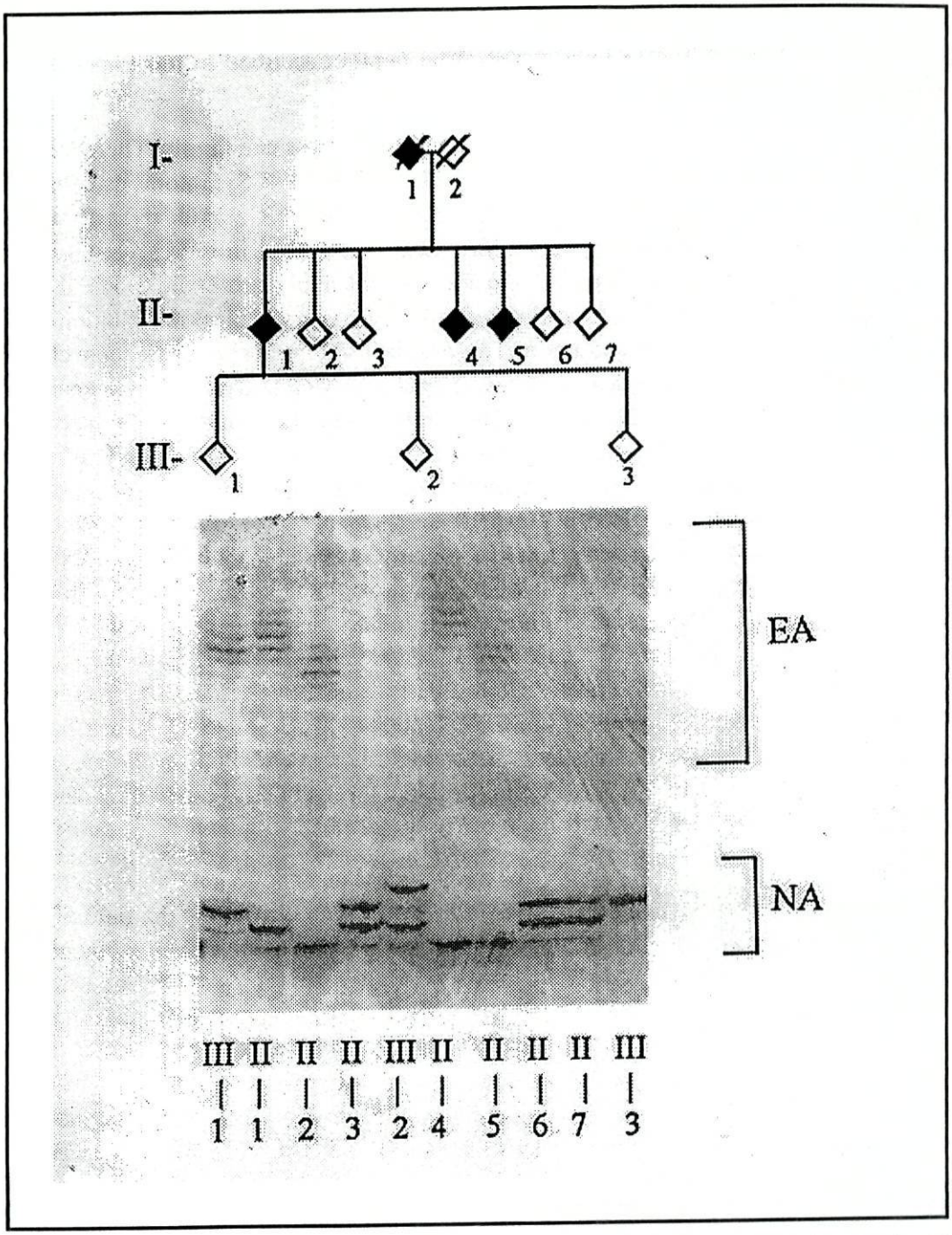
Six individuals had an abnormal CAG repeat in the *SCA1* gene (Figure), three males and three females. The number of repeats in the expanded allele varied from 44 to 51 CAG units, with a mean of 48.2. Mild instability of the CAG tract was seen in the two transmissions that could be documented in this family. In both occasions there was a contraction of the CAG tract, of one and six CAG units. By contrast, the normal alleles were transmitted in a mendelian fashion and varied from 30 to 33 CAG repeats (Figure).

The appearance of the normal and the expanded CAG repeats in the *SCA1* gene varied markedly. All the normal alleles had a single strong band distinctively seen in the autoradiographs, whereas the expanded alleles showed several bands (Figure).

The ten individuals genotyped in this family had CAG repeats of normal size in the *MJD* and *DRPLA* genes (data not shown).

DISCUSSION

The classification of the autosomal dominant SCAs has been difficult due to variability and overlapping in clinical characteristics and pathological presentation[5]. It is not uncommon to find affected individuals, in the same family, with a wide variety of symptoms[10]. It is now generally accepted that the controversies involving diagnosis and classification of this group of disorders will only be solved when the molecular aspects are clarified[26]. With the cloning of the *SCA1*, *MJD* and *DRPLA* genes and the characterization of the respective mutations an accurate diagnosis can now be performed, even in small families or single affected individuals. This will result in a better estimate of the prevalence of these disorders, as well as provide more detailed clinical, pathological and molecular information that will improve our understanding of these group of diseases.



Top panel: Reduced pedigree of the Brazilian family carrying the SCAI mutation. Blackened symbols represent clinically affecied individuals. Diagonal lines indicate deceased individuals. Bottom panel: Analysis of PCR products containing the expanded CAG repeat at the SCAI locus. Genomic DNA was amplified using primers Rep 1 and Rep 2. PCR products were analyzed on 6% polyacrylamide gels. Normal alleles (NA) had sizes varying from 30 to 33 CAG units and expanded alleles (EA) varied from 44 to 51 CAGs.

We[32] and others[24] have determined the frequency of the three different SCAs for which direct molecular diagnosis is available: *SCA1*, *MJD* and *DRPLA*. Families of different geographic and ethnic origins have been reported with the *SCA1* mutation; however, *SCA1* seems to occur more frequently in certain ethnic groups such as Italians and Eastern (EuropeansRanum et al.[24], Silveira et al.[32], and Lopes-Cendes unpublished results]. In Southern Italy a cluster of SCA1 families has been described sharing the same haplotype for markers closely linked to the *SCA1* locus, which suggests

a common origin of these families[12]. Therefore, it is not surprising to find SCA1 families in Brazil particularly in regions of strong Italian immigration. The family described in this paper is most likely of Italian background.

Clinical variability is usually present in SCA1, even within the same family. There has been no description of any clinical feature that is specific for SCA1 patients[8,20,34]. Symptoms usually begin in the third and fourth decade of life and are characterized by gait ataxia, dysarthria, and ophthalmoplegia[8]. Limb ataxia is typically less severe than gait ataxia. In the early stages, eye movements appear to be full and the saccadic velocities are relatively preserved[34]. The disorder gradually progresses and patients become bedridden after 10 to 20 years of disease evolution. In the later stages of the disease, distal areflexia occurs, and dysphagia develops leading to frequent choking spells and aspiration pneumonia. Some degree of increased tone as well as dystonic movement may occur late in the course of the disease. Dementia has not been observed in genetically proven SCA1 families; although mild cognitive decline may occur in the advanced stages of the disease[34]. Infrequent signs include optic atrophy and Parkinsonian features[8,20]. One of the largest SCA1 families studied, the Schut kindred, shows remarkable heterogeneity in disease presentation, with cases starting in the first or second decades of life and progressing rapidly, as well as patients with onset after the fourth decade presenting a mild disease[29]. The Brazilian SCA1 family reported here is relatively small and does not permit extensive clinical correlations; however it seems that the disease presentation has been very similar in the three clinically affected individuals, and with no specific associated features such as: slow eye movements, extrapyramidal features, peripheral signs, retinal degeneration and myoclonus, which are more frequently found in SCA2, MJD, SCA4, SCA7 and DRPLA patients, respectively[2,6,15,16,18,25,26]. Small families with patients presenting a short evolution of the disease, such as the Brazilian SCA1 pedigree, represent a very difficult problem for the clinical differential diagnosis. We believe that diagnostic questions in SCA patients can only be solved with molecular testing.

The observation that in one single family, the disease has a tendency for a progressive earlier onset with increased severity in younger generations has intrigued researchers in the field of SCAs for a long time. This phenomenon, called anticipation, is observed in other neurodegenerative disorders, such as: Huntington disease, Kennedy disease, MJD and DRPLA[35]. All of which are caused by an expansion of a trinucleotide CAG. It has been observed that translation of the mutant protein actually occurs and that the CAG stretch codes for a polyglutamine tract at the protein level[11,31]. These observations suggest a toxic gain of function by the proteins containing an expanded glutamine tract[11,27]. In addition, the observed inverse correlation between the repeat size and age at onset of the disease and the tendency of an overall increase in the CAG repeat size in successive generations[13,23], indicate that this toxic effect is proportional to the length of the polyglutamine tract. Therefore, offering a possible molecular explanation for the phenomenon of anticipation observed in these neurodegenerative disorders.

The molecular characteristics of the expanded CAG repeat found in this family are similar to those reported in other SCA1 families[8,13,20,22]. We observed mild instability during transmission of the expanded CAG tract, suggesting gametic mosaicism. In addition, the observation of multiple bands for the expanded allele, that were seen in the autoradiographs, indicates the presence of somatic mosaicism, with different cells containing different lengths of the CAG repeat.

In SCA1 families an inverse correlation between the size of the CAG repeat and the age at onset of the disease has been observed[13,20,22,23]; however this correlation is not perfect, only about 66% of variability in age at onset can be attributed to the length of the CAG repeat in these SCA1 patients. This suggests that there are factors other than the repeat size involved in the determination of the disease phenotype. Therefore, the size of the CAG repeat is not a good predictor of age at onset in SCA1. Although the CAG tract has a tendency for expansion in successive generations[13,23], anticipation cannot be always observed, since contractions, as seen in the Brazilian SCA1 family, also occur.

Confirmation or exclusion of diagnosis can be accomplished in almost all pre-symptomatic or suspected cases of SCA1, specially if affected family members are also tested. The availability of such highly sensitive and specific test for a late onset disorder has raised several questions about ethic and legal aspects of molecular testing in at risk individuals[1]. This emphasizes the importance of a multidiciplinary supportive counseling program that should be available for all individuals undergoing this type of molecular testing.

Acknowledgments - The authors would like to thank the family members who participated in this project. This work was supported by: the joint Program FRSQ-ACAF (Fonds de la Recherche en Santé du Québec and Association Canadienne de l'Ataxie de Friedreich), the NIH (grant NS 31687) and the Network of Centres of Excellence (Canadian Genetic Disease Network). Dr. I.L.C. is supported by a fellowship from the Savoy Foundation. I.S. is recipient of a scholarship from JNICT (Junta Nacional de Investigação Cientifica e Tecnológica), Portugal and Dr. G.A.R. is supported by the Medical Research Council of Canada and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

REFERENCES

1. Benjamin CM, Adam S, Wiggins S, Theilmann JL, Copley TT, Bloch M, Squitieri F, McKellin W, Cox S, Brown SA, Kremer HPH, Burgess M, Meshino W, Summers A, Mcgregor D, Buchanan J, Greenberg C, Carson N, Ives E, Frecker M, Welch JP, Fuller A, Rosenblatt D, Miller S, Dufresne S, Roy M, Andermann E, Prevost C, Khalifa M, Girard K, Taylor S, Hunter A, Goldsmith C, Whelan D, Eisenberg D, Soltan H, Kane J, Shokeir MHK, Gibson A, Cardwell S, Bamforth S, Grover S, Suchowersky O, Klimek M, Garber T, Gardner HA, MacLeod P, Hayden MR. Proceed with care: direct predictive testing for Huntington disease. Am J Hum Genet 1994;55:606-617.
2. Benomar A, Krols L, Stevanin G, Cancel G, LeGern E, David G, Ouhabi H, Martin J-J, Durr A, Zaim A, Ravise N, Busque C, Penet C, Van Regemorter N, Weissenbach J, Yahyaoui M, Chkili T, Agid Y, Van Broeckhoven C, Brice A. The gene for autosomal dominant cerebellar ataxia with pigmentary macular dystrophy maps to chromosome 3p12-p21.1 Nature Genet 1995;10:84-88.
3. Cancel G, Abbas N, Stevanin G, Durr A, Chneiweiss H, Néri C, Duyckaerts C, Penet C, Cann HM, Agid Y, Brice A. Marked phenotypic heterogeneity associated with expansion of a CAG repeat sequence at the spinocerebellar ataxia 3/Machado-Joseph disease locus. Am J Hum Genet 1995;57:809-816.
4. Chong SS, McCall AE, Cota J, Subramony SH, Orr HT, Hughes MR, Zoghbi HY. Gametic and somatic tissue-specific heterogeneity of the expanded *SCA1* CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. Nature Genet 1995;10:344-350.
5. Currier RD, Subramony SH. Is it possible to differentiate clinically the ataxias ? Paper presented at the 3rd International Workshop on Machado-Joseph disease, Furnas, São Miguel, Azores, April 7-9, 1994.
6. Gardner K, Alderson K, Galster B, Kaplan C, Leppert M, Ptacek L. Autosomal dominant spinocerebellar ataxia: clinical description of a distinct hereditary ataxia and genetic localization to chromosome 16 (SCA4) in a Utah kindred [Abstract]. Neurology 1994; 44 (Suppl 2):921S.
7. Gispert S, Twells R, Orozco G, Brice A, Weber J, Heredero L, Schewfler K, Riley B, Allotey R, Nothers C, Hillermann R, Lunkes A, Khati C. Stevanini G, Hernandez A, Magarino C, Klockgether T, Durr A, Chneiweiss H, Enczmann J, Farral M, Beckmann J, Mullan M, Wernet P, Agid Y, Freund H-J, Williamson R, Auburger G and Chanberlain S. Chromosomal assignment of the second locus for autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA2) to chromosome 12q23-24.1. Nature Genet 1993;4:295-299.
8. Giunti P, Sweeney MG, Spadaro M, Jodice C, Novelletto A, Malaspina P, Frontali M, Harding AE. The trinucleotide repeat expansion on chromosome 6p (SCA1) in autosomal dominant cerebellar ataxias. Brain 1994;117:645-649.
9. Gouw LG, Kaplan CD, Haines JH, Digre KB, Rutledge SL, Matilla A, Leppert M, Zoghbi HY, Ptácek LJ. Retinal degeneration characterizes a spinocerebellar ataxia mapping to chromosome 3p. Nature Genet 1995;10:89-93.
10. Harding AE. Clinical features and classification of inherited ataxias. In Harding AE, Deufel T (eds). Inherited ataxias. New York: Raven Press, Adv Neurol 1993;61:1-14.
11. Housman D. Gain of glutamines, gain of function ? Nature Genet 1995;10:3-6.
12. Jodice C, Frontali M, Persichetti F, Novelletto A, Pandolfo M, Sparadaro M, Giunti P, Schinaia G, Lulli P, Malaspina P, Plasmati R, Tola R, Antonelli A, Donato SD, Morocutti C, Weissenbach J, Cann HM, Terrenato L. The gene for spinal cerebellar ataxia 1 (SCA1) is flanked by two closely linked highly polymorphic microsatellite loci. Hum Molec Genet 1993;2:1383-1387.
13. Jodice C, Malaspina P, Persichetti F, Novelletto A, Spadaro M, Giunti P, Morocutti C, Terrenato L, Harding AE, Frontali M. Effect of trinucleotide repeat length and parental sex on phenotypic variation in spinocerebellar ataxia 1. Am J Hum Genet 1994;54:959-965.
14. Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S, Kawakami H, Nakamura S, Nishimura M, Akiguchi I, Kimura J, Narumiya S, Kakizuka A. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. Nature Genet 1994;8:221-228.
15. Koide R, Ikeuchi T, Onodera O, Tanaka H, Igarashi S, Endo K, Takahashi H, Kondo R, Ishikawa A, Hayashi T, Saito M, Tomoda A, Miike T, Naito H, Ikuta F, Tsuji S. Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA). Nature Genet 1994;6:9-13.
16. Lopes-Cendes I, Andermann E, Attig E, Cendes F, Bosch S, Wagner M, Gerstenbrand F, Andermann F, Rouleau GA. Confirmation of the SCA-2 locus as an alternative locus for dominantly inherited spinocerebellar ataxias and refinement of the candidate region. Am J Hum Genet 1994;54:774-781.

17. Lopes-Cendes I, Andermann E, Rouleau GA. Evidence for the existence of a fourth dominantly inherited spinocerebellar ataxia locus. Genomics 1994;21:270-274.
18. Lopes-Cendes I, Silveira I, Maciel P, Gaspar C, Radvany J, Chitayat D, Babul R, Stewart J, Dolliver M, Robitaille Y, Rouleau G, Sequeiros J. Limits of clinical assessment in the accurate diagnosis of Machado-Joseph disease, 1996 [Submitted for publication].
19. Maciel P, Gaspar C, DeStefano A, Silveira I, Coutinho P, Radvany J, Dawson DM, Sudarsky L, Guimarães J, Loureiro JEL, Nezarati MM, Corwin LI, Lopes-Cendes I, Rooke K, Rosenberg R, MacLeod P, Farrer LA, Sequeiros J, Rouleau GA. Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. Am J Hum Genet 1995;57:54-61.
20. Matilla T, Volpini V, Genís D, Rosell J, Corral J, Dávalos A, Molins A, Estivill X. Presymptomatic analysis of spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) via the expansion of the *SCA1* CAG-repeat in a large pedigree displaying anticipation and parental male bias. Hum Molec Genet 1993;2:2123-2128.
21. Nechiporuk A, Lopes-Cendes I, Nechiporuk T, Starkman S, Frederick T, Andermann E, Rouleau GA, Weissenbach JS, Kort E, Pulst SM. Genetic mapping of the spinocerebellar ataxia type 2 gene on human chromosome 12. Neurology 1996 [in press].
22. Orr HT, Chung M, Banfi S, Kwiatkowski TJ-J, Servadio A, Beaudet AL, McCall AE, Duvick LA, Ranum LPW, Zoghbi HY. Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. Nature Genet 1993;4:221-226.
23. Ranum LPW, Chung M, Banfi S, Bryer A, Schut LJ, Ramesar R, Duvick LA, McCall A, Subramony SH, Goldfarb L, Gomez C, Sandkuijl LA, Orr HT, Zoghbi HY. Molecular and clinical correlations in spinocerebellar ataxia type 1: evidence for familial effects on the age at onset. Am J Hum Genet 1994;55:244-252.
24. Ranum LPW, Lundgren JK, Schut LJ, Ahrens MJ, Perlman JA, Bird TD, Gomez C, Orr HY. Spinocerebellar ataxia type 1 and Machado-Joseph disease: incidence of CAG expansions among adult-onset ataxia patients from 311 families with dominant, recessive or sporadic ataxia. Am J Hum Genet 1995;57:603-608.
25. Ranum LPW, Schut LJ, Lundgren JK, Orr HT, Livingston DM. Spinocerebellar ataxia type 5 in a family descended from the grandparents of President Lincoln maps to chromosome 11. Nature Genet 1994; 8:280-284.
26. Rosenberg RN. Autosomal dominant cerebellar phenotypes: the genotype has settled the issue. Neurology 1995;45:1-5.
27. Ross CA. When more is less: pathogenesis of glutamine repeat neurodegenerative diseases. Neuron 1995;15:493-496.
28. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
29. Schut JW. Hereditary ataxia: clinical study through six generations. Arch Neurol Psych 150;63:535-568.
30. Sequeiros J, Silveira I, Maciel P, Coutinho P, Manaia A, Gaspar C, Burlet P, Loureiro L, Guimarães J, Tanaka H, Takiyama Y, Sakamoto H, Nishizawa M, Nomura Y, Segawa M, Tsuji S, Melki J, Munnich A. Genetic linkage studies of Machado-Joseph disease with chromosome 14q STRPs in 16 Portuguese-Azorean kindreds. Genomics 1994;21:645-648.
31. Servadio A, Koshy B, Armstrong D, Antalffy B, Orr HT, Zoghbi HY. Expression analysis of the ataxin-1 protein in tissue from normal and spinocerebellar ataxia type 1 individuals. Nature Genet 1995;10:94-98.
32. Silveira I, Lopes-Cendes I, Kish S, Maciel P, Gaspar C, Coutinho P, Botez MI, Teive H, Arruda W, Steiner CE, Pinto-Junior W, Maciel JA, Jain S, Sack, G, Andermann E, Sudarsky L, Rosenberg, R, MacLeod P, Chitayat D, Babul R, Sequeiros J, Rouleau GA. Frequency of spinocerebellar ataxia type 1, dentatorubropallidoluysian atrophy and Machado-Joseph disease mutations in a large group of spinocerebellar ataxia patients. Neurology 1996;46:214-218.
33. Stevanin G, Le Guern E, Ravisé, N, Chneiweiss H, Durr A, Cancel G, Vignal A, Boch A-L, Ruberg M, Penet C, Pothin Y, Lagroua I, Haguenau M, Rancurel G, Weissenbach J, Agid Y, Brice A. A third locus for autosomal dominant cerebellar ataxia type 1 maps to chromosome 14q24.3-qter: evidence for the existence of a fourth locus. Am J Hum Genet 1994; 54:11-20.
34. Subramony SH. Clinical aspects of hereditary ataxia. In Zoghbi H. Proceedings of Course 419: Clinical Aspects and Molecular Genetics of Hereditary Ataxias. American Academy of Neurology 48th Annual Meeting, March 23-30, 1996.
35. Sutherland GR, Richards RI. Simple tandem DNA repeats and human genetic disease. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:3636-3641.
36. Takiyama Y, Nishizawa M, Tanaka H, Kawashima S, Sakamoto H, Karube Y, Shimazaki H, Soutome M, Endo K, Ohta S, Kagawa Y, Kanazawa I, Mizuno Y, Yoshida M, Yuasa T, Horikawa Y, Oyanagi K, Nagai H, Kondo T, Inuzuka T, Onodera O, Tsuji S. The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q. Nature Genet 1993; 4:300-304.
37. Twells R, Yenchitsomanus P-T, Sirinavin C, Allotey R, Poungvarin N, Viriyavejakul A, Cemal C, Weber J, Farral M, Rodpraser P, Prayoonwiwat N, Williamson R, Chamberlain S. Autosomal dominant cerebellar ataxia with dementia: evidence for a fourth disease locus. Hum Molec Genet 1994;3:177-180.
38. Twist EC, Casaubon LK, Ruttledge MH, Farrer LA, MacLeod PM, Radvany J, Rosenberg RN, Rouleau GA. Machado Joseph disease maps to the same region of chromosome 14 as the spinocerebellar ataxia type 3 locus. Am J Med Genet 1995;32:25-31.
39. Zoghbi HY, Pollack MS, Lyons LA, Ferrell RE, Daiger SP, Beaudet AL. Spinocerebellar ataxia: variable age of onset and linkage to human leukocyte antigen in a large kindred. Ann Neurology 1988;23:580-584.

DISCUSSÃO GERAL

MAPEAMENTO CROMOSSÓMICO DA DMJ EM FAMÍLIAS PORTUGUESAS

Estratégia aplicada

A doença de Machado-Joseph é uma degenerescência hereditária multissistémica do sistema nervoso, não existindo, à data de início deste trabalho, qualquer conhecimento sobre o gene responsável ou sobre a proteína envolvida nesse processo patológico.

A estratégia clássica, utilizada na clonagem de genes implicados em doenças hereditárias, necessitava do conhecimento prévio da função do gene e da proteína mutada, envolvendo em muitos casos a purificação da proteína normal e a determinação parcial da sua sequência aminoacídica, ou então a produção de anticorpos contra a proteína. Estas estratégias, designadas por *clonagem funcional*, têm tido muito sucesso, sobretudo em doenças metabólicas autossómicas recessivas. Porém, não podem ser aplicadas quando o processo bioquímico envolvido na patologia é desconhecido, como é o caso da maioria das doenças dominantes.

Recentemente, foi posta em prática uma nova estratégia, que possibilita a clonagem de genes envolvidos em doenças genéticas e a identificação da proteína implicada na patologia, iniciada com o mapeamento por análise de ligação genética. Esta estratégia foi designada por *clonagem posicional* (inicialmente *genética inversa*) por ter início com a localização cromossómica do gene responsável.

Todas as doenças hereditárias podem beneficiar de uma estratégia de *clonagem posicional*. No entanto, a análise torna-se mais simples no caso de doenças monogénicas que apresentem penetrância completa. A DMJ foi uma doença que pôde usufruir desta estratégia, pois apesar da existência de uma grande variabilidade clínica, subdividida em três tipos, havia fortes evidências de ser causada por um gene único principal. A penetrância, apesar de elevada (98%), não é completa, e é dependente da idade, o que nos levou a estabelecer diferentes classes de liabilidade que permitiram ultrapassar este problema.

As exclusões que tinham sido efectuadas anteriormente, os resultados preliminares obtidos na análise de marcadores séricos, a possível existência de modelos animais e ainda a possibilidade da DMJ estar associada com genes envolvidos noutras patologias permitiram por em acção uma estratégia de 'regiões candidatas'. Esta estratégia, que possibilitou a localização de genes implicados noutras doenças [Geisterfer-Lowrance *et al.*, 1990; Fontaine *et al.*, 1990] permitiu-nos orientar a pesquisa, antes de iniciar um mapeamento aleatório do genoma humano.

Dificuldades na execução da estratégia adoptada

Aspectos clínicos

A enorme variabilidade clínica da DMJ, subdividida em três tipos, assim como a grande variação nas idades de início e a penetrância incompleta, estiveram na origem dos principais problemas. As dificuldades no diagnóstico, nomeadamente quando o doente se encontrava em fase incial dos sintomas, levaram a uma perda de informação, porque devido às

incertezas vários foram classificados como 'suspeitos', não fornecendo desta forma qualquer informação na análise de ligação.

Idade de início

A idade de início nos doentes DMJ é influenciada por factores de ordem étnica. Nos doentes das famílias portuguesas, em geral, a idade de início (média ± DP: 39.1 ± 0.8) é muito mais tardia em comparação com as famílias japonesas (26.5 ± 3.3), por exemplo [Sequeiros & Coutinho, 1993]. Este facto permite explicar a dificuldade acrescida em encontrar várias gerações de doentes, tendo sido muito desfavorável aos estudos de mapeamento nas famílias portuguesas.

Penetrância

A DMJ apresenta penetrância incompleta nas famílias portuguesas, o que implica a existência de indivíduos que são obrigatoriamente portadores da mutação DMJ, mas que nunca manifestaram a sintomatologia (mesmo em idade avançada) [Sequeiros, 1989]. Este facto ocasiona a introdução de erros na determinação dos *lod scores* por análise de ligação genética, se não forem usadas classes de liabilidade. No entanto, esta correcção para a penetrância dependente da idade ocasiona também perda significativa de informação.

Fenocópias

As fenocópias, que aparentam um fenótipo da doença sem que este seja de causa genética, originam erros na análise de ligação, semelhantes aos originados pela heterogeneidade genética e adicionados aos criados pela penetrância incompleta. As

fenocópias são frequentes em casos de ataxia, que pode ser por vezes originada por causas ambienciais.

Heterogeneidade genética

Outro dos factores que terá dificultado o mapeamento cromossómico da DMJ foi a presença de heterogeneidade genética. Após a identificação da mutação responsável pela DMJ, foi possível demonstrar que, entre as famílias diagnosticadas com DMJ e seleccionadas para a fase de mapeamento cromossómico, quatro não apresentavam de facto a mutação, revelando a existência de heterogeneidade genética entre as famílias portuguesas. A grande sobreposição clínica das diversas formas de ataxia dominante, bem como o pequeno tamanho dessas famílias, com poucos doentes examinados e muitas vezes apenas em estádios iniciais da sua doença, poderá ter estado na origem destas dificuldades de diagnóstico.

Obtenção de famílias informativas

Para contornar o problema da heterogeneidade genética deveriam ter sido utilizadas poucas (duas ou três) árvores genealógicas de grande tamanho e adequada estrutura em vez de numerosas famílias de pequeno e médio tamanho. Porém, uma das maiores dificuldades sentidas foi exactamente a obtenção de árvores familiares com doentes vivos em duas ou mais gerações e a sua colheita. Esta dificuldade deve-se ao facto da DMJ ser uma doença de início tardio, evoluindo durante cerca de 20 anos (em média), sendo difícil encontrar progenitor e descendente simultaneamente na fase de evolução da doença. Também o facto do norte de Portugal e do arquipélago dos Açores (onde foram recolhidas as famílias) serem regiões de grande emigração, dificultou a recolha completa das famílias, faltando muitos indivíduos importantes e acarretando grande perda de informação.

Frequências alélicas dos marcadores

As famílias usadas na análise de ligação, com vista ao mapeamento cromossómico da DMJ tinham (pelas razões acima descritas) muitos núcleos incompletos, em que faltavam muitas vezes os progenitores nas primeiras gerações, exigindo ao programa *LINKAGE* a reconstrução de haplótipos com base na informação dos descendentes e nas frequências alélicas introduzidas. Normalmente, para os RFLPs as frequências encontram-se descritas na literatura. Mas, com os microssatélites, altamente polimórficos, os alelos diferem muitas vezes apenas de dois pares de bases, não sendo por isso correcto compará-los com a literatura (a determinação do tamanho varia com o método usado); além disso existem variações importantes entre diferentes populações, o que tornou necessário calcular as suas frequências para a população em estudo. Como as frequências alélicas dos STRPs do cromossoma 14q foram determinadas com base na análise de um pequeno número de cromossomas de colaterais (esposos de doentes), poderão não ter sido suficientemente representativas, produzindo *lod scores* mais baixos. A diminuição nos *lods* pode ter ocorrido por o alelo em fase com a doença ser frequentemente o mais comum nos indivíduos colaterais. Por outro lado, na falta de estimativas correctas, as análises foram por vezes realizadas usando frequências iguais para todos os alelos, podendo neste caso, terem-se produzido *lod scores* inflacionados ao ser atribuída uma frequência pequena para um alelo muito comum na população. Para ultrapassar estes problemas, as frequências alélicas deveriam ter sido sempre calculadas a partir de um grande número de cromossomas normais da população açoriana e portuguesa continental (mas que de início não tínhamos disponível).

Análise apenas dos afectados

Para corrigir o efeito da penetrância dependente da idade, realizámos o cálculo dos *lod sores*, usando 5-20 classes de liabilidade e uma penetrância máxima de 0.98. Para os STRPs do cromossoma 14q, como pretendíamos também comparar resultados eliminando quase completamente a incerteza quanto ao genótipo dos sujeitos em risco, realizámos ainda o

cálculo usando uma penetrância de 0.01 e que simulou uma análise apenas dos doentes (*affecteds only*), o que habitualmente não produziu resultados significativamente diferentes da análise de todos os familiares.

Exclusões obtidas

Para o mapeamento primário do gene envolvido na doença de Machado-Joseph foram seleccionadas 16 famílias portuguesas diagnosticadas com DMJ e foi planeada uma estratégia de *clonagem posicional*, baseada inicialmente no estudo de regiões candidatas. As exclusões por nós obtidas totalizaram aproximadamente 200 cM do genoma autossómico humano. Foram feitas diversas exclusões nos cromossomas 2q, 3q, 5q e 15q, correspondendo respectivamente ao *locus* do ratinho mutante *dystonia musculorum*, a uma das regiões positivas em análises preliminares (com marcadores tradicionais), e às sub-unidade β e α da hexosaminidase A (*loci* envolvidos na doença de Tay-Sachs). A região que contém o gene da sub-unidade β da hexosaminidase A foi excluída numa grande extensão; as exclusões obtidas nas outras três regiões foram menos extensas.

Para evitar duplicação de esforços foi por nós estabelecido um 'consórcio de exclusões' com os outros grupos (americanos, canadianos, japoneses) envolvidos no mapeamento comossómico da DMJ. As exclusões alcançadas, no seu conjunto, totalizavam aproximadamente um terço do genoma humano, à data em que foi detectada ligação genética ao cromossoma 14 por um dos grupos japoneses.

HETEROGENEIDADE GENÉTICA ENTRE A DMJ E A SCA2

As ataxias dominantes são um grupo clinicamente muito heterogéneo de doenças, que apresentam uma grande sobreposição fenotípica, dificultando o seu diagnóstico e classificação. Em 1990, Orozco-Diaz e colegas descreveram um vasto núcleo de doentes em Cuba, com uma forma de ataxia associada a movimentos oculares lentos, então denominada ataxia de Holguin. Esta forma de ataxia inicialmente descrita na Índia [Wadia & Swami, 1971], foi posteriormente localizada ao cromossoma 12q, entre os marcadores genéticos PLA2 e D12S58 [Gispert *et al.*, 1993], passando então a ser designada por ataxia espinocerebelosa de tipo 2 (SCA2). Devido à existência de uma extensa sobreposição clínica entre a SCA2 e a DMJ, bem como ao facto de ser conhecida a imigração de um grande número de açorianos para as Caraíbas, foi colocada a hipótese de se tratar de diferentes expressões geográficas da mesma doença [Orozco-Diaz *et al.*, 1990] ou de serem devidas a mutações alélicas [Silveira *et al.*, 1993].

Foi por nós excluída a ligação do *locus* DMJ a uma região de 15 cM de cada lado do gene da fenilalanina hidroxilase (FAH), na altura, o marcador mais próximo do *locus* SCA2, o que nos permitiu concluir que a DMJ e a SCA2 têm localizações genéticas diferentes e, consequentemente, se trata de duas formas geneticamente distintas (genes diferentes e em *loci* diferentes) de ataxia espinocerebelosa, confirmando-se assim anteriores suspeitas sobre a grande heterogeneidade genética existente entre as ataxias dominantes.

MAPEAMENTO DA DMJ AO CROMOSSOMA 14

Foram encontradas diversas famílias DMJ no Japão [Sakai *et al.*, 1983; Yuasa *et al.*, 1986], onde a doença apresenta hoje uma das mais elevadas prevalências em todo o mundo. Os portugueses foram os primeiros europeus a chegar ao Japão, onde se estabeleceram e mantiveram interesses comerciais durante quase cem anos, não sendo pois de excluir, à partida, a hipótese de a mutação DMJ ter sido aí introduzida por eles [Sequeiros, 1989]. Com a localização da DMJ ao cromossoma 14q em cinco famílias japonesas [Takiyama *et al.*, 1993], surgiu assim um *locus* de grande interesse para a localização da DMJ nas famílias portuguesas.

A análise de ligação genética por nós efectuada nestas famílias, com marcadores do cromossoma 14q ligados ao *locus* DMJ em famílias japonesas, resultou na obtenção de *lod scores* francamente positivos, apesar das limitações atrás expostas. Foi assim possível (1°) confirmar a localização da DMJ ao cromossoma 14, numa região de 29 cM entre os marcadores D14S48 e D12S45, e (2°) concluir pela homogeneidade genética entre as famílias portuguesas e japonesas. O trabalho posterior de genotipagem de marcadores contidos neste intervalo permitiu ainda reduzir a região de interesse a um intervalo de aproximadamente 11 cM, entre os marcadores genéticos D14S126 e AFM 343vf1.

Paralelamente, um outro grupo japonês, baseado na hipótese provável da DMJ ser causada pela expansão de um trinucleótido $(CAG)_n$, pôs em prática uma estratégia de pesquisa de um *banco* de clones celulares, contendo cada um uma cópia diferente de ADN_c de cérebro humano, com uma sonda $(CTG)_{13}$. Deste modo, isolaram o gene DMJ (designado MJD1), o qual continha um CAG repetitivo no cromossoma 14, no interior da região codificante, expandido nos doentes com DMJ [Kawaguchi *et al.*, 1994].

FREQUÊNCIA DAS MUTAÇÕES SCA1, DRPLA E DMJ EM DOENTES DE DIVERSAS ORIGENS

A clonagem dos genes SCA1, DRPLA e DMJ, e a identificação da expansão repetitiva do trinucleótido CAG nos respectivos genes como causadora de cada uma destas doenças, veio permitir a realização do diagnóstico definitivo destes três tipos de SCA, pela análise directa num único indivíduo [Orr *et al.*, 1993; Koide *et al.*, 1994; Nagafuchi *et al.*, 1994; Kawaguchi *et al.*, 1994].

Origens étnicas

A análise molecular de 92 doentes, não-aparentados, com ataxia espinocerebelosa, de diversas origens geográficas e étnicas e apresentando diferentes modos de transmissão, permitiu-nos identificar as mutações nos genes SCA1 e DMJ em famílias de diversos países. Assim, encontrámos a expansão CAG no gene SCA1 em doentes norte-americanos de origem holandesa e chinesa e em doentes brasileiros de ascendência italiana, enquanto a mutação no gene DMJ foi encontrada em famílias portuguesas, luso-americanas e luso-brasileiras, como era esperado, mas também em famílias de diversas outras origens (afro-americana, americana de ascendência alemã, e chinesa). Pelo contrário, a repetição CAG no gene da DRPLA foi identificada apenas num doente de origem japonesa

A mutação SCA1 tem sido encontrada em doentes de famílias italianas, inglesas, siberianas, espanholas, japonesas, francesas, indianas, alemãs e africanas [Matilla et al., 1993; Ranum *et al.*, 1995; Giunti *et al.*, 1995; Dubourg et al., 1995; Kameya *et al.* 1995; Goldfarb *et al.*, 1996], nós encontrámos ainda doentes brasileiros de origem italiana e norte-americanos

ascendência holandesa e chinesa, sugerindo a existência de vários cromossomas SCA1 ancestrais (várias mutações independentes).

A análise de haplótipos com marcadores muito próximos do *locus* DMJ, em famílias de diversas origens étnicas e geográficas, parece sugerir a ocorrência de várias mutações em doentes de origens diferentes [Stevanin *et al.*, 1995; Takiyama *et al.*, 1995; Iughetti *et al.*, 1996; Gaspar *et al.*, 1996a e 1996b]. Contudo, existe ainda a necessidade de identificar novos polimorfismos intragénicos e analisar os haplótipos formados entre estes e o polimorfismo CAG, no sentido de clarificar o mecanismo mutacional, bem como o número e as origens geográficas das mutações ancestrais.

Na DRPLA o conhecimento do mecanismo mutacional e da origem geográfica da mutação encontra-se um pouco mais avançado. A análise de dois polimorfismos intragénicos, bi-alélicos, no gene DRPLA, localizados no primeiro e terceiro intrões e resultantes da substituição de um simples nucleótido, em conjunto com o polimorfismo da repetição CAG, permitiram identificar um haplótipo comum em doentes japoneses e europeus. Este haplótipo é o mais frequente na população asiática normal, encontrando-se associado a alelos normais com uma repetição $(CAG)_n$ longa, sobretudo na população japonesa. Este facto pode explicar a elevada frequência da DRPLA no Japão, em comparação com outras populações, apoiando a hipótese de que esta possa ter resultado de uma mutação num haplótipo antigo, com origem asiática, sugerindo também um mecanismo mutacional em múltiplas etapas [Yanagisawa *et al.*, 1996; Watkins *et al.*, 1995].

Frequência das mutações

No nosso estudo, a mutação SCA1 apresentou-se como responsável por 10% dos casos não-portugueses de ataxia dominante, enquanto a mutação DRPLA não foi encontrada fora da população japonesa. Finalmente, a mutação DMJ revelou-se como a causa mais

frequente de ataxia dominante, quer entre os casos de origem portuguesa (84%), que incluíam famílias portuguesas, luso-americanas e luso-brasileiras, quer entre os doentes não-portugueses estudados (17%). Estes resultados são concordantes com os que outros grupos obtiveram em estudos posteriores. Dubourg e colaboradores [1995] analisaram 88 famílias com ataxia cerebelosa progressiva e identificaram a mutação SCA1 em 15% dessas famílias. Dürr e colaboradores [1996], num estudo semelhante, detectaram a mutação SCA1 em 13% das suas famílias, enquanto a mutação DMJ foi encontrada em 28%. Ranum e colaboradores [1995] analisaram 311 famílias com formas dominantes, recessivas e esporádicas de ataxia, tendo encontrado a mutação SCA1 em 3% das 149 famílias com ataxia dominante, enquanto a DMJ representava 21% das mesmas. A frequência da mutação DMJ foi de 29% das ataxias dominantes, num estudo realizado por Giunti e colaboradores [1995].

Os trabalhos de vários grupos indicam que a DMJ apresenta uma frequência elevada sobretudo em Portugal e nas comunidades portuguesas dos Estados-Unidos e Canadá, no Japão, Brasil, Alemanha e França [Takiyama *et al.*, 1995; Maruyama *et al.*, 1995; Maciel *et al.*, 1995; Ranum *et al.*, 1995; Giunti *et al.*, 1995; Schölls *et al.*, 1995; Dürr *et al.*, 1996]. A existência de ligações históricas entre Portugal e o oriente, o continente africano e a América do Sul, bem como a existência de comunidades portuguesas na América do Norte, poderá estar na origem da forte presença da DMJ nestas populações [Sequeiros,1989].

Neste momento, a DMJ apresenta-se como a forma de ataxia espinocerebelosa mais comum em todo no mundo, com uma representação aproximadamente dupla da SCA1. A DRPLA é muito rara na população ocidental, embora seja frequente na população japonesa. Os estudos mais recentes, realizados por Stevanin e colaboradores [1996], apontam a SCA2 (que à data de execução deste trabalho não era ainda possível analisar) como a segunda em frequência, entre as ataxias dominantes.

Dificuldades do diagnóstico clínico e patológico

Identificámos a mutação DMJ em dois doentes com o diagnóstico patológico de atrofia espinopôntica, confirmando impressões prévias de que muitos destes casos se tratavam de facto de DMJ [Sequeiros & Suite, 1986]. Também encontrámos a mutação DMJ num doente com diagnóstico patológico de "atrofia espino-ponto-cerebelosa", em três doentes com diagnóstico clínico de "SCA" e num caso diagnosticado com "ataxia espástica". Estes resultados revelam que o diagnóstico, clínico e patológico, da DMJ é muitas vezes difícil em famílias sem origem portuguesa, e por vezes mesmo em doentes de origem portuguesa, com ou sem história familiar. Por outro lado, certas famílias com diagnóstico clínico de DMJ, incluindo uma família americana de origem siciliana [Suite *et al.*, 1986], quatro das famílias portuguesas (2 açorianas e 2 continentais) [Coutinho *et al.*, 1994] e oito famílias indianas [Jain & Maheshwari, 1986 e 1990], não apresentaram a respectiva mutação, realçando ainda mais as dificuldades por vezes envolvidas no diagnóstico das ataxias dominantes.

Formas recessivas e casos isolados

Os nossos resultados revelaram também que os casos de SCA que nos foram descritos como tendo um modo de transmissão recessivo não eram causados pela expansão do $(CAG)_n$ em qualquer daqueles três genes. Um dos doentes que apresentou expansão do trinucleótido CAG no gene DMJ não tinha história familiar da doença; apesar deste facto poder indicar a presença de uma mutação *de novo*, a ausência de história familiar dever-se-á mais provavelmente à morte precoce do pai, que se presumia não ser afectado. Também nos casos recessivos e esporádicos analisados por outros grupos não foram encontradas expansões do $(CAG)_n$ nestes genes [Dubourg *et al.*,1995; Giunti *et al.*,1995; Ranum *et al.*,1995; Dürr *et al.*,1996].

FREQUÊNCIA DAS MUTAÇÕES SCA1, DRPLA E DMJ NAS FAMÍLIAS PORTUGUESAS COM ATAXIA

Frequências

A identificação da mutação responsável em três formas de ataxia veio permitir a elaboração de um diagnóstico molecular directo e exacto para estes tipos de ataxia, permitindo ultrapassar as dificuldades do diagnóstico clínico e as limitações dos estudos de ligação. Assim, a análise dos trinucleótidos CAG repetitivos nos genes SCA1, DRPLA e DMJ, em doentes pertencentes a 48 famílias portuguesas com ataxias espinocerebelosas, revelou que a mutação DMJ era a única presente neste grupo de doentes (74% dos casos dominantes). Não foram assim identificadas as causas nos restantes 26% das famílias portuguesas (residentes nos Açores e no continente) com ataxias autossómicas dominantes, sugerindo a existência de outros *loci* e, consequentemente, a existência de heterogeneidade genética nas ataxias dominantes em Portugal.

A mutação SCA1, não foi encontrada nas famílias portuguesas estudadas, apesar de apresentar uma frequência elevada na Europa, sobretudo entre italianos, mas também em doentes ingleses, franceses e espanhóis [Frontali *et al.* 1991 e 1993; Matilla *et al.*, 1993; Dubourg *et al.*, 1995; Giunti *et al.*, 1995].

Embora tenham já sido identificados raros casos noutras populações [Burke *et al.*, 1994; Warner *et al.*, 1994], a mutação DRPLA apresenta sobretudo uma grande incidência em famílias japonesas, não sendo pois de estranhar o facto de não ter sido encontrada na população portuguesa analisada.

A DMJ foi primeiro descrita em doentes açorianos residentes nos Estados Unidos e no arquipélago dos Açores [Nakano *et al.*, 1972; Woods & Schaumburg, 1972; Rosenberg *et al.*, 1976; Romanul *et al.*, 1977; Coutinho & Andrade, 1978], só mais tarde tendo sido diagnosticada uma família portuguesa continental [Lima & Coutinho, 1980]. Era assim de prever uma elevada prevalência da DMJ no arquipélago dos Açores, enquanto que em Portugal continental a DMJ seria menos comum. Na realidade a frequência encontrada para a mutação DMJ nos Açores (89%) foi significativamente diferente da apresentada na população portuguesa continental (60%), mas não tanto quanto a princípio seria de esperar.

Limites normais para alelos DMJ

A variação de tamanho para os alelos DMJ normais encontrava-se até há pouco compreendida entre 12 e 40 *repeats* [Maciel *et al.*, 1995; Ranum *et al.*, 1995]. Nós encontrámos recentemente um alelo normal de 41 *repeats*, aumentando assim os limites normais para os alelos DMJ. Comparando com a SCA1 (e com as outras doenças causadas por expansão de trinucleótidos não-CAG), existe na DMJ um grande intervalo entre o tamanho dos alelos normais e dos expandidos (42-61). Na SBMA, HD, DRPLA e SCA1 uma expansão ininterrupta de 37 repetições ou mais origina a doença, enquanto na DMJ são necessárias expansões maiores, sugerindo a possibilidade de as sequências que limitam o $(CAG)_n$ poderem modificar o efeito mutacional na proteína. Na SCA1, quer o tamanho da expansão, quer a existência de uma interrupção CAT, distinguem um alelo normal de um mutante [Chung *et al.*, 1993], enquanto na DMJ a expansão dos alelos anormais é o único factor condicionante. Recentemente, Quan e colaboradores [1996] descreveram um alelo SCA1 normal com 44 unidades CAG repetidas (dentro do intervalo dos alelos expandidos) interrompido em dois locais, cada um com dois tripletos CAT separados por um CAG, demonstrando que, em contraste com a DRPLA e DMJ, o diagnóstico molecular na SCA1 nem sempre pode ser baseado apenas no tamanho da repetição.

Correlação genótipo-fenótipo na DMJ

Os resultados obtidos mostram que o tamanho do $(CAG)_n$ no gene DMJ está inversamente correlacionado com a idade de início da doença, sendo responsável por cerca de 50% dessa variação. Uma correlação semelhante tem sido encontrada noutras doenças causadas pela expansão de trinucleótidos CAG repetitivos, como no caso da HD, SCA1 e DRPLA [Snell *et al.*, 1993; Orr *et al.*, 1993; Koide *et al.*, 1993; Nagafuchi *et al.*, 1993]. No grupo estudado, dois doentes DMJ com uma expansão de 70 CAGs apresentavam idades de início de 38 e 55 anos, demonstrando que o tamanho da repetição só por si não pode ser usado para prever a idade de início.

Recentemente, DeStefano e colaboradores [1996] demonstraram que existem outros factores (genéticos ou ambienciais) independentes da expansão CAG, que influenciam a idade de início na DMJ. Será importante analisar a transmissão familiar dos polimorfismos existentes no interior do gene DMJ, no sentido de averiguar se eles influenciam também, para além da instabilidade do CAG, a idade de início da doença.

Instabilidade mutacional do $(CAG)_n$ na DMJ

As doenças causadas por trinucleótidos repetitivos e expandidos caracterizam-se por instabilidade na transmissão e mosaicismo somático [Duyao *et al.*, 1993; Snell *et al.*, 1993; Telenius *et al.* 1994; Ueno *et al.*, 1995]. Entre as famílias DMJ analisadas neste estudo foram encontradas seis transmissões progenitor-descendente, apresentando um aumento médio do tamanho do *repeat* de 0.67 CAGs. Estes resultados indicam a existência de instabilidade na transmissão, idêntica à anteriormente descrita [Maciel *et al.*, 1995]. Os resultados mostram também que o alelo normal aparece sempre como uma banda única, enquanto os alelos

expandidos aparecem com várias bandas (ver Artigo III, Fig.2), sugerindo a existência de mosaicismo somático (variação no número de repetições dos alelos expandidos), como foi evidenciado em publicações anteriores [Cancel *et al.*, 1995]. Foi confirmada a presença de mosaicismo no sangue e esperma de doentes DMJ, pela demonstração de alelos expandidos com uma banda principal e várias bandas de menor intensidade correspondentes às variações de tamanho do $(CAG)_n$; o mosaicismo no esperma era superior ao do sangue [Cancel *et al.*, 1995].

Foi também demonstrada a existência de mosaicismo somático, em termos de tamanho do $(CAG)_n$, no sistema nervoso central de doentes com DMJ [Lopes-Cendes *et al.*, 1996]. Todas as regiões cerebrais estudadas se apresentavam homogéneas em termos de variação do tamanho do $(CAG)_n$, à excepção do cortex cerebeloso que apresentava $(CAG)_n$'s de menor tamanho e uma menor amplitude da sua variação. Este resultado parece excluir qualquer possibilidade de associação entre o tamanho da expansão e a especificidade da degenerescência neuronal na DMJ. Resultados semelhantes foram também encontrados na DRPLA e SCA1 [Ueno *et al.*, 1995; Lopes-Cendes *et al.*,1996].

As características clínicas e genéticas comuns à SCA1, DRPLA, DMJ, SBMA e HD são numerosas, sendo todas estas doenças degenerativas do sistema nervoso causadas pela expansão de um trinucleótido CAG repetitivo, que codifica para uma sequência poliglutamínica no interior da respectiva proteína [Orr *et al.*, 1993; Koide *et al.*, 1994; Nagafuchi *et al.*, 1994; Kawaguchi *et al.*, 1994; La Spada *et al.*, 1991; The Huntington's Disease Collaborative Research Group 1993]. Na SCA1, DRPLA e HD os limites de variação de tamanho dos alelos normais e anormais são sensivelmente idênticos. Existe também um efeito idêntico na transmissão paterna do alelo expandido, com maior expansão em média e consequente antecipação na idade de início [Chung *et al.*, 1993; Nagafuchi *et al.*, 1994; Snell *et al.*, 1993]. Pelo contrário, a DMJ apresenta um grande intervalo entre os alelos normais e expandidos, enquanto o efeito paterno se observa sobre a instabilidade em geral e não apenas sobre as expansões [Maciel *et al.*, 1995; Cancel *et al.*, 1995]. Particularmente interessante é

também a observação de que no grupo de doentes DMJ estudado, a maior antecipação (18 anos) foi numa transmissão pai-filho, resultante de um aumento de três repetições CAG, enquanto que o único caso juvenil agora estudado(início aos 13 anos; $(CAG)_{80}$) também recebeu o alelo DMJ pelo pai (não genotipado).

Os resultados alcançados por Maruyama e colaboradores [1995] indicaram também que as diferenças no tamanho do $(CAG)_n$ entre pai e descendência são superiores às diferenças de tamanho entre mãe e descendência. Por outro lado, a antecipação não parece ser afectada pelo sexo do transmissor [Maciel *et al.*, 1995; Cancel *et al.*, 1995]. É importante realçar a recente observação de Ikeuchi e colaboradores [1996], de que o número de descendentes afectados superava o número de descendentes normais na DMJ e na DRPLA, contrariando a lei de Mendel de uma probabilidade de 0.5 para a transmissão de cada alelo. Nesse estudo, os alelos paternos DRPLA e DMJ expandidos foram preferencialmente transmitidos à descendência (em 62% das transmissões em que o pai sofria de DRPLA e em 73% de DMJ), não tendo sido observada distorção significativa da taxa de segregação, a favor do alelo mutante, nos casos em que a mãe era o transmissor afectado. Com base nesses resultados, os autores sugeriram que um mecanismo molecular comum poderia estar envolvido nas transmissões paternas, causando simultaneamente instabilidade e desvio meiótico.

Inspirados no modelo oferecido pela SCA1, tendo como objectivo estudar o envolvimento de factores *cis* na instabilidade do CAG repetitivo, Igarashi e colaboradores [1996] analisaram dois polimorfismos intragénicos, bi-alélicos, no gene DMJ. O polimorfismo CAG/CAA situa-se no interior da repetição $(CAG)_n$, enquanto o polimorfismo CGG/GGG se encontra na posição 3'- final da repetição $(CAG)_n$. Os resultados mostraram que o polimorfismo CGG/GGG no alelo normal dos progenitores DMJ influencia fortemente a instabilidade na transmissão do $(CAG)_n$ expandido, sugerindo a existência de uma interacção entre os alelos DMJ normais e os alelos expandidos. A configuração $(CAG)_nCGG$ parece estar também estreitamente relacionada com a instabilidade do gene DMJ [Matsumura *et al.*, 1996].

Existem ainda evidências de que o alelo ancestral era $(CAG)_n$-GGG, uma vez que em vários outros primatas foi encontrado um codão GGG nesta posição [Rubinsztein *et al.*, 1995].

HETEROGENEIDADE GENÉTICA DAS ATAXIAS DOMINANTES

As ataxias dominantes apresentam acentuada heterogeneidade clínica à qual corresponde uma grande heterogeneidade genética. No início deste trabalho estava apenas mapeado um *locus* (SCA1), no cromossoma 6p, para as ataxias dominantes. Actualmente, estão já mapeados oito genes responsáveis por formas dominantes de ataxia espinocerebelosa: SCA1, SCA2, DMJ/SCA3, SCA4, SCA5, SCA6, SCA7 e DRPLA [Zoghbi *et al.*, 1988; Gispert *et al.*, 1993; Takiyama *et al.*, 1993; Gardner *et al.*, 1994; Koide *et al.*, 1994; Ranum *et al.*, 1994b; Benomar *et al.*, 1995; Zhuchenko *et al.*, 1997). E existem ainda algumas famílias com ataxia dominante em que o gene responsável não foi ainda localizado [Twells *et al.*, 1994; Lopes Cendes *et al.*, 1994], prevendo-se pois que existam ainda outros genes implicados nestas formas de ataxia. O nosso estudo evidenciou também heterogeneidade genética nas ataxias dominantes em geral, incluindo em Portugal. Primeiro, com a exclusão da DMJ em famílias portuguesas do *locus* da SCA2 em famílias cubanas, depois o facto de não ter sido identificada a mutação em 26% das ataxias dominantes em Portugal e em 37% das famílias dominantes (totais) estudadas.

IMPORTÂNCIA DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR NA IDENTIFICAÇÃO DA DMJ

Foi realizado um estudo sobre as características clínicas e moleculares observadas em quatro famílias (14 doentes com informação clínica detalhada) com diagnóstico molecular de DMJ, mas sem diagnóstico clínico prévio desta doença e sua comparação com 32 famílias clinicamente diagnosticadas e portadoras da mutação DMJ.

Origem étnica das famílias

A origem geográfica ou étnica dos doentes desempenha um papel importante no diagnóstico clínico de certas doenças preferencialmente associadas a determinados grupos étnicos. A DMJ é um exemplo de uma dessas doenças, pois inicialmente foi sobretudo encontrada na população açoriana [Coutinho & Andrade, 1978]. Das quatro famílias mencionadas, apenas uma era de origem portuguesa, mas não açoriana; as outras três pertenciam a populações em que, à data do seu diagnóstico, apenas eram conhecidas famílias suspeitas de serem DMJ [Sequeiros & Coutinho, 1993].

Características clínicas e patológicas específicas

Todos os doentes com DMJ começam com o tipo 2, evoluindo posteriormente para os tipos 1 ou 3, ou continuando como tipo 2 toda a vida [Coutinho, 1992]. Os 14 doentes das quatro famílias referidas (com suficiente informação clínica) podiam ser classificados como

DMJ de tipo 2 ou 3, nenhum doente podia ser classificado como tipo 1. Sendo o tipo 1 a forma mais típica da DMJ, este poderá ter sido o factor principal que dificultou o diagnóstico nestas famílias.

Alguns sinais clínicos, apesar de pouco frequentes, são muito característicos da DMJ como é o caso, por exemplo, do aspecto saliente dos olhos resultante da retracção das pálpebras [Coutinho, 1992], que foi observado em apenas quatro dos 14 doentes (famílias B3, C e C2). A distonia é igualmente importante para o diagnóstico da DMJ, mas encontra-se presente em menos de 30% dos casos [Coutinho, 1992]; foi detectada apenas num doente das quatro famílias estudadas (família B3). As fasciculações da face que são também uma característica clínica importante na DMJ [Lima & Coutinho, 1980; Coutinho, 1992], não foram encontradas em qualquer dos 14 doentes examinados. Em resumo, algumas das características clínicas mais típicas de DMJ estavam pouco representadas nas quatro famílias sem diagnóstico clínico de DMJ.

Em dois doentes foram encontrados, no exame patológico e à RMN, indícios de atrofia ligeira a moderada do cortex cerebeloso e das olivas inferiores; o que levaria muitos autores a excluir o diagnóstico de DMJ [Coutinho, 1982; Harding, 1984; Rosenberg, 1995]. Os dois doentes com atrofia cortical cerebelosa e olivar apresentavam um longo período de evolução de DMJ de tipo 3, podendo este ser um factor que possibilitou a detecção da atrofia à RMN e no exame patológico. Mesmo assim, estes sinais eram muito mais ligeiros que os encontrados nos casos típicos de OPCA.

Foram recentemente publicadas famílias francesas e alemãs que apresentam a mutação DMJ mas que, de acordo com os autores, apresentavam um fenótipo diferente denominado de 'SCA3' [Cancel *et al.*, 1995; Haberhausen *et al.*, 1995; Schölls *et al.*, 1995]. As razões invocadas pelos autores baseavam-se em três características diferenciais: 1) ausência de ascendência portuguesa; 2) ausência de sinais extrapiramidais (distonia); e 3) atrofia das olivas inferiores. A disponibilidade de um teste molecular para a mutação DMJ permitiu-nos,

contudo, tal como a outros grupos [Ranum *et al.*, 1995; Giunti *et al.*, 1995], identificar muitas famílias DMJ de origens diversas, demonstrando que a DMJ não está limitada à população portuguesa. Por sua vez, os sinais extrapiramidais e, em particular, as posturas distónicas ocorrem apenas numa pequena percentagem de doentes (menos de 30%), pelo que, na ausência destes sintomas, o diagnóstico clínico de DMJ não deveria ser afastado. Finalmente, ficou demonstrado que dois doentes portadores da mutação DMJ, apresentando-se clinicamente como DMJ tipo 3, possuíam atrofia ligeira a moderada das olivas inferiores. Não há pois quaisquer argumentos clínicos (como já não havia genéticos) genéticos para continuar a diferenciar a 'SCA3' da DMJ.

Tamanho do $(CAG)_n$ no gene DMJ

O tamanho do $(CAG)_n$ nos genes DMJ dos 19 indivíduos portadores da mutação nas quatro famílias sem diagnóstico clínico prévio era, em média, significativamente menor que o de 150 doentes do grupo controle; uma vez que o tamanho do $(CAG)_n$ no gene DMJ está inversamente correlacionado com a idade de início e a gravidade da doença, alelos expandidos de pequeno tamanho podem ter resultado numa expressão clínica mais suave da doença, tornando o diagnóstico clínico mais difícil. Em adição, o tamanho do $(CAG)_n$ nos 14 doentes em estudo revelou diferenças com os doentes de tipo 1 do grupo controle, mas não com os de tipo 2 e 3. Este facto está de acordo com as suas características clínicas (todos tipo 2 ou 3) e confirma a existência de uma relação entre o tamanho da repetição e o fenótipo clínico [Takiyama *et al.*, 1995; Maciel *et al.*, 1995].

Diagnóstico molecular

Recentemente, foi descrita uma família japonesa em que os dois doentes apresentavam expansão do $(CAG)_n$ no gene DMJ [Sakai *et al.*, 1996], apesar desta família ter sido diagnosticada, com base num exame neuropatológico, como DRPLA [Goto *et al.*, 1982]. Este facto sugere não só que o diagnóstico clínico de DMJ é por vezes difícil, como também o diagnóstico patológico pode ser enganador, acentuando a importância da análise molecular.

A DMJ apresenta-se como uma doença que, na maior parte dos casos, pode ser clinicamente diferenciada das outras ataxias dominantes, sobretudo quando os sinais clínicos mais característicos se encontram presentes num ou em vários elementos de uma família. Alguns dos casos do tipo 2 e 3, sobretudo nas suas fases iniciais, são mais difíceis de diferenciar das outras SCAs, em particular quando a origem geográfica é menos comum e quando aparecem isolados ou pertencem a famílias pequenas. Nesses casos, o diagnóstico de DMJ pode não ser feito e nem mesmo ser suspeitado. Por isso, pensamos que deverá ser sempre procurada a expansão DMJ em doentes com ataxia espinocerebelosa (em famílias ainda sem qualquer diagnóstico molecular), independentemente da sua origem étnica ou geográfica, uma vez que, para além da elevada sobreposição clínica entre as ataxias, a DMJ se apresenta como a ataxia dominante mais comum.

ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E MOLECULARES DE UMA FAMÍLIA COM SCA1

A análise molecular para as diversas mutações responsáveis por ataxias espinocerebelosas, numa família brasileira, resultou na identificação de um $(CAG)_n$ expandido no gene SCA1 em seis elementos, três dos quais assintomáticos. Esta família era

relativamente pequena não permitindo grandes correlações clínicas. No entanto, a apresentação clínica da doença foi muito semelhante nos três doentes, sem quaisquer das características mais típicas de outras SCAs, tais como movimentos oculares lentos, sinais extrapiramidais, neuropatia sensitiva, degenerescência retiniana ou epilepsia mioclónica (mais frequentes na SCA2, DMJ, SCA4, SCA7 e DRPLA, respectivamente). As famílias pequenas como esta, com doentes que têm ainda uma curta evolução clínica da doença, representam um problema para o diagnóstico diferencial, apenas ultrapassado com a realização do teste molecular.

O facto de ter sido encontrada uma família brasileira com SCA1 não é de estranhar, uma vez que esta doença apresenta uma frequência elevada entre europeus, sobretudo em Itália [Frontali *et al.*, 1993], e sabendo-se que existem no Brasil regiões de forte imigração italiana.

Correlação genótipo-fenótipo na SCA1

Tem vindo a ser observada, também nas famílias com SCA1, uma correlação inversa entre o tamanho do $(CAG)_n$ e a idade de início da doença, contudo esta correlação não é perfeita, pois apenas cerca de 66% da variação na idade de início pode ser atribuída ao tamanho do $(CAG)_n$ [Jodice *et al.*, 1993; Matilla *et al.*, 1993; Ranum *et al.*, 1994a]. Estas observações sugerem que existem (também na SCA1) outros factores determinantes do fenótipo clínico. Por consequência, não é possível prever a idade de início dos primeiros sintomas pelo tamanho do $(CAG)_n$ nos doentes com SCA1. Apesar da repetição ter tendência para se expandir em sucessivas gerações, com uma consequente antecipação da idade de início [Jodice *et al.*, 1993; Ranum *et al.*, 1994a], nem sempre se observa antecipação, pelo facto de também ocorrerem contracções (como foi observado nesta família brasileira) ou se verificar estabilidade do *repeat*.

Instabilidade mutacional do $(CAG)_n$ na SCA1

As características moleculares da expansão $(CAG)_n$ encontradas nesta família foram semelhantes às existentes nas famílias SCA1 anteriormente descritas [Jodice *et al.*, 1993; Matilla *et al.*, 1993; Ranum *et al.*, 1994a]. O sexo do transmissor desempenha um efeito determinante na SCA1, sendo as expansões de maior tamanho exclusivamente transmitidas por via paterna, enquanto nas transmissões em que a mãe é o progenitor afectado tem sido observada sobretudo estabilidade ou contracção no tamanho do $(CAG)_n$ [Jodice *et al.*, 1993; Matilla *et al.*, 1993; Ranum *et al.*, 1994a]. Nas duas transmissões observadas nesta família brasileira e que resultaram ambas em contracção do *repeat*, o progenitor afectado era a mãe. A instabilidade na transmissão do $(CAG)_n$ expandido sugere a existência de mosaicismo ao nível dos gametas. Também observámos, no sangue periférico, múltiplas bandas nos alelos expandidos dos doentes (ver Artigo III, Fig.1 e Figura do Artigo VI), fazendo supor a presença de mosaicismo somático, em que células diferentes contêm diferentes tamanhos do $(CAG)_n$.

A existência de mosaicismo somático foi já observada no sangue, esperma e sistema nervoso central de doentes com SCA1 [Chong *et al.*,1995; Lopes-Cendes *et al.*, 1996]. O mosaicismo no esperma era superior ao do sangue, [Chong e *et al.*, 1995]. Não foi, no entanto, encontrada associação entre o aumento no tamanho do $(CAG)_n$ e as estruturas cerebrais mais afectadas [Chong *et al.*, 1995; Lopes-Cendes *et al.*,1996].

Foi identificado um polimorfismo no interior da repetição CAG do gene SCA1 que consiste numa interrupção CAT [Chung *et al.*, 1993]. A sequenciação e a análise de restrição dos produtos de PCR contendo a sequência repetitiva, em 126 alelos normais, demonstrou que 98% apresentavam esta interrupção, enquanto 2% tinham um CAG repetitivo sem interrupção mas de tamanho inferior a 21 unidades CAG. Pelo contrário, a sequenciação ou digestão dos produtos de PCR de 30 alelos expandidos revelou a falta da interrupção CAT em

todos eles. Estes resultados indicam que, na SCA1, a perda da interrupção CAT influencia a conversão de um alelo estável num alelo instável, que pode posteriormente sofrer expansão, originando um quadro patológico.

Os estudos realizados com os ratinhos transgénicos criados pela introdução de um ADN_c do gene SCA1 (contendo uma sequência perfeita com 82 repetições CAG), demonstraram que não ocorriam variações de tamanho quando os alelos expandidos eram transmitidos em gerações sucessivas de ratinhos [Burright *et al.*,1995]. Estes resultados mostram, pois, que o tamanho da expansão CAG perfeita não é o único factor que influencia a estabilidade das sequências $(CAG)_n$ na SCA1.

Identificação de outros tipos de ataxia

Em 1995, Trottier e colaboradores identificaram um anticorpo monoclonal que reconhece proteínas contendo expansões poliglutamínicas. Os autores demonstraram claramente que este anticorpo permite reconhecer doentes SCA2 e SCA7, cujas expansões poliglutamínicas originam proteínas com 150kDa e 130kDa, respectivamente. No nosso estudo, não foi identificada a causa da doença em 26% das famílias dominantes portuguesas e em 37% das famílias dominantes (totais) estudadas. O tamanho destas famílias não possibilitou a realização de estudos por análise de ligação para os outros *loci* já localizados. Este anticorpo, usado contra extractos proteicos de linhas celulares linfoblásticas destes doentes, poderá vir a revelar se estas duas formas de ataxia, e possivelmente também a SCA4 e a SCA5, se encontram representadas entre elas.

Recentemente, Stevanin e colaboradores [1996] provaram a utilidade deste anticorpo, ao detectarem a proteína SCA2, de 150 kDa, em 16 famílias com ataxia cerebelosa, permitindo-lhes concluir que esta forma de ataxia é a segunda em frequência depois da DMJ.

Muito recentemente, e após a conclusão do nosso trabalho, foi identificada a mutação SCA2, existindo agora um diagnóstico molecular directo para esta afecção [Pulst *et al.*, 1996; Sanpei *et al.*, 1996; Imbert *et al.*, 1996;]. No início de 1997 foi ainda identificada a mutação responsável por uma nova forma de ataxia, a SCA6 [Zhuchenko *et al.*, 1997]. A análise destas mutações possibilitará a identificação destes tipos de ataxia nas famílias ainda sem diagnóstico molecular.

MECANISMO PATOLÓGICO NA DMJ E NAS OUTRAS ATAXIAS DOMINANTES

A estratégia de *clonagem posicional* com o mapeamento cromossómico e a identificação das mutações nos genes da DMJ e outras ataxias dominantes veio permitir o início do estudo dos mecanismos patogénicos nestas doenças. Consequentemente, no sentido de identificar o mecanismo patológico que está na origem das manifestações clínicas e moleculares das ataxias dominantes causadas por expansão de tripletos CAG, têm sido efectuados estudos de expressão proteica, desenvolvidos modelos animais e utilizados os modelos facultados por outras doenças também causadas por expansões poliglutamínicas.

Os nossos resultados e os de outros grupos mostram que a idade de início e a gravidade da doença na SCA1, DRPLA e DMJ está directamente relacionado com o número de expansões CAG nos respectivos genes [Matilla *et al.*, 1993; Ranum *et al.*, 1994a e 1995; Nagafuchi *et al.*, 1994; Koide *et al.*, 1994; Cancel *et al.*, 1995; Takiyama *et al.*, 1995; Maruyama *et al.*, 1995; Schöls et al., 1995; Maciel *et al.*, 1995].

A análise de expressão do produto do gene SCA1, denominado *ataxina-1*, demonstrou a existência de uma proteína normal em indivíduos normais e em doentes (heterozigotos); nos doentes foi também detectada uma proteína anormal. A *ataxina-1* encontra-se presente em diversos tecidos, tais como o coração, músculo esquelético e fígado. Esta proteína apresenta uma localização nuclear em todas as regiões cerebrais de indivíduos normais e de doentes com SCA1. Nos outros tecidos (não neuronais) a *ataxina-1* apresenta uma localização predominantemente citoplasmática. Contudo, foi também observada a presença da *ataxina-1* no citoplasma das células de Purkinje [Servadio *et al.*, 1995]. O padrão de expressão encontrado para a *ataxina-1* foi semelhante em doentes e em indivíduos normais, indicando que a proteína mutada não apresenta uma localização intracelular anormal. Os resultados obtidos por Servadio e colaboradores [1995] mostram que o ARN_m anormal é traduzido, produzindo quantidades normais de proteína.

O estudo das características moleculares do produto do gene DRPLA resultou também na identificação de duas proteínas de diferentes tamanhos: a proteína normal, presente em indivíduos normais e em doentes, e a proteína expandida presente apenas nos doentes. Contudo, os tamanhos moleculares destas proteínas, determinados por migração electroforética, apresentaram-se superiores aos previstos pela sequência aminoacídica. Os resultados obtidos neste estudo demonstram também que a proteína resultante da tradução do gene DRPLA apresenta sobretudo uma localização ao nível do citoplasma das células neuronais [Yazawa *et al.*, 1995].

No sentido de analisar se as expansões poliglutamínicas no gene DMJ induziam a morte dos neurónios *in vivo* foi criado um ratinho transgénico [Ikeda *et al.*,1996]. Na construção deste transgene foi usado um ADN_c para exprimir apenas a sequência poliglutamínica expandida do gene DMJ, para além dos elementos promotores do gene Pcp2 de ratinho, sendo a expressão do transgene especificamente dirigida para as células de Purkinje. O facto de o ratinho ter desenvolvido um fenótipo de ataxia, bem como, no exame histopatológico, a maior parte das células de Purkinje se encontrarem lesadas, permitiu

concluir que as expansões poliglutamínicas só por si são de facto causadoras de degenerescência e perda neuronal.

O facto de a expressão clínica nestas doenças estar correlacionada com o número de CAGs, bem como ocorrer a tradução da proteína mutada que codifica uma sequência poliglutamínica, sugere um mecanismo de patogénese causado por um ganho de função da proteína expandida.

A identificação da estrutura dos genes *rsca1* de rato e *Sca1* do ratinho, bem como do gene *rdrpla* de rato, homólogos dos genes SCA1 e DRPLA em humanos, permitiu detectar uma elevada homologia nestes genes. Contudo, a sequência $(CAG)_n$ apresenta-se muito reduzida no rato e no ratinho, não estando, provavelmente, sujeita ao mecanismo mutacional que ocorre com repetições de maior tamanho em humanos. Este pequeno tamanho da sequência $(CAG)_n$ no rato e no ratinho poderá ser uma das causas da falta de modelos animais naturais com longas expansões $(CAG)_n$ [Schmitt *et al.*,1995; Gossen *et al.*,1996; Banfi *et al.*,1996]. Por outro lado, estes factos indicam que não é necessária uma grande sequência poliglutamínica para a função fisiológica destas proteínas, tanto no rato, como no ratinho. As sequências poliglutamínicas nos genes SCA1 e DMJ de vários primatas, apresentam-se também de menor tamanho e com algumas variações, sugerindo que não é necessário que sejam conservadas para a normal função destes genes [Rubinsztein *et al.*, 1995]. As doenças causadas por expansões poliglutamínicas devem então resultar de um ganho (tóxico) de função das proteínas anormais, e não de uma perda de função.

Modelo animal de degenerescência neuronal

Com vista ao esclarecimento do mecanismo mutacional na SCA1 foi criado um ratinho transgénico contendo um alelo SCA1 humano normal, com 30 repetições, e um alelo SCA1

humano expandido, com 82 repetições [Burright *et al.*,1995]. Na construção deste transgene foram usados os elementos promotores do gene Pcp2 de ratinho, pelo facto das sequências reguladoras em 5' deste gene serem capazes de dirigir especificamente a expressão do transgene para as células de Purkinje, o local primário de patologia na SCA1. Os resultados obtidos permitiram concluir que a expressão deste trangene induz a perda de células de Purkinje do cortex cerebeloso, provocando ataxia. Por isso, este ratinho transgénico pode ser um modelo animal de degenerescência neuronal causada pela expansão de trinucleótidos CAG repetitivos [Burright *et al.*,1995].

Mecanismo celular de degenerescência neuronal

Com o objectivo de identificar os acontecimentos celulares na origem da doença de Machado-Joseph, Ikeda e colaboradores [1996] utilizaram células em cultura de forma a permitirem estudos de expressão de diferentes tamanhos da proteína DMJ e da sequência poliglutamínica isolada. Estes estudos permitiram concluir que as proteínas resultantes da expressão apenas da porção CAG expandida se encontram depositadas nas células afectadas, provocando apoptose (morte celular geneticamente programada ou fisiológica); que a tradução da expansão poliglutamínica é essencial e suficiente para induzir morte celular; e que a morte celular aumenta com o aumento do tamanho da expansão poliglutamínica. Os autores propuseram então um mecanismo de patogénese em que a porção poliglutamínica das proteínas estaria covalentemente modificada nas células afectadas, originando proteínas de peso molecular aumentado, que seriam precipitadas. Os autores sugeriram, assim, um modelo no qual a proteólise das proteínas com expansões poliglutamínicas estaria envolvida no processo patológico de degenerescência neuronal, por um mecanismo de especificidade proteolítica tecidular. Por exemplo, nas células de Purkinje, um dos principais tipos celulares afectados na SCA1 (mas não na DMJ), a *ataxina-1* sofreria uma proteólise mais intensa do

que a proteína DMJ. Este poderá ser um modelo de patogénese das expansões poliglutamínicas, que necessita de comprovação nas outras doenças.

Doença de Huntington: um modelo para as doenças poliglutamínicas

A doença de Huntington é também uma doença degenerativa do sistema nervoso causada pela expansão de uma sequência poliglutamínica no interior de uma proteína, denominada *huntingtina*. A apopaína é uma enzima responsável pela morte celular nos mamíferos pelo processo de apoptose. Recentemente, foi demonstrado que a *huntingtina* é um substrato chave da apopaína, sendo especificamente clivada por esta enzima indutora de morte celular. A presença na proteína de uma sequência poliglutamínica expandida aumenta a velocidade de proteólise, sugerindo que o mecanismo de patogénese na doença de Huntington pode ser devido a uma apoptose desajustada [Goldberg *et al.*,1996]. Em conformidade com esta hipótese estão também os resultados obtidos com ratinhos transgénicos contendo dois genes HD mutados, que evidenciaram morte celular por um processo de apoptose, com consequente morte embrionária [Nasir *et al.*, 1995 e 1996].

O mecanismo de patogénese da doença de Huntington apresenta-se assim como um modelo para as ataxias dominantes. A descoberta recente de que o produto dos genes HD, DRPLA, SCA1 e SBMA interactuam especificamente com a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) [Burke *et al.*,1996; Koshy *et al.*, 1996] veio reforçar a hipótese de existência de um mecanismo de patogénese comum para as doenças causadas por expansão poliglutamínica.

A *ataxina-1* interage com a GAPDH pela sua parte N-terminal que contém a sequência poliglutamínica. Esta ligação é extremamente forte, não se dissociando nem mesmo pela lavagem com uma solução salina de 1M [Koshy *et al.*, 1996]. A enzima GAPDH é uma

das enzimas intervenientes no metabolismo da glicólise, catalizando a conversão do gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-difosfoglicerato no processo energético de metabolização da glicose. É possível que os produtos resultantes da lise das proteínas com expansões poliglutamínicas tenham uma maior afinidade para a GAPDH, ocasionando anomalias no metabolismo energético que, em células mais vulneráveis como os neurónios, originaria morte celular.

Cadeias poliglutamínicas como substratos de transglutaminases

Em 1993, Green propôs que as glutaminas repetidas, presentes em número excessivo nas proteínas envolvidas nestes processos patológicos, poderiam tornar-se substratos de transglutaminases, sofrendo agregação proteica por um mecanismo de *crosslinking*, formando agregados insolúveis. Estes agregados seriam, provavelmente, degradados por proteólise, restando sempre um dipeptídeo final que não seria degradado. Em consequência, a formação destes agregados teria um efeito nocivo nas células neuronais.

Baseados na hipótese sugerida por Green [1993], um grupo italiano [Cariello *et al.*, 1996] analisou a actividade transglutaminásica em doentes com a doença de Huntington. Este grupo descobriu que a actividade transglutaminásica estava elevada em 25% destes doente, sugerindo que esse pode ser um dos factores envolvidos no mecanismo de patogénese da doença.

Proteínas de ligação ao ADN

Uma outra hipótese [Perutz, 1994], assenta no facto de as glutaminas poderem actuar como as proteínas com domínio de *fecho éclair* (*polar zipper*), sendo esta uma das quatro estruturas típicas das proteínas de ligação ao ADN (durante a transcrição), podendo assim estar envolvidas na agregação de proteínas reguladoras da transcrição, e quando este domínio se tornava demasiado longo, provocava alteração na afinidade entre as proteínas, alterando a transcrição. Ou então, as expansões poderiam causar a aglomeração e precipitação das proteínas anormais nos neurónios. Os sintomas seriam assim sentidos quando esta deposição atingisse um valor crítico, explicando o facto de quanto maior a expansão menor a idade de início e maior a gravidade da doença e as manifestações patológicas de degenerescência neuronal.

Cadeias homopoliméricas de glutamina ou prolina na transcrição

Uma hipótese alternativa foi ainda sugerida por Gerber e colaboradores [1994] que, baseados no facto de uma grande percentagem de factores de transcrição conterem cadeias homopoliméricas de glutamina ou de prolina, levou os autores a estudarem a importância do tamanho destas cadeias na funcionalidade normal destes factores. Os resultados obtidos permitiram concluir que, embora por razões ainda desconhecidas, a activação da transcrição apresenta um valor óptimo a dado número de repetições. Foi então sugerido que as cadeias homopoliméricas, normalmente codificadas por tripletos repetitivos de tamanho variável, quando presentes em genes envolvidos em patologias, seriam responsáveis pela modulação da actividade desses factores de transcrição e, consequentemente, pela modificação do programa genético do organismo. A observação de que a variação de tamanho da cadeia poliglutamínica pode influenciar fortemente a funcionalidade de certos factores de transcrição, como acontece

com o receptor do androgénio (AR), que contém uma sequência $(CAG)_n$ que se encontra expandida na atrofia espinobulbar (SBMA), foi também referida por Chamberlain e colaboradores [1994], que demonstraram ser esta cadeia poliglutamínica inibidora da função de activação da transcrição.

ARN contendo $(CAG)_n$ interactua com proteínas de ligação ao ARN

McLaughlin e colaboradores [1996] identificaram duas proteínas de ligação ao ARN (*RNA-binding proteins*) que interactuam com trinucleótidos CAG repetitivos, em função do tecido e da extensão da repetição CAG. Estas proteínas foram identificadas em tecido humano do cortex e do estriado. Os autores propuseram então três modelos de patogénese para a doença de Huntington e as ataxias dominantes. O primeiro supõe a existência de uma interacção entre a proteína de ligação ao ARN e os ARN_m com sequências $(CAG)_n$ expandidas, que poderia alterar a tradução, aumentando ou diminuindo os movimentos dos ribossomas ao longo do ARN_m, por exemplo. No segundo modelo, as interacções proteína-ARN alterariam o transporte e a distribuição subcelular dos ARN_m, uma vez que é conhecida a existência de proteínas envolvidas no transporte intracelular dos ARN_m. O último modelo sugere que as expansões CAG repetitivas fixariam proteínas citoplasmáticas, normalmente associadas com outros ARN_m celulares com CAG repetitivos; desta forma, ocorreria uma alteração na coordenação da expressão de múltiplos ARN_m, resultando em morte celular selectiva.

Necessidade de estudos adicionais

Nesta fase do seu estudo, as doenças degenerativas do sistema nervoso causadas pela expansão de sequências poliglutamínicas parecem, de facto, ser devidas a um ganho de função das proteínas expandidas. Para além dos mecanismos de patogénese sugeridos pelas experiências realizadas pelos autores já referidos, outras hipóteses têm surgido ao longo dos últimos anos. No entanto, apesar do mecanismo de patogénese nas doenças poliglutamínicas não ser ainda completamente conhecido, alguns passos desse mecanismo foram já evidenciados pelos diversos grupos. Assim, de uma forma muito simples e resumida, parece que as proteínas com um número excessivo de glutaminas formam agregados que sofrem proteólise, originando produtos que se depositam nas células e desencadeiam um processo de morte neuronal programada. Este modelo explicaria a diminuição na idade de início e maior gravidade da doença com o aumento do número de CAGs, uma vez que a agregação proteica dependeria do número de glutaminas. Por outro lado, a especificidade das manifestações patológicas em cada doença seria explicada por uma especificidade proteolítica tecidular. Porém, são necessários outros estudos no sentido de esclarecer se este mecanismo é único e correcto, ou se de facto as proteínas poliglutamínicas estão também envolvidas na regulação da transcrição ou tradução, sendo essa a sua principal função que, quando alterada, desencadeia a morte celular programada de certas populações de neurónios.

PERSPECTIVAS FUTURAS PARA A DMJ E OUTRAS ATAXIAS DOMINANTES

Prevenção

O mapeamento cromossómico da DMJ (à semelhança da SCA1 e DRPLA) orientou a clonagem do gene e a identificação da respectiva mutação, permitindo a realização de um diagnóstico molecular por análise directa da expansão CAG repetitiva. A facilidade de realização um diagnóstico directo e seguro para a DMJ permitiu já por em prática um programa de teste preditivo para os familiares assintomáticos, em risco de desenvolver a sintomatologia [Sequeiros, 1996], bem como oferecer a realização do diagnóstico pré-natal aos casais em risco de transmitir a doença à sua descendência. O aconselhamento genético baseado no teste preditivo e no diagnóstico pré-natal será assim também uma forma de prevenção para esta doença genética, podendo conduzir eventualmente à diminuição da frequência do gene alterado, nas populações abrangidas por este programa.

Identificação da origem geográfica das mutações

A origem geográfica das várias mutações que supostamente ocorreram no gene DMJ, poderá agora ser definitivamente identificada com base na análise dos haplótipos formados com os polimorfismos intragénicos e os marcadores estreitamente ligados, com a expansão CAG, nas diversas populações em que a mutação foi identificada.

Análise de outras mutações

A recente identificação das mutações SCA2, SCA6 e SCA7 [Pulst *et al.*, 1996; Imbert *et al.*, 1996; Sanpei *et al.*, 1996; Lindblad *et al.*, 1996; Zhuchenko *et al.*, 1997], efectuada já após a conclusão laboratorial deste trabalho, permitirá a realização do diagnóstico molecular em famílias e em doentes isolados, com estas três formas adicionais de SCA. A análise destes genes nas famílias que não possuiam qualquer das mutações SCA1, DRPLA ou DMJ, poderá assim conduzir à sua identificação molecular.Também a utilização do anticorpo monoclonal no reconhecimento de proteínas com expansões poliglutamínicas [Trottier, *et al.*, 1995] poderá ajudar na identificação de ataxias já mapeadas mas, cujos genes são desconhecidos.

Identificação de outros genes

Existem ainda famílias com ataxia dominante cujo *locus* responsável não foi ainda mapeado [Twells *et al.*, 1994; Lopes-Cendes *et al.*, 1994]. A identificação deste(s) gene(s), bem como dos genes responsáveis pela SCA4 e SCA5 proporcionará também o estudo de novas mutações em famílias ainda sem diagnóstico molecular.

Identificação do mecanismo patológico

No decorrer dos últimos quatro anos, como vimos, foram vários os mecanismos de patogénese propostos para as doenças resultantes de expansões poliglutamínicas. Apesar de não ser ainda completamente conhecido o(s) mecanismo(s) fisiopatológico(s), estão em estudo muitas hipóteses que conduzirão certamente ao esclarecimento do processo bioquímico responsável. Este processo poderá envolver apenas uma ou várias das hipóteses apresentadas,

mas a sua identificação será indubitavelmente o início da investigação com vista ao tratamento destas doenças.

Terapia convencional

A identificação dos genes e das proteínas envolvidos na SCA1, DRPLA e DMJ, bem como nas outras ataxias dominantes permitirão conhecer os processos bioquímicos na origem destas patologias. Este possibilitará a identificação de medicamentos que inibam a função adquirida pelas proteínas com expansões poliglutamínicas e delinear estratégias terapêuticas, que serão primeiro analisadas nos modelos animais já existentes, no sentido de impedir a progressão destas doenças neurológicas causadas pela expansão de CAGs repetitivos.

Terapia génica

A fisiopatologia das ataxias autossómicas dominantes não está ainda completamente esclarecida. No entanto, as mais recentes descobertas indicam que a morte programada de certas populações de neurónios desempenha um papel importante nas degenerescências do sistema nervoso. Nos últimos anos, os estudos sobre peptídeos inibidores da morte neuronal por apoptose, chamados factores neurotróficos, têm sido muito intensificados. Foi demonstrado que o NGF (*nerve growth factor*), o primeiro a ser caracterizado, permite a sobrevivência em cultura dos neurónios sensitivos e simpáticos, enquanto um outro factor, o CNTF (*ciliary neurotrophic factor*), se apresenta como agente terapêutico nas doenças do neurónio motor [Kahn, 1993]. Estes e outros factores neurotróficos poderão no futuro vir a ter uma aplicação importante no tratamento das degenerescências espinocerebelosas, apresentando-se como uma hipótese de terapia nestas doenças. Contudo, estes factores apresentam desde logo um problema de administração, pelo facto do seu tempo de semi-vida

ser normalmente de apenas alguns minutos quando injectados por via intravenosa, de forma que eles terão de ser directamente colocados nas células alvo. A produção de factores neurotróficos *in situ*, por células colocadas na proximidade das células alvo, poderá ser conseguida por transplante de células (gliais ou neurónios embrionários) geneticamente modificadas, após nelas se introduzir o gene codificador do factor respectivo, no sistema nervoso central dos doentes.

CONCLUSÕES GERAIS

1. Demonstrou-se que a DMJ e a ataxia de Holguin, agora denominada SCA2, se situam em *loci* diferentes (não-alélicas), comprovando a existência de heterogeneidade genética entre as formas dominantes de ataxia.

2. Confirmou-se a localização da DMJ em famílias portuguesas no cromossoma 14q e diminuiu-se o intervalo de interesse para 11 cM.

3. Provou-se que a mutação DMJ é a mutação mais frequente (74%) em famílias portuguesas ou de origem portuguesa com ataxia espinocerebelosa dominante.

4. A DMJ é também a mais frequente, entre as três mutações responsáveis por formas dominantes de ataxia anteriormente identificadas, em populações sem ascendência portuguesa conhecida (cerca de 17%). Em segundo lugar situa-se a mutação SCA1, com uma frequência aproximada de 10% nas famílias estudadas. Por último, pouco frequente na população ocidental, a expansão $(CAG)_n$ responsável pela DRPLA foi encontrada apenas numa família de origem japonesa.

5. A ataxia cerebelosa numa percentagem significativa (37%) das famílias estudadas com formas dominantes (incluindo 12 portuguesas e duas brasileiras de origem portuguesa) será devida a outras mutações, ainda não identificadas à altura em que este trabalho foi efectuado.

6. À heterogeneidade clínica das ataxias dominantes parece corresponder pois uma grande heterogeneidade genética, superior à inicialmente suspeitada.

7. Este trabalho demonstrou ainda a importância do estudo molecular no diagnóstico definitivo das ataxias dominantes, que deve ser sempre realizado independentemente do grau de certeza do diagnóstico clínico, da história familiar e da origem étnica ou geográfica das famílias em estudo.

8. O mapeamento e caracterização dos genes das ataxias dominantes permitiram já o início do estudo dos mecanismos patogénicos que, por sua vez, conduzirão a médio prazo à investigação de terapias para estas doenças.

BIBLIOGRAFIA

Amasino RM (1986) Acceleration of nucleic acid hybridization rate by polyethylene glicol. Anal Biochem 152:304-307.*

Amorim A, Prata MJ, Veiga I, Almeida VM, Santos MT, Loureiro JL, Coutinho P, Sequeiros J (1991) Machado-Joseph disease: linkage relationship. Am J Med Genet 49 (4 supp.):355 (Abstract).

Banfi S, Servadio A, Chung M, Capozzoli F, Duvick LA, Elde R, Zoghbi HY, Orr HT (1996) Cloning and developmental expression analysis of the murine homolog of the spinocerebellar ataxia type 1 gene (Sca1). Hum Mol Genet 5:33-40.

Barbeau A (1980) Distribution of ataxias in Quebec. In: Sobin I, ed. Spinocerebellar degenerations. Tokyo: University of Tokyo Press, 121-141.*

Barbeau A, Sadibelquiz M, Sadibelquiz A, Roy M (1984) A clinical classification of hereditary ataxias. Can J Neurol Sci 11:501-505.*

Barceló JM, Mahadevan MS, Tsilfidis C, Mackenzie AE, Korneluk RG, (1993) Intergenerational stability of the myotonic dysthrophy protomutation. Hum Mol Genet 2:705-709.

Belal S, Cancel G, Stevanin G, Hentati F, Khati C, Ben Hamida C, Auburger G, Agid Y, Ben Hamida M, Brice A (1994) Clinical and genetic analysis of a Tunisian family with autosomal dominant cerebellar ataxia type 1 linked to the SCA2 locus. Neurology 44:1423-1426.

Ben Hamida C, Doerflinger N, Belal S, Linder C, Reutenauer L, Dib C, Gyapay G, Vignal A, Le Paslier D, Cohen D, Pandolfo M, Mokini V, Novelli G, Hentati F, Ben Hamida M, Mandel J-L, Koenig M (1993) Localization of Friedreich ataxia phenotype with selective vitamin E deficiency to chromosome 8q by homozygosity mapping. Nature Genet 5:195-200.

Benomar A, Krols L, Stevanin G, Cancel G, LeGuern E, David G, Ouhabi H, Martin JJ, Durr A, Zaim A, Ravisé N, Busque C, Penet C, Regemorter NV, Weissenbach J, Yahyaoui M, Chkili T, Agid Y, Broeckhoven CV, Brice A (1995) The gene for autosomal dominant cerebellar ataxia with pigmentary macular dystrophy maps to chromosome 3p12-p21.1. Nature Genet 10:84-88.

Borst P, Greaves DR (1987) Programmed gene rearrangements altering gene expression. Science 235: 658-667.

Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am J Hum Genet 32:314-331.

Bouchard JP, Barbeau A, Bouchard R, Bouchard RW (1978) Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. Can J Neurol Sci 5: 61-69.*

Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, Buckler AJ, Church D, Aburatani H, Hunter K, Stanton VP, Thirion J-P, Hudson T, Sohn R, Zemelman B, Snell RG, Rundle SA, Crow S, Davies J, Shelbourne P, Buxton J, Jones C, Juvonen V, Johnson K, Harper PS, Shaw DJ, Housman DE (1992) Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcrit encoding a protein kinase family member. Cell 68:799-808.

Burke JR, Wingfield MS, Lewis KE, Roses AD, Lee JE, Hulette C, Pericak-Vance MA, Vance JM (1994) The Haw River syndrome: dentatorubropallidoluysian atrophy (DRPLA) in an African-American family. Nature Genet 7:521-524.

Burke JR, Enghild JJ, Martin ME, Jou Y-S, Myers RM, Roses AD, Vance JM, Strittmatter WJ (1996) Huntingtin and DRPLA proteins selectively interact with the enzyme GAPDH. Nature Med 2:347-350.

Burright EN, Clark HB, Servadio A, Matilla T, Feddersen RM, Yunis WS, Duvick LA, Zogbhi HY, Orr HT (1995) SCA1 transgenic mice: a model for neurodegeneration caused by an expanded CAG trinucleotide repeat. Cell 82:937-948.

Burt T, Blumbergs P, Currie B (1993) A dominant hereditary ataxia resembling Machado-Joseph disease in Arnhem Land, Australia. Neurology 43:1750-1752.

Burt T, Currie B, Kilburn C, Lethlean AK, Dempsey K, Blair I, Cohen A, Nicholson G (1996) Machado-Joseph disease in east Arnhem Land, Australia: chromosome 14q32.1 expanded repeat confirmed in four families. Neurology 46:1118-1122.

Campuzano V, Montermini L, Molto MD, Pianese L, Cossee M, Cavalcanti F, Monros E et al. (1996) Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. Science 271:1423-1427.

Cancel G, Abbas N, Stevanin G, Dürr A, Chneiweiss H, Neri C, Duyckaerts C, Penet C, Cann HM, Agid Y, Brice A (1995) Marked phenotypic heterogeneity associated with expansion of a CAG repeat sequence at the spinocerebellar ataxia 3/Machado-Joseph disease locus. Am J Hum Genet 57:809-816.

Carson WJ, Radvany J, Farrer LA, Vincent D, Rosenberg RN, MacLeod P, Rouleau GA (1992) The Machado-Joseph disease locus is different from the spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1). Genomics 13:852-855.

Cariello L, Cristofaro T, Zanetti L, Cuomo T, Di Maio L, Campanella G, Rinaldi S, Zanetti P, Di Lauro R, Varrone S (1996) Transglutaminase activity is related to CAG repeat length in patients with Huntington's disease. Hum Genet 98:633-635.

Cavenee WK, Dryja TP, Philips RA et al. (1983) Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. Nature 305:779-784.

Chamberlain S, Shaw J, Rowland LP, Wallis J, South S, Nakamura Y, von Gabain A, Farrall M, Williamson R (1988) Mapping of the mutation causing Friedreich's ataxia to human chromosome 9. Nature 334:248-250.

Chamberlain NL, Driver ED, Miesfeld RL (1994) The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. Nucleic Acids Res 22:3181-3186.

Chazot G, Kopp N, Barbeau A, Trillet M, Schott B (1996) La maladie de Joseph (deux cas dans une famille francaise). Actes de la Societe Francaise de Neurologie, Rev Neurol 1983:139-228(Abstract).*

Chen SJ, Chen Z, Larsen C-J, Berger R (1989) Leucémies aiguës à chromosome Philadelphie: un nouveau bcr et um modèle de recombinaison. Médecine/Sciences 5:282-283.

Chong SS, McCall AE, Cota J, Orr HT, Hughes MR, Zoghbi HY (1995) Gametic and somatic tissue-specific heterogeneity of the expanded SCA1 CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. Nature Genet 10:344-349.

Chung MY, Ranum LP, Duvick LA, Servadio A, Zoghbi HY, Orr HT (1993) Evidence for a mechanism predisposing to intergenerational CAG repeat instability in spinocerebellar ataxia type 1. Nature Genet 5:254-258.

Church GM, Kieffer-Higgins S (1988) Multiplex DNA sequencing. Science 240:185-188.

Collins FS (1992) Positional cloning: let's not call it reverse anymore. Nature Genet 1:3-6.

Connarty M, Dennis NR, Patch C, Macpherson JN, Harvey JF (1996) Molecular re-investigation of patients with Huntington's diasease in Wessex reveals a family with dentatorubral and pallidoluysian atrophy. Hum Genet 97:76-78.

Connor JM, Ferguson-Smith MA (1987) Essential Medical Genetics. 2nd ed, Alden Press, Oxford.

Coutinho P, Andrade C (1978) Autosomal dominant system degeneration in Portuguese families of the Azores Islands. Neurology 28:703-709.

Coutinho P, Guimarães A, Scaravilli F (1982) The pathology of Machado-Joseph disease. Acta Neuropathol (Berl) 58;48-54.

Coutinho P (1992) Doença de Machado Joseph: tentativa de definição. Dissertação de Doutoramento, Porto.

Coutinho P, Silva CC, Gonçalves F, Graça RI, Lourenço E, Sequeiros J, Leal Loureiro J, Guimarães J, Ribeiro P (1994) Epidemiologia da doença de Machado-Joseph em Portugal. Rev Port Neurol 3:69-76.

Currier RD (1984) A classification of ataxia. Ital J Neurol Sci (Suppl) 4:55-64.*

Currier RD, Subramony SH (1993) Distinguishing between the adult ataxias. In: Lechtenberg R (ed) Handbook of cerebellar diseases. Marcel Dekker, New York: 337-343.

David G, Giunti P, Abbas N, Coullin P, Stevanin G, Horta W, Gemmill R, Weissenbach J, Wood N, Cunha S, Drabkin H, Harding AE, Agid Y, Brice A (1996) The gene for autosomal dominant cerebellar ataxia type II is located in a 5-cM region in 3p12-p13: genetic and physical mapping of the SCA7 locus. Am J Hum Genet 59:1328-1336.

Dausset J, Cann H, Cohen D, Lathrop M, Lalouel J-M, White R (1990) Centre d'Etude du Polymorphism Human (CEPH): collaborative genetic mapping of the human genome. Genomics 6, 575-577.

Davies KE, Read AP (1988) Molecular Basis of Inherited Diseases. IRL Press, Oxford.

DeStefano AL, Cupples LA, Maciel P, Gaspar C, Radvany J, Dawson DM, Sudarsky L, Corwin L, Coutinho P, MacLeod P, Sequeiros J, Rouleau GA, Farrer LA (1996) A familial factor independent of CAG repeat length influences age at onset of Machado-Joseph disease. Am J Hum Genet 59:119-127.

Dib C, Fauré S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Morissette J, Weissenbach J (1996) A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. Nature 380:152-154.

Donahue RP, Bias WB, Renwick JH, McKusick VA (1968) Probable assignment of the Duffy blood group locus to chromosome 1 in man. Proc Natl Aca Sci USA 61:949-955.*

Donnis-Keller H, Green P, Helms C, Cartinhour S, Weiffenbach B, Stephens K, Keith TP, Bowden DW, Smith DR, Lander ES, Botstein D, Akots G, Rediker KS, Gravius T, Brown V, Rising MB, Parker C, Powers JA, Watt DE, Kauffman ER, Bricker A, Phipps P, Muller-Kahle H, Fulton TR, Ng S, Schumm JW, Barker DF, Crooks SM, Lincoln SE, Daly MJ, Abrahamson J (1987) A genetic linkage map of the human genome. Cell 51:319-337.

Dubourg O, Dürr A, Cancel G, Stevanin G, Chneiweiss H, Penet C, Agid Y, Brice A (1995) Analysis of the SCA1 CAG repeat in a large number of families with dominant ataxia: clinical and molecular correlations. Ann Neurol 37:176-180.

Dürr A, Stevanin G, Cancel G, Duyckaerts C, Abbas N, Didierjean O, Chneiweiss H, Benomar A, Lyon-Caen O, Julien J, Serdaru M, Penet C, Agid Y, Brice A (1996) Spinocerebellar ataxia 3 and Machado-Joseph disease: clinical, molecular and neuropathological features. Ann Neurol 39:490-499.

Duyao M, Ambrose C, Myers R, Novelletto A, Persichetti F, Frontali M, Folstein S, Ross C, Franz M, Abbott M, Gray J, Conneally P, Young A, Penney J, Hollingsworth Z, Shoulson I, Lazzarini A, Falek A, Koroshetz W, Sax D, Bird E, Vonsattel J, Bonilla E, Alvir J, Bickham Conde J, Cha J-H, Dure L, Gomez F, Ramos M, Sanchez-Ramos J, Snodgrass S, Young M, Wexler N, Moscowitz C, Penchaszadeh G, MacFarlane H, Anderson M, Jenkins B, Srinidhi J, Barnes G, Gusella J, MacDonald M (1993) Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. Nature Genet 4:387-392.

Edwards JH (1987) Exclusion mapping. J Med Genet 24:539-543.*

Farmer TW, Hulette CM (1992) "Haw River syndrome" or dentato-rubro-pallido-luysian atrophy?. Arch Neurol 49:13.

Filla A, De Michelle G, Banfi S, Santoro L, Perretti A, Cavalcanti F, Pianese L, Castaldo I, Barbieri F, Campanella G, Cocozza S (1995) Has spinocerebellar ataxia type 2 a distinct phenotype? Genetic and clinical study of an Italian family. Neurology 45:793-796.

Flanigan K, Gardner K, Alderson K, Galster B, Otterud B, Leppert MF, Kaplan C, Ptácek LJ (1996) Autosomal dominant spinocerebellar ataxia with sensory axonal neuropathy (SCA4): clinical description and genetic localization to chromosome 16q22.1. Am J Hum Genet 59:392-399.

Fontaine B, Khurana TS, Hoffman EP, Bruns GAP, Haines JL, Trofatter JA, Hanson MP, Rich J, McFarlane H, Yasek DM, Romano D, Gusella JF, Brown RH (1990) Hyperkalemic periodic paralysis and the adult muscle sodium channel α-subunit gene. Science 250:1000-1002.

Forse RA, Macleod PM, Holden JJA, White BN (1989) DNA marker studies show that Machado-Joseph disease is not an allele of the Huntington disease locus. J Neurogenet 5:155-158.

Friedreich N (1863) Uber degenerative atrophie der spinalen hinterstrange. Virchows Arch Pathol Anat Physiol 26:391-419, 433-459; 27:1-26.*

Frontali M, Jodice C, Lulli P, Spadaro M, Cappellacci S, Giunti P, Malaspina P, Morellini M, Morocutti C, Novelletto A, Persichetti F, Trabace S, Anastasi R, Terrenato L (1991) Spinocerebellar ataxia (SCA1) in to large Italian kindreds: evidence in favor of a locus position distal to GLO1 and HLA cluster. Ann Hum Genet 55:7-15.

Frontali M, Spadaro M, Terrenato L (1993) Late-onset spinocerebellar ataxias in Calabria, Italy. In: Lechtenberg R (ed) Handbook of cerebellar diseases. Marcel Dekker, New York: 419-421.

Fu Y-H, Pizzuti A, Fenwick Jr RG, King J, Rajnarayan S, Dunne PW, Dubel J, Nasser GA, Ashizawa T, de Jong P, Wieringa B, Korneluk R, Perryman MB, Epstein HF, Caskey CT (1992) An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. Science 255:1256-1258.

Gadoth N, Tiqva P, Slotogora J, Merims D (1996) Correlation between clinical and molecular genetic analysis in Machado-Joseph disease. Neurology 46:A329 (Abstract).

Gardner K, Alderson K, Galster B, Kaplan C, Leppert M, Ptácek L (1994) Autosomal dominant spinocerebellar ataxia: clinical description of a distinct hereditary ataxia and genetic localization to chromosome 16 (SCA4) in a Utah kindred. Neurology 44:A361(Abstract).

Gaspar C, Lopes-Cendes I, DeStefano A, Maciel P, Silveira I, Coutinho P, MacLeod P, Sequeiros J, Farrer LA, Rouleau GA (1996a) Linkage disequilibrium analysis in Machado-Joseph disease patients of different ethnic origins. Hum Genet 98:620-624.

Gaspar C, Goto J, Lopes-Cendes I, Maciel P, Silveira I, Coutinho P, Riess O, Sasaki H, Wood N, Brunt E, Watanabe M, Volpini V, HsiehM, Soong B-W, Wang G-X, Brice A, Sequeiros J, Rouleau GA (1996b) Haplotype analysis in a large group of Machado-Joseph disease families with different ethnic backgrounds. Am J Hum Genet 59 (suppl. 4):A218 (Abstract).

Gerber H-P, Seipel K, Georgiev O, Hofferer M, Hug M, Rusconi S, Schaffner W (1994) Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches. Science 263:808-811.

Geisterfer-Lowrance AAT, Kass S, Tanigawa G, Vosberg H-P, McKenna W, Seidman CE, Seidman JG (1990) A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a β cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. Cell 62:999-1006.

Gencic S, Abuelo D, Ambler M, Hudson LD (1989) Pelizaeus-Merzbacher disease: an X-linked neurologic disorder of myelin metabolism with a novel mutation in the gene encoding proteolipid protein. Am J Hum Genet 45:435-442.

Genis D, Matilla T, Volpini V, Rosell J, Davalos A, Ferrer I, Molins A, Estivill X (1995) Clinical, neuropathologic, and genetic studies of a large spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) kindred: (CAG)n expansion and early premonitory signs and symptoms. Neurology 45:24-30.

Gispert S, Twells R, Orozco G, Brice A, Weber J, Heredero L, Scheufler K, Riley B, Allotey R, Nothers C, Hillermann R, Lunkes A, Khati C, Stevanin G, Hernandez A, Magarino C, Klockgether A, Dürr A, Chneiweiss H, Enczmann J, Farrall M, Beckmann J, Mullan M, Wernet P, Agid Y, Freund H-J, Williamson R, Auburger G, Chamberlain S (1993) Chromosomal assignment of the second locus for autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA2) to chromosome 12q23-24.1. Nature Genet 4:295-299.

Giunti P, Sweeney MG, Harding AE (1995) Detection of the Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia three trinucleotide repeat expansion in families with autosomal dominant motor disorders, including the Drew family of Walworth. Brain 118:1077-1085.

Goldberg YP, Kremer B, Andrew SE, Theilmann J, Graham RK, Squitieri F, Telenius H, Adam S, Sajoo A, Starr E, Heiberg A, Wolf G, Hayden MR (1993) Molecular analysis of new mutations for Huntington's disease: intermediate alleles and sex of origin effects. Nature Genet 5:174-179.

Goldberg YP, Nicholson DW, Rasper DM, Kalchman MA, Koide HB, Graham RK, Bromm M, Kazemi-Esfarjani P, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Hayden MR (1996) Cleavage of Huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. Nature Genet 13:442-449.

Goldberg-Stern H, D'jaldetti R, Melamed E, Gadoth N (1994) Machado-Joseph (Azorean) disease on a Yemenite Jewish family in Israel. Neurology 44:1298-1301.

Goldfarb LG, Vasconcelos O, Platonov FA, Lunkes A, Kipnis V, Kononova S, Chabrashvili T, Vladimirtsev VA, Alexeev VP, Gajdusek DC (1996) Unstable triplet repeat and phenotypic variability of spinocerebellar ataxia type 1. Ann Neurol 39:500-506.

Goltsov AA, Eisensmith RC, Konecki DS, Lichter-Konecki U, Woo SLC (1992) Associations between mutations and a VNTR in the human phenylalanine hydroxilase gene. Am J Hum Genet 51:627-636.

Gossen M, Schmitt I, Obst K, Wahle P, Epplen JT, Riess O (1996) cDNA cloning and expression of rsca1, the rat counterpart of the human spinocerebellar ataxia type 1 gene. Hum Mol Genet 5:381-389.

Goto I, Tobimatsu S, Ohta M, Hosokawa S, Shibasaki H, Kuroiwa Y (1982) Dentatorubral-pallidoluysian atrophy degeneration: clinical, neuro-ophthalmologic, biochemical, and pathologic studies on autosomal dominant form. Neurology 32:1395-1399.*

Gouw LG, Kaplan CD, Haines JH, Digre KB, Rutledge SL, Matilla A, Leppert M, Zoghbi HY, Ptacek LJ (1995) Retinal degeneration characterizes a spinocerebellar ataxia mapping to chromosome 3p. Nature Genet 10:89-93.

Green H (1993) Human genetic diseases due to codon reiteration: relationship to an evolutionary mechanism. Cell 74:955-956.

Greenfield JG (1954) The Spino-Cerebellar Degenerations. Oxford, Blackwell Scientific Publications.*

Guo-Xiang W (1994) A six-year study of Machado-Joseph disease of non-Portuguese families in China. 3rd International Workshop on Machado-Joseph disease (Azores) (Abstract).

Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA, Tanzi RE, Watkins PC, Ottina K, Wallace MR, Sakaguchi AY, Young AB, Shoulson I, Bonilla E, Martin JB (1983) A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. Nature 306:234-238.

Haberhausen G, Damian MS, Leweke F, Muller U (1996) Spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3) is genetically identical to Machado-Joseph disease (MJD). J Neurol Sci 132:71-75.

Harding AE (1983) Classification of the hereditary ataxias and releted disorders. Lancet 1:1151-1155.

Harding AE (1984) The Hereditary Ataxias and Related Disorders. Churchill Livingstone, New York.

Healton EB, Brust JCM, Kerr DL, Resor S, Penn A (1980) Presumably Azorean Disease in a presumably non-Portuguese family. Neurology 30:1084-1089.

Higgins JJ, Nee LE, Vasconcelos O, Ide SE, Lavedan C, Goldfarb LG, Polymeropoulos MH (1996) Mutations in American families with spinocerebellar ataxia (SCA) type 3: SCA3 is allelic to Machado-Joseph disease. Neurology 46:208-213.

Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AOM, Pretorius I-M, Jarman AP, Weatherall DJ (1989) A review of the molecular genetics of the human α-globin gene cluster. Blood 73:1081-1104.

Holmes G (1907) An attempt to classify cerebellar disease with a note on Marie's hereditary cerebellar ataxia. Brain 30:545-567.*

Igarashi S, Takiyama Y, Cancel G, Rogaeva EA, Sasaki H, Wakisaka A, Zhou Y-X, Takano H, Endo K, Sanpei K, Oyake M, Tanaka H, Stevanin G, Abbas N, Durr A, Rogaev EI, Sherrington R, Tsuda T, Ikeda M, Cassa E, Nishizawa E, Benomar A, Julien J, Weissenbach J, Wang G-X, St.George-Hyslop PH, Brice A, Tsuji S (1996) Intergenerational instability of the CAG repeat of the gene for Machado-Joseph disease (MJD1) is affected by the genotype of the normal chromosome: implications for the molecular mechanisms of the instability of the CAG repeat. Hum Mol Genet 5:923-932.

Ikeda H, Yamaguchi M, Sugai S, Aze Y, Narumiya S, Kakizuka A (1996) Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo. Nature Genet 13:197-202.

Ikeuchi T, Igarashi S, Takiyama Y, Onodera O, Oyake M, Takano H, Koide H, Tsuji S (1996) Non-Mendelian transmission in dentatorubral-pallidoluysian atrophy and Machado-Joseph disease: the mutant allele is preferentially transmitted in male meiosis. Am J Hum Genet 58:730-733.

Imbert G, Saudau F, Yvert G, Devys D, Trottier Y, Garnier J-M, Weber C, Mandel J-L, Cancel G, Abbas N, Dürr A, Didierjean O, Stevanin G, Agid Y, Brice A (1996) Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats. Nature Genet 14:285-291.

Iughetti P, Zatz M, Passos-Bueno MR, Marie SK (1996) Different origins of mutations at the Machado-Joseph (MJD1). J Med Genet 33:439-440.

Jackson JF, Currier RD, Terasaki PI, Morton NE (1977) Spinocerebellar ataxia and HLA linkage: risk prediction by HLA typing. N Engl J Med 296:1138-1141.

Jain S, Maheshawari MC (1986) Joseph disease in India: report of two families. J Neurogenet 3:61-63.

Jain S, Maheshawari MC (1990) Eight families with Joseph's disease in India. Neurology 40:128-131.

Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL (1985) Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. Nature 314:67-73.

Jodice C, Malaspina P, Persichetti F, Novelletto A, Spadaro M, Giunti P, Morocutti C, Terrenato L, Harding AE, Frontali M (1994) Effect of trinucleotide repeat length and parental sex on phenotipic variation in spinocerebellar ataxia type 1. Am J Hum Genet 54:959-965.

Kahn A (1993) Thérapie génique: l'ADN médicament. John Libbey Eurotex, Paris.

Kameya T, Abe K, Aoki M, Sahara M, Tobita M, Konno H, Itoyama Y (1995) Analysis of spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1): related CAG trinucleotide expansion in Japan. Neurology 45:1587-1594.

Kaplan JC, Delpech M (1995) Bioligie Moleculaire et Medecine. 2nd edn. Medecine-Sciences Flammarion, Paris .

Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S, Kawakami H, Nakamura S, Nishimura M, Akiguchi I, Kimura J, Narumiya S, Kakizuka A (1994) CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. Nature Genet 8:221-228.

Kazazian Jr HH, Wong C, Youssoufian H, Scott AF, Phillips DG, Antonorakis SE (1988) Haemophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man. Nature 332:164-166.

Kazazian Jr HH, Boehm CD (1988) Molecular basis and prenatal diagnosis of β-thalassemia. Blood 72:1107-1116.

Knowlton RG, Cohen-Haguenauer O, Van Cong N et al. (1985) A polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis is located on chromosome 7. Nature 318:380-382.

Koide R, Ikeuchi T, Onodera O, Tanaka H, Igarashi S, Endo K, Takahashi H, Kondo R, Ishikawa A, Hayashi T, Saito M, Tomoda A, Miike T, Naito H, Ikuta F, Tsuji S (1994) Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA). Nature Genet 6:9-13.

Konigsmark BW, Weiner LP (1970) The olivopontocerebellar atrophies : a review. Medicine 49:227-241.*

Koshy B, Matilla T, Burright EN, Merry DE, Fischbeck KH, Orr HT, Zoghbi HY (1996) Spinocerebellar ataxia type-1 and spinobulbar muscular atrophy gene products interact with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Hum Mol Genet 5:1311-1318.

Kremer EJ, Pritchard M, Lynch M, Yu S, Holman K, Baker E, Warren ST, Schlessinger D, Sutherland GR, Richards RI (1991) Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)n. Science 252:1711-1714.

La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fishbeck H (1991) Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. Nature 352:77-79.

Ladame P (1890) Friedreich's disease. Brain 13:467-537.*

Lathrop GM, Lalouel JM (1984) Easy calculations of *lod scores* and genetic risks on small computers. Am J Hum Genet 36:460-465.

Lehrman MA, Goldstein JL, Russell DW, Brown MS (1987) Duplication of seven exons in LDL receptor gene caused by Alu-Alu recombination in a subject with familial hypercholesterolemia. Cell 48:827-835.

Lezin A, Cancel G, Stevanin G, Smadja D, Vernant J-C, Durr A, Marcial J, Buisson G-G, Bellance R, Chneiweiss H, Agid Y, Brice A (1996) Autosomal dominant cerebellar ataxia type 1 in Martinique (French West Indies): genetic analysis of three unrelated SCA2 families. Hum Genet 97:671-676.

Li SH, McInnis MG, Margolis RL, Antonarakis SE, Ross CA (1993) Novel triplet repeat containing genes in human brain: cloning, expression, and length polymorphisms. Genomics 16:572-579.

Liebhaber SA, Griese E-U, Weiss I, Cash FE, Ayub H, Higgs DR, Horst J (1990) Inactivation of human α-globin gene expression by *de novo* deletion located upstream of the α-globin gene cluster. Proc Natl Aca Sci USA 87:9431-9435.

Lima L, Coutinho P (1980) Clinical criteria for diagnosis of Machado-Joseph disease: report of a non-Azorean Portuguese family. Neurology 30:319-322.

Lindblad K, Savontaus M-L, Stevanin G, Holmberg M, Digre K, Zander C, David G, Benomar A, Nikoskelainen E, Trottier Y, Holmgren G, Ptacek LJ (1996) CAG repeat expansions in SCA7. Am J Hum Genet 59 (suppl. 4): A269.

Livingstone IR, Sequeiros J (1984) Machado-Joseph disease in an American-Italian Family. J Neurogenet 1:185-188.

Lopes-Cendes I, Andermann E, Attig E, Cendes F, Bosch S, Wagner M, Gerstenbrand F, Andermann F, Rouleau GA (1994a) Confirmation of the SCA-2 locus as an alternative locus for dominantly inherited spinocerebellar ataxias and refinement of the candidate region. Am J Hum Genet 54:774-781.

Lopes-Cendes I, Andermann E, Rouleau GA (1994b) Evidence for the existence of a fourth dominantly inherited spinocerebellar ataxia locus. Genomics 21:270-274.

Lopes-Cendes I, Maciel P, Kish S, Gaspar C, Robitaille Y, Clark HB, Koeppen AH, Nance M, Schut L, Silveira I, Coutinho P, Sequeiros J, Rouleau GA (1996) Somatic mosaicism in the central nervous system in spinocerebellar ataxia type 1 and Machado-Joseph disease. Ann Neurol 40:199-206.

Luty JA, Litt M (1991) Dinucleotide repeat polymorphism at the D14S45 locus. Nucleic Acids Res 19:4308.

Maciel P, Gaspar C, DeStefano AL, Silveira I, Coutinho P, Radvany J, Dawson DM, Sudarsky L, Guimaraes J, Loureiro JE, Nezarati MN, Corwin LI, Lopes-Cendes I, Rooke K, Rosenberg RN, MacLeod P, Farrer LA, Sequeiros J, Rouleau GA (1995) Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. Am J Hum Genet 57:54-61.

Mahadevan M, Tsilfidis C, Sabourin L, Shutler G, Anemiya C, Jansen G, Neville C, Narang M, Barceló J, O'Hoy K, Leblond S, Earle-MacDonald J, de Jong PJ, Wieringa B, Korneluk RG (1992) Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. Science 255:1253-1255.

Margolis RL, Stine OC, McInnis MG, Ranen NG, Rubinsztein DC, Leggo J, Jones Brando LV, Kidwai AS, Loev SJ, Breschel TS, Callahan C, Simpson SG, DePaulo JR, McMahon J, J, Sanjeev J, Paykel ES, Walsh C, DeLisi LE, Crow TJ, Torrey EF, Ashworth RG, Macke JP, Nathans J, Ross CA (1996) cDNA cloning of a human homologue of the *Caenorhabditis elegans* cell fate-determining gene *mab*-21: expression, chromosomal localization and analysis of a highly polymorphic (CAG)n trinucleotide repeat. Hum Mol Genet 5:607-616.

Marie P (1893) Sur l'heredo-ataxie cerebelleuse. Sem Med (Paris) 13:444-447.*

Maruyama H, Nakamura S, Matsuyama Z, Sakai T, Doyu M, Sobue G, Seto M, Tsujihata M, Oh-i T, Nishio T, Sunohara N, Takahashi R, Hayashi M, Nishino I, Ohtake T, Oda T, Nishimura M, Saida T, Matsumoto H, Baba M, Kawaguchi Y, Kakizuka A, Kawakami H (1995) Molecular features of the CAG repeats and clinical manifestation of Machado-Joseph disease. Hum Mol Genet 4:807-812.

Mathias SL, Scott AF, Kazazian Jr HH, Boeke JD, Gabriel A (1991) Reverse transcriptase encoded by a human transposable element. Science 254:1808-1810.

Matilla T, Volpini V, Rosell G, Corral J, Davalos A, Molins A, Estivill X (1993) Presymptomatic analysis of spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) via the expansion of the SCA1 CAG-repeat in a large pedigree displaying anticipation and parental male bias. Hum Mol Genet 2:2123-2128.

Matsumura R, Takayanagi T, Murata K, Futamura N, Makito H, Ueno S (1996) Relationship of (CAG)nC configuration to repeat instability of the Machado-Joseph disease gene. Hum Genet 98:643-645.

Maxam A, Gilbert WA (1977) A new method for sequencing DNA. Proc Natl Acad Sci USA 74:560-564.

McKusick VA (1991) Current trends in mapping human genes. FASEB J 5:12-20.

McKusick VA (1996) Mendelian inheritance in man: catalogs of autosomal dominant, autosomal recessive, and X-linked phenotypes. OMIM (the on-line version).

McLaughlin BA, Spencer C, Eberwine J (1996) CAG trinucleotide RNA repeats interact with RNA-binding proteins. Am J Hum Genet 59:561-569.

Melki J, Abdelhak S, Sheth P, Bachelot MF, Burlet P, Marcadet A, Aicardi J, Barois A, Carriere JP, Fardeau M, Fontan D, Ponsot G, Billette T, Angelini C, Barbosa C, Ferriere G, Lanzi G, Ottolini A, Babron MC, Cohen D, Hanauer A, Clerget-Darpoux F, Lathrop M, Munnich A, Frezal J (1990) Gene for chronic proximal spinal muscular atrophies maps to chromosome 5q. Nature 344:767-768.

Mendel G (1865) Experiments in plants hybridization. Translated from the German by W. Bateson and reprinted in *Classic Papers in Genetics* (1959) (ed. J.A. Peters), pp.1-20. Prentice Hall, New Jersey.*

Menzel P (1891) Beitrag zur Kenntnis der hereditaren ataxie und kleinhiratrophie. Arch Psychiat Nervenkr 22:160-190.*

Miesfeld R, Krystal M, Arnheim N (1981) A member of a new repeated sequence family which is conserved throughout eucaryotic evolution is found between the human delta and beta globin genes. Nucleic Acids Res 9:5931-5947.

Muratani K, Hada T, Yamamoto Y, Kaneko T, Shigeto Y, Ohue T, Furuyama J, Higashino K (1991) Inactivation of the colinesterase gene by Alu insertion: possible mechanisms for human gene transposition. Proc Natl Acad Sci USA 88:11315-11319.

Murray JM, Davies KE, Harper PS, Meredith L, Williamson R (1982) Linkage relationship of a cloned DNA sequence on the short arm of chromosome X to Duchenne muscular dysthrophy. Nature 300:69-71.

Myers SM, Macleod PM, Forse RA, Forster-Gibson CJ, Simpson NE (1986) Machado-Joseph disease: linkage analysis between the loci for the disease and 18 protein markers. Cytogenetic Cell Genet 43:226-228.

Nagafuchi S, Yanagisawa H, Sato K, Shirayama T, Ohsaki E, Bundo M, Takeda T, Tadokoro K, Kondo I, Murayama N, Tanaka Y, Kikushima H, Umino K, Kurosawa H, Furukawa T, Nihei K, Inoue T, Sano A, Komure O, Takahashi M, Yoshizawa T, Kanazawa I, Yamada M (1994) Dentatorubral and pallidoluysian atrophy expansion of an unstable CAG trinucleotide on chromosome 12p. Nature Genet 6:14-18.

Naito H, Oyanagi S (1982) Familial myoclonus epilepsy and choreathetosis: hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy. Neurology 29:798-807.

Nakamura Y, Leppert P, O'Connell P, Wolff R, Holm T, Culver M, Martin C, Fujimoto E, Hoff M, Kumlin E, White R (1987) Variable number of tandem repeats (VNTR) markers for human gene mapping. Science 235:1616-1622.

Nakano KK, Dawson DM, Spence A (1972) Machado disease: A hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. Neurology 22:49-55.

Nasir J, Floresco SB, O'Kuskey JR, Diewert VM, Richman JM, Zeisler J, Borowski A, Marth JD, Phillips AG, Hayden MR (1995) Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. Cell 81:811-823.

Nasir J, Goldberg P, Hayden MR (1996) Huntington disease: new insights into the relationship between CAG expansion and disease. Hum Mol Genet 5:1431-1435.

Néri C, Albanèse V, Lebre A-S, Holbert S, Saada C, Bougueleret L, Meier-Ewert S, Le Gall I, Millasseau P, Bui H, Giudicelli C, Massart C, Guillou S, Gervy P, Poullier E, Rigault P, Weissenbach J, Lennon G, Chumakov I, Dausset J, Lehrach H, Cohen D, Cann HM (1996) Survey of CAG/CTG repeats in human cDNAs representing new genes: candidates for inherited neurological disorders. Hum Mol Genet 5:1001-1009.

NIH/CEPH Collaborative Mapping Group (1992) A comprehensive genetic linkage map of the human genome. Science 258:67-86.

Nikali K, Suomalainen A, Terwilliger J, Weissenbach J, Peltonen L (1995) Random search for shared chromosomal regions in four affected individuals: the assignment of a new hereditary ataxia locus. Am J Hum Genet 56:1088-1095.

Norremole A, Nielsen JE, Sorensen SA, Hasholt L (1995) Elongated CAG repeats of the B37 gene in a Danish family with dentatorubral-pallidoluysian atrophy. Hum Genet 95:313-318.

Nystuen A, Benke PJ, Merren J, Stone EM, Sheffield VC (1996) A cerebellar ataxia locus identified by DNA pooling to search for linkage disequilibrium in an isolated population from the Cayman Islands. Hum Mol Genet 5:525-531.

Oberlé I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, Boue J, Bertheas MF, Mandel J-L (1991) Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. Science 252:1097-1102.

O'Connel P, Lathrop GM, Nakamura Y, Leppert ML, Lalouel J-M, White R (1989) Twenty loci form a continuous map of markers for human chromosome 2. Genomics 5:738-745.

Orozco G, Nodarse A, Cordoves R, Auburger G (1990) Autosomal dominant cerebellar ataxia: clinical analysis of 263 patients from a homogeneous population in Holguin, Cuba. Neurology 40:1369-1375.

Orr HT, Chung MY, Banfi S, Kwiatkowski TJ, Jr., Servadio A, Beaudet AL, McCall AE, Duvick LA, Ranum LP, Zoghbi HY (1993) Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. Nature Genet 4:221-226.

Ott J (1985) Analysis of Human Genetic Linkage. Johns Hopkins University Press, Baltimore.

Perutz MF, Johnson T, Susuki M, Finch JT (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:5355-5358.

Potter NT, Meyer MA, Zimermman AW, Eisenstadt ML, Anderson IJ (1995) Molecular and clinical findings in a family with dentatorubral-pallidoluysian atrophy. Ann Neurol 37:273-277.

Pou-Serradel A, Russi A, Ferrer I, Galofre E, Escudero D (1987) Maladie de Machado-Joseph dans une famille d'origine espagnole. Rev Neurol (Paris) 143:520-525.*

Pulst S-M, Nechiporuk A, Starkman S (1993) Anticipation in spinocerebellar ataxia type 2. Nature Genet 5:8-10.

Pulst S-M, Nechiporuk A, Nechiporuk T, Gispert S, Chen C-N, Lopes-Cendes I, Pearlman S, Starkman S, Orozco-Diaz G, Lunkes A, DeJong P, Rouleau GA, Auburger G, Korenberg J, Figueroa C, Sahba S (1996) Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. Nature Genet 14:269-276.

Quan F, Janas J, Popovich BW (1995) A novel CAG repeat configuration in the SCA1 gene: implications for the molecular diagnostics of spinocerebellar ataxia type 1. Hum Mol Genet 4:2411-2413.

Radvany J (1993) The Catarina Kindred: Machado-Joseph disease of Azorean Ancestry. In: Lechtenberg R (ed) Handbook of Cerebellar Diseases. Marcel Dekker, New York: 363-372.

Ranum LP, Chung MY, Banfi S, Bryer A, Schut LJ, Ramesar R, Duvick LA, McCall A, Subramony SH, Goldfarb L, Gomez C, Sandkuijl LA, Orr HT, Zoghbi HY (1994a) Molecular and clinical correlations in spinocerebellar ataxia type 1: evidence for familial effects on the age at onset. Am J Hum Genet 55:244-252.

Ranum LP, Schut LJ, Lundgren JK, Orr HT, Livingston DM (1994b) Spinocerebellar ataxia type 5 in a family descended from the grandparents of President Lincoln maps to chromosome 11. Nature Genet 8:280-284.

Ranum LP, Lundgren JK, Schut LJ, Ahrens MJ, Perlman S, Aita J, Bird TD, Gomez C, Orr HT (1995) Spinocerebellar ataxia type 1 and Machado-Joseph disease: incidence of CAG expansions among adult-onset ataxia patients from 311 families with dominant, recessive, or sporadic ataxia. Am J Hum Genet 57:603-608.

Richards RI, Sutherlands GR (1992) Dynamic mutations: a new class of mutations causing human disease. Cell 70:709-712.

Riggins GJ, Lokey LK, Chastain JL, Leiner HA, Sherman SL, Wilkinson KD, Warren ST (1992) Human genes containing polymorphic trinucleotide repeats. Nature Genet 2:186-191.

Romanul FCA, Fowler HL, Radvany J, Feldman RG, Feingold M (1977) Azorean disease of the nervous system. N Engl J Med 296:1505-1508.

Rosenberg RN, Nyhan WL, Bay C, Shore P (1976) Autosomal dominant striatonigral degeneration: a clinical, pathologic, and biochemical study of a new genetic disorder. Neurology 26:703-714.

Rosenberg RN (1990) Autosomal dominant cerebellar phenotypes: the genotype will settle the issue. Neurology 40:1329-1331.

Rosenberg RN (1995) Autosomal dominant cerebellar phenotypes: the genotype has settled the issue. Neurology 45: 1-5.

Rubinsztein DC, Leggo J, Coetzee GA, Irvine RA, Buckley M, Ferguson-Smith MA (1995) Sequence variation and size ranges of CAG repeats in the Machado-Joseph disease, spinocerebellar ataxia type 1 and androgen receptor genes. Hum Mol Genet 4:1585-1590.

Rubinsztein DC, Leggo J, Coles R, Almqvist E, Biancalana V, Cassiman J-J, Chotai K, Connarty M, Craufurd D, Curtis A, Curtis D, Davidson MJ, Differ A-M, Dode C, Dodge A, Frontali M, Ranen NG, Stine OC, Sherr M, Abbott MH, Franz ML, Graham CA, Harper PS, Hedreen JC, Jackson A, Kaplan JC, Losekoot M, MacMillan JC, Morrison P, Trottier Y, Novelletto A, Simpson SA, Theilmann J, Whittaker JL, Folstein S, Ross CA, Hayden MR (1996) Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington Disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal erderly individuals with 36-39 repeats. Am J Hum Genet 59:16-22.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230:1350-1354.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239:487-494.

Sakai T, Ohta M, Ishino H (1983) Joseph disease in a non-Portuguese family. Neurology 33:74-80.

Sakai T, Antoku Y, Kawakami H, Maruyama H, Nakamura S, Tanaka K (1996) A family with Machado-Joseph disease previously diagnosed as dentatorubral-pallidoluysian atrophy. Neurology 46:1154-1156.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sanger B (1892) On hereditary ataxia with a series of twenty-one cases. Brain 250-268.*

Sanger F, Nicklen S, Coulson A (1977) DNA sequencing with chain-termination inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-5467.

Sanpei K, Takano H, Igarashi S, Sato T, Oyake M, Sasaki H, Wakisaka A, Tashiro K, Ishida Y, Ikeuchi T, Koide R, Saito M, Sato A, Tanaka T, Hanyu S, Takiyama Y, Nishizawa M, Shimizu N, Nomura Y, Segawa M, Iwabuchi K, Eguchi I, Tanaka H, Takahashi H, Tsuji S (1996) Identification of the spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct identification of repeat expansion and cloning technique, DIRECT. Nature Genet 14:277-284.

Schalling M, Hudson TJ, Buetow KH, Housman DE (1993) Direct detection of novel expanded trinucleotide repeats in the human genome. Nature Genet 4:135-139.

Schmitt I, Epplen JT, Riess O (1996) Predominant neuronal expression of the gene responsible for dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA) in rat. Hum Mol Genet 4:1619-1624.

Schöls L, Vieira-Saecker AM, Schols S, Przuntek H, Epplen JT, Riess O (1995) Trinucleotide expansion within the MJD1 gene presents clinically as spinocerebellar ataxia and occurs most frequently in German SCA patients. Hum Mol Genet 4:1001-1005.

Schut JW (1950) Hereditary ataxia: clinical study through six generations. Arch Neurol Psychiat 63:535-568.*

Sequeiros J, Suite NDA (1986) Letter: Spinopontine atrophy disputed as a separete entity: the first description of Machado-Joseph disease. Neurology 36:1408.

Sequeiros J (1989) Análise genética das causas da variação fenotípica na doença de Machado-Joseph. Dissertação de Doutoramento, Porto.

Sequeiros J, Manaia A, Silveira I, Coutinho P, Loureiro JML, Melki J, Rozet JM, Burlet P, Amorim A, Prata MJ, Veiga I, Almeida VM, Santos MT, Santos MS, Rocha J, Brandao MC, Munnich A (1992) Linkage analysis of Machado-Joseph disease with 44 traditional and DNA polymorphisms. Am J Hum Genet 51:A373(Abstract).

Sequeiros J, Coutinho P (1993) Epidemiology and clinical aspects of Machado-Joseph disease. In: Harding AE (ed) Advances in Neurology. Raven Press, New York: 139-153.

Sequeiros (1996) O teste preditivo da doença de Machado-Joseph, ICBAS, Porto.

Servadio A, Koshy B, Amstrong D, Antalffy B, Orr HT, Zoghbi HY (1995) Expression analysis of the ataxin-1 protein in tissues from normal and spinocerebellar ataxia type 1 individuals. Nature Genet 10:94-98.

Silveira I, Manaia A, Melki J, Magarino C, Lunkes A, Hernandez A, Gispert S, Burlet P, Rozet JM, Coutinho P, Loureiro JML, Guimarães J, Auburger G, Munnich A, Sequeiros J. Machado-Joseph disease is genetically different from Holguin dominant ataxia (SCA2). Genomics 17:556-559.

Smith JK (1975) Dentatorubralpallidoluysian atrophy. In: Vinken PJ, Bruyn GW (eds) Handbook of Clinical Neurology. North-Holland, Amsterdam: 519-534.

Smith H (1970) A restriction enzyme from Hemophilus influenzae II: base sequence of the recognition site. J Mol Biol 51:393:409.

Smith H, Nathans D (1973) A suggested numenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes. J Mol Biol 81:419-423.

Snell RG, MacMillan JC, Cheadle JP, Fenton I, Lazarou LP, Davies P, MacDonald ME, Gusella JF, Harper PS, Shaw DJ (1993) Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease. Nature Genet 4:393-397.

Solomon SD, Geisterfer-Lowrance AAT, Vosberg H-P, Hiller G, Jarcho JA, Morton CC, McBride WO, Mitchell AL, Bale AE, McKenna WJ, Seidman JG, Seidman CE (1990) A locus for familial hypertrophic cardiomyopathy is closely linked to the cardiac myosin heavy chain genes, CRI-L436 on chromosome 14 at q11-q12. Am J Hum Genet 47:389-394.

Soong B, Cherng C-H (1996) Machado-Joseph disease: molecular and clinical characterization in nine Chinese families. Neurology 46:A197(Abstract).

Sotelo C, Guenet JL (1988) Pathologic changes in the CNS of dystonia musculorum mutant mouse: an animal model for human spinocerebellar ataxia. Neuroscience 2:403-424.

Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separeted by gel electrophoresis. J Mol Biol 98:503-517.

Spadaro M, Giunti P, Lulli P, Frontali M, Jodice C, Cappellacci C, Morellini M, Persichetti F, Trabace S, Anastasi R, Morocutti C (1992) HLA linked spinocerebellar ataxias: a clinical, neuropathologic and genetic study of a large Italian kindred. Acta Neurol Scand 85:227-265.*

Spurr NK, Naylor S (1991) Report of the first international workshop on human chromosome 2 mapping. Workshop on human chromosome 2 mapping.

Stevanin G, Le Guern E, Ravise N, Chneiweiss H, Dürr A, Cancel G, Vignal A, Boch A-L, Ruberg M, Penet C, Pothin Y, Lagroua I, Haguenau M, Rancurel G, Weissenbach J, Agid Y, Brice A (1994) A third locus for autosomal dominant cerebellar ataxia type 1 maps to chromosome 14q24.3-qter: evidence for the existence of a fourth locus. Am J Hum Genet 54:11-20.

Stevanin G, Cancel G, Didierjean O, Dürr A, Abbas N, Cassa E, Feingold J, Agid Y, Brice A (1995) Linkage Disequilibrium at the Machado-Joseph disease/spinal cerebellar ataxia 3 locus: evidence for a common founder effect in French and Portuguese-Brazilian families as well as a second ancestral Portuguese-Azorean mutation. Am J Hum Genet 57:1247-1250.

Stevanin G, Trottier Y, Cancel G, Dürr A, David G, Didierjean O, Bürk K, Imbert G, Saudau F, Abada-Bendib M, Gourfinkel-An I, Benomar A, Abbas N, Klockgether T, Grid D, Agid Y, Mandel J-L, Brice A (1996) Screening for proteins with polyglutamines expansions in autosomal dominant cerebellar ataxia. Hum Mol Genet 5:1887-1892.

Subramony SH, Currier RD (1991) The classification of familial ataxias. In: Vinken PJ, Bruyn GW, Klawans HL (eds) Handbook of Clinicl Neurology. Elsevier Science Publishers, New York: 271-284.

Suite NDA, Sequeiros J, McKhann GM (1986) Machado-Joseph disease in a Sicilian-American family. J Neurogenet 3:177-182.

Sutherland GR, Richards RI (1995) Simple tandem DNA repeats and human genetic diseases. Proc Natl Acad Sci USA 92:3636-3641.

Takahashi H, Ohama E, Naito H, Takeda S, Nakashima S, Makifuchi T, Ikuta F (1988) Hereditary dentatorubral-pallidoluyisian atrophy: clinical and pathologic variants in a family. Neurology 38:1065-1070.

Takahata N, Ito K, Yoshimura Y, Nishihori K, Suzuki H (1978) Familial chorea and myoclonus epilepsy. Neurology 28:913-919.

Takiyama Y, Nishizawa M, Tanaka H, Kawashima S, Sakamoto H, Karube Y, Shimazaki H, Soutome M, Endo K, Ohta S, Kagawa Y, Kanazawa I, Mizuno Y, Yoshida M, Yuasa T, Horikawa Y, Oyanagi K, Nagai H, Kondo T, Inuzuka T, Onodera O, Tsuji S (1993) The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q. Nature Genet 4:300-304.

Takiyama Y, Ygarashi S, Rogaeva EA, Endo K, Rogaev EI, Tanaka H, Sherrington R, Sanpei K, Liang Y, Saito M, Tsuda T, Takano H, Ikeda M, Lin C, Chi H, Kennedy JL, Lang AE, Wherrett JR, Segawa M, Nomura Y, Yuasa T, Weissenbach J, Yoshida M, Nishizawa M, Kidd KK, Tsuji S, St George-Hyslop PH (1995) Evidence for inter-generational instability in the CAG repeat in the MJD1 gene and for conserved haplotypes at flanking markers amongst Japanese and Caucasian subjects with Machado-Joseph disease. Hum Mol Genet 4:1137-1146.

Telenius H, Kremer B, Goldberg YP, Theilmann J, Andrew SE, Zeisler J, Adam S, Greenberg C, Ives EJ, Clarke LA, Hayden MR (1994) Somatic and gonadal mosaicism of the Huntington disease gene CAG repeat in brain and sperm. Nature Genet 6:409-414.

Terwilliger JD, Ott J (1994) Handbook of human genetic linkage. Johns Hopkins University Press, Baltimore.

The Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. Cell 72:971-983.

Trask B (1991) Gene mapping by *in situ* hybridization. Curr Opin Genet Develop 1:82-87.*

Trottier Y, Lutz Y, Stevanin G, Imbert G, Devys D, Cancel G, Saudou F, Weber C, David G, Tora L, Agid Y, Brice A, Mandel JL (1995) Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias. Nature 378:403-406.

Twells R, Yenchitsomanus PT, Sirinavin C, Allotey R, Poungvarin N, Viriyavejakul A, Cemal C, Weber J, Farrall M, Rodprasert P, et al (1994) Autosomal dominant cerebellar ataxia with dementia: evidence for a fourth disease locus. Hum Mol Genet 3:177-180.

Twist EC, Casaubon LK, Ruttledge MH, Rao VS, Macleod PM, Radvany J, Zhao Z, Rosenberg RN, Farrer LA, Rouleau GA (1995) Machado Joseph disease maps to the same region of chromosome 14 as the spinocerebellar ataxia type 3 locus. J Med Genet 32:25-31.

Ueno S, Kondoh K, Kotani Y, Komure O, Kuno S, Kawai J, Hazama F, Sano A (1995) Somatic mosaicism of CAG repeat in dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA). Hum Mol Genet 4:663-666.

Verkerk AJMH, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu Y-H, Kuhl DPA, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang F, Eussen BE, Ommen G-JB, Blonden LAJ, Riggins GJ, Chastain JL, Kunst CB, Gaijaard H, Caskey CT (1991) Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. Cell 65:905-914.

Verschuren-Bemelmans CC, Brunt ERP, Burton M, Mensik RGJ, van der Meulen MA, Smith NH, Stolte-Dijkstra I, Buys CHCM, Scheffer H (1995) Refinement by linkage analysis in two large families of the candidate region of the third locus (SCA3) for autosomal dominant cerebellar ataxia type 1. Hum Genet 96:691-694.

Wadia NH, Swami RK (1971) A new form of heredo-familial spinocerebelar degeneration with slow eye movements: nine families. Brain 94:359-374.*

Wadia NH (1993) A common variety of hereditary ataxia in India. In: Lechtenberg R (ed) Handbook of cerebellar diseases. Marcel Dekker, New York: 373-388.

Wallace MR, Andersen LB, Saulino AM, Gregory PE, Glover TW, Collins FS (1991) A de novo insertion results in neurofibromatosis type 1. Nature 353:864-866.

Wang Z, Weber JL (1992) Continuous linkage map of human chromosome 14 short tandem repeat polymorphism. Genomics 13:532-536.

Warner TT, Williams L, Harding AE (1994) Letter: DRPLA in Europe. Nature Genet 6:225.

Warner TT, Williams LD, Walker RWH, Flinter F, Robb SA, Bundey SE, Honaver M, Harding AE (1995) A clinical and molecular genetic study of dentatorubropallidoluysian atrophy in four European families. Ann Neurol 37:452-459.

Watkins WS, Bamshad M, Jorde LB (1995) Population genetics of trinucleotide repeat polymorphisms. Hum Mol Genet 4:1485-1491.

Weber JL, May PE (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. Am J Hum Genet 44:388-396.

Weber JL (1990) Informativeness of human (dC-dG)n · (dG-dT)n polymorphisms. Genomics 7:524-530.

Weiner AL, Deininger PL, Efstratiadis (1986) Nonviral retroposons: genes, pseudogenes, and transposable elements generated by the reverse flow of genetic information. Ann Rev Biochem 55:631-661.

Weissenbach J, Gyapay G, Dib C, Vignal A, Morissette J, Millasseau P, Vaysseix, Lathrop M (1992) A second-generation linkage map of the human genome. Nature 359:794-801.

Wilson EB (1911) The sex chromosomes. Arch Mikrosk Anal Enwicklungsmech 77:249-271.*

Woods BT, Schaumburg HH (1972) Nigro-spino-dentatal degeneration with nuclear ophthalmoplegia: a unique and partially treatable clinicopathological entity. J Neurol Sci 17:149-166.

Yakura H, Wakisaka A, Fujimoto S, Itakura K (1974) Letter: Hereditary ataxia and HL-A. N Engl J Med 291:154-155.

Yanagisawa H, Fujii K, Nagafuchi S, Nakahori Y, Nakagome Y, Akane A, Nakamura M, Sano A, Komure O, Kondo I, Jin DK, Sorensen SA, Potter NT, Young SR, Nakamura K, Nukina N, Nagao Y, Tadokoro K, Okuyama T, Miyashita T, Inoue T, Kanazawa I, Yamada M (1996) A unique origin and multistep process for the generation of expanded DRPLA triplet repeats. Hum Mol Genet 5:373-379.

Yazawa I, Nukina N, Hashida H, Goto J, Yamada M, Kanazawa I (1995) Abnormal gene product identified in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA) in brain. Nature Genet 10:99-103.

Yuasa T, Ohama E, Harayama H, Yamada M, Miyatake T (1986) Joseph's disease: clinical and pathological studies in a Japanese family. Ann Neurol 19:152-157.*

Yuasa T, Miyatake T, Ohama E, Coutinho P, Sequeiros J, Leite I, Andrade C (1990) A comparative study of Machado-Joseph disease in Portuguese and Japanese. Advances in Neurological Sciences 34:102-112 (Japanese).

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

Zoghbi HY, Pollack MS, Lyons LA, Ferrell RE, Daiger SP, Beaudet AL (1988) Spinocerebellar ataxia: variable age of onset and linkage to human leukocyte antigen in a large kindred. Ann Neurol 23:580-584.

Zülch KJ (1948) Über die anatomische Stellung der Kleinhirnrindenatrophie. Dtsch Z Nervenh 159:19,70.*

*Conhecidos apenas por citação

oferta
4.000$00

17-6-98

BIBLIOTECA
DO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
"ABEL SALAZAR"