



Ministero della Salute – Direzione Generale della Ricerca scientifica e Tecnologica

Fondi 5 per mille ANNO 2012 - Enti della Ricerca Sanitaria
Abstract ed elenco pubblicazioni scientifiche

ENTE¹: IRCCS BURLO GAROFOLO

Titolo del progetto:
Analisi multidisciplinare di malattie rare

Abstract

L'analisi del DNA può permettere di precisare e confermare la diagnosi in un enorme numero di malattie genetiche rare. Fino a pochi anni fa, l'analisi veniva tendenzialmente eseguita in più tempi, sui soli geni candidati per una determinata patologia. Si procedeva, infatti, per esclusione a partire dai geni più probabilmente coinvolti, identificati sulla base dell'esperienza e della letteratura disponibile, e proseguendo via via, in caso di analisi negative. In questo modo, era necessario eseguire numerose analisi prima di stabilire le alterazioni in causa nella malattia, con conseguente aumento di costi e tempi. In molti casi, infatti, la diagnosi si otteneva con troppo ritardo, a volte compromettendo le possibilità della miglior cura della patologia. Inoltre, nelle circostanze più complesse e rare, poteva succedere che non si riscontrassero mutazioni nei geni candidati o le mutazioni trovate non chiarivano completamente il quadro clinico e il paziente così rimaneva senza una diagnosi certa. Le tecnologie di sequenziamento di nuova generazione (Next Generation Sequencing, NGS) per l'analisi del DNA permettono un'analisi più completa delle sequenze significative (codificanti la sintesi di proteine) del nostro patrimonio genetico con un costo limitato. Una di queste tecnologie prende il nome di "analisi dell'ESOMA" (Whole Exome Sequence, WES). L'analisi WES ha potenzialità enormi, permettendo di identificare mutazioni causative della malattia virtualmente in tutti i geni candidati, accelerando quindi i tempi della diagnosi e riducendone i costi. Inoltre, questo tipo di analisi può permettere di identificare mutazioni in geni che non sarebbero mai stati indagati con un approccio tradizionale. In questi casi occorre tuttavia ottenere nuove prove a conferma del ruolo causativo della mutazione identificata, per escludere che questa costituisca solo un reperto casuale, non correlato alla malattia osservata. Per questi motivi, si rende necessaria molta prudenza nell'utilizzo di questi nuovi strumenti e la raccolta meticolosa di informazioni cliniche, genetiche e funzionali sono fondamentali per essere in grado di interpretare con ragionevole sicurezza i risultati.

¹ Istituzione beneficiaria del contributo del 5 per mille.

Il presente progetto si è posto la valutazione della fattibilità di un approccio di analisi dell'ESOMA nella diagnostica di pazienti con malattie gravi ad esordio precoce in cui si fosse ipotizzato, sulla base di criteri clinici e/o familiari, una causa monogenica. In generale, lo studio si è proposto di valutare la resa di un approccio multidisciplinare, in termini assistenziali ed economici.

Il progetto si è svolto in tre fasi principali, sfruttando le competenze di un gruppo di lavoro con competenze pediatriche, genetiche, biostatistiche e laboratoristiche.

1. Fase di arruolamento dei pazienti.

Il gruppo di lavoro ha discusso i casi clinici afferenti al dipartimento di Pediatria dell'IRCCS Burlo Garofolo candidati ad entrare nello studio. E' stata valutata la gravità della malattia, le peculiarità e complessità che rendevano il caso clinico diverso da quello osservabile in condizioni multifattoriali note, la precocità di esordio, la presenza di casi familiari, l'eventuale esecuzione senza esito di precedenti indagini genetiche e/o funzionali.

Confermata la necessità di proseguire con l'indagine WES, ai genitori del paziente o al paziente (se maggiorenne) sono state spiegate le finalità dello studio ed è stato proposto l'arruolamento nello studio; è stato inoltre consegnato un modulo per la registrazione del consenso informato attraverso cui i genitori o il paziente hanno potuto scegliere se essere informati in caso d'identificazione incidentale di varianti geniche associate a rischio prevenibile di malattie diverse da quelle per cui è stata effettuata la ricerca. In caso positivo la comunicazione è stata effettuata attraverso una consulenza genetica formale.

I risultati dell'analisi WES sono stati comunicati al paziente (o ai suoi genitori) da parte di un medico specialista nell'ambito di una consulenza genetica e, ove possibile, è stata proposta una conferma dei risultati con strumenti diagnostici assistenziali. Non è stato in nessun caso data la comunicazione di varianti genetiche, incidentalmente identificate, correlate a condizioni morbose o rischi per i quali non esistesse al momento dell'analisi la possibilità di cura o prevenzione.

Del paziente arruolato sono stati raccolti e preparati i campioni biologici. Tali campioni per le successive analisi, molecolari e funzionali, sono stati conservati in forma anonimizzata.

2. Fase di analisi dell'esoma (WES).

Al fine di poter analizzare l'intero esoma, i campioni biologici raccolti sono stati rappresentati da un prelievo di sangue venoso (2-3 mL) o scraper buccale (cellule epiteliali della bocca) o pezzi biotici conservati. Il DNA è stato estratto presso i laboratori dell'IRCCS Burlo Garofolo da biologi/biotecnologi afferenti al gruppo di lavoro. Per il sequenziamento WES erano necessari 50 nanogrammi di DNA genomico, quantificato con Qubit, o metodo paragonabile, con un rapporto di assorbanza A260/A280 compreso tra 1.8 e 2, ed un rapporto A260/A230 tra 2 e 2.2.

Il sequenziamento degli esomi è stato svolto presso il centro CRIBI (Padova), con un coverage medio garantito di 80X e i risultati sono stati inviati su un disco rigido.

L'analisi post-sequenziamento è stata svolta da biologi e medici del gruppo di lavoro specialisti in bioinformatica ed ha compreso l'allineamento delle reads sul genoma di riferimento e l'analisi delle varianti. Entrambe le analisi sono state effettuate con il software proprietario dell'Ion Proton.

3. Fase di discussione e conferma dei risultati.

I risultati dell'analisi WES e le mutazioni identificate con questa tecnica, sono stati discussi dal gruppo di lavoro. Le mutazioni compatibili con il quadro clinico del paziente e ritenute potenzialmente responsabili della malattia, sono state confermate con una seconda metodica di analisi genetica mirata (sequenziamento di Sanger).

A questo punto si è inserito un aspetto critico del progetto poiché era fondamentale stabilire una correlazione univoca tra le mutazioni riscontrate e la malattia. Infatti, nel caso che la mutazione identificata non fosse stata già descritta e caratterizzata in precedenza, era cruciale eseguire saggi di tipo biologico-funzionale per valutare il coinvolgimento della mutazione nella compromissione di specifiche funzioni biologiche, in modo da confermare che l'anomalia identificata sia stata realmente la causa, fino a prova contraria, della malattia nel paziente analizzato.

Tutte le indagini confermative sono state eseguite presso i laboratori dell'IRCCS Burlo Garofolo da biologi/biotecnologi pertinenti al gruppo di lavoro o, in casi particolari, sfruttando la collaborazione con altri gruppi di ricerca con particolare esperienza riguardo all'ambito genetico-funzionale in studio.

Parallelamente allo studio finalizzato alla diagnosi ed eventuale terapia del paziente, il gruppo di lavoro ha discusso, le potenziali ricadute teoriche e pratiche dei risultati sulla conoscenza della malattia, sulla scelta di approcci terapeutici mirati e sulla possibilità di analizzare i geni individuati in altri soggetti con quadri clinici simili.

Nell'ambito di questo progetto sono stati analizzati 30 pazienti.

In 9 soggetti si è giunti a diagnosticare malattie rare conosciute che per vari motivi non erano state individuate con indagini di primo livello. In due di questi soggetti, affetti rispettivamente da alfa mannosidasi e da immunodeficienza APDS2, la conoscenza ha permesso di applicare terapie innovative sperimentali (partecipazione alla sperimentazione rhLAMAN-08).

In 2 soggetti sono state identificate mutazioni associate a malattie ancora non descritte in precedenza (difetto di DNase2, difetto di PIM1). La descrizione di queste due nuove malattie ha permesso di migliorare le conoscenze ed i protocolli diagnostici e terapeutici nell'ambito delle interferonopatie e delle malattie linfoproliferative. Anche in questo caso è stato possibile modificare i trattamenti sulla base delle conoscenze acquisite.

In 8 soggetti sono state trovate varianti genetiche probabilmente causative, ma ulteriori studi sono necessari per confermarne il ruolo (linfoma post-infezione da EBV con mutazione di CTPS2, interferonopatia con difetto di cGAS, sindrome CANDLE atipica, linfadenopatie suppurative sterili, leucopenia familiare, altre condizioni sindromiche).

Infine, in 11 soggetti non sono state trovate varianti in grado di spiegare la malattia in studio.

Un aspetto collaterale di questo studio è stata l'identificazione del significato benigno di varianti genetiche precedentemente ritenute causative di malattia. Questo dato ne sottolineava la provvisorietà di alcune informazioni riguardanti il significato di varianti genetiche e l'importanza di rivalutare periodicamente i risultati di analisi di esoma dubbie o apparentemente non informative. L'esistenza di gruppi multidisciplinari dedicati a questo ambito diagnostico ha avuto un ruolo fondamentale anche in questo processo di rivalutazione periodica.

Abbiamo infine descritto alcune implicazioni mediche ed etiche correlate al vissuto dell'innovazione per i pazienti con malattie rare e complesse.

Prodotti della Ricerca (correlati al progetto, elenco pubblicazioni su riviste indicizzate):

Bianco AM, Faletra F, Vozi D, Girardelli M, Knowles A, Tommasini A, Zauli G, Marcuzzi A. *Two-gene mutation in a single patient: Biochemical and functional analysis for a correct interpretation of exome results.* Mol Med Rep. 2015;12(4):6128-6132.

Girardelli M, Arrigo S, Barabino A, Loganes C, Morreale G, Crovella S, Tommasini A, Bianco AM. *The diagnostic challenge of very early-onset enterocolitis in an infant with XIAP deficiency.* BMC Pediatr. 2015;15:208.

Lougaris V, Faletra F, Lanzi G, Vozi D, Marcuzzi A, Valencic E, Piscianz E, Bianco A, Girardelli M, Baronio M, Loganes C, Fasth A, Salvini F, Trizzino A, Moratto D, Facchetti F, Giliani S, Plebani A, Tommasini A. *Altered germinal center reaction and abnormal B cell peripheral maturation in PI3KR1-mutated patients presenting with HIGM-like phenotype.* Clin Immunol. 2015;159(1):33-36.

Marcuzzi A, Vozi D, Girardelli M, Tricarico PM, Knowles A, Crovella S, Vuch J, Tommasini A, Piscianz E, Bianco AM. *Putative modifier genes in mevalonate kinase deficiency.* Mol Med Rep. 2016;13(4):3181-9.

Marcuzzi A, Girardelli M, Bianco AM, Martelossi S, Magnolato A, Tommasini A, Crovella S. *Inflammation profile of four early onset Crohn patients.* Gene. 2012;493(2):282-5.

Piscianz E, Cuzzoni E, Sharma R, Tesser A, Sapra P, Tommasini A. *Reappraisal of Antimalarials in Interferonopathies: New Perspectives for Old Drugs*. *Curr Med Chem*. 2018;25(24):2797-2810.

Rodero MP, Tesser A, Bartok E, Rice GI, Della Mina E, Depp M, Beitz B, Bondet V, Cagnard N, Duffy D, Dussiot M, Frémond ML, Gattorno M, Guillem F, Kitabayashi N, Porcheray F, Rieux-Laucat F, Seabra L, Uggenti C, Volpi S, Zeef LAH, Alyanakian MA, Beltrand J, Bianco AM, Boddaert N, Brouzes C, Candon S, Caorsi R, Charbit M, Fabre M, Faletra F, Girard M, Harroche A, Hartmann E, Lasne D, Marcuzzi A, Neven B, Nitschke P, Pascreau T, Pastore S, Picard C, Picco P, Piscianz E, Polak M, Quartier P, Rabant M, Stocco G, Taddio A, Uettwiller F, Valencic E, Vozzi D, Hartmann G, Barchet W, Hermine O, Bader-Meunier B, Tommasini A, Crow YJ. *Type I interferon-mediated autoinflammation due to DNase II deficiency*. *Nat Commun*. 2017;8(1):2176.

Tommasini A, Magnolato A, Bruno I. *Innovation for rare diseases and bioethical concerns: A thin thread between medical progress and suffering*. *World J Clin Pediatr*. 2018;7(3):75-82.

Trombetta A, Ghirardo S, Pastore S, Tesser A, Piscianz E, Tommasini A, Bobbo M, Taddio A. *Pulmonary arterial hypertension in interferonopathies: a case report and a review of the literature*. *Pulm Circ*. 2019;9(3):2045894019869837.

Valencic E, Grasso AG, Conversano E, Lucafò M, Piscianz E, Gregori M, Conti F, Cancrini C, Tommasini A. *Theophylline as a precision therapy in a young girl with PIK3R1 immunodeficiency*. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2018;6(6):2165-2167.

Valencic E, Smid A, Jakopin Z, Tommasini A, Mlinaric-Rascan I. *Repositioning Drugs for Rare Immune Diseases: Hopes and Challenges for a Precision Medicine*. *Curr Med Chem*. 2018;25(24):2764-2782.

Verzegnassi F, Valencic E, Kiren V, Giurici N, Bianco AM, Marcuzzi A, Vozzi D, Tommasini A, Faletra F. *The Challenge of Next Generation Sequencing in a Boy With Severe Mononucleosis and EBV-related Lymphoma*.

J Pediatr Hematol Oncol. 2018;40(5): e323-e326.

Data della firma digitale

Il Direttore Scientifico

Prof.Fabio Barbone

Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003

Il Direttore Scientifico

Prof.Fabio Barbone