

Corso di Dottorato di Ricerca in Medicina Traslazionale dello Sviluppo e dell'Invecchiamento Attivo (XXXII ciclo)

Curriculum: Marcatori Molecolari, Radiologici, Clinici e Cognitivo-Comportamentali

Dello Sviluppo E Del Declino Funzionale

Coordinatore: Prof. Palmiero Monteleone

Dottoranda: Sara Nuovo

Tutor: Prof. Pietro Vajro

Relazione attività del dottorando

1° ANNO

Nel corso del primo anno, l'attività di ricerca della dottoranda si è incentrata sullo studio delle caratteristiche fenotipiche e molecolari dei difetti congeniti del cervelletto e del tronco encefalico, con particolare riferimento alla Sindrome di Joubert (SJ) e alle ipoplasie pontocerebellari (PCH).

Il lavoro di approfondimento **CLINICO** svolto si è articolato nelle seguenti attività:

a) aggiornamento delle schede cliniche dei pazienti affetti da SJ coinvolti nel progetto di ricerca, ottenuto attraverso il confronto con gli specialisti inviati o con le stesse famiglie. Ciò si è rivelato particolarmente utile per descrivere in maniera accurata le manifestazioni renali della patologia e metterle in correlazione con eventuali marcatori biochimici in grado di fornire indicazioni prognostiche precoci.

b) valutazione delle manifestazioni cliniche e del fenotipo neuroradiologico dei pazienti affetti da patologie malformative del cervelletto e del tronco encefalico diverse dalla SJ, al fine di giungere ad un corretto inquadramento diagnostico e suggerire degli approfondimenti molecolari mirati.

Lo studio degli aspetti **MOLECOLARI** delle patologie investigate, subordinato alla diagnosi clinica, è avvenuto mediante:

i) sequenziamento Sanger di mutazioni specifiche o dell'intera porzione codificante e delle giunzioni esone-introne di geni noti

ii) analisi di Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) per la ricerca di riarrangiamenti (delezioni o duplicazioni)

iii) analisi NGS (*next generation sequencing*) di un pannello di geni ciliari (inclusi i geni noti come causativi di SJ)

iv) analisi NGS di un pannello di geni noti responsabili di patologie malformative del cervelletto e del tronco encefalico diverse dalla SJ (inclusi i geni noti come causativi di PCH)

v) sequenziamento dell'intera porzione codificante del genoma (whole exome sequencing-WES), volto all'identificazione di nuovi geni-malattia; in particolare, il WES si è basato sull'analisi dell'intero nucleo familiare (coppia di fratelli affetti/probando e genitori sani \pm fratello sano o affetto) per condizioni non immediatamente riconducibili a sindromi note o in pazienti con diagnosi clinica definita ma risultati negativi alla ricerca di varianti patogenetiche nei geni causativi noti.

La dottoranda si è occupata in prima persona dell'analisi e dell'interpretazione dei dati ottenuti dai protocolli di sequenziamento.

L'attività del primo anno ha previsto, inoltre, lo sviluppo di un questionario clinico dedicato alle atassie con esordio in età pediatrica, finalizzato alla futura realizzazione di un **DATABASE** online di patologia che contenesse i dati clinici, genetici e neuroradiologici dei pazienti inseriti e da utilizzare per alimentare il Registro Italiano di Patologia delle atassie pediatriche, con finalità epidemiologiche e di salute pubblica (progetto svolto in collaborazione con l'Istituto Superiore di Sanità).

2° ANNO

Nel corso del secondo anno, la dottoranda ha proseguito la sua attività di ricerca relativa allo studio delle caratteristiche fenotipiche e molecolari dei difetti congeniti del cervelletto e del tronco encefalico.

Il lavoro di approfondimento **CLINICO** ha previsto le seguenti attività:

a) nell'ambito dell'aggiornamento delle schede cliniche dei pazienti affetti da SJ coinvolti nel progetto di ricerca, particolare attenzione è stata riservata all'acquisizione di dati aggiornati relativi ai soggetti affetti adulti. In virtù della loro età, per questi soggetti non è attesa un'evoluzione del quadro clinico; di conseguenza, tale sottogruppo di pazienti è di fondamentale utilità ai fini della valutazione delle correlazioni genotipo-fenotipo. In riferimento alle manifestazioni renali della SJ, il lavoro di approfondimento effettuato sulla casistica disponibile ha permesso di identificare nel deficit di concentrazione urinaria un marcatore precoce dello sviluppo di nefropatia.

b) nell'ambito delle patologie malformative del cervelletto e del tronco encefalico diverse dalla SJ, l'attività si è incentrata principalmente su due aspetti: i) caratterizzazione delle manifestazioni cliniche e del fenotipo neuroradiologico di circa 60 pazienti con PCH, ai fini della rivalutazione delle correlazioni genotipo-fenotipo ad oggi note relativamente a questo gruppo di condizioni (lavoro in preparazione); ii) caratterizzazione clinica e neuroradiologica dei pazienti con specifici fenotipi malformativi cerebellari (ipoplasia vermiana isolata, ipoplasia cerebellare globale, shrunken cerebellum, displasia cerebellare, malformazione di Dandy Walker) già sottoposti ad analisi citogenetica (SNP-array o CGH-array ad elevata risoluzione), volta ad investigare il ruolo causativo delle Copy Number Variants (CNVs) nelle diverse tipologie di malformazione cerebellare.

Lo studio degli aspetti **MOLECOLARI** delle patologie investigate, subordinato alla diagnosi clinica, è avvenuto mediante il protocollo di analisi utilizzato nel corso del primo anno, con l'aggiunta di:

i) analisi basata sull'utilizzo di un array-CGH customizzato ad elevata risoluzione, introdotta in un gruppo selezionato di pazienti con SJ e volta ad investigare la presenza di riarrangiamenti (microdelezioni/microduplicazioni) a carico dei più frequenti geni causativi di SJ.

La dottoranda si è occupata in prima persona dell'analisi e dell'interpretazione dei dati ottenuti dai protocolli di sequenziamento. L'acquisizione di nuove competenze in materia di analisi dati e programmazione le ha inoltre consentito di rielaborare i dati acquisiti per l'identificazione di correlazioni genotipo-fenotipo.

L'attività del secondo anno ha previsto, inoltre, la partecipazione attiva alla prima fase della realizzazione del **DATABASE** online PADAPORT dedicato alle atassie con esordio in età pediatrica (sulla base del questionario clinico definito nel corso dell'anno precedente), in collaborazione con l'IRCCS Eugenio Medea (sede Bosisio Parini).

3° ANNO

Nel corso del terzo anno, la dottoranda ha proseguito la sua attività di ricerca relativa allo studio delle caratteristiche fenotipiche e molecolari della SJ, delle PCH, e degli altri difetti congeniti del cervelletto e del tronco encefalico.

Il lavoro di approfondimento **CLINICO** ha previsto le seguenti attività:

a) proseguimento dell'attività di aggiornamento delle schede cliniche dei pazienti affetti da SJ, al fine di investigare l'eventuale evoluzione del quadro clinico e di acquisire informazioni relative alla storia naturale di malattia. Parallelamente, nell'ambito di una collaborazione con l'Istituto Superiore di Sanità, è stata condotta un'indagine volta a stimare la prevalenza italiana dei pazienti con SJ alla data dell'8 Ottobre 2018; a tale scopo, è stata utilizzata la casistica decennale reclutata mediante il network dei centri clinici aderenti al del progetto di ricerca sulle malformazioni cerebellari e sparsi sull'intero territorio nazionale. Tale lavoro ha permesso di stimare il tasso di prevalenza globale e specifico per sesso e per età dei pazienti JS in Italia. Nell'ambito dello stesso lavoro, sono stati calcolati i tassi di prevalenza relativi al sottogruppo di pazienti SJ nei quali lo screening molecolare (condotto mediante tecnologia next-generation sequencing-NGS) ha dato esito positivo, ed è stata stimata la frequenza mutazionale dei geni presenti nella coorte in esame. Considerato il diverso impatto che i vari geni causativi possono avere sullo sviluppo di complicanze d'organo, tale informazione risulta di fondamentale importanza al fine di identificare i bisogni assistenziali di una specifica fascia di pazienti e pianificare i conseguenti interventi di carattere assistenziale al livello di sanità pubblica.

b) partecipazione a gruppi di ricerca internazionali, volta alla definizione di flow-charts clinico-strumentali e alla formulazione di indicazioni per il management da adottarsi in pazienti con specifiche patologie neurologiche pediatriche. In particolare, questa interazione ha portato alla proposta di un algoritmo per l'inquadramento diagnostico delle forme di atassia ad esordio precoce. Analogamente, attraverso un lavoro collaborativo che ha coinvolto ricercatori esperti nel campo della SJ, sono state redatte delle raccomandazioni dedicate al personale medico-sanitario impegnato nella gestione dei pazienti affetti da tale patologia.

c) valutazione delle schede cliniche e delle immagini di risonanza dei pazienti con malformazioni del cervelletto e troncoencefalo che non rientrano nei gruppi JS e PCH. La fase di valutazione pre-test, basata sulla conoscenza della genetica clinica e sull'esperienza maturata nel corso del triennio nel riconoscimento di specifici pattern di neuroimaging associati a patologie cerebellari malformative, ha permesso di eseguire degli approfondimenti molecolari "mirati", ottimizzando le risorse disponibili e aumentando il tasso di successo diagnostico. Sulla base dello specifico sospetto clinico, i soggetti sono stati sottoposti ad analisi genetiche differenti.

Lo studio degli aspetti **MOLECOLARI** delle patologie investigate, è avvenuto mediante il protocollo di analisi utilizzato nel corso del primo anno, con l'aggiunta di:

i) analisi NGS di un pannello di geni causativi di *shrunken cerebellum* o di atassia congenita non progressiva.

La dottoranda si è occupata in prima persona dell'analisi e dell'interpretazione dei dati ottenuti dai protocolli di sequenziamento e dell'applicazione di modelli statistici multivariati per la ricerca di correlazioni genotipo-fenotipo.

Nell'ambito del terzo anno di attività, la dottoranda ha completato la realizzazione del DATABASE online **PADAPORT** dedicato alle atassie con esordio in età pediatrica, in collaborazione con l'IRCCS Eugenio Medea (sede Bosisio Parini, Lecco). Il progetto è stato presentato alla comunità europea di neurologia pediatrica.

Vi indico solo alcune delle **pubblicazioni** prodotte durante il corso di dottorato :

1. **Nuovo S**, Bacigalupo I, Ginevrino M, Battini R, Bertini E, Borgatti R, Casella A, Micalizzi A, Nardella M, Romaniello R, Serpieri V, Zanni G, Valente EM, Vanacore N. **Age and sex prevalence estimate of Joubert Syndrome in Italy.** *Neurology*. 2020 Feb;94(8):e797-e801. doi:10.1212/WNL.0000000000008996. PubMed PMID: 31969461.
2. **Nuovo S**, Fuiano L, Micalizzi A, Battini R, Bertini E, Borgatti R, Caridi G, D'Arrigo S, Fazzi E, Fischetto R, Ghiggeri GM, Giordano L, Leuzzi V, Romaniello R, Signorini S, Stringini G, Zanni G, Romani M, Valente EM, Emma F. **Impaired urinary concentration ability is a sensitive predictor of renal disease progression in Joubert syndrome.** *Nephrol Dial Transplant* 2018 Nov 6 [Epub ahead of print]. doi: 10.1093/ndt/gfy333. PubMed PMID: 30403813.
3. **Nuovo S**, Micalizzi A, D'Arrigo S, Ginevrino M, Biagini T, Mazza T, Valente EM. **Between SCA5 and SCAR14: delineation of the SPTBN2 p.R480W-associated phenotype.** *Eur J Hum Genet*. 2018 Jul;26(7):928-929. doi: 10.1038/s41431-018-0158-7. Epub 2018 May 25. PubMed PMID: 29795474; PubMed Central PMCID: PMC6018709.