

RELAZIONE FINALE DEL PROGETTO AISA 2019:

“NEXT GENERATION SEQUENCING IN A SERIES OF UNDIAGNOSED PATIENTS”

“Next generation sequencing (NGS) in una serie di pazienti senza diagnosi molecolare.”

Tale progetto è stato finanziato in parte da AISA (Bando 2019).

INTRODUZIONE

Le atassie ereditarie sono un gruppo di malattie genetiche che colpiscono il cervelletto e le sue vie afferenti ed efferenti.

Le atassie ereditarie sono suddivise in forme dominanti che hanno una trasmissione verticale (un genitore affetto trasmette la malattia ai figli) e le forme recessive che hanno una trasmissione orizzontale (i genitori sono sani ma portatori, i fratelli possono essere affetti) anche se il confine tra le due forme sta diventando sfumato, considerato che ci sono mutazioni dello stesso gene che possono causare malattie in condizioni di mono- (dominanti) o biallelismo (recessive). Finora sono state identificate circa 50 forme dominanti (denominate anche atassie spino-cerebellari, SCA) con 35 geni identificati. La mutazione più frequente, responsabile delle SCA 1-2-3-6-7-17 è la ripetizione abnorme (espansione) della tripletta citosina-adenina-guanina (CAG). Nelle forme recessive sono stati identificati oltre 90 geni.

Considerando l'eterogeneità genetica delle atassie ereditarie, il processo diagnostico può essere tecnicamente complesso e richiedere tempi lunghi. Si è calcolato un ritardo nella diagnosi di 3-6 anni per le forme infantili e di 5-10 anni per le forme dell'adulto.

Nell'ultimo decennio il metodo Next Generation Sequencing (NGS) o di sequenziamento parallelo massivo, che permette di esaminare più geni contemporaneamente, ha sostituito la strategia “*gene-after-gene*”, basata sul metodo Sanger che consente di testare un gene alla volta.

Esistono diverse tecniche di NGS con differenti complessità e costi: la tecnica denominata Targeted Re-sequencing Panel (TRP), che permette il test simultaneo di più geni (50-300) responsabili dell'atassia; la tecnica denominata exome sequencing (ES) che consente di testare le porzioni codificanti di tutti i 20.000 geni del genoma umano; il clinical exome, che testa i geni legati alle malattie trasmesse con modalità mendeliana (circa 6000 geni); la tecnica di genome sequencing (GS) che consente di esaminare l'intero genoma incluse le regioni introniche, regolatorie e promotrici.

Con i metodi tradizionali “*gene-after-gene*” circa il 50% dei pazienti con atassie dominante o recessiva ha ricevuto una diagnosi genetica definitiva.

L'introduzione della tecnica NGS ha incrementato notevolmente il numero di pazienti diagnosticati, che erano rimasti irrisolti con gli approcci tradizionali, con risultati diversi, a seconda delle metodiche: 17% con TRP e 36% con ES. GS non è ancora un metodo diagnostico clinico comunemente utilizzato. I principali vantaggi di NGS sono: a) accelerare la diagnosi genetica; b) ampliare i fenotipi di malattie già note; c) ampliare i genotipi identificando nuove mutazioni in geni già noti; d) identificare nuove manifestazioni neurologiche di un gene già noto come causa di un disturbo neurologico; e) identificare nuovi geni.

Gli obiettivi dello studio sono stati:

- 1) Esaminare almeno 200 pazienti atassici, sporadici o familiari, risultati negativi al test per le espansioni delle triplette CAG (per le SCA) e GAA (per l'atassia di Friedrich) o di altri singoli geni o test biochimici, mediante TRP con un pannello che include 285 geni dell'atassia (ATAXOMA).
- 2) Testare mediante ES pazienti negativi al primo livello che abbiano altri membri della famiglia disponibili (la condizione ideale è il TRIO = paziente più entrambi i genitori)
- 3) Eseguire GS in pazienti negativi al secondo livello, che appartengono ad ampie famiglie (con ≥ 4 persone colpite in due generazioni)

RISULTATI

Pazienti coinvolti:

Un totale di 377 pazienti con diverse forme di atassia degenerativa-ereditaria provenienti da 12 centri specializzati in atassie ereditarie (Università/Policlinico Federico II, Napoli; IRCCS, Pisa; IRCCS, Gemelli-Roma; Università Cattolica/Policlinico Gemelli, Roma; Università/Policlinico Sapienza (Neurologia; Neuropsichiatria infantile), Roma; Ospedale San Camillo, Roma; Università/Policlinico, Messina; Università/Policlinico, Siena; IRCCS Gaslini, Genova; Università/Policlinico Vanvitelli, Napoli; Università/Policlinico, Padova) sono stati studiati. Altri 297 parenti affetti o sani si sono resi disponibili per studi di segregazione. Sessantadue pazienti (16,5%) erano casi familiari, e 315 (83,5%) erano casi sporadici. Tale coorte era già nota come negativa per le espansioni GAA o CAG, era fenotipicamente eterogenea ed includeva pazienti con atassia cerebellare pura, atassia spastica, atassia sensoriale o forme complesse con mioclono, epilessia e declino cognitivo. L'età di insorgenza era variabile: 94 (24,9%) con esordio infantile-adolescenziale, < 16 anni; 81(21,5%) con insorgenza adulta, < 40 anni; 195 (51,7%) con esordio tardivo, ≥ 40 anni.

Ataxoma (TRP-NGS)

Tutti i pazienti sono stati esaminati con ataxoma (TRP-NGS = 285 geni di atassia ereditaria). Secondo le linee guida di American College of Medical Genetics, in 125 pazienti (33,2%) sono state identificate delle varianti patogene (mutazioni) o verosimilmente patogene. Cinquantanove (15,6%) pazienti erano portatori di varianti di significato sconosciuto (VUS), incluse: varianti bialleliche che non è stato possibile mettere in fase (cioè stabilire l'origine materna o paterna delle mutazioni), varianti verosimilmente patogene in geni non chiaramente correlati all'atassia e probabili varianti patogene singole, in geni noti per causare solo disturbi recessivi. L'ataxoma ha dato esito negativo in 193 (51,2%) pazienti.

Tra i 125 casi positivi, sono state identificate 164 mutazioni patogene o verosimilmente patogene. Sessantanove mutazioni erano "nuove" (non precedentemente descritte), 37 missense e 32 troncanti. Le "nuove" mutazioni missense sono state esaminate *in silico* per verificare il loro presunto effetto deleterio sulla struttura della proteina. Inoltre lo studio filogenetico ha mostrato che tutti i residui interessati dalla mutazione erano evolutivamente conservati in più specie. Ancora, l'analisi della localizzazione del dominio proteico ha indicato che le nuove varianti erano situate in regioni della proteina che si suppone abbiano un ruolo centrale per la loro funzione.

Sono state trovate varianti che causano la malattia in 56 geni diversi. I nove geni più comuni sono stati: *STUB1*, *PRKCG*, *SPG7*, *CACNA1A*, *PNPLA6*, *SYNE1*, *TMEM240*, *CACNA1G*, *ITPR1*, che rendono

conto della metà dei casi con test positivo. Le vie metaboliche più frequentemente coinvolte sono: omeostasi e controllo di qualità delle proteine. Sono anche frequentemente interessati i canali ionici e la trasduzione del segnale

Nella review della letteratura di 27 studi pubblicati, TRP ha avuto un risultato medio di positività del 19,4% (range 11-82) e ES del 34,6% (20-57). Di conseguenza la resa dell'atassoma-TRP, utilizzato in questo studio, è risultata più vicina ad ES che a TRP finora descritta. Una migliore selezione dei pazienti ed un maggior numero di geni responsabili di atassia inseriti in atassoma potrebbero spiegare il nostro migliore risultato.

Esoma e Genoma

Inoltre, tra i 193 pazienti con atassoma non risolto, 69 (17 TRIO) sono stati sottoposti a sequenziamento dell'esoma (ES) e sette (5 TRIO) a sequenziamento del genoma (GS). E' in corso la valutazione dei risultati.

Studi di serie di pazienti.

Sono stati eseguiti tre studi.

1) In 14 famiglie con atassia dominante abbiamo riscontrato nove mutazioni nel gene *PRKCG* che sono responsabili dell'atassia spinocerebellare tipo14 (SCA14). Sette mutazioni erano di nuova identificazione. Quattro pazienti presentavano un fenotipo atipico. Lo studio ha ampliato lo spettro genetico e clinico della SCA14 (Vedi ref. #4 nel sito AISA).

2) Le varianti più comuni nel nostro studio sono le mutazioni in eterozigosi del gene *STUB1*. Tali mutazioni sono responsabili di SCA48, una SCA non causata da espansioni CAG. Il fenotipo è di una atassia ad insorgenza adulta associata a segni cognitivo-psichiatrici e disordini del movimento (corea e parkinsonismo). Le mutazioni *STUB1* potrebbero essere la causa più frequente di SCA causate da mutazioni convenzionali (Vedi ref. #5 nel sito AISA).

3) Lo studio di 62 pazienti con atassia ad esordio tardivo ha evidenziato nove pazienti portatori di un'espansione biallelica AAGGG nel gene *RFC1* responsabile della CANVAS (Cerebellar Ataxia, Neuropathy, Vestibular Areflexia Syndrome; Vedi ref. #6 nel sito AISA). Questo gene è stato recentemente identificato ed è una causa frequente di atassia recessiva o sporadica ad insorgenza tardiva.

CONCLUSIONI

- 1) Un totale di 125 (33%) pazienti con atassia ereditaria provenienti da una serie di 377 pazienti in precedenza esaminati con esito negativo con tecniche genetiche e biochimiche tradizionali hanno ricevuto una diagnosi genetica definita con una tecnica di Next Generation Sequencing (NGS), denominata Targeting Re-sequencing Panel (TRP), che comprende 285 geni responsabili di atassia (ATAXOMA). Tali risultati sono superiori all'attesa (19%) e si avvicinano a quelli ottenuti mediante Exome Sequencing (35%). Nel complesso è aumentato il numero di pazienti che ricevono una diagnosi genetica, ma non si è ancora raggiunto il 100% (Vedi ref. #1 nel sito AISA).
- 2) Sono state trovate 69 nuove mutazioni: 37 missense e 32 troncanti in geni già noti (Vedi ref. #1 nel sito AISA).

- 3) Il fenotipo di alcune forme di atassia ereditaria è stato ampliato (Vedi ref. #2, #3, #4 nel sito AISA).
- 4) Queste tecniche permettono di abbreviare il tempo di attesa per la diagnosi che in alcuni casi è stato superiore ai 30 anni (Vedi ref. #2 and #3 nel sito AISA).
- 5) È stato eseguito lo studio di serie di pazienti con atassie dominanti e recessive che ha portato ad una migliore definizione clinica e genetica (Vedi ref. #4, #5, #6 nel sito AISA).

CONCLUSIONS

- 1) One hundred twenty-five out of 377 (33%) of unsolved ataxic patients already screened with traditional methods received a definite genetic diagnosis by ataxoma (TRP- NGS). This yield is higher than expected for TRP studies (19%). A more precise selection of the patients and a higher number of ataxic genes analyzed may explain the better performance. This value is close to the 35% expected from Exome Sequencing (ES) studies (ref.#1).
- 2) Sixty-nine novel mutations in known genes were found in the course of the study: 37 missense and 32 truncating (ref.#1).
- 3) The phenotypes of some ataxic disorders were widened (ref.#2, #3, #4).
- 4) The delay to diagnosis has been long for most patients and sometimes very long (e.g. 24-35 year in patients reported in ref.#2 and #3).
- 5) NGS studies of series of patients with dominant or recessive ataxias contributed to a better definition of the clinical and genetic aspects of these disorders (ref. #4, #5, #6).

Ringraziamo tutti i pazienti e le loro famiglie per la collaborazione, l'AISA per il finanziamento e tutti i centri che hanno collaborato.

Alessandro Filla

AOU Federico II, Napoli

Giuseppe De Michele

AOU Federico II, Napoli

Daniele Galatolo

IRCCS Stella Maris, Pisa

Filippo M. Santorelli

IRCCS Stella Maris, Pisa

Glossario

NGS: Per sequenziamento genetico di nuova generazione (Next generation sequencing, NGS) si intende l'insieme delle tecnologie di sequenziamento degli acidi nucleici che hanno in comune la capacità di sequenziare, in parallelo, milioni di frammenti di DNA. Queste tecnologie hanno segnato una svolta rivoluzionaria nella possibilità di caratterizzare genomi di grandi dimensioni rispetto al metodo di sequenziamento del DNA di prima generazione (sequenziamento Sanger), grazie alla potenzialità di produrre, in un'unica seduta di analisi, una quantità di informazioni genetiche milioni di volte più grande.

ES: Exome Sequencing anche noto come Whole Exome Sequencing (WES), o sequenziamento dell'esoma, è una tecnica genomica per il sequenziamento di tutte le regioni codificanti proteine dei geni in un genoma (noto come esoma). Consiste di due fasi: la prima è la selezione di un insieme di DNA che codifica proteine. Queste regioni conosciute come esoni corrispondono al circa 1% del genoma umano. La seconda fase prevede il sequenziamento del DNA esonico utilizzando tecniche di sequenziamento del DNA "high-throughput".

GS: Genome sequencing, anche conosciuto come Whole Genome Sequencing, è il processo di determinazione dell'intera, o quasi intera, sequenza di DNA del genoma di un organismo, simultaneamente. Comprende il sequenziamento di tutto il DNA cromosomico e del DNA contenuto nei mitocondri.

TRP: Targeted gene Re-sequencing Panels è la tecnica per il sequenziamento di una selezione di geni o regioni geniche che sono in associazione con la malattia studiata (usualmente 50-300 geni).

Trio: L'analisi del genoma viene eseguita in TRIO (probando e genitori) tecnica che consente di aumentare l'accuratezza e la sensibilità diagnostica riducendo tempi e costi.

Variante o mutazione: Il cambiamento di una sequenza di DNA nei confronti del modello più frequente nella popolazione normale è considerato una mutazione o variante genetica. Tale modifica di una base del codice genetico può essere silente o causa di malattia.

CAG: Citosina- adenina-guanina, l'espansione patologica di questa serie di tre nucleotidi è la causa più frequente di atassia dominante o atassia spinocerebellare o SCA.

GAA: Guanina-adenina-adenina l'espansione patologica di questa sequenza di tre nucleotidi è la causa più frequente di atassia di Friedrich quando presente su entrambi gli alleli (omozigosi).

Analisi in silico: tale analisi, per lo più di natura bioinformatica, aiuta a capire se la variante in esame nel gene oggetto di studio è patogena o no tramite l'utilizzo di programmi computerizzati di predizione (software).

SCA: atassia spinocerebellare o dominante.

Eredità autosomica dominante o trasmissione verticale (un genitore affetto).

Eredità autosomica recessiva o trasmissione orizzontale (genitori sani e carrier della malattia).