

## La diagnosi genetica nell'era di Next Generation Sequencing (NGS)

*Prof Alessandro Filla – Università Federico II Napoli*

La tecnica di Next Generation Sequencing (NGS) introdotta nella prima decade del 2000 ha rivoluzionato l'analisi genetica in molte malattie neurologiche rare e nelle atassie in particolare. NGS, che permette l'analisi simultanea di più geni, ha un'efficienza nettamente superiore rispetto alle tecniche precedenti degli anni 90, che si basavano su analisi successive di singoli geni (tecnica di Sanger). L'analisi genetica mediante NGS utilizza tre approcci: a. *Target Resequencing Panel* (TRP), pannello di analisi di un numero limitato (100-200) di geni legati ad atassie ereditarie; b. *Exome Sequencing* (ES) per il sequenziamento di tutta la parte codificante del DNA (circa 1-2% del genoma umano, ossia circa 20.000 geni) e che contiene l'85% delle mutazioni patogene; c. *Whole Genome Sequencing* (WGS), una metodica capace di individuare le mutazioni nelle regioni codificanti e non codificanti dell'intero genoma. Il costo, il tempo e la difficoltà nell'interpretazione dei risultati fanno sì che al momento nella pratica clinica si utilizzino esclusivamente le modalità TRP e ES, essendo WGS per lo più limitato ad ambito di ricerca.

I risultati di NGS si possono riassumere in quattro punti: a. ampliamento fenotipo nelle singole malattie; b. nuove manifestazioni neurologiche di geni già noti come causa di una differente malattia neurologica; c. identificazione di nuovi geni; d. velocizzazione della diagnosi genetica. Alcuni esempi sono qui elencati: a. ampliamento del fenotipo: il gene *SPG7* (SPastic Gait type 7), già conosciuto come responsabile di una forma di paraparesi spastica ereditaria, è stato recentemente riconosciuto come causa frequente di atassia-spastica ereditaria (con compromissione del cervelletto), e secondo in frequenza all'atassia di Friedreich come causa di atassia cerebellare recessiva; b. nuove manifestazioni neurologiche di geni già noti come causa di una differente malattia neurologica. NGS ha mostrato che il gene *POLR3A* (RNA polymerase III subunit A), già conosciuto come causa di una grave malattia neurologica caratterizzata da leucodistrofia (alterazione della sostanza bianca cerebrale) associata ad alterazione dello sviluppo sessuale e dentario, può causare, quando le mutazioni sono più lievi, un'atassia spastica; c. identificazione di nuovi geni. I nuovi geni identificati con NGS sono numerosi. Di particolare importanza per la frequenza è il gene responsabile di CANVAS (cerebellar ataxia, neuropathy, vestibular areflexia), *RFC1* (Replication Factor 1; identificato con WGS). Una sequenza ripetuta numerose volte di cinque nucleotidi adenina-guanina (AAGGG), biallelica, causa la malattia. Tale malattia è responsabile di un numero rilevante di atassie a insorgenza nell'adulto sporadiche o familiari, frequentemente associata a tosse e disturbi vegetativi; d. velocizzazione della diagnosi genetica. Il procedimento diagnostico tradizionale (metodo di Sanger) prevede l'analisi di singoli geni. Nel caso di negatività si procede all'analisi successiva di altri geni. Un procedimento che richiede anni, spesso non conclusivo. Il tempo medio qualora si raggiungesse la diagnosi era di circa un lustro per le forme infantili e più di un decennio per le forme adulte. Come detto in precedenza, la diagnosi si raggiunge in un numero limitato di casi. L'introduzione delle tecniche di NGS ha modificato i tempi della diagnosi e l'efficacia (percentuale di risoluzione). Lo studio mediante pannello multigenico (TRP) permette il raggiungimento della diagnosi nel 15-20% delle forme in precedenza studiate con tecniche tradizionali, ma non diagnosticate, l'esoma (ES) nel 30-40% dei casi. Nei lavori citati in calce, sono riportati esempi di singoli pazienti o serie di pazienti che hanno atteso >20 anni per la diagnosi. *Rimane comunque una parte non trascurabile di pazienti atassici in cui la diagnosi genetica con TRP e ES non è raggiunta*. I motivi sono vari: forme considerate genetiche ma che in realtà non lo sono (fenocopie); le tecniche NGS non coprono tutto il gene e alcune mutazioni possono sfuggire; le espansioni ripetute e le anomalie strutturali del gene sfuggono al test; lo stesso vale per le mutazioni in regioni non codificanti del gene ecc.

Nel prossimo futuro il sequenziamento dell'intero genoma (WGS) permetterà un'ancora maggiore efficienza nella diagnosi. Diagnosi definita significa certezza per il paziente e rappresenta il primo passo per la ricerca della cura.

Alessandro Filla e Giuseppe De Michele  
Università Federico II, Napoli

Filippo Santorelli e Daniele Galatolo  
IRCCS "Stella Maris", Calambrone, Pisa

RINGRAZIAMENTI: Lo studio NGS in una serie di pazienti con atassia ereditaria non diagnosticata è parzialmente finanziato da AISA, 2019 a AF.

#### REFERENZE:

De Michele G, Galatolo D, Lieto M, Maione L, Coccozza S, Santorelli FM, Filla A. A New AARS2 Mutation in Two Siblings With Tremor, Downbeat Nystagmus, and Primary Amenorrhea: A Benign Phenotype Without Leukoencephalopathy. *Mov Disord Clin Pract.* 2020 7; 7:684-687. doi: 10.1002/mdc3.12991.

De Michele G, Galatolo D, Lieto M, Fico T, Saccà F, Santorelli FM, Filla A. Ataxia-myoclonus syndrome due to a novel homozygous ATP13A2 mutation. *Parkinsonism Relat Disord.* 2020;76:42-43. doi: 10.1016/j.parkreldis.2020.06.001.

De Michele G, Galatolo D, Barghigiani M, Dello Iacovo D, Trovato R, Tessa A, Salvatore E, Filla A, De Michele G, Santorelli FM. Spinocerebellar ataxia type 48: last but not least. *Neurol Sci.* 2020;41:2423-2432. doi: 10.1007/s10072-020-04408-3. .

#### ALTRE REFERENZE:

Galatolo D, Tessa A, Filla A, Santorelli FM. Clinical application of next generation sequencing in hereditary spinocerebellar ataxia: increasing the diagnostic yield and broadening the ataxia-spasticity spectrum. A retrospective analysis. *Neurogenetics.* 2018 ;19:1-8. doi: 10.1007/s10048-017-0532-6.

Ngo KJ, Rexach JE, Lee H, Petty LE, Perlman S, Valera JM, Deignan JL, Mao Y, Aker M, Posey JE, Jhangiani SN, Coban-Akdemir ZH, Boerwinkle E, Muzny D, Nelson AB, Hassin-Baer S, Poke G, Neas K, Geschwind MD, Grody WW, Gibbs R, Geschwind DH, Lupski JR, Below JE, Nelson SF, Fogel BL. A diagnostic ceiling for exome sequencing in cerebellar ataxia and related neurological disorders. *Hum Mutat.* 2020;41:487-501. doi: 10.1002/humu.23946.

Parodi L, Coarelli G, Stevanin G, Brice A, Durr A. Hereditary ataxias and paraparesias: clinical and genetic update. *Curr Opin Neurol.* 2018;31:462-471. doi: 10.1097/WCO.0000000000000585.

Rexach J, Lee H, Martinez-Agosto JA, Németh AH, Fogel BL. Clinical application of next-generation sequencing to the practice of neurology. *Lancet Neurol.* 2019;18:492-503. doi: 10.1016/S1474-4422(19)30033-X.