

SCHEMA DEL PROGETTO DI RICERCA OGGETTO DI SPONSORIZZAZIONE

1. Responsabile scientifico della ricerca

Nome e Cognome: Andrea Dardis

Qualifica: Dirigente Biologo

Struttura: SOC Malattie Rare

2. Titolo del progetto di ricerca

Ottimizzazione del percorso diagnostico di pazienti affetti da malattie d'accumulo lisosomiali

3. Descrizione delle attività progettuali

Le **malattie da accumulo lisosomiale** (LSD) sono un gruppo eterogeneo di malattie rare causate da difetti nei geni che codificano per le proteine coinvolte nella degradazione lisosomiale di macromolecole. La loro incidenza stimata è di circa un caso su 5.000 nati vivi, sebbene l'inclusione di queste malattie in programmi pilota di screening neonatale suggerisca un'incidenza maggiore. Le nuove opzioni di trattamento per le malattie da accumulo lisosomiale richiedono una diagnosi rapida e precoce, se si vuole ottenere il massimo beneficio clinico.

La conferma diagnostica di malattie lisosomiali da deficit enzimatico prevede, oltre alla valutazione clinica del paziente, la dimostrazione del deficit enzimatico mediante dosaggio dell'attività dell'enzima specifico seguita dall'identificazione di varianti patogenetiche a carico del gene che codifica per l'enzima deficitario. Tuttavia, l'eterogeneità fenotipica presente in questi pazienti, il riscontro di attività enzimatiche residue borderline e di varianti genetiche di significato incerto (VUS) molto spesso complicano la diagnosi portando a misdiagnosi, introduzione di terapie non appropriate e ritardi diagnostici che portano a danni d'organo irreversibili con un enorme impatto sul sistema sanitario e la qualità di vita dei pazienti e le loro famiglie.

Queste difficoltà nella definizione diagnostica diventano ancora più importanti in neonati asintomatici che risultano positivi allo screening neonatale allargato.

La SOC Malattie Rare segue attualmente circa 200 pazienti affetti da LSD ed è centro di riferimento Europeo per la diagnosi e cura di questo gruppo di malattie, oltre che il Centro di conferma diagnostica di neonati risultati positivi allo screening neonatale regionale per malattie di Gaucher, Pompe e Fabry.

Il progetto si propone quindi di ottimizzare il percorso diagnostico di pazienti affetti dalle LSD più frequenti: Malattia di Gaucher, Pompe e Fabry.

Le attività previste sono:

1-Sviluppo del dosaggio della glucosylsfingosina e globotriaosylsfingosina (biomarcatori di malattia di Gaucher e Fabry) su campioni di goccia di sangue raccolta su carta assorbente (Dry blood spot-DBS):

Il dosaggio di questi biomarcatori in plasma è già stato validato nel nostro Centro e viene utilizzato nella pratica clinica sia come supporto alla diagnosi sia per valutare la risposta a terapia. Il centro riceve anche

campioni di strutture extra-regionali in quanto è uno dei pochi laboratori Italiani ad eseguire questi dosaggi. Tuttavia, il DBS è un metodo di campionamento che consente la raccolta del campione anche in casa, in modo meno invasivo del prelievo venoso e non richiede il trasporto e lo stoccaggio dei refrigerati. Risulta quindi il campione ideale da utilizzare in pazienti neonati o pediatrici e pazienti residenti in altre regioni Italiane. Per la validazione verranno utilizzati campioni di controlli sani e pazienti affetti da malattie di Fabry o Gaucher (circa 80 pazienti) presenti nella Biobanca della ASUFC, sezione Malattie Rare.

2- *Sviluppo del dosaggio di tetrasaccaridi urinari*: Questi metaboliti sono stati proposti come biomarcatori della malattia di Pompe. Tuttavia, in Italia soltanto un paio di laboratori esegue il loro dosaggio e l'utilità di queste molecole come biomarcatori della malattia necessita di ulteriori studi. Per la validazione verranno utilizzati campioni di controllo e di circa 30 pazienti affetti da malattia di Pompe presenti nella Biobanca della ASUFC, sezione Malattie Rare.

3- *Sviluppo di sistemi di espressione in vitro validati clinicamente per la riclassificazione di varianti di significato clinico incerto*: Lo spettro di mutazioni identificate in pazienti affetti da LSD è molto eterogeneo. In particolare, più di 500, 700 e 1000 varianti sono state riportate nei geni *GBA*, *GAA* e *GLA* associati rispettivamente a malattia di Gaucher, Pompe e Fabry. L'interpretazione del significato di queste varianti rimane molto spesso incerto (VUS), in particolare quando vengono identificate in neonati asintomatici risultati positivi allo screening neonatale o pazienti con forme cliniche lievi. Tuttavia, i risultati di test funzionali possono fornire delle evidenze che consentono la riclassificazione di queste VUS come benigne o patogenetiche. Nel 2019, sono state pubblicate delle raccomandazioni del "Sequence Variant interpretation (SVI) working group del Clinical Genome Resource (ClinGen) per la validazione e l'utilizzo di test funzionali nella riclassificazione delle varianti [Brnich et al. Genome Medicine (2020) 12:3].

Il nostro laboratorio ha sviluppato dei sistemi di espressione in vitro di proteine mutate che prevedono la trasfezione transiente del cDNA dei geni *GLA*, *GAA* o *GBA* nelle loro versioni wild type o mutata in linee cellulari in coltura e l'ulteriore determinazione dei livelli di espressione e attività enzimatica.

In questo progetto prevediamo di ottimizzare la nostra piattaforma mediante l'utilizzo di linee cellulari knock out per i geni oggetto dello studio (generate tramite editing genomico e già disponibili nel nostro laboratorio) e validare la piattaforma secondo le raccomandazioni del ClinGen.

4- *Validazione di una pipeline bio-informatica la predizione dell'impatto delle VUS sulla struttura/funzione delle proteine mutate*. Sempre con l'obiettivo di sviluppare degli strumenti che forniscano dati aggiuntivi per la classificazione delle varianti genetiche, verranno validati dei programmi open access di predizione della struttura 3D a partire della sequenza proteica come AlphaFlod e Protein Structure Prediction Server PS2 come strumenti di supporto alla classificazione delle varianti genetiche. Per la validazione verranno valutate almeno 20 varianti classificate come patogenetiche e 20 come benigne secondo linee guida dell'American Collage of Medical Genetics (ACMG) per ognuno dei 3 geni oggetto dello studio.

4. Obiettivi previsti e risultati attesi

Questo progetto si propone di ottimizzare il percorso diagnostico di pazienti affetti dalle malattie lisosomiali più frequenti: Malattia di Gaucher, Fabry e Pompe mediante un approccio integrato che prevede oltre al dosaggio enzimatico e il test genetico, l'implementazione di biomarcatori specifici, test funzionali in vitro validati secondo le raccomandazioni del Clinical Genome Resource (ClinGen) e sviluppo di strumenti bioinformatici.

I risultati attesi sono:

- 1-Produzione di un protocollo validato per il dosaggio di sfingolipidi (LisoGb1 e lisoGb3) in DBS
- 2-Produzione di un protocollo validato per il dosaggio di tetrasaccaridi urinari
- 3-Determinare l'utilità del dosaggio di tetrasaccaridi urinari come biomarcatori della malattia di Pompe
- 4-Ottenere una piattaforma per l'analisi funzionale di varianti nei geni GAA, GLA e GBA validata secondo le raccomandazioni del Clinical Genome Resource (ClinGen)
- 5-Validare una pipeline per la predizione dell'impatto delle varianti genetiche sulla struttura della proteina
- 6-Riclassificare al meno 20 VUS applicando i sistemi sviluppati in 4 e 5.
- 7-Ridurre i tempi diagnostici e il numero di diagnosi incerte mediante l'utilizzo integrato delle metodiche/strumenti sviluppati.

5. Personale interno/esterno adibito alle attività progettuali (es. borse di ricerca da attivare)

Personale esterno: 1 borsista laureato in chimica (borsa da attivare)

6. Sede/i presso la/e quale/i verrà sviluppata l'attività di ricerca

Laboratorio del Centro di Coordinamento Regionale Malattie Rare

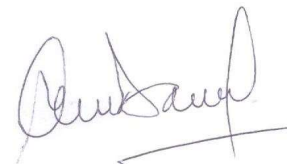
7. Durata del progetto

3 anni

8. Costi previsti e finanziamento totale richiesto

Costo previsto: 60.000

Finanziamento totale richiesto: 60.000



Firma del professionista proponente