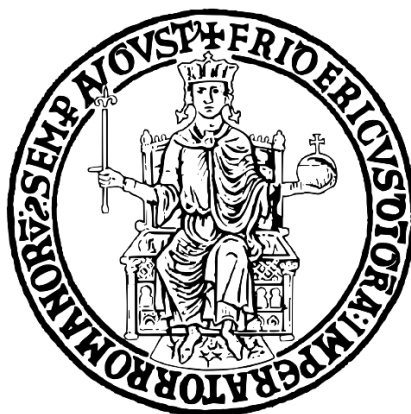


UNIVERSITÀ DI NAPOLI FEDERICO II

**DIPARTIMENTO DI NEUROSCIENZE E SCIENZE RIPRODUTTIVE
ED ODONTOSTOMATOLOGICHE**



Corso di Dottorato di Ricerca in Neuroscienze – XXXV Ciclo

Coordinatore: Prof. Maurizio Taglialatela

TIPIZZAZIONE GENOTIPICA E FENOTIPICA DELLE ATASSIE EREDITARIE: FOCUS SU FORME DI RECENTE INDIVIDUAZIONE

PhD Student

Dott.ssa Giovanna De Michele

Tutor

Prof. Francesco Saccà

Sommario

Introduzione	4
Obiettivi	9
Metodi	10
Pazienti	10
Valutazione dei pazienti	10
Indagini genetiche	11
Estrazione del DNA	11
Analisi genetiche preliminari	12
Studi di conferma Sanger.....	12
La creazione del pannello di geni.....	13
Preparazione delle librerie.....	13
Sequenziamento	17
Analisi dei dati	18
Screening per CANVAS.....	19
Caratterizzazione delle forme rare	20
Risultati.....	21
NGS	21
Mutazioni del gene <i>PRKCG</i> (SCA14).....	21
Mutazioni del gene <i>POL3RA</i>	24
Mutazioni del gene <i>AARS2</i>	27
Mutazioni monoalleliche del gene <i>STUB1</i> (SCA48)	29
Screening per mutazioni del gene <i>RFC1</i> (CANVAS).....	42
Mutazioni del gene <i>RFC1</i>	42
Conclusioni.....	46
Bibliografia.....	50

Indice delle figure

Figura 1 - Workflow del sistema SureSelect Target Enrichment per la preparazione della libreria (Immagine per gentile concessione di www.agilent.com).....	16
Figura 2 - Reperti RM in due pazienti con mutazioni <i>POLR3A</i>	26
Figura 3 - Reperti RM in paziente con mutazioni <i>AARS2</i>	28
Figura 4 - Schema del gene <i>STUB1</i> e della proteina CHIP con i suoi domini.	30
Figura 5 - Alberi genealogici della Famiglia 1 e della Famiglia 2 (SCA48).	31
Figura 6 - RM encefalo in 3 pazienti SCA48 (tagli coronale ed assiale pesati in T2, ed assiale in T1).....	35
Figura 7 - Confronto tra età di esordio e caratteristiche cliniche delle sequenti non-polyQ SCA: CACNA1A, PRKCG (SCA14), AFG3L2 (SCA28), ITRP1 (SCA15/29), STUB1 (SCA48), SPTBN2 (SCA5) e KCNC3 (SCA13).	38
Figura 8 - Studio mediante DaTscan in pazienti CANVAS.	45

Introduzione

Le atassie ereditarie sono un gruppo di rare patologie neurodegenerative, eterogeneo sia dal punto di vista clinico che genetico. Clinicamente sono caratterizzate da progressiva atassia della marcia, solitamente associata a disartria, dismetria, anomalie dei movimenti oculari. In alcune forme, possono essere presenti disturbi neurologici extracerebellari, quali neuropatia periferica, spasticità, epilessia, disturbi cognitivi e/o psichiatrici, disordini del movimento ipocinetici e/o ipercinetici. Infine, ci sono forme in cui sono presenti anche disturbi non neurologici, quali cataratta, cardiomiopatia, disturbi endocrini.

Dal punto di vista genetico, distinguiamo atassie autosomiche dominanti, atassie autosomiche recessive, atassie X-linked ed atassie a trasmissione mitocondriale (Jayadev et al., 2013).

Per identificare una precisa forma di atassia ereditaria occorre innanzitutto:

- Effettuare una dettagliata anamnesi personale e familiare, indagando eventualmente il tipo di ereditarietà
- Praticare un approfondito esame obiettivo neurologico, che ricerchi i segni di coinvolgimento cerebellare (atassia, disartria, dismetria, nistagmo, anomalie saccadiche) ed extracerebellare;
- Escludere le numerose cause di atassia non ereditaria (forme vascolari, autoimmuni, tossico-carenziali, neoplastiche e paraneoplastiche).

Prima di procedere con le indagini genetiche, si effettuano una serie di esami di laboratorio (ad esempio dosaggio della vitamina B12, alfa-fetoproteina, vitamina E, colestano, metabolismo del rame) necessari sia per escludere le cause acquisite sia per individuare specifiche forme di atassia ereditaria. Fondamentale è anche la Risonanza Magnetica dell'encefalo, che può mostrare atrofia cerebellare ed eventuali altri reperti (atrofia del tronco, atrofia corticale, aree di alterato segnale)

che possono indirizzare verso sindromi specifiche (de Silva et al., 2018). Inoltre, è spesso utile praticare lo studio delle velocità di conduzione sensitiva e motoria del nervo periferico, per evidenziare la presenza ed il tipo di neuropatia, ed in alcuni casi lo studio dei potenziali evocati centrali.

Si procede successivamente con le indagini genetiche; in assenza di una precisa ipotesi diagnostica, si ricercano in primo luogo le atassie ereditarie più frequenti, ed in secondo luogo si effettua uno screening più ampio per la ricerca di forme più rare.

Tra le atassie dominanti, anche dette SCA (Spinocerebellar ataxias), le più frequentemente identificate sono quelle dovute ad espansione di una sequenza trinucleotidica citosina-adenina-guanina (CAG) a livello del DNA esonico, cui corrisponde una sequenza di poliglutamine (polyQ) a livello proteico, cioè SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA17. Tra le atassie autosomiche recessive, la forma più frequente è l'atassia di Friedreich (FRDA), dovuta ad espansione della sequenza guanina-adenina-adenina (GAA) nel primo introne del gene *FXN*. Altre atassie recessive relativamente frequenti sono l'atassia teleangectasia (mutazione del gene *ATM*), l'atassia con aprassia oculomotoria 1 (mutazione del gene *APT*X) e 2 (mutazione del gene *SET*X), e la paraplegia spastica 7 (SPG7), dovuta a mutazioni nel gene *SPG7* ed associata solitamente ad atassia e spasticità.

Le atassie X-linked sono in generale poco frequenti: tra queste, la più comune è la forma FXTAS, causata da un'espansione delle ripetizioni del trinucleotide CGG nel range della premutazione nel gene *FMR1* (55-200 ripetizioni).

Ugualmente rare sono le atassie a trasmissione mitocondriale, che sono solitamente associate ad un fenotipo complesso. Le principali patologie a trasmissione mitocondriale che possono presentarsi con atassia sono la sindrome NARP (neuropatia, atassia, retinite pigmentosa), MERRF

(epilessia mioclonica con fibre rosse sfilacciate), MELAS (miopatia mitocondriale, encefalopatia, acidosi lattica e episodi tipo ictus), KSS (sindrome di Kearns-Sayre).

Oltre a queste forme, più frequenti e note da più tempo, sono state recentemente identificate numerose altre atassie ereditarie, grazie anche all'avvento delle tecniche di Next Generation Sequencing (NGS) (Fogel et al., 2014). Negli ultimi vent'anni, infatti, l'NGS ha permesso di sequenziare, in parallelo, milioni di frammenti di DNA, in modo più rapido ed economico che in passato. In base all'ampiezza della porzione di genoma analizzata, l'NGS può prevedere diversi approcci:

- Whole-Genome Sequencing (WGS), consistente nel sequenziamento di tutto il genoma;
- Whole-Exome Sequencing (WES), consistente nel sequenziamento degli esoni degli oltre 22.000 geni attualmente noti;
- Target Resequencing Panel (TRP), consistente nel sequenziamento mirato di pannelli di geni le cui mutazioni sono associate a determinate patologie.

Ad oggi, nella diagnostica delle atassie ereditarie i TRP rappresentano l'approccio col migliore rapporto costo-efficacia, ed identificano un minor numero di varianti di significato incerto (VOUS) rispetto ai WES e WGS. I pannelli necessitano di continuo aggiornamento in base alla scoperta di nuovi geni/nuove presentazioni cliniche. Considerando gli studi TRP sulle atassie, la resa diagnostica media è del 19,4%, mentre i WES hanno una resa diagnostica media del 34,6 (Galatolo et al., 2021), ma con costi decisamente superiori.

Il raggiungimento di una diagnosi molecolare precisa non è un mero esercizio accademico, ma ha anche una notevole utilità clinica, poiché permette di porre fine all'odissea diagnostica dei pazienti con malattie rare, con benefici per i pazienti, per i loro familiari, ma anche per il sistema sanitario. Infatti, una diagnosi genetica permette di interrompere le indagini non necessarie, evitare

trattamenti inutili e potenzialmente dannosi, informare sulle possibilità terapeutiche e proporre un corretto counseling genetico. Infine, il paziente con diagnosi accertata può partecipare ad eventuali trial clinici con farmaci sperimentali.

L'NGS ha permesso di identificare nuovi geni associati ad atassia, ed anche di descrivere fenotipi atipici in geni già associati ad atassia o ad altre patologie neurologiche, in particolare le paraparesi spastiche (Krygier et al., 2021, Dobkowska et al., 2019). Sono state identificate recentemente numerose nuove SCA e ad oggi le forme individuate sono ben 50 (Kryeger et al., 2021). In genere le atassie più recentemente identificate risultano essere più rare, talora presenti in una o poche famiglie, ma una delle ultime forme di SCA identificate (SCA48) ha mostrato di essere relativamente frequentemente e di essere caratterizzata da un fenotipo peculiare e complesso. Inoltre, le modalità di trasmissione di questa forma sono un argomento dibattuto ed ancora non ben chiarito.

Anche se non diagnosticabile mediante NGS, merita di essere menzionata infine un'altra atassia recessiva di recente identificazione, la CANVAS (Cerebellar ataxia, neuropathy, vestibular areflexia syndrome). Questa forma, non rara, è associata ad espansione biallelica intronica AAGGG nel gene *RFC1* (Cortese et al., 2019). Come suggerito dall'acronimo, la CANVAS è caratterizzata clinicamente da atassia, a componente mista cerebellare e sensitiva, associata a deficit vestibolare, nonché a disturbi autonomici e a tosse secca. L'esordio è tardivo e la progressione lenta. Nel caso in cui il fenotipo faccia porre il sospetto di CANVAS, per ricercare l'espansione intronica patogena è necessario effettuare uno screening genetico mirato con tecniche di Southern blot o long range PCR o repeat sequencing.

In conclusione, accanto alle più classiche atassie legate ad espansione di sequenze trinucleotidiche, sono emerse nuove forme di atassia, la cui caratterizzazione clinica e genetica è ancora parziale, a causa sia della recente identificazione sia della rarità. Per definire meglio tali

forme è fondamentale la collaborazione internazionale tra i centri che si occupano di malattie rare, in modo da aggregare un maggior numero di pazienti, analizzare genotipi e fenotipi, programmare studi clinici.

Obiettivi

Nel corso di questo dottorato di ricerca, il mio studio si è rivolto principalmente alle forme più recenti e più rare di atassie, ed in particolare a forme autosomiche recessive e forme dominanti non legate ad espansione di sequenze esoniche di triplette CAG, anche dette non-polyQ SCA. Speciale attenzione è stata dedicata alla forma autosomica dominante SCA48 e a CANVAS, autosomica recessiva, entrambe di recente identificazione e rivelatesi non infrequenti nell'ambito delle atassie genetiche.

Pertanto, gli obiettivi di questo dottorato di ricerca sono stati:

- Investigare, attraverso indagini genetiche, in particolare pannelli NGS mirati, una coorte di pazienti atassici "orfani" di diagnosi molecolare.
- Caratterizzare i genotipi ed i fenotipi delle atassie rare identificate, anche attraverso reti di collaborazione nazionale ed internazionale.

Metodi

Pazienti

Nel corso del triennio 2020-2022, presso il Centro per le Atassie del Dipartimento di Neuroscienze, Scienze Riproduttive ed Odontostomatologiche dell'Università di Napoli Federico II, sono stati arruolati pazienti atassici per i quali c'era un sospetto clinico di eziologia genetica ed erano state in precedenza escluse le atassie genetiche più frequenti (SCA1, 2, 3, 6, 7, 8, 12, 17, FRDA, SPG7). I pazienti hanno fornito il proprio consenso informato per lo studio. In caso di minori, i genitori o i tutori hanno dato consenso informato allo studio.

Oltre a questi pazienti, in prevalenza originari della Campania, sono stati inclusi, in specifici sottostudi, pazienti con specifiche atassie genetiche (mutazioni di *PRKCG*, *POLR3A*, *STUB1*) provenienti da altri centri italiani ed esteri. La collaborazione tra diversi centri atassia risulta fondamentale per raccogliere maggiori informazioni su sindromi ancora poco studiate in quanto rare e/o di recente identificazione.

Valutazione dei pazienti

La caratterizzazione clinica dei pazienti è stata effettuata mediante esame neurologico con scale di valutazione validate per le sindromi atassiche, la IACRS (Inherited Ataxia Clinical Rating Scale) e la SARA (Scale for the Assessment and Rating of Ataxia). La IACRS si compone di 16 parametri che valutano i segni cerebellari, la disfunzione del tratto piramidale, la pallestesia. Ha un punteggio variabile da 0 a 36, con 0 indicante l'assenza di atassia e 36 il grado più severo (Filla et al., 1990). La SARA si compone di 8 parametri, che valutano deambulazione, disartria, dismetria agli arti superiori e inferiori, tremore, disdiadococinesia; ha un punteggio che va da 0 a 40, con 0 indicante l'assenza di atassia e 40 il grado più severo (Schmitz-Hübsch et al., 2006).

La progressione della malattia è stata valutata attraverso l'impiego della IAPS (Inherited Ataxias Progression Scale), che si compone di quattro fasi (I: assenza di sintomi; II: atassia presente, ma autonomia conservata; III: atassia con necessità di assistenza e di ausili per la deambulazione; IV: necessità di sedia a rotelle) (Campanella et al., 1980). In alcuni sottostudi è stata anche utilizzato, come indice di progressione, il rapporto tra la SARA all'ultima visita e gli anni di malattia.

La caratterizzazione neuroradiologica è stata effettuata tramite Risonanza Magnetica (RM) dell'encefalo, per valutare principalmente la presenza di atrofia del cervelletto, del tronco encefalo, delle strutture sovratentoriali, e la presenza di alterazione del segnale nelle strutture sopra e sottotentoriali. In pazienti selezionati si è praticato lo studio delle velocità di conduzione sensitiva (VCS) e motoria (VCM) del nervo periferico, e dei potenziali evocati centrali, motori (MEP), somatoestesici (SSEP), acustici (BAEP) e visivi (VEP).

In caso di disturbi cognitivi, è stato effettuato come test di screening il Mini-Mental State Examination (MMSE), e successivamente una batteria di test neuropsicologici comprendenti prove di memoria a breve e lungo termine, prove di aprassia, prove esecutive (fluenza verbale, FAB, matrici di Raven) (Trojano et al., 1998).

Indagini genetiche

Estrazione del DNA

I campioni di DNA sono stati ottenuti da sangue venoso periferico dei pazienti trattato con EDTA. L'estrazione del DNA è stata eseguita attraverso il sistema automatizzato per l'isolamento degli acidi nucleici MagNA Pure Compact (Roche), ed il DNA genomico è stato analizzato qualitativamente con elettroforesi su gel di agarosio all'1,5%.

Analisi genetiche preliminari

Prima di essere sottoposti a TRP, tutti i pazienti sono stati testati per le espansioni patologiche associate a SCA1, 2, 3, 6, 7, 8, 12 e 17, per l'espansione intronica GAA nel gene *FRDA*, e per mutazioni di *SPG7*. Per escludere le SCA da CAG, è stato utilizzato il protocollo basato su fluorescenza Triplet Repeat Primed PCR (Warner et al., 1996; Cagnoli et al., 2006). L'elettroforesi capillare è stata eseguita con il sequenziatore automatico 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems), ed i frammenti sono stati analizzati usando il software GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems). L'espansione patologica GAA è stata testata secondo un protocollo long-range PCR (Campuzano et al., 1996). I prodotti PCR sono stati separati su gel di agarosio allo 0,8% ed analizzati col software Image Lab (Bio-Rad). Il gene *SPG7* è stato analizzato con metodiche di sequenziamento diretto.

Il termociclatore GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) è stato usato sia nelle precedenti indagini, sia per i sequenziamenti di conferma Sanger e nel SureSelect Target Enrichment System (Agilent Technologies) per indirizzare il sequenziamento di nuova generazione alle regioni di interesse del genoma.

Studi di conferma Sanger

Le mutazioni patologiche identificate con NGS sono state confermate con il sequenziamento Sanger. Gli ampliconi di interesse sono stati ottenuti con la PCR e purificati con ExoSAP (Exonuclease I-Shrimp Alkaline Phosphatase). Le sequenze nucleotidiche sono state determinate attraverso elettroforesi capillare, utilizzando il sequenziatore automatico 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) associato a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Life Technologies) e G50 Dye Terminator Removal Kit (RBC Bioscience). L'analisi degli elettroferogrammi è stata eseguita col software SeqScape v2.7.

La creazione del pannello di geni

È stato allestito un pannello contenente 285 geni certamente o possibilmente associati alle atassie ereditarie, utilizzando il software SureDesign (Agilent Technologies) (Tabella1).

Preparazione delle librerie

I campioni di DNA sono stati processati utilizzando SureSelect Target Enrichment System (Agilent Technologies). Il DNA genomico (gDNA) è stato innanzitutto misurato quantitativamente con Qubit dsDNA Broad Range Assay (Invitrogen). Quindi, da una soluzione contenente 25 ng/μl di DNA genomico sono stati estratti 2μl, il gDNA è stato frammentato enzimaticamente e sono stati aggiunti adattatori di sequenziamento alla fine di ogni frammento. I frammenti di gDNA marcati con gli adattatori sono stati amplificati con la PCR. Dopo aver preparato la libreria di ampliconi, è stata eseguita l'ibridizzazione delle regioni di interesse utilizzando sonde di RNA biotinilato (Figura 1, A). Il gDNA di interesse, marcato con le sonde di RNA biotinilato, è stato quindi isolato usando perline magnetiche rivestite di streptavidina, una proteina con alta affinità per la biotina (Figura 1, B). Dopo aver rimosso le perline e degradato le sonde di RNA (Figura 1, C), la libreria dei frammenti di gDNA di interesse è stata amplificata usando primer a doppia indicizzazione, un processo molto importante perché le moderne macchine di NGS consentono di analizzare librerie provenienti da diversi pazienti in parallelo ed è quindi necessario mantenere la corrispondenza tra ogni amplicone ed il rispettivo paziente. Per ogni paziente si ha quindi una libreria di ampliconi marcati con primer a doppia indicizzazione e, dopo aver unito insieme le librerie, si può procedere con il sequenziamento. Per valutare la qualità e la quantità del DNA è stato usato 2200 TapeStation (Agilent Technologies).

Tabella 1. Elenco dei 285 geni inclusi nel TRP per le atassie

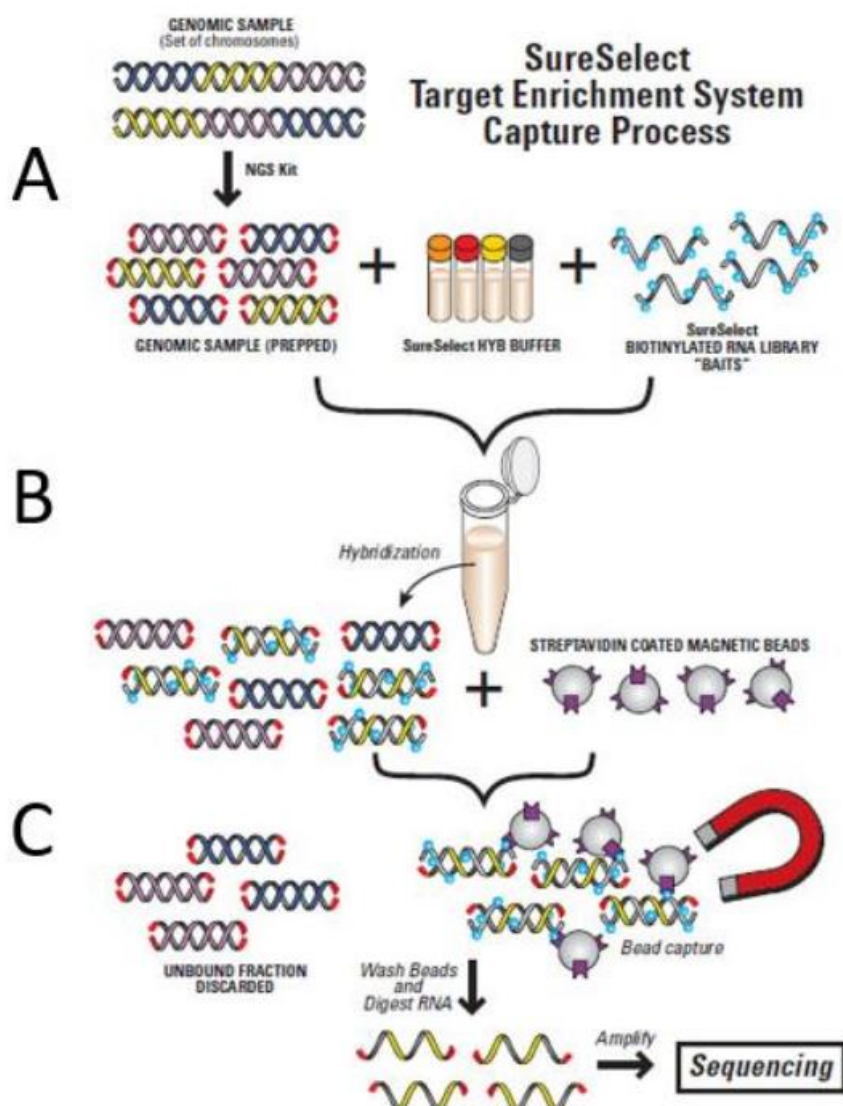
GENI	MIM	GENI	MIM	GENI	MIM	GENI	MIM
AARS	612035	ATP1A3	182350	CHMP1A	164010	EEF2	130610
ABCB7	300135	ATP2B3	300014	CLCN2	600570	EIF2B1	606686
ABCD1	300371	ATP7B	606882	CLN5	608102	EIF2B2	606454
ABHD12	613599	ATP8A2	605870	CLN6	606725	EIF2B3	606273
ACO2	100850	BEAN1	612051	CLN8	607837	EIF2B4	606687
ADCK3	606980	BRAT1	614506	CLP1	608757	EIF2B5	603945
ADGRG1	604110	BRF1	604902	COA7	615623	ELOVL4	605512
AFG3L2	604581	C10ORF2	606075	COQ2	609825	ELOVL5	611805
AHDC1	615790	C12ORF65	613541	COQ4	612898	ERCC4	133520
AHI1	608894	C5ORF42	614571	COQ9	612837	ERCC8	609412
ALDH5A1	610045	C12ORF65	613541	CSPP1	166490	EXOSC3	606489
ALG3	608750	C9ORF72	614260	CSTB	601145	EXOSC8	606019
ALG6	604566	CA8	114815	CTBP1	602618	FA2H	611026
AMACR	604489	CACNA1A	601011	CTSD	116840	FARS2	611592
AMPD2	102771	CACNA1G	604065	CWF19L1	616120	FASTKD2	612322
ANO10	613726	CACNB4	601949	CYP27A1	606530	FGF14	601515
APOB	107730	CASK	300172	CYP7B1	603711	FLVCR1	609144
APTX	606350	CC2D2A	612013	DARS	603084	FMR1	309550
ARL13B	608992	CCDC88C	611204	DARS2	610956	FOLR1	136430
ARSA	607574	CD40LG	300386	DDHD2	615003	FXN	606829
ATG5	604261	CDK5	123831	DKC1	300126	GALC	606890
ATL1	606439	CEP104	616690	DNAJC19	608977	GAN	605379
ATM	607585	CEP290	610142	DNAJC3	601184	GBA2	609471
ATP13A2	610513	CEP41	610523	DNMT1	126375	GBE1	607839
GDAP1	606598	MKS1	609883	PIK3R5	611317	SCN2A	182390
GFAP	137780	MMACHC	609831	PLA2G6	603604	SCN8A	600702
GJB1	304040	MME	120520	PLEKHG4	609526	SCYL1	607982
GJC2	608803	MRE11A	600814	PLP1	300401	SEPSECS	613009
GLB1	611458	MTPAP	613669	PMM2	601785	SETX	608465
GOSR2	604027	MTTP	590075	PMPCA	613036	SIL1	608005
GRID2	602368	MVK	251170	PNKP	605610	SLC17A5	604322
GRM1	604473	NAGLU	609701	PNPLA6	603197	SLC1A3	600111

<i>HARS</i>	142810	<i>NDUF51</i>	157655	<i>POLG</i>	174763	<i>SLC25A4</i>	610826
<i>HARS2</i>	600783	<i>NDUF57</i>	601825	<i>POLR3A</i>	614258	<i>SLC2A1</i>	138140
<i>HEXA</i>	606869	<i>NEU1</i>	608272	<i>POLR3B</i>	614366	<i>SLC33A1</i>	603690
<i>HEXB</i>	606873	<i>NOL3</i>	605235	<i>PPT1</i>	600722	<i>SLC35A2</i>	314375
<i>HIBCH</i>	610690	<i>NOP56</i>	614154	<i>PRINCKLE1</i>	608500	<i>SLC52A2</i>	607882
<i>HSD17B4</i>	601860	<i>NPC1</i>	607623	<i>PRKCG</i>	176980	<i>SLC6A19</i>	608893
<i>INPP5E</i>	613037	<i>NPC2</i>	601015	<i>PRNP</i>	176640	<i>SLC9A1</i>	107310
<i>ITPR1</i>	147265	<i>NPHP1</i>	607100	<i>PRPS1</i>	311850	<i>SLC9A6</i>	300231
<i>KCNA1</i>	176260	<i>OFD1</i>	300170	<i>PRRT2</i>	614386	<i>SMPD1</i>	607608
<i>KCNA2</i>	176262	<i>OPA1</i>	605290	<i>PSAP</i>	176801	<i>SNAP25</i>	600322
<i>KCNC1</i>	176258	<i>OPA3</i>	606580	<i>PSEN1</i>	104311	<i>SNX14</i>	616105
<i>KCNC3</i>	176264	<i>OPHN1</i>	300127	<i>PTF1A</i>	607194	<i>SPAST</i>	604277
<i>KCND3</i>	605411	<i>OTUD4</i>	611744	<i>PTRH2</i>	608625	<i>SPG11</i>	610844
<i>KCNJ10</i>	602208	<i>PAX6</i>	607108	<i>QARS</i>	603727	<i>SPG7</i>	602783
<i>KCTD7</i>	611725	<i>PDE6D</i>	602676	<i>RAB3GAP1</i>	602536	<i>SPTBN2</i>	604985
<i>KIF1A</i>	601255	<i>PDHA1</i>	300502	<i>RARS</i>	107820	<i>SRD5A3</i>	611715
<i>KIF1C</i>	603060	<i>PDSS1</i>	607429	<i>RARS2</i>	611524	<i>STS</i>	300747
<i>KIF7</i>	611254	<i>PDSS2</i>	610564	<i>RELN</i>	600514	<i>STUB1</i>	607207
<i>LAMA1</i>	150320	<i>PDYN</i>	131340	<i>RNF170</i>	614649	<i>STXBP1</i>	602926
<i>LMNB2</i>	150341	<i>PEX10</i>	602859	<i>RNF216</i>	609948	<i>SURF1</i>	185620
<i>LYST</i>	606897	<i>PEX16</i>	603360	<i>RPGRIP1L</i>	610937	<i>SYNE1</i>	608441
<i>MARS2</i>	609728	<i>PEX2</i>	170993	<i>RUBCN</i>	613516	<i>SYNE2</i>	608442
<i>MED17</i>	603810	<i>PEX6</i>	601498	<i>SACS</i>	604490	<i>SYT14</i>	610949
<i>MFN2</i>	608507	<i>PEX7</i>	601757	<i>SAMD9L</i>	611170	<i>TBC1D23</i>	617687
<i>MFSD8</i>	611124	<i>PHYH</i>	602026	<i>SCN1A</i>	182389	<i>TCTN1</i>	609863
<i>TCTN2</i>	613846	<i>TMEM67</i>	609884	<i>TTPA</i>	600415	<i>WDR81</i>	614218
<i>TCTN3</i>	613847	<i>TOP1</i>	126420	<i>TUBB3</i>	602661	<i>WFS1</i>	606201
<i>TDP1</i>	607198	<i>TPP1</i>	607998	<i>TUBB4A</i>	602662	<i>WWOX</i>	605131
<i>TGM6</i>	613900	<i>TRNT1</i>	612907	<i>UBA5</i>	610552	<i>XPA</i>	611153
<i>THG1L</i>	Nd	<i>TRPC3</i>	602345	<i>UBR4</i>	609890	<i>XRCC4</i>	194363
<i>TINF2</i>	604319	<i>TSEN2</i>	608753	<i>UCHL1</i>	191342	<i>ZFYVE26</i>	612012
<i>TMEM138</i>	614459	<i>TSEN34</i>	608754	<i>VAMP1</i>	185880	<i>ZFYVE27</i>	610243
<i>TMEM216</i>	613277	<i>TSEN54</i>	608755	<i>VAR52</i>	612802	<i>ZNF423</i>	604557
<i>TMEM231</i>	614949	<i>TTBK2</i>	611695	<i>VLDLR</i>	192977	<i>ZNF592</i>	613624

<i>TMEM237</i>	614423	<i>TTC19</i>	613814	<i>VRK1</i>	602168		
<i>TMEM240</i>	616101	<i>TTC21B</i>	612014	<i>VWA3B</i>	614884		

Figura 1 - Workflow del sistema SureSelect Target Enrichment per la preparazione della libreria

(Immagine per gentile concessione di www.agilent.com).



Sequenziamento

In questo studio è stata usata la piattaforma per il sequenziamento ad alta resa MiSeq Illumina, che utilizza un approccio di amplificazione "a ponte" (Bridge PCR). In ogni sequenziamento sono stati usati MiSeq reagent kit v2 (2x150bp) e 4.5 Gb flow cell. Innanzitutto, le librerie precedentemente preparate per ogni paziente sono state unite insieme per il sequenziamento multiplex. Per ogni sequenziamento è stata usata una concentrazione molare del pool di librerie compresa tra 6 pM e 10 pM ed è stato aggiunto PhiX all'1% come controllo (genoma del fago PhiX 174, il primo ad essere sequenziato). Quindi, il DNA è stato denaturato chimicamente e si è dato inizio al sequenziamento. La tecnica MiSeq Illumina prevede che i frammenti a singolo filamento, precedentemente marcati con adattatori, si leghino casualmente sulla superficie della flow cell, un supporto solido dove sono posti gli oligonucleotidi complementari agli adattatori. Vengono quindi aggiunti i nucleotidi e l'enzima per l'amplificazione a ponte in fase solida: l'estremità libera di un frammento di DNA si piega a ponte, si ibrida ad un primer adattatore vicino avente sequenza complementare e l'enzima incorpora nucleotidi per generare ponti a doppio filamento sul substrato solido. La successiva denaturazione lascia i templates a singolo filamento ancorati al substrato. Grazie quindi a questo sistema di generazione di cluster che non richiede l'utilizzo di microsfere, fotolitografia o un sistema meccanico di spotting, si generano milioni di cluster nei canali della flow cell, contenenti milioni di copie della stessa molecola di DNA a doppio filamento. Per definire la sequenza si utilizza un processo denominato Sequencing by Synthesis (SBS), consistente nel riconoscimento dei nucleotidi fluorescenti che vengono aggiunti nella flow cell nel momento in cui il DNA viene sintetizzato a partire dal template: la definizione della sequenza avviene quindi una base alla volta, ma in parallelo per tutte le sequenze presenti nelle cellette. In particolare, si aggiungono le DNA polimerasi, i deossinucleotidi fosfato marcati con colorante fluorescente ed i primer. La DNA polimerasi catalizza l'aggiunta alla sequenza della base corretta,

la quale viene colpita da un laser che eccita il colorante generando un segnale luminoso; sulla base del segnale aggiunto è possibile definire la base incorporata. Infine, la molecola colorante viene rimossa enzimaticamente in modo tale che possa iniziare un nuovo ciclo di sintesi che si ripete come il precedente. Grazie al susseguirsi di questi cicli è possibile definire l'intera sequenza nucleotidica.

Questo processo avviene contemporaneamente per ogni filamento ancorato alla flow cell e porta all'identificazione della sequenza nucleotidica di ogni amplicone tramite allineamento dei dati e confronto con una sequenza di controllo.

Analisi dei dati

L'analisi dei dati è stata eseguita usando il software SureCall (Agilent Technologies), che permette di allineare la sequenza dei dati grezzi con la sequenza del genoma umano di riferimento (hg 19). Le differenze tra questi due rappresentano le varianti identificate nei campioni di DNA usati per il sequenziamento.

Le varianti così trovate vengono analizzate usando il software Ingenuity Variant Analysis (Qiagen) e filtrate secondo i seguenti parametri:

- Call quality: è un punteggio che indica la qualità del base calling, ovvero del processo che consente di convertire i dati grezzi ottenuti con le tecniche di sequenziamento (es. pattern di fluorescenza) in sequenze nucleotidiche. Più è basso questo score e maggiore è la probabilità che siano stati compiuti errori. In questo studio, le varianti con $CQ < 30$ (corrispondente ad una accuratezza $< 99.9\%$) sono state scartate.
- Read depth: indica quante volte una variante è stata sequenziata. In questo studio, le varianti con profondità di lettura inferiore a 20 sono state scartate.

- Frequenza delle varianti: sono state considerate solo le varianti rare e sono state scartate quelle con frequenza nella popolazione superiore all'1%. Il principale database cui abbiamo fatto riferimento è Genome Aggregation Database (gnomAD) (<http://gnomad.broadinstitute.org>), un database online che contiene le frequenze delle varianti genetiche in più di 120.000 sequenze esomiche e 15.000 sequenze genomiche provenienti da individui non imparentati.
- Falsi positivi: alcune varianti possono essere presenti in più campioni e questo è improbabile perché stiamo considerando un gruppo di malattie rare. In realtà, questi sono spesso errori del sequenziamento di nuova generazione. Per risolvere questo problema, le varianti condivise da 3 o più campioni sono state scartate.

Inoltre, per valutare le conseguenze delle mutazioni sulla funzione delle proteine sono stati usati gli algoritmi SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) (<http://sift.jcvi.org>) e PolyPhen2 (Polymorphism Phenotyping) (<http://figenetics.bwh.harvard.edu>), entrambi in grado di predire le conseguenze di mutazioni missenso sulla base di parametri come l'omologia di sequenza e informazioni filogenetiche. Per predire le conseguenze delle varianti di splicing, invece, sono stati applicati gli algoritmi NeteGene2 (<http://zenetics.bwh.harvard.edu>) e BDGP (<http://www.fruitfly.org>) alle varianti introniche, 20 nucleotidi a monte ed a valle di ogni esone considerato. Mutazioni nei siti di splicing sono state considerate patogenetiche.

Screening per CANVAS

Nei pazienti con sospetto clinico di CANVAS, lo screening è stato eseguito con PCR standard con primer fiancheggianti il locus CANVAS per indagare la presenza di almeno un prodotto di 350 paia di basi corrispondente a un allele non espanso (AAAAG)¹¹ nel gene *RFC1*. Questo metodo non era in grado di differenziare i soggetti wild-type dai portatori eterozigoti. I pazienti che non sono riusciti ad amplificare sono stati ulteriormente analizzati mediante tre distinte Repeat-Primed PCR

(RP-PCR) per espansioni ripetute associate al motivo patogeno prototipo (AAGGG) o ai motivi (AAAAG) e (AAAGG) come descritto da Cortese et al nel 2019. Le RP-PCR sono state eseguite utilizzando un Master Mix per PCR lungo GoTaqR (Promega); l'analisi della lunghezza del frammento è stata eseguita su un 3500 Genetic DNA Analyzer con software Fragments (Thermo Fisher); un modello "a dente di sega" è stato osservato solo nella reazione RP-PCR specifica per il motivo (AAGGG) che identifica i pazienti con l'espansione biallelica AAGGG associata a CANVAS. I pazienti che sembravano biallelici per la ripetizione AAGGG in base ai risultati delle RP-PCR sono stati sottoposti a long range PCR e sequenziamento Sanger. I pazienti *RFC1*-positivi sono stati sottoposti a Southern blotting.

Caratterizzazione delle forme rare

Una volta individuate, grazie alla valutazione clinica e agli studi NGS, specifiche atassie ereditarie, abbiamo caratterizzato alcune delle forme rare rilevate. In particolare, abbiamo studiato e pubblicato i dati di pazienti con mutazione nei seguenti geni: *STUB1*, *ATP3A2*, *POLR3A*, *PRKCG*, *AARS2*, *RFC1*. Per alcune sindromi, abbiamo analizzato e descritto i dati dei nostri pazienti insieme a quelli di pazienti di altri centri atassie con mutazioni negli stessi geni (*STUB1*, *POLR3A*, *PRKCG*).

Per la condivisione dei dati dei pazienti non-polyQ SCA, nel 2020 stata creata la rete internazionale SCANOP, che riunisce 23 centri provenienti da 10 stati (Francia, Italia, Germania, Gran Bretagna, Portogallo, Stati Uniti, Austria, Olanda, Spagna, Israele), coordinati dal centro Pitié-Salpêtrière di Parigi. SCANOP ha organizzato un database elettronico comune su piattaforma REDCap (Research Electronic Data Capture) in cui ogni centro ha inserito i dati dei propri pazienti non-polyQ SCA. Successivamente sono stati analizzati i dati genetici e fenotipici dei pazienti. Il nostro centro si è interessato in particolare ai pazienti con mutazioni in *STUB1* (SCA48).

Risultati

NGS

Gli studi di NGS hanno permesso di identificare le seguenti mutazioni: *STUB1* (8 pazienti), *PRKCG* (3 pazienti), *POLR3A* (2 pazienti), *AARS2* (2 pazienti) e, in singoli pazienti, *KIF1C*, *DHDDS*, *ATM*, *CACNA1A*, *CACNA1G*, *SYNE1*, *ITPR1*, *KCND3*, *ATP3A2*.

Sono descritte di seguito le caratteristiche genetiche e fenotipiche dei pazienti studiati.

Mutazioni del gene *PRKCG* (SCA14)

PRKCG è il gene codificante la proteina chinasi C gamma (PKC γ), che comprende un dominio regolatore ed un dominio catalitico. Mutazioni in eterozigosi di *PRKCG* sono associate a SCA14, un'atassia dominante lentamente progressiva che rappresenta l'1-7% di tutte le non-polyQ SCA. Solitamente le mutazioni sono localizzate nel dominio regolatore, mentre le più rare mutazioni nel dominio catalitico sono associate a un fenotipo più complesso. Le varianti riportate sono perlopiù missenso, ed una sola nonsense è stata identificata (Shirafuji et al., 2019).

SCA14 esordisce mediamente nella quarta decade, ma può manifestarsi anche nell'infanzia o in età avanzata. Si tratta di un'atassia pura nella maggior parte dei casi; in circa un terzo dei pazienti possono essere associati segni piramidali, e più raramente disturbi del movimento (mioclono, distonia), disturbi cognitivi e psichiatrici. Alla RM dell'encefalo, è presente atrofia cerebellare, di entità variabile, solitamente a prevalenza vermiana (Chelban et al., 2018).

Grazie agli studi di NGS, con l'utilizzo di un TRP specificamente designato per le atassie, abbiamo analizzato in uno studio italiano multicentrico 358 pazienti con atassia senza diagnosi genetica. Abbiamo quindi indentificato 10 pazienti con mutazioni in *PRKCG* (2,8% dei pazienti studiati), di cui tre provenienti dal nostro centro, gli altri dall'istituto di Neurologia della

Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli di Roma, l'IRCCS Fondazione Stella Maris di Pisa, il Dipartimento di Scienze Mediche, Chirurgiche e Neuroscienze di Siena. Estendendo lo screening genetico ai familiari affetti, sono stati individuati altri quattro pazienti con SCA14. Abbiamo quindi analizzato i dati clinici, neuroradiologici, genetici dei 14 pazienti con SCA14, provenienti da 10 famiglie (De Michele et al., 2022). In totale sono state individuate nove differenti varianti patogenetiche in *PRKCG*, di cui sette non erano mai state in precedenza riportate. Sei varianti erano localizzate nel dominio regolatore, tre in quello catalitico. Una delle varianti, c.1308C > G, p.Y436*, risulta essere la seconda mutazione nonsense finora descritta in *PRKCG*.

In accordo con i dati precedentemente riportati in letteratura, l'età media $\pm$ DS all'esordio è risultata di 32,6 anni $\pm$ 19,3, con un range da 0 a 66 (due pazienti hanno avuto esordio nel primo anno di vita). Il punteggio SARA medio era 13,6 $\pm$ 9,7 (range 2-31). Il tasso medio di progressione (punteggio SARA per anno) è stato di 1,23 $\pm$ 0,96. Le principali caratteristiche cliniche dei quattordici pazienti sono riassunte nella Tabella 2. Quattro dei casi riportati avevano un fenotipo atipico, mai descritto in precedenza in letteratura. Infatti una paziente aveva un'atassia episodica, un'altra un fenotipo prevalentemente spastico, e due bambini un fenotipo precoce e grave.

La RM encefalo è stata eseguita in 13 pazienti su 14, ed ha evidenziato atrofia cerebellare in 10 (77%), globale in sei casi, prevalentemente vermiana in quattro. In un caso era anche presente iperintensità dei nuclei dentati nelle sequenze T2-pesate.

In conclusione, questo studio ha permesso di evidenziare sette nuove mutazioni patogene nel gene *PRKCG*, inclusa la seconda nonsense finora identificata. Quattro pazienti presentavano un quadro clinico peculiare (atassia episodica, spasticità prevalente, fenotipo grave con esordio infantile), mai descritto in precedenza. Complessivamente, questi risultati ampliano le conoscenze genetiche e fenotipiche sulla SCA14.

Tabella 2. Caratteristiche cliniche e radiologiche dei pazienti SCA14

Patient, Family	Sex	Onset (yrs)	Age (yrs)	Duration (yrs)	SARA score	SDSF	Gait ataxia	Dysarthria	Dysmetria	Abnormal ocular movements	Knee jerks	LL increased tone	Babinski signs	LL decreased vibration sense	Dystonia	Tremor	Cognitive impairment	MRI Cerebellar atrophy	PRKCG mutation
1, A	M	44	51	7	8	2	Yes	Yes	Yes	SP	Weak	No	No	Yes	No	No	No	+++	c.358C>T, p.L120F
2, A	M	50	56	6	6	2	Yes	Yes	Yes	SP	Weak	No	No	Yes	No	No	No	++	c.358C>T, p.L120F
3, B	F	40	71	31	22	3	Yes	Yes	Yes	No	Normal	No	No	No	No	No	No	+	c.230G>A, p.C77Y
4, B	M	56	69	13	22	3	Yes	Yes	No	No	Normal	No	No	No	No	No	Mild	+	c.230G>A, p.C77Y
5, B	M	21	41	20	19	3	Yes	Yes	Yes	No	Normal	No	No	No	No	No	ID	+	c.230G>A, p.C77Y
6, C	M	30	41	11	26	6	Yes	Yes	Yes	SS	Normal	No	No	No	Yes	Yes	Mild	+	c.380A>C, p.Q127P
7, D	F	16	58	42	14	3	Yes	Yes	Yes	Ny	Normal	No	No	No	No	No	No	++	c.1928 T>G, p.F643C
8, E	F	35	42	7	5	2	Yes	Yes	No	No	Normal	No	No	No	No	No	No	++	c.413 T>A, p.V138E
9, F	M	24	40	16	8	2	Yes	Yes	Yes	HS	Brisk	Yes	Yes	No	No	No	No	++	c.466G>A, p.E156K
10, F	F	66	67	1	2	1	Yes	No	No	No	Brisk	No	No	Yes	No	Yes	No	NA	c.466G>A, p.E156K
11, G	F	44	49	5	4	2	Yes	No	Yes	No	Brisk	No	Yes	No	No	No	Mild	-	c.230G>A, p.C77Y
12, H	F	30	47	17	2	3	Yes*	No	Yes	No	Brisk	Yes	Yes	No	No	No	No	+	c.1381G>A, p.A461T
13, I	M	1	7	6	21	2	Yes	Yes	Yes	SP	Brisk	Yes	Yes	No	Yes	Yes	ID	-	c.1308C>G, p.Y436*
14, J	F	0	14	14	31	4	Yes	Yes	Yes	GP	Brisk	Yes	Yes	NE	Yes	No	ID	-	c.419G>A, p.R140Q

*Spasticity

LL, lower limbs, NA not available, NE not evaluable, SP saccadic pursuit, SS Slow saccades, HS hypometric saccades, ID intellectual disability, SARA scale for the assessment and rating of ataxia, SDFS spinocerebellar degeneration functional score

Mutazioni del gene *POL3RA*

Le sindromi associate a *POLR3* sono un gruppo di patologie, con fenotipi parzialmente sovrapposti, causati da mutazioni bialleliche nei geni *POLR3A*, *POLR3B*, *POLR1C*, e *POLR3K*, che codificano per subunità della RNA polimerasi III (Pol III), coinvolta nel processo di trascrizione di alcune forme di RNA.

In particolare *POLR3A* codifica per la subunità catalitica di Pol III, e mutazioni in *POLR3A* si associano a leucodistrofia ipomielinizzante, con esordio solitamente infantile di sintomi neurologici (atassia, tremore, spasticità, neuropatia) e non neurologici (ipogonadismo, oligodontia). Tale sindrome è anche detta “sindrome 4H”, poiché caratterizzata dalla triade ipomielinizzazione (hypomyelination), ipodontia (hypodontia) e ipogonadismo ipogonadotropo (hypogonadotropic hypogonadism) (Wolf et al., 2014).

Tipicamente la RM encefalo mostra un pattern di leucodistrofia ipomielinizzante, atrofia cerebellare, assottigliamento del corpo calloso.

Tuttavia, recentemente, è stato descritto un fenotipo più lieve caratterizzato da atassia spastica ad esordio tardivo, associato specificamente alla mutazione intronica di *POLR3A* c.1909 + 22G > A (Minnerop et al., 2019).

Tra i nostri pazienti sottoposti a NGS, due presentavano la variante c.1909 + 22G > A in eterozigosi composta con un'altra mutazione. Nell'ambito di uno studio italiano multicentrico (Di Donato et al., 2022), abbiamo quindi esaminato e descritto le caratteristiche di 10 pazienti provenienti da 8 famiglie con mutazioni bialleliche in *POLR3A*, una delle quali era costantemente c.1909 + 22G > A). Tutte le varianti sono state confermate con sequenziamento Sanger, eseguito sia nei pazienti sia, quando possibile, nei genitori. Nel caso di un paziente (paziente 4, che proveniva dal nostro centro) che presentava un riarrangiamento intragenico, è stato sviluppato un metodo PCR

quantitativo in tempo reale (qRT) per confermare il riarrangiamento sia nel paziente che nei genitori.

Clinicamente, l'età media all'esordio era di $14,5 \pm 2,1$ anni. In nove pazienti il sintomo all'esordio era l'atassia, mentre un paziente presentava paraparesi spastica. All'esame obiettivo neurologico, due pazienti avevano un fenotipo di atassia pura, sette un fenotipo atasso-spastico, ed in uno il fenotipo era di paraplegia spastica acuta. Nessun paziente ha mostrato clinicamente anomalie cognitive. In nessun caso erano presenti significativi segni non neurologici, tranne che nel paziente 4, uno dei due casi individuati presso il nostro centro, che presentava ipogonadismo ipogonadotropo subclinico, caratterizzato esclusivamente da bassi livelli di FSH e LH. Questo paziente presentava un peculiare quadro clinico e genetico, con epilessia generalizzata, sordità neurosensoriale e lipomi cutanei diffusi. L'analisi genetica mostrava, in associazione a c.1909 + 22G > A, una delezione intragenica che interessava gli esoni 14-18 di *POLR3A*, presente anche nel padre del paziente.

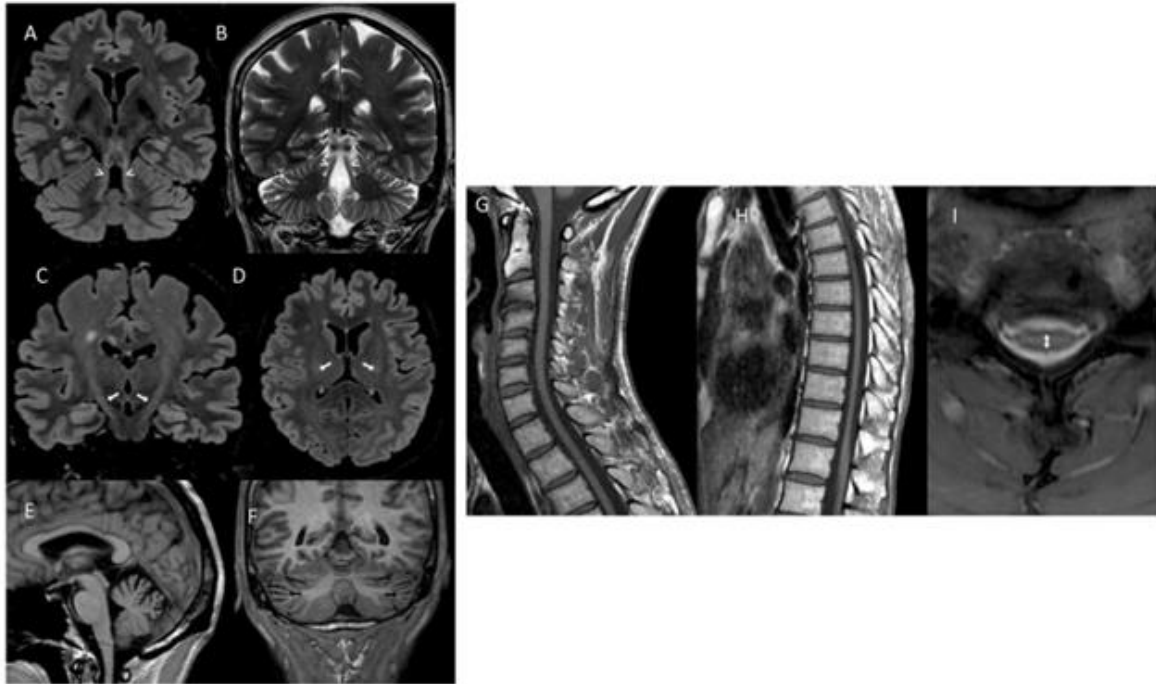
Gli studi EMG, VCM e VCS erano normali in tutti i casi, mentre MEP e SSEP, quando esaminati, risultavano patologici.

Alla RM, il principale reperto evidenziato è stato un'iperintensità nelle sequenze in T2 del peduncolo cerebellare superiore, associato ad atrofia midollare. Soltanto un paziente presentava ipomielinizzazione centrale (Figura 2).

Il nostro studio ha quindi permesso di mostrare che, contrariamente al fenotipo classico, i pazienti con variante intronica c.1909 + 22G > A in *POLR3A* presentano un fenotipo più lieve, caratterizzato da atassia spastica, in assenza degli altri segni neurologici (distonia, neuropatia, tremore) e non neurologici (oligodentia, ipogonadismo) tipici della forma classica. Inoltre, è stato individuato il primo paziente con una estesa delezione negli esoni 14–18; tale delezione è stata sospettata sulla

base della minore copertura negli studi NGS, ed è stata rilevata da analisi qRT-PCR specifiche per il gene. È interessante notare che il nostro paziente con la delezione presentava il fenotipo più complesso tra quelli osservati all'interno della nostra coorte.

Figura 2 - Reperti RM in due pazienti con mutazioni *POLR3A*.



Legenda. Nel primo paziente (A-D), iperintensità dei peduncoli cerebellari superiori in sezione coronale 3D T2-FLAIR (A) e T2 (B), iperintensità del tratto corticospinale in coronale (C) e assiale (D) 3D T2-FLAIR. Nel secondo paziente (E-I), atrofia cerebellare in sezione coronale 3D T1 (F), atrofia del midollo cervicale (G) e toracico (H) in sagittale T1, e assiale MERGE T2 (I).

Mutazioni del gene *AARS2*

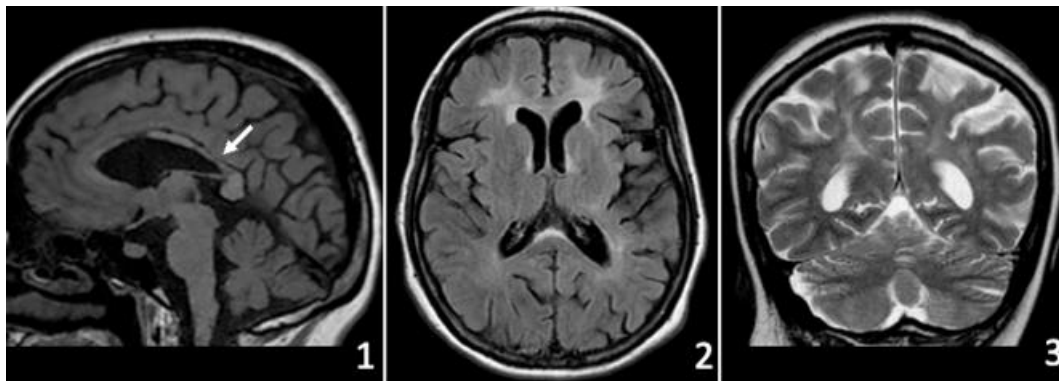
AARS2 è un gene nucleare codificante per l'alanil-tRNA sintetasi mitocondriale. Mutazioni bialleliche di *AARS2* sono responsabili di due principali fenotipi: cardiomiopatia infantile letale e leucoencefalopatia progressiva con esordio in età infantile o giovanile. La leucoencefalopatia è associata ad insufficienza gonadica nelle donne. Sono stati descritti di recente fenotipi atipici, tra cui tre pazienti con progressivo deterioramento motorio e cognitivo che, alla RM dell'encefalo, presentavano atrofia cerebellare ma non leucoencefalopatia (Dallabona et al., 2014, Wang et al., 2019).

Presso il nostro centro atassie abbiamo identificato, grazie allo screening TRP, due sorelle con mutazione biallelica in *AARS2* ed un fenotipo mai descritto in precedenza (De Michele et al., 2020a). Le due pazienti, rispettivamente di 38 e 32 anni, si erano sottoposte a visita neurologica per un tremore delle mani, presente rispettivamente dall'età di 14 e 11 anni. Entrambe inoltre avevano un'amenorrea primaria. L'esame neurologico aveva evidenziato, in entrambe le pazienti, un nistagmo downbeat, una lieve difficoltà nella deambulazione in tandem, ed un marcato tremore d'azione. La RM dell'encefalo risultava nella norma. Dopo aver escluso le atassie più frequenti, anomalie del cariotipo, nonché espansioni nel gene *FMR1*, lo studio NGS ha mostrato mutazioni bialleliche nel gene *AARS2* (c.385A>C, p.Thr129Pro; c.446G>A, p.Cys149Tyr). Le mutazioni identificate sono state confermate mediante sequenziamento di Sanger, segregavano con il fenotipo nella famiglia, e la loro patogenicità è stata confermata in silico. Entrambe le mutazioni erano localizzate nel dominio di amminoacilazione, che è essenziale per l'attività enzimatica di *AARS2*.

Questo studio ha dimostrato che il gene *AARS2* può essere responsabile di un quadro sia clinico che radiologico sfumato, e che pertanto mutazioni in questo gene vanno ricercate in pazienti con segni cerebellari associati ad amenorrea anche in assenza di leucoencefalopatia alla RM.

Tuttavia, circa un anno dopo la pubblicazione di questo studio, la sorella maggiore ha presentato un grave e improvviso deterioramento, motorio e cognitivo. La RM ha evidenziato un quadro di leucoencefalopatia diffusa, più marcato a sede frontoparietale, con marcato assottigliamento del corpo calloso (Figura 3).

Figura 3 - Reperti RM in paziente con mutazioni AARS2.



Legenda. Sezione sagittale pesata in T1 (A) che mostra assottigliamento del corpo calloso (freccia bianca), sezione assiale in FLAIR (B) e coronale T2 (C) con evidenza di leucodistrofia prevalentemente fronto-parietale.

Mutazioni monoalleliche del gene *STUB1* (SCA48)

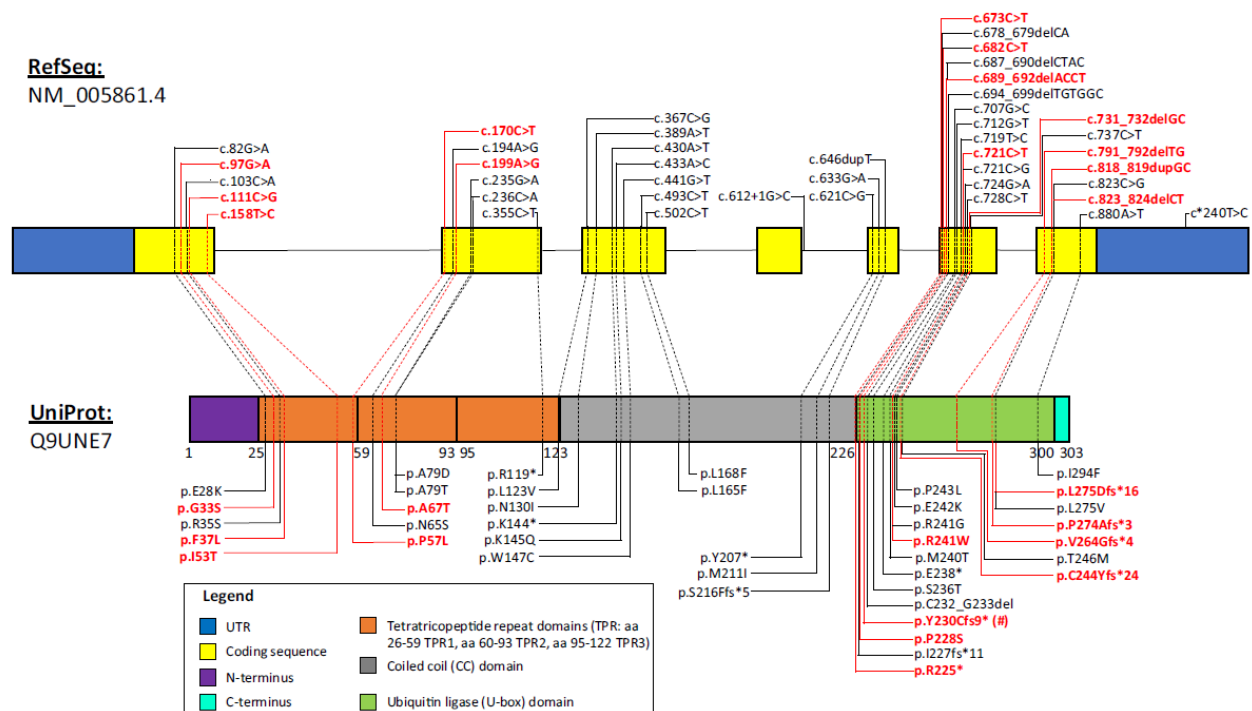
SCA48 è una delle ultime atassie autosomiche dominanti identificate. È stata inizialmente descritta, nel 2018, in una famiglia spagnola con atassia e disturbi cognitivi a trasmissione autosomica dominante, in associazione con una mutazione eterozigote nel gene *STUB1* (Genis et al., 2018). Immediatamente dopo, SCA48 è stata identificata in numerose famiglie italiane, francesi, olandesi, turche (De Michele et al., 2019; Lieto et al., 2020; Roux et al., 2020; Mol et al., 2020; Palvadeau et al., 2020).

Il gene *STUB1* codifica per la proteina CHIP, un'ubiquitin-ligasi (E3) che ha una struttura a tre domini: un dominio TPR N-terminale, una regione di connessione che consente la dimerizzazione, e un dominio U-box C-terminale (Nikolaj et al., 2004) (Figura 4).

Sia dal punto di vista genetico che dal punto di vista fenotipico SCA48 presenta delle caratteristiche peculiari. Infatti, il gene *STUB1* era stato già nel 2013 associato ad un'altra forma di atassia, a trasmissione recessiva, denominata SCAR16 (Shi et al., 2013). Successivamente alla prima descrizione, SCAR16 è stata identificata in circa venti famiglie, con un fenotipo caratterizzato da atassia ad esordio precoce, associata ad altri segni neurologici quali spasticità, disturbi del movimento, epilessia, e talora ipogonadismo (De Michele et al., 2020b).

Non è stata al momento identificata una correlazione tra tipo o localizzazione delle mutazioni e modalità di trasmissione recessiva o dominante. Un aspetto di difficile interpretazione è che nelle famiglie SCAR16 i genitori degli affetti, portatori obbligati di mutazioni del gene *STUB1*, non vengono mai descritti come sintomatici.

Figura 4 - Schema del gene *STUB1* e della proteina CHIP con i suoi domini.



Legenda. Le mutazioni SCAR16 sono riportate in nero, le mutazioni SCA48 in rosso. #, p.Y230Cfs9* è stata trovata sia in SCA48 che in SCAR16.

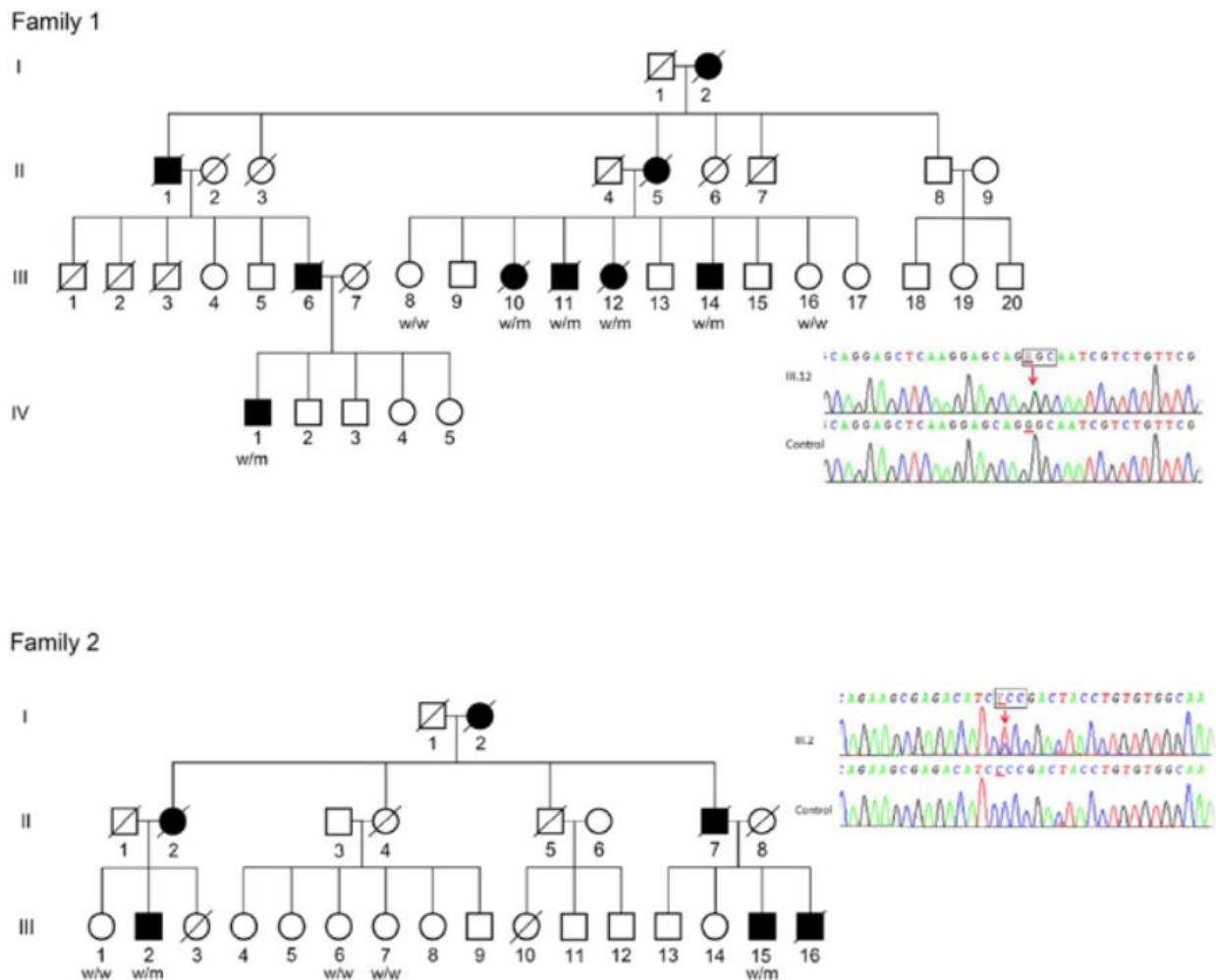
Dal punto di vista clinico, SCA48 è un'atassia dal fenotipo complesso, in cui ai sintomi cerebellari si accompagnano disturbi cognitivi, psichiatrici, nonché disturbi del movimento sia di tipo ipocinetico che ipercinetico. La complessità del fenotipo accomuna SCA48 con un'altra forma di atassia dominante, SCA17. Infatti SCA17, dovuta ad espansione CAG nel gene *TBP*, è anch'essa associata a disturbi cognitivi, psichiatrici ed extrapiramidali.

SCA48. Studio multicentrico italiano

Dopo l'identificazione della famiglia spagnola, abbiamo eseguito uno studio mediante WES e sequenziamento secondo Sanger in due ampie famiglie campane a trasmissione autosomica dominante, il cui fenotipo richiamava quello appunto descritto da Genis et al (2018) per la presenza di atassia, disturbi cognitivi, psichiatrici ed extrapiramidali (De Michele et al., 2019). Nelle

nostre famiglie segregavano due differenti mutazioni: p.(Gly33Ser), nel dominio TRP e p.(Pro228Ser), localizzata nella regione ubiquitin-ligasi (Figura 5). In quello studio sottolineavamo la somiglianza tra SCA48 e SCA17.

Figura 5 - Alberi genealogici della Famiglia 1 e della Famiglia 2 (SCA48).



Legenda. I simboli vuoti indicano individui non affetti, i simboli pieni individui affetti, i quadrati uomini, i cerchi donne; i simboli barrati indicano persone decedute; "m" e "w" rappresentano rispettivamente la presenza di alleli causativi e wild-type. Sono mostrati gli elettroferogrammi delle regioni che fiancheggiano le mutazioni del gene *STUB1* c. 97G>A (p.G33S) (Famiglia 1; pannello superiore) e c.682C>T (p.P228S) (Famiglia 2; pannello inferiore).

Successivamente abbiamo voluto allargare lo screening di SCA48 ad altre famiglie con atassie non identificate. Lo studio è stato eseguito in collaborazione con due centri italiani, l'istituto di Neurologia della Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli di Roma e l'IRCCS Fondazione Stella Maris di Pisa. Questo studio italiano multicentrico ha investigato mediante NGS la prevalenza relativa di SCA48 tra pazienti con atassia ad esordio in età adulta, in cui erano state precedentemente escluse le cause di atassia acquisita e le SCA da triplette CAG, la FRDA, la FXTAS (Lieto et al., 2020).

In una ampia coorte di 235 pazienti atassici, di cui 17 con familiarità dominante, sono stati individuati otto pazienti con mutazioni eterozigoti in *STUB1*, responsabili di SCA48. La prevalenza relativa di SCA48 è quindi risultata di 3,4% (8/235), ma, considerando solo i casi con familiarità dominante, risultava del 23,5% (4/17). Tramite gli studi di segregazione, tra i familiari dei pazienti SCA48 sono stati individuate altri tre affetti, per un totale quindi di 11 pazienti.

Dal punto di vista genetico, sono state individuate tre mutazioni missenso (c.170C>T/p.[Pro57Leu]; c.199G>A/p.[Ala67Thr]; c.721C>T/p.[Arg241Trp]) in residui altamente conservati e predetti patogenici in silico, una mutazione nonsense (c.673C>T/p.[Arg225*]) e quattro inserzioni/delezioni (c.791_792delTG/p.[Val264Glyfs*4]; c.818_819dupGC/p.[Pro274Alafs*3]. Infine sono state rilevate anche due mutazioni precedentemente riportate in SCA48, c.689_692delACCT/p.[Tyr230Cysfs*9]; e c.823_824delCT/p.[Leu275fs*16].

Dal punto di vista fenotipico, l'età media all'esordio era di $41,5 \pm 8,2$ anni (mediana 42; range 30–56), con una durata media di malattia di $14,8 \pm 10,9$ anni (mediana 15; range 0,5–30). L'atassia e i disturbi cerebellari (disartria, dismetria, alterazione dei movimenti oculari), erano presenti in tutti i pazienti, con una gravità variabile (la SARA variava da 3/40 a 36/40). Il fenotipo si è confermato piuttosto complesso, con un'associazione di atassia, disturbi del movimento, cognitivi e psichiatrici. Infatti sette pazienti presentavano corea, cinque distonia, quattro parkinsonismo. I

disturbi psichiatrici erano presenti in sette pazienti, e quelli cognitivi in otto (alcuni pazienti presentavano una lieve alterazione delle funzioni esecutive, altri un grave e marcato deterioramento cognitivo globale). In nessun caso erano presenti chiari segni di spasticità (Tabella 3).

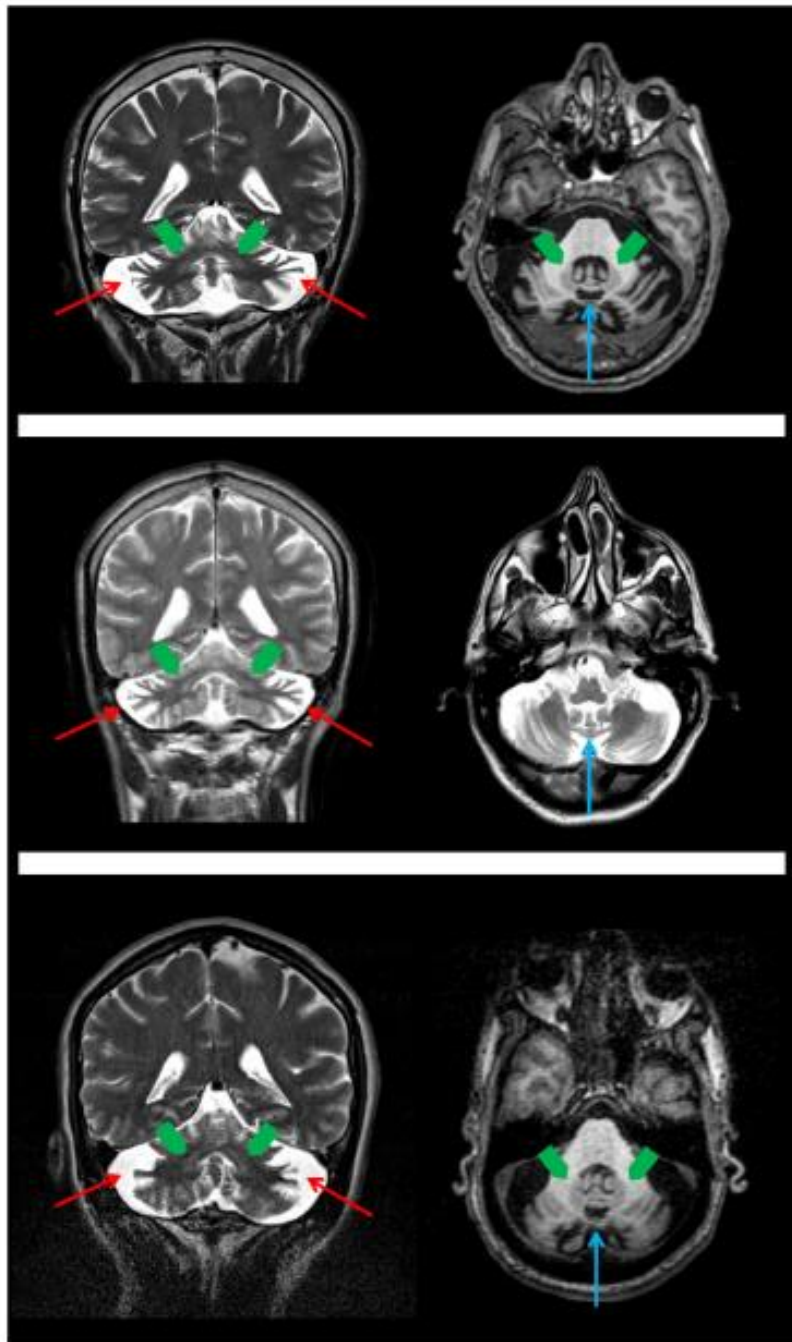
La RM encefalo, effettuata in sette pazienti, ha rilevato una significativa atrofia cerebellare, che interessava sia le regioni vermiane che emisferiche, ma che era più evidente nella porzione laterale del lobo posteriore corrispondente al lobulo VI e VII. Inoltre, alcuni pazienti presentavano un'iperintensità nelle sequenze T2 a livello di entrambi i nuclei dentati (Figura 6). L'associazione di tale alterazione del segnale con l'atrofia cerebellare appare alla RM simile all'immagine di un granchio, per cui abbiamo descritto il cosiddetto "crab sign" tipico di SCA48 (Cocozza et al., 2020).

La PET-FDG, eseguita in tre pazienti, documentava un ipometabolismo cerebellare, talamico e corticale, mentre il DaTscan, eseguito in un paziente con parkinsonismo, era risultato nella norma.

Tabella 3. Dati demografici e clinici dei pazienti SCA48

	Family A		Family B		Family C		Family D	Family E	Family F	Family G	Family H
	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6	Patient 7	Patient 8	Patient 9	Patient 10	Patient 11
Mutation in <i>STUB1</i>	c.689_692delACCT p.Tyr230Cysfs*9		c.818_819dupGC p.Pro274Alafs*3		c.791_792delTG p.Val264Glyfs*4		c.199G>A p.Ala67Thr	c.673C>T p.Arg225*	c.721C>T p.Arg241Trp	c.823_824delCT p.Leu275fs*16	c.170C>T p.Pro57Leu
Sex, age at last examination	M, 51	F, 67	F, 67	F, 37	M, 66	F, 70	F, 52	F, 52	F, 46	F, 60	M, 52
Signs/symptoms at onset (age)	GA, DYS (31)	GA, DYS (48)	Chorea, GA (42)	GA, COG (34)	DYS (56)	GA (40)	DYS (37)	GA, DYS (50)	DYS, COG (46)	DYS (30)	DYS (43)
Family history	+	+	+	+	+	+	-	MSA-C	-	-	+
Gait Ataxia	+	+++	+	+	+	++	++	++	-	++	+
Dysarthria	++	+++	+	+	+	++	++	++	+	++	+++ (bulbar)
Dysmetria	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Eye Movements abnormalities	+(NY, BSP)	+(BSP)	-	+(BSP)	+(BSP, IMP)	+(BSP, slow saccades)	+(IMP)	+(IMP)	++	+(NY)	+(BSP, hypometric saccades)
SARA score	11/40	36/40	40/40	9/40	12/40	14/40	17/40	9/40	3/40	12/40	10/40
Parkinsonism	-	++	-	-	+	+	-	-	-	+	-
Dystonia/Tremor	+(Retrocollis) Head tremor	+(Anterocollis)	++(Anterocollis, Upper limbs, Blepharospasm)	-	-	-	+(Hands)	-	-	+(Retrocollis)	-
Chorea	-	+(Oral)	+(Hands)	++(Head)	+(Head)	++(Oral, Limbs)	+(Hands)	-	-	++(Head, Oral)	-
Increased Tendon Reflexes	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+
EMG/ENG studies	normal	ND	ND	ND	normal	ND	normal	normal	normal	ND	normal
SSEP/MEP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	normal	normal	ND	normal
Psychiatric manifestations	-	+(depression)	++(anxiety, irritability)	-	++ (apathy, irritability)	-	-	+(apathy)	+(apathy)	+(anxiety, depression)	+(self-harm)
MMSE	27/30	16/30	13/30	17/30	14/30	16/30	26/30	27/30	28/30	24/30	ND

Figura 6 - RM encefalo in 3 pazienti SCA48 (tagli coronale ed assiale pesati in T2, ed assiale in T1).



Legenda. Si evidenziano i reperti tipici di SCA48 in tre pazienti: marcata atrofia cerebellare sia vermiana (freccia blu) che emisferica, specialmente a livello delle aree laterali e posteriori (Lobo VI, Crus I, Crus II, Lobulo VIII, freccia rossa); inoltre, iperintensità bilaterale dei nuclei dentati estesa fino alla porzione mediale dei peduncoli cerebellari medi (freccia verde).

SCA48. Studio multicentrico europeo

La rarità delle non-polyQ SCA ne rende difficile lo studio, sia dal punto di vista genetico che fenotipico. Pertanto, dal 2021 è stata creata una rete di collaborazione internazionale, chiamata SCANOP, al fine raccogliere in un database comune le informazioni sulle non-polyQ SCA e studiarne le caratteristiche genetiche e cliniche. SCANOP riunisce 23 centri, provenienti da 10 stati (Francia, Italia, Germania, Gran Bretagna, Portogallo, Stati Uniti, Austria, Olanda, Spagna, Israele), coordinati dal centro Pitié-Salpêtrière di Parigi. SCANOP ha organizzato un database elettronico comune su piattaforma REDCap, in cui abbiamo inserito i dati di 966 pazienti con varianti genetiche associate a non-polyQ SCA. Tra questi, abbiamo poi selezionato ed incluso nell'analisi dei dati 727 pazienti le cui varianti erano patogene secondo i criteri ACMG (class IV/V). Sono stati invece esclusi dallo studio i 121 pazienti con varianti Class III (n=121) e i 41 con informazioni mancanti (n=41).

Tra i 727 pazienti inclusi, 77 avevano mutazioni in *STUB1*, responsabili di SCA48. Il nostro centro si è concentrato in particolare sull'analisi dei pazienti con SCA48. I dati emersi sono stati poi confrontati con quelli delle altre non-polyQ SCA inserite nel database, in particolare *CACNA1A* (239 pazienti); *PRKCG* (SCA14, 175 pazienti); *AFG3L2* (SCA28, 101 pazienti); *ITPR1* (SCA15/29, 91 pazienti); *SPTBN2* (SCA5, 39 pazienti); e *KCNC3* (SCA13, 34 pazienti).

Tra i 77 pazienti con SCA48 identificati, sono state individuate 33 varianti patogeniche in *STUB1*, distribuite lungo tutti i domini della proteina CHIP. Non sono stati identificati chiari hotspot mutazionali o particolari correlazioni genotipo-fenotipo. Delle 33 varianti, 18 erano missenso, sei frameshift, cinque nonsense, tre di splicing ed una era una delezione in-frame. Dieci varianti in *STUB1* ricorrevano in differenti famiglie.

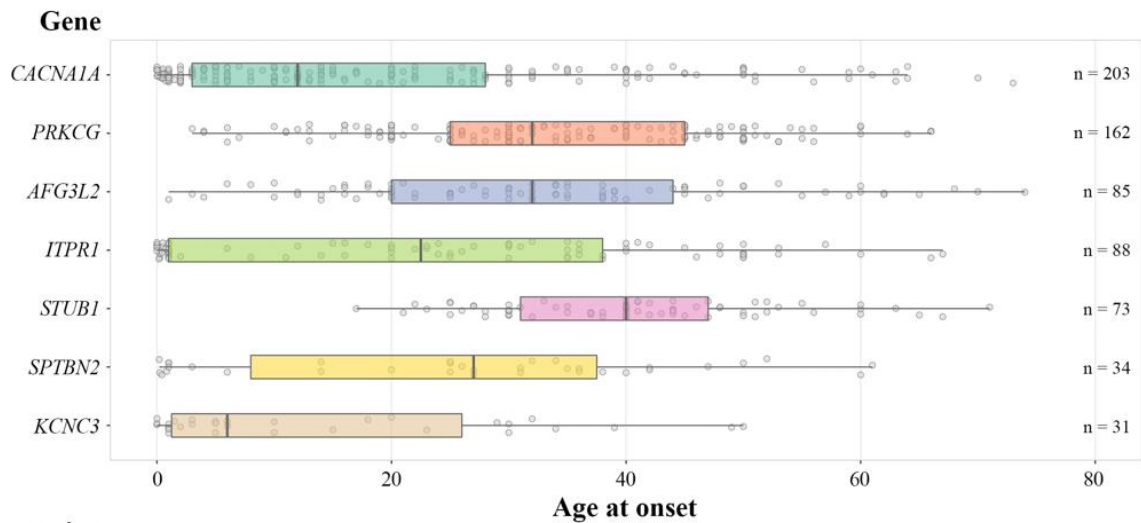
L'età media all'esordio è risultata di 40 anni. A differenza che la grande maggioranza delle SCA, non è stato individuato nessun caso di SCA48 in età infantile (Figura 7, A). Rispetto a tutte le altre

non-polyQ SCA studiate, SCA48 è risultata quella con maggiore frequenza di deterioramento cognitivo (65% dei pazienti) e disturbi psichiatrici (44%) (Figura 7, B). Peraltro, i sintomi psichiatrici e cognitivi in molti casi risultano disturbi presenti all'esordio, già nella terza – quarta decade, mentre l'atassia compariva solitamente tra la quinta e la sesta decade. Distonia, corea, mioclono e parkinsonismo erano comuni (47%), e spesso concomitanti con il deterioramento cognitivo.

La progressione di malattia della SCA48, confrontata con le altre non-polyQ SCA, è risultata la più rapida, l'unica con una progressione maggiore di 1 punto alla scala SARA all'anno. Sebbene il declino cognitivo, i segni extrapiramidali e i sintomi psichiatrici si siano verificati con frequenza molto maggiore rispetto a quelle tipiche nelle SCA considerate nel confronto, non è stata nessuna di queste caratteristiche, ma piuttosto la rapida progressione della malattia ad essere il miglior predittore che un paziente avesse una mutazione in *STUB1* rispetto agli altri sette geni.

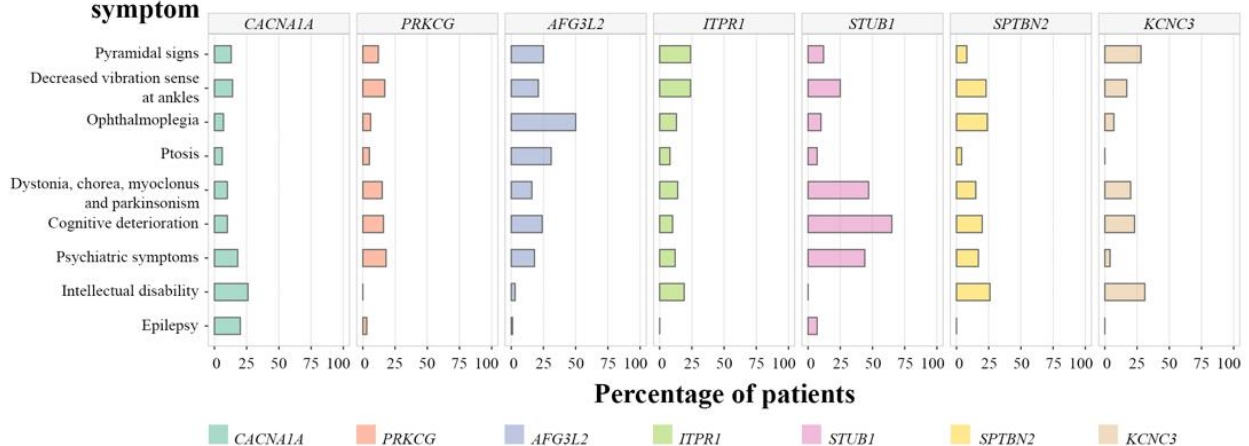
Figura 7 - Confronto tra età di esordio e caratteristiche cliniche delle sequenti non-polyQ SCA: CACNA1A, PRKCG (SCA14), AFG3L2 (SCA28), ITPR1 (SCA15/29), STUB1 (SCA48), SPTBN2 (SCA5) e KCNC3 (SCA13).

A



B

Accompanying symptom



Legenda.

A. Boxplot che mostrano la distribuzione dell'età all'esordio per ciascuna non-polyQ SCA. I limiti inferiore e superiore corrispondono al primo e al terzo quartile (25° e il 75° percentile).

B. Barplot che rappresentano la percentuale di pazienti con sintomi associati all'ataxia cerebellare per ciascuna non-polyQ SCA.

SCA48 e SCA17: eredità digenica o interazione genetica?

Dall'analisi della coorte dei pazienti affetti SCA48, è emerso un interessante dato genetico: una percentuale elevata dei nostri pazienti e di quelli di altri gruppi (Magri et al., 2022; Barbier et al., 2022), oltre alla mutazione patogenica in *STUB1*, presentava un'espansione intermedia nel gene *TBP*, la cui espansione completa è responsabile della SCA17. Il gene *TBP* codifica per la TATA Binding Protein, un fattore di trascrizione che lega una specifica sequenza di DNA chiamata TATA box. Gli alleli normali TBP hanno un numero di sequenze CAG comprese tra 25 e 40 (Nethisinghe et al., 2018), mentre gli alleli patogeni, responsabili di SCA17, hanno un numero di triplette superiore a 49. Gli alleli con un numero di ripetizioni compreso tra 41 e 48 sono definiti intermedi, e sono associati ad una penetranza incompleta di SCA17. Occorre precisare che il limite inferiore del range degli alleli intermedi SCA17 non è ben definito. Ad esempio, è stato indicato anche il valore di 43 (Sequeiros et al., 2010) e nella letteratura su SCA48 si è suggerito che 40 ripetizioni CAG potrebbero rientrare tra i valori intermedi.

In uno studio su una popolazione europea sana di 13.585 individui, erano presenti 143 alleli intermedi con una prevalenza quindi dell'1,05% (Gardiner et al., 2019).

A differenza della popolazione generale, i pazienti con SCA48 analizzati presentano molto frequentemente un allele intermedio *TBP* (≥ 40), nel 90% (9/10) nei casi di Magri et al. (2022) e nel 40% nei casi di Barbier et al. (2022). È stata anche osservata una correlazione tra l'entità dell'espansione e la funzione cognitiva, per cui ad una maggiore lunghezza dell'allele *TBP* corrispondeva una maggiore frequenza del deterioramento cognitivo nonché una più rapida progressione della patologia (Barbier et al., 2022).

Abbiamo analizzato l'allele *TBP* in 16 dei nostri pazienti affetti da SCA48. In sei di essi l'allele con sequenza CAG maggiore era nella norma (38-39) ed in dieci aveva un valore intermedio (40-44). Quindi, anche se frequentemente le mutazioni *STUB1* si associano ad alleli intermedi SCA17

(62,5%), vi sono casi in cui la sola mutazione *STUB1* sembra sufficiente a determinare la patologia.

È in corso uno studio cooperativo che prevede l'estensione dell'indagine relativa agli alleli intermedi anche alla famiglia originaria spagnola ed a famiglie americane affette. Si procederà quindi ad ulteriori analisi per verificare se anche alleli intermedi di altre polyQ SCA possano avere un ruolo nella patogenesi di SCA48. È interessante osservare che in quattro delle nostre famiglie coesistono affetti con alleli *TBP* normali ed intermedi.

Abbiamo anche confrontato i nostri pazienti con e senza allele intermedio per caratteristiche cliniche. Non esisteva alcuna differenza per età d'esordio dell'atassia ($41,0 \pm 8,7$ vs $41,3 \pm 8,1$), né per frequenza di disturbi cognitivi, psichiatrici o extrapiramidali associati all'atassia. Né vi era correlazione tra grandezza della sequenza CAG ed età di esordio (r di Pearson = -0,07).

Tali dati contraddicono l'ipotesi di trasmissione digenica (Magri et al., 2022), poiché vi sono pazienti con SCA48 che presentano un allele *TBP* nel range della norma (il 37,5% nella nostra casistica ed il 60% in quella di Barbier et al. 2022). L'altra ipotesi è di un'interazione tra i geni *STUB1* e *TBP* nello sviluppo della SCA48. Un'espansione intermedia di *TBP1* potrebbe agire come disease modifier in SCA48, causando maggiore frequenza del deterioramento cognitivo e più rapida progressione (Barbier et al., 2022). I nostri dati però non sembrano mostrare significative differenze cliniche tra pazienti con e senza alleli intermedi SCA17. Sarà necessaria quindi ulteriore ricerca per chiarire questi aspetti, importanti non solo per definire meglio la patogenesi di SCA48 ma anche per il counseling genetico. Nella nostra casistica due pazienti, all'età di 60 e 62 anni, pur essendo portatori della mutazione non hanno sviluppato la malattia.

STUB1 codifica per CHIP (C-terminus of HSC70-Interacting Protein), un enzima coinvolto nell'omeostasi proteica (Rosser et al., 2007). L'analisi in vitro eseguita per diverse mutazioni *STUB1* ha suggerito un'ampia gamma di alterazioni nell'attività fisiologica di CHIP, che includono la diminuzione dell'espressione di CHIP, l'alterazione dell'attività dell'ubiquitina-ligasi, alterazioni dell'oligomerizzazione della proteina e delle sue proprietà di chaperone ed è stata infine descritta una localizzazione anomala di CHIP nelle cellule di Purkinje (Kanack et al., 2018, Chen et al., 2020, Chen et al., 2021, Pakdaman et al., 2021). Tutto ciò potrebbe condurre ad aploinsufficienza di CHIP e conseguente compromissione dell'omeostasi proteica con accumulo di proteine mal ripiegate e aggregati e conseguenti neurotossicità e perdita neuronale, come appunto osservato negli studi neuropatologici condotti in SCA48 (Chen et al 2020., Mol et al., 2020, Roux et al., 2020). In effetti, l'esame neuropatologico di alcuni casi giunti a riscontro autoptico ha rivelato marcata perdita di cellule di Purkinje nel cervelletto (Roux et al., 2020) con localizzazione aberrante di *STUB1* nelle arborizzazioni dendritiche distali (Chen et al.,2020), inclusioni neuronali positive per ubiquitina/p62 nel cervelletto, nella neocorteccia e nel tronco encefalico (Mol et al., 2020)

Il meccanismo patogenetico è stato solo in parte chiarito. Un meccanismo di perdita di funzione associato alle mutazioni bialleliche di *STUB1* è stato ampiamente dimostrato (Heimdal et al., 2014, Shi et al.,2014, Pakdaman et al., 2017, Kanack et al., 2018, Shi et al., 2018). Un'aploinsufficienza indotta da mutazioni monoalleliche appare anche in accordo con il fenotipo di SCA48, che è più lieve rispetto a quello causato dalle mutazioni bialleliche che conducono a SCAR16. In effetti topi knock-out eterozigoti presentavano alterazioni solo ad un ristretto numero di test comportamentali (McLaughlin et al., 2012). Anche in pazienti con mutazioni eterozigoti le indagini funzionali hanno dimostrato una netta riduzione della proteina CHIP in cellule mononucleate da sangue periferico, mentre i livelli di mRNA erano intatti (Mengel et al., 2021).

È anche interessante ipotizzare che, se la presenza di alleli *TBP* intermedi usualmente non conduce ad importante accumulo di inclusioni intraneuronali e neurotossicità, in presenza di aploinsufficienza di CHIP, che ha un importante ruolo nell'ubiquitinazione e nella degradazione proteica, questi fenomeni potrebbero divenire più rilevanti ed incrementare la penetranza della malattia (Magri et al., 2022). Meno probabile appare un effetto dominante negativo che causerebbe aggregazioni di α -sinucleina e proteina tau (Chen et al., 2021). Infine, è stato proposto anche un meccanismo tossico di guadagno di funzione, supportato dall'aberrante localizzazione intracellulare di CHIP nelle cellule di Purkinje dei pazienti, che potrebbe condurre alla morte neuronale (Chen et al., 2020) e dall'aumento dell'attività di co-chaperone riscontrato in topi knock-in (Shi et al., 2018).

Screening per mutazioni del gene *RFC1* (CANVAS)

Mutazioni del gene *RFC1*

CANVAS (Cerebellar Ataxia with Neuropathy and Bilateral Vestibular Areflexia Syndrome) è una forma di atassia recessiva ad esordio tardivo associata a neuropatia ed areflessia vestibolare bilaterale, dovuta a mutazioni del gene *RFC1*. Il gene *RFC1* codifica per una subunità del fattore di replicazione C, un'ATPasi DNA-dipendente necessaria per la replicazione e la riparazione del DNA eucariotico e con probabile ruolo nella stabilità dei telomeri.

Il fenotipo clinico è stato inizialmente descritto da Migliaccio et al. (2004), mentre la causa genetica è stata identificata solo nel 2019 da Cortese et al. Nella CANVAS, è presente un'espansione biallelica del numero di ripetizioni del pentanucleotide AAGGG nel gene *RFC1*, usualmente superiore a 400 ripetizioni (400–2000), laddove la sequenza “wild-type” è di 11 ripetizioni AAGGG.

Oltre all'atassia, la neuropatia e il deficit vestibolare, sono spesso presenti tosse cronica e disturbi autonomici. In alcuni casi sono stati anche descritti altri disturbi neurologici quali parkinsonismo (Da Silva et al., 2020). La RM dell'encefalo mostra frequentemente atrofia cerebellare talora in associazione con alterazioni dei cordoni posteriori a livello cervicale (Matos et al., 2021).

Presso il centro atassie della Federico II, abbiamo ricercato (vedi Metodi) l'espansione della sequenza AAGGG nel gene *RFC1* in una coorte di 62 pazienti con atassia sporadica ad esordio tardivo (Barghigiani et al., 2022). Prima di effettuare lo screening genetico per CANVAS, in tutti i pazienti erano state escluse forme di atassia acquisita, le poly-Q SCA e FRDA. In alcuni pazienti selezionati erano stati anche effettuati TRP per atassia.

Prima di effettuare il test per CANVAS, tra i 62 pazienti studiati, la diagnosi clinica era atrofia multisistemica di tipo cerebellare (MSA-C) in 44 (probabile in 39, possibile in 5) in accordo ai criteri di Gilman et al. (2008). I restanti 18 pazienti avevano ricevuto una diagnosi di esclusione di atassia sporadica dell'età adulta (SAOA).

Tra i 62 pazienti esaminati, nove sono risultati positivi per espansione omozigote AAGGG nel gene *RFC1*. Di questi pazienti, prima dello screening CANVAS, sei avevano ricevuto la diagnosi di SCA e tre di MSA-C. Per quanto riguarda CANVAS, l'età media all'esordio $\pm$ SD era di $54,0 \pm 5,2$ anni, il punteggio SARA medio $9,0 \pm 4,2$, lo stadio IAPS mediano 2 (range 2-3). La durata media di malattia era di $10,2 \pm 6,4$ anni, e la progressione di malattia valutata con il punteggio alla SARA era di $1,04 \pm 0,55$ all'anno. Tre pazienti necessitavano di un supporto costante per camminare. L'atassia della marcia era presente in tutti i pazienti, la disartria e la frammentazione dei movimenti oculari di inseguimento lento erano entrambe molto frequenti (in circa l'80% di casi), il nistagmo e l'iperreflessia rotulea erano presenti nel 44% dei pazienti, ma il segno di Babinski e l'ipertonie non erano mai presenti, quindi non vi erano definiti segni di una sindrome piramidale. Una marcata compromissione distale della pallestesia al malleolo esterno era presente nel 56% dei casi. Rigidità

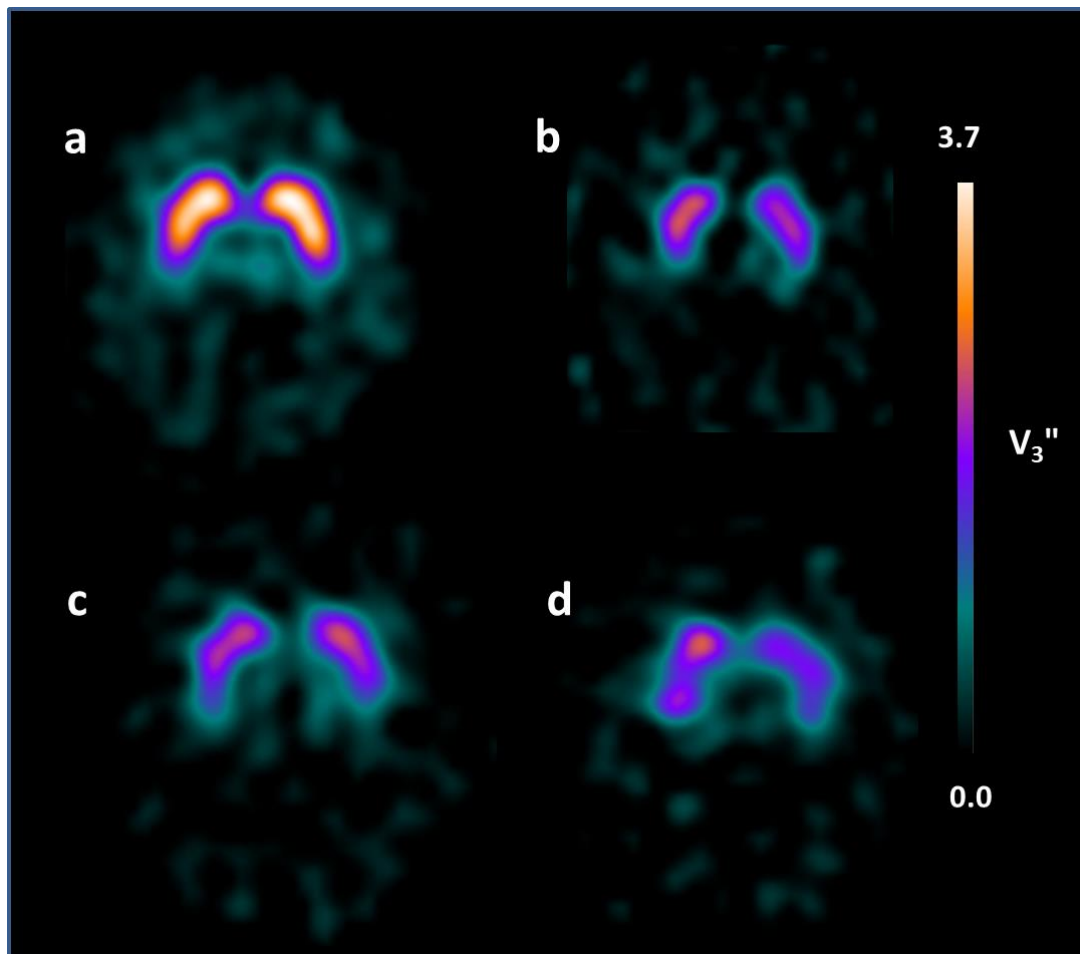
e bradicinesia erano sempre assenti, in due pazienti era presente tremore e in uno si riscontrava distonia di lieve entità. La disfunzione vescicale era comune (63%), in un solo paziente si sono verificati episodi sincopali. La tosse era un altro sintomo frequente, presente nel 75% dei casi e, quando presente, precedeva sempre l'atassia. La disfagia era riferita dal 67% dei pazienti ed un disturbo comportamentale in sonno REM nel 25%. La RM dell'encefalo mostrava atrofia cerebellare in tutti i casi tranne uno ed era associata in un singolo caso ad atrofia del ponte. Gli studi di VCM e VCS erano sempre alterati così come le valutazioni vestibolari. Un risultato interessante del nostro studio è la presenza di un DaTscan anomalo nei tre pazienti esaminati, pur in assenza di caratteristiche cliniche di parkinsonismo (Figura 8).

Un altro dato peculiare è che un'espansione *RFC1* allo stato eterozigote è stata trovata in sei pazienti, quattro con diagnosi di MSA-C e due con diagnosi di SAOA. Sebbene i portatori eterozigoti dell'espansione patologica *RFC1* non fossero stati sottoposti a studi WES, avevamo potuto escludere ulteriori varianti patogene o probabilmente patogene impiegando un TRP per atassia.

Pertanto, l'incidenza di espansioni eterozigoti di *RFC1* in MSA-C e SAOA certamente maggiore (11,3%) rispetto alla popolazione generale (0,7%; Cortese et al., 2019) non sembra essere casuale ($p < 0,005$) e potrebbe indicare un possibile ruolo dell'espansione *RFC1* quale fattore di rischio per atassia ad esordio tardivo.

In conclusione, abbiamo identificato nove pazienti con espansione omozigote AAGGG nel gene *RFC1* (14,5%), una percentuale che rientra nell'ampio range di valori riportati in letteratura ed abbiamo confermato nei nostri pazienti il fenotipo caratteristico di CANVAS.

Figura 8 - Studio mediante DaTscan in pazienti CANVAS.



Legenda. Immagini assiali a livello dello striato ottenute mediante SPECT con ^{123}I -FP-CIT (ioflupane) in un soggetto normale (a, 61 anni), nel paziente 1 (b, 63 anni), nel paziente 2 (c, 51 anni) e nel paziente 3 (d, 53 anni). Tutti i pazienti, confrontati con il controllo, mostrano una diffusa riduzione, da lieve a moderata, dei valori di densità del trasportatore della dopamina (V_3'') striatale, che interessa nucleo caudato e putamen, bilateralmente. Solo il paziente 3 mostrava una leggera asimmetria striatale (sinistra<destra).

Conclusioni

Gli obiettivi della ricerca qui presentata sono di dare una diagnosi certa a pazienti affetti da sindromi atassiche, malattie ereditarie rare, di caratterizzare ed estendere il fenotipo di queste patologie, di identificarne le mutazioni causative, cercando di comprendere i meccanismi patogenetici che dall'errore genetico conducono alle manifestazioni cliniche.

L'incidenza di una singola malattia rara è bassa, ma le malattie rare come gruppo sono piuttosto comuni: l'Europa conta circa 30 milioni di persone affette da malattie rare. Le malattie rare costituiscono modelli di disfunzione di determinate pathway molecolari ed il loro studio ci permette di comprendere non solo i meccanismi patogenetici della malattia, ma anche il funzionamento di quelle pathway in condizioni di normalità ed il loro coinvolgimento in altre malattie correlate e più comuni.

Utilità scientifica a parte, il raggiungimento di una diagnosi è di evidente beneficio per i pazienti, per le famiglie e per il sistema sanitario, interrompendo un'odissea diagnostica costosa e logorante, evitando esami e terapie non appropriate e consentendo un adeguato counseling genetico. Anche se purtroppo gli esempi non sono ancora molti, vi sono malattie rare in cui esistono terapie ed il loro numero potrebbe rapidamente aumentare in futuro.

Infine le strategie terapeutiche che vengono sviluppate per le malattie rare rientrano strettamente nel concetto di medicina di precisione ed è quindi probabile che ciò che apprendiamo nel trattamento di queste patologie possa aiutarci nel trattamento di malattie più comuni, quindi l'investimento in questo tipo di ricerca dovrebbe essere considerato di tipo traslazionale.

La presente ricerca è focalizzata sulle SCA non-polyQ, forme quindi più rare e di diagnosi più difficile, e su alcune sindromi atassiche autosomiche recessive di recente individuazione. In

entrambi i casi si tratta quindi di atassie con meccanismo patogenetico eterogeneo e spesso non ancora chiarito.

Una prima considerazione da farsi sui risultati ottenuti è che, utilizzando tecniche di NGS, è stato possibile giungere a diagnosi definitiva in cinque pazienti con mutazioni in *PRKCG* (SCA14), due con mutazioni in *POLR3A*, 16 con mutazioni in *STUB1*, due con mutazioni in *AARS2*, ed inoltre 9 pazienti rispettivamente con mutazioni in *KIF1C*, *DHDDS*, *ATM*, *CACNA1A*, *CACNA1G*, *SYNE1*, *ITPR1*, *KCND3*, *ATP3A2*. Infine, utilizzando la metodica della RP-PCR, nove pazienti sono risultati positivi per espansione omozigote AAGGG nel gene *RFC1*. Quindi, in totale, si è raggiunta una diagnosi molecolare in 43 pazienti seguiti presso il Centro per le Atassie dell'Università di Napoli Federico II.

Inoltre, alcuni dei nostri pazienti presentavano quadri clinici peculiari che hanno permesso di ampliare il fenotipo associato alla presenza di specifiche mutazioni. In particolare, i fenotipi di atassia episodica, spasticità prevalente, e grave con esordio infantile, mai descritti in precedenza nella SCA14, inducono a considerare utile lo screening per le mutazioni del gene *PRKCG* anche in pazienti con queste manifestazioni cliniche (De Michele et al., 2022).

Di particolare interesse è anche uno dei nostri pazienti con mutazioni in *POLR3A*, portatore della mutazione c.1909 + 22G > A e di un'ampia delezione intragenica (Di Donato et al., 2022). Il fenotipo era caratterizzato da atassia, epilessia, sordità neurosensoriale e lipomi. La mutazione c.1909 + 22G > A è in genere associata ad un quadro clinico lieve, ma in questo caso la contemporanea presenza di una delezione che interessava cinque esoni ha determinato un fenotipo piuttosto grave.

In due sorelle con lievi segni cerebellari (nistagmo e tremore d'azione) ed amenorrea sono state identificate mutazioni bialleliche di *AARS2* (De Michele et al., 2020a). Le due mutazioni rinvenute erano localizzate nel dominio di amminoacilazione, che è essenziale per l'attività enzimatica di

AARS2. La RM dell'encefalo risultava nella norma in entrambe le sorelle, laddove una leucoencefalopatia progressiva è un tipico elemento caratterizzante il quadro clinico. Anche questo dato espande il fenotipo di una rara forma genetica ed amplia i criteri di screening di AARS2.

La forma di atassia più frequentemente diagnosticata nei nostri pazienti, SCA48, è anche quella che apre più interrogativi per modalità di trasmissione e meccanismo patogenetico.

Dal punto di vista clinico abbiamo per primi confermato il peculiare fenotipo di questa SCA (atassia associata a disturbi cognitivi e psichiatrici e disturbi del movimento) riportato nella famiglia originaria spagnola (Genis et al., 2018) e per primi abbiamo rilevato la somiglianza clinica con SCA17, una polyQ-SCA (De Michele et al., 2019). SCA48, anche se con un quadro clinico più lieve, ha molte analogie con SCAR16, che è causata da mutazioni bialleliche dello stesso gene *STUB1* ed ha quindi trasmissione autosomica recessiva (De Michele et al., 2020b). Ad aumentare la complessità della modalità di trasmissione ereditaria di SCA48, molti dei pazienti presentano la frequente coesistenza di ripetizioni CAG nel range intermedio di SCA17 (Magri et al., 2022, Barbier et al., 2022), che sono di per sé solo raramente causa di malattia. Una trasmissione digenica sembra tuttavia esclusa dalla presenza di pazienti che non sono portatori di alleli intermedi SCA17. Anche i dati in supporto di un'interazione genetica SCA17/SCA48 sono per ora molto deboli. Ne consegue un'importante difficoltà, al momento, nel counseling genetico alle famiglie.

Anche il meccanismo patogenetico delle mutazioni *STUB1* è ancora da definire. La loss of function di CHIP può certamente spiegare le forme recessive (SCAR16), ma è ancora dibattuto se l'aploinsufficienza, o un effetto dominante negativo o un meccanismo tossico di gain of function possano essere alla base della perdita neuronale in SCA48.

L'ultima patologia che abbiamo studiato è una forma autosomica recessiva a presentazione per lo più sporadica per cui spesso i pazienti ricevono diagnosi di MSA-C o SAOA, forme sporadiche ad esordio tardivo non considerate genetiche. Abbiamo identificato nella nostra casistica nove pazienti (14,5%), con espansione omozigote AAGGG nel gene *RFC1* ed abbiamo confermato il fenotipo caratteristico di CANVAS anche nei nostri pazienti, proponendo però un probabile coinvolgimento anche della via dopaminergica nigrostriatale, come suggerito dalle alterazioni rilevate al DaTscan (De Michele et al., 2022). Il dato più interessante di questo studio è però l'elevata incidenza di espansioni eterozigoti di *RFC1* nella nostra casistica, che fa pensare ad un possibile ruolo come fattore predisponente delle mutazioni di *RFC1* nelle forme di atassia sporadica idiopatica dell'adulto. Pertanto, come non raramente accade, meccanismi molecolari alla base di forme genetiche potrebbero contribuire anche alla patogenesi di forme non genetiche.

Bibliografia

- Barghigiani M, De Michele G, Tessa A, Fico T, Natale G, Saccà F, Pane C, Cuomo N, De Rosa A, Pappatà S, De Michele G, Santorelli FM, Filla A. Screening for RFC-1 pathological expansion in late-onset ataxias: a contribution to the differential diagnosis. *J Neurol*. 2022 Oct;269:5431-5435. doi: 10.1007/s00415-022-11192-x. PMID: 35633373.
- Beijer D, Deconinck T, De Bleecker JL, Dotti MT, Malandrini A, Urtizberea JA, Zulaica M, López de Munain A, Asselbergh B, De Jonghe P, Baets J. Nonsense mutations in alpha-II spectrin in three families with juvenile onset hereditary motor neuropathy. *Brain*. 2019 Sep 1;142:2605-2616. doi: 10.1093/brain/awz216. PMID: 31332438.
- Cagnoli C, Stevanin G, Michielotto C, Gerbino Promis G, Brussino A, Pappi P, Durr A, Dragone E, Viemont M, Gellera C, Brice A, Migone N, Brusco A. Large pathogenic expansions in the SCA2 and SCA7 genes can be detected by fluorescent repeat-primed polymerase chain reaction assay. *J Mol Diagn*. 2006 Feb;8:128-32. doi: 10.2353/jmoldx.2006.050043. PMID: 16436644; PMCID: PMC1867568.
- Campanella G, Filla A, DeFalco F, Mansi D, Durivage A, Barbeau A. Friedreich's ataxia in the south of Italy: a clinical and biochemical survey of 23 patients. *Can J Neurol Sci*. 1980 Nov;7:351-7. doi: 10.1017/s0317167100022873. PMID: 6452193.
- Campuzano V, Montermini L, Moltò MD, Pianese L, Cossée M, Cavalcanti F, Monros E, Rodius F, Duclos F, Monticelli A, Zara F, Cañizares J, Koutnikova H, Bidichandani SI, Gellera C, Brice A, Trouillas P, De Michele G, Filla A, De Frutos R, Palau F, Patel PI, Di Donato S, Mandel JL, Coccozza S, Koenig M, Pandolfo M. Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science*. 1996 Mar 8;271:1423-7. doi: 10.1126/science.271.5254.1423. PMID: 8596916.
- Chelban V, Wiethoff S, Fabian-Jessing BK, Haridy NA, Khan A, Efthymiou S, Becker EBE, O'Connor E, Hersheson J, Newland K, Hojland AT, Gregersen PA, Lindquist SG, Petersen MB, Nielsen JE, Nielsen M, Wood NW, Giunti P, Houlden H. Genotype-phenotype correlations, dystonia and disease progression in spinocerebellar ataxia type 14. *Mov Disord*. 2018 Jul;33:1119-1129. doi: 10.1002/mds.27334. PMID: 29603387; PMCID: PMC6175136.
- Chen DH, Latimer C, Yagi M, Ndugga-Kabuye MK, Heigham E, Jayadev S, Meabon JS, Gomez CM, Keene CD, Cook DG, Raskind WH, Bird TD. Heterozygous *STUB1* missense variants cause ataxia, cognitive decline, and *STUB1* mislocalization. *Neurol Genet*. 2020 Feb;6:1-13. doi: 10.1212/NXG.0000000000000397. PMID: 32211513; PMCID: PMC7073456.
- Chen HY, Hsu CL, Lin HY, Lin YF, Tsai SF, Ho YJ, Li YR, Tsai JW, Teng SC, Lin CH. Clinical and functional characterization of a novel *STUB1* frameshift mutation in autosomal dominant spinocerebellar ataxia type 48 (SCA48). *J Biomed Sci*. 2021 Sep;28:65. doi: 10.1186/s12929-021-00763-1. PMID: 34565360; PMCID: PMC8466936.
- Coccozza S, Pontillo G, De Michele G, Perillo T, Guerriero E, Ugga L, Salvatore E, Galatolo D, Riso V, Saccà F, Quarantelli M, Brunetti A. The "crab sign": an imaging feature of spinocerebellar ataxia type 48. *Neuroradiology*. 2020 Sep;62:1095-1103. doi: 10.1007/s00234-020-02427-7. PMID: 32285148.
- Cortese A, Simone R, Sullivan R, Vandrovcova J, Tariq H, Yau WY, Humphrey J, Jaunmuktane Z, Sivakumar P, Polke J, Ilyas M, Tribollet E, Tomaselli PJ, Devigili G, Callegari I, Versino M, Salpietro V, Efthymiou S, Kaski D, Wood NW, Andrade NS, Buglo E, Rebelo A, Rossor AM, Bronstein A, Fratta P, Marques WJ, Züchner S, Reilly MM, Houlden H. Biallelic expansion of an intronic repeat in RFC1 is a common cause of late-onset ataxia. *Nat Genet*. 2019 Apr;51:649-658. doi: 10.1038/s41588-019-0372-4. PMCID: PMC6709527.

- da Silva Schmitt G, Martinez ARM, da Graça FF, de Lima FD, Bonadia LC, Amorim BJ, Nucci A, França MC Jr. Dopa-Responsive Parkinsonism in a Patient With Homozygous RFC1 Expansions. *Mov Disord*. 2020 Oct;35:1889-1890. doi: 10.1002/mds.28286. PMID: 33068476.
- Dallabona C, Diodato D, Kevelam SH, Haack TB, Wong LJ, Salomons GS, Baruffini E, Melchionda L, Mariotti C, Strom TM, Meitinger T, Prokisch H, Chapman K, Colley A, Rocha H, Ounap K, Schiffmann R, Salsano E, Savoirdo M, Hamilton EM, Abbink TE, Wolf NI, Ferrero I, Lamperti C, Zeviani M, Vanderver A, Ghezzi D, van der Knaap MS. Novel (ovario) leukodystrophy related to AARS2 mutations. *Neurology*. 2014 Jun 10;82:2063-71. doi: 10.1212/WNL.0000000000000497. PMID: 24808023; PMCID: PMC4118500.
- De Michele G, Galatolo D, Lieto M, Maione L, Coccozza S, Santorelli FM, Filla A. New AARS2 Mutations in Two Siblings With Tremor, Downbeat Nystagmus, and Primary Amenorrhea: A Benign Phenotype Without Leukoencephalopathy. *Mov Disord Clin Pract*. 2020 Jul;7:684-687. doi: 10.1002/mdc3.12991. PMID: 32775515; PMCID: PMC7396852.
- 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 Sep;41:2423-2432. doi: 10.1007/s10072-020-04408-3. PMID: 32342324
- De Michele G, Galatolo D, Galosi S, Mignarri A, Silvestri G, Casali C, Leuzzi V, Ricca I, Barghigiani M, Tessa A, Cioffi E, Caputi C, Riso V, Dotti MT, Saccà F, De Michele G, Coccozza S, Filla A, Santorelli FM. Episodic ataxia and severe infantile phenotype in spinocerebellar ataxia type 14: expansion of the phenotype and novel mutations. *J Neurol*. 2022 Mar;269:1476-1484. doi: 10.1007/s00415-021-10712-5. PMID: 34292398; PMCID: PMC8857164
- De Michele G, Lieto M, Galatolo D, Salvatore E, Coccozza S, Barghigiani M, Tessa A, Baldacci J, Pappatà S, Filla A, De Michele G, Santorelli FM. Spinocerebellar ataxia 48 presenting with ataxia associated with cognitive, psychiatric, and extrapyramidal features: A report of two Italian families. *Parkinsonism Relat Disord*. 2019 Aug;65:91-96. doi: 10.1016/j.parkreldis.2019.05.001. Epub 2019 May 14. PMID: 31126790.
- de Silva RN, Vallortigara J, Greenfield J, Hunt B, Giunti P, Hadjivassiliou M. Diagnosis and management of progressive ataxia in adults. *Pract Neurol*. 2019 Jun;19:196-207. doi: 10.1136/practneurol-2018-002096. PMID: 31048364; PMCID: PMC6585307.
- Di Donato I, Gallo A, Ricca I, Fini N, Silvestri G, Gurrieri F, Cirillo M, Cerase A, Natale G, Matrone F, Riso V, Melone MAB, Tessa A, De Michele G, Federico A, Filla A, Dotti MT, Santorelli FM. POLR3A variants in hereditary spastic paraparesis and ataxia: clinical, genetic, and neuroradiological findings in a cohort of Italian patients. *Neurol Sci*. 2022
- Durr A. Autosomal dominant cerebellar ataxias: polyglutamine expansions and beyond. *Lancet Neurol*. 2010 Sep;9:885-94. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70183-6. PMID: 20723845.
- Elert-Dobkowska E, Stepniak I, Krysa W, Ziora-Jakutowicz K, Rakowicz M, Sobanska A, Pilch J, Antczak-Marach D, Zaremba J, Sulek A. Next-generation sequencing study reveals the broader variant spectrum of hereditary spastic paraplegia and related phenotypes. *Neurogenetics*. 2019 Mar;20(1):27-38. doi: 10.1007/s10048-019-00565-6. Epub 2019 Feb 19. PMID: 30778698; PMCID: PMC6411833.
- Filla A, De Michele G, Caruso G, Marconi R, Campanella G. Genetic data and natural history of Friedreich's disease: a study of 80 Italian patients. *J Neurol*. 1990 Oct;237:345-51. doi: 10.1007/BF00315657. PMID: 2277267.
- Fogel BL, Lee H, Deignan JL, Strom SP, Kantarci S, Wang X, Quintero-Rivera F, Vilain E, Grody WW, Perlman S, Geschwind DH, Nelson SF. Exome sequencing in the clinical diagnosis of sporadic or familial cerebellar ataxia. *JAMA Neurol*. 2014 Oct;71:1237-46. doi: 10.1001/jamaneurol.2014.1944. Erratum in: *JAMA Neurol*. 2015 Jan;72:128. PMID: 25133958; PMCID: PMC4324730.

- Galatolo D, De Michele G, Silvestri G, Leuzzi V, Casali C, Musumeci O, Antenora A, Astrea G, Barghigiani M, Battini R, Battisti C, Caputi C, Cioffi E, De Michele G, Dotti MT, Fico T, Fiorillo C, Galosi S, Lieto M, Malandrini A, Melone MAB, Mignarri A, Natale G, Pegoraro E, Petrucci A, Ricca I, Riso V, Rossi S, Rubegni A, Scarlatti A, Tinelli F, Trovato R, Tedeschi G, Tessa A, Filla A, Santorelli FM. NGS in Hereditary Ataxia: When Rare Becomes Frequent. *Int J Mol Sci.* 2021 Aug;22:8490. doi: 10.3390/ijms22168490. PMID: 34445196; PMCID: PMC8395181.
- Gardiner SL, Boogaard MW, Trompet S, de Mutsert R, Rosendaal FR, Gussekloo J, Jukema JW, Roos RAC, Aziz NA. Prevalence of Carriers of Intermediate and Pathological Polyglutamine Disease-Associated Alleles Among Large Population-Based Cohorts. *JAMA Neurol.* 2019 Jun 1;76:650-656. doi: 10.1001/jamaneurol.2019.0423. PMID: 30933216; PMCID: PMC6563569.
- Genis D, Ortega-Cubero S, San Nicolás H, Corral J, Gardenyes J, de Jorge L, López E, Campos B, Lorenzo E, Tonda R, Beltran S, Negre M, Obón M, Beltran B, Fàbregas L, Alemany B, Márquez F, Ramió-Torrentà L, Gich J, Volpini V, Pastor P. Heterozygous *STUB1* mutation causes familial ataxia with cognitive affective syndrome (SCA48). *Neurology.* 2018 Nov 20;91:e1988-e1998. doi: 10.1212/WNL.0000000000006550. PMID: 30381368.
- Gilman S, Wenning GK, Low PA, Brooks DJ, Mathias CJ, Trojanowski JQ, Wood NW, Colosimo C, Dürr A, Fowler CJ, Kaufmann H, Klockgether T, Lees A, Poewe W, Quinn N, Revesz T, Robertson D, Sandroni P, Seppi K, Vidailhet M. Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *Neurology.* 2008 Aug;71:670-6. doi: 10.1212/01.wnl.0000324625.00404.15. PMID: 18725592; PMCID: PMC2676993.
- Ikeda Y, Dick KA, Weatherspoon MR, Gincel D, Armbrust KR, Dalton JC, Stevanin G, Dürr A, Zühlke C, Bürk K, Clark HB, Brice A, Rothstein JD, Schut LJ, Day JW, Ranum LP. Spectrin mutations cause spinocerebellar ataxia type 5. *Nat Genet.* 2006 Feb;38:184-90. doi: 10.1038/ng1728. PMID: 16429157.
- Jayadev S, Bird TD. Hereditary ataxias: overview. *Genet Med.* 2013 Sep;15:673-83. doi: 10.1038/gim.2013.28. PMID: 23538602.
- Kanack AJ, Newsom OJ, Scaglione KM. Most mutations that cause spinocerebellar ataxia autosomal recessive type 16 (SCAR16) destabilize the protein quality-control E3 ligase CHIP. *J Biol Chem.* 2018 Feb 23;293:2735-2743. doi: 10.1074/jbc.RA117.000477. PMID: 29317501; PMCID: PMC5827432.
- Krygier M, Mazurkiewicz-Bełdzińska M. Milestones in genetics of cerebellar ataxias. *Neurogenetics.* 2021 Oct;22:225-234. doi: 10.1007/s10048-021-00656-3. PMID: 34224032; PMCID: PMC8426223.
- Leveille E, Estiar MA, Krohn L, Spiegelman D, Dionne-Laporte A, Dupré N, Trempe JF, Rouleau GA, Gan-Or Z. SPTAN1 variants as a potential cause for autosomal recessive hereditary spastic paraplegia. *J Hum Genet.* 2019 Nov;64:1145-1151. doi: 10.1038/s10038-019-0669-2. PMID: 31515523.
- Lieto M, Riso V, Galatolo D, De Michele G, Rossi S, Barghigiani M, Coccozza S, Pontillo G, Trovato R, Saccà F, Salvatore E, Tessa A, Filla A, Santorelli FM, De Michele G, Silvestri G. The complex phenotype of spinocerebellar ataxia type 48 in eight unrelated Italian families. *Eur J Neurol.* 2020 Mar;27:498-505. doi: 10.1111/ene.14094. PMID: 31571321
- Magri S, Nanetti L, Gellera C, Sarto E, Rizzo E, Mongelli A, Ricci B, Fancellu R, Sambati L, Cortelli P, Brusco A, Bruzzone MG, Mariotti C, Di Bella D, Taroni F. Digenic inheritance of *STUB1* variants and TBP polyglutamine expansions explains the incomplete penetrance of SCA17 and SCA48. *Genet Med.* 2022 Jan;24):29-40. doi: 10.1016/j.gim.2021.08.003. PMID: 34906452.
- Matos PCAAP, Rezende TJR, Schmitt GS, Bonadia LC, Reis F, Martinez ARM, de Lima FD, Bueno MGA, Tomaselli PJ, Cendes F, Pedroso JL, Barsottini OGP, Marques W Jr, França M Jr. Brain Structural Signature of RFC1-Related Disorder. *Mov Disord.* 2021 Nov;36:2634-2641. doi: 10.1002/mds.28711. PMID: 34241918.

- McLaughlin B, Buendia MA, Saborido TP, Palubinsky AM, Stankowski JN, Stanwood GD. Haploinsufficiency of the E3 ubiquitin ligase C-terminus of heat shock cognate 70 interacting protein (CHIP) produces specific behavioral impairments. *PLoS One*. 2012;7(5):e36340. doi: 10.1371/journal.pone.0036340. PMID: 22606257; PMCID: PMC3350526.
- Mengel D, Traschütz A, Reich S, Leyva-Gutiérrez A, Bender F, Hauser S, Haack TB, Synofzik M. A de novo STUB1 variant associated with an early adult-onset multisystemic ataxia phenotype. *J Neurol*. 2021 Oct;268:3845-3851. doi: 10.1007/s00415-021-10524-7. PMID: 33811518; PMCID: PMC8463406..
- Migliaccio AA, Halmagyi GM, McGarvie LA, Cremer PD. Cerebellar ataxia with bilateral vestibulopathy: description of a syndrome and its characteristic clinical sign. *Brain*. 2004 Feb;127:280-93. doi: 10.1093/brain/awh030. PMID: 14607788.
- Minnerop M, Kurzwelly D, Wagner H et al (2017) Hypomorphic mutations in POLR3A are a frequent cause of sporadic and recessive spastic ataxia. *Brain* 140(6):1561–1578 8. Gauquelin L, Tétéreault M, Thiffault I et al (2018) POLR3A variants in hereditary spastic paraplegia and ataxia. *Brain* 141:e111.
- Mol MO, van Rooij JGJ, Brusse E, Verkerk AJMH, Melhem S, den Dunnen WFA, Rizzu P, Cupidi C, van Swieten JC, Donker Kaat L. Clinical and pathologic phenotype of a large family with heterozygous STUB1 mutation. *Neurol Genet*. 2020 Mar 23;6:e417. doi: 10.1212/NXG.0000000000000417. PMID: 32337344; PMCID: PMC7164971.
- Nethisinghe S, Lim WN, Ging H, Zeitlberger A, Abeti R, Pemble S, Sweeney MG, Labrum R, Cervera C, Houlden H, Rosser E, Limousin P, Kennedy A, Lunn MP, Bhatia KP, Wood NW, Hardy J, Polke JM, Veneziano L, Brusco A, Davis MB, Giunti P. Complexity of the Genetics and Clinical Presentation of Spinocerebellar Ataxia 17. *Front Cell Neurosci*. 2018 Nov 23;12:429. doi: 10.3389/fncel.2018.00429. PMID: 30532692; PMCID: PMC6265347.
- Nikolay R, Wiederkehr T, Rist W, Kramer G, Mayer MP, Bukau B. Dimerization of the human E3 ligase CHIP via a coiled-coil domain is essential for its activity. *J Biol Chem*. 2004 Jan;279:2673-8. doi: 10.1074/jbc.M311112200. PMID: 14610072.
- Pakdaman Y, Berland S, Bustad HJ, Erdal S, Thompson BA, James PA, Power KN, Ellingsen S, Krooni M, Berge LI, Sexton A, Bindoff LA, Knappskog PM, Johansson S, Aukrust I. Genetic Dominant Variants in *STUB1*, Segregating in Families with SCA48, Display In Vitro Functional Impairments Indistinctive from Recessive Variants Associated with SCAR16. *Int J Mol Sci*. 2021 May;22:5870. doi: 10.3390/ijms22115870. PMID: 34070858; PMCID: PMC8199271.
- Palvadeau R, Kaya-Güleç ZE, Şimşir G, Vural A, Öztıp-Çakmak Ö, Genç G, Aygün MS, Falay O, Başak AN, Ertan S. Cerebellar cognitive-affective syndrome preceding ataxia associated with complex extrapyramidal features in a Turkish SCA48 family. *Neurogenetics*. 2020 Jan;21:51-58. doi: 10.1007/s10048-019-00595-0. PMID: 31741143.
- Rivière JB, Ramalingam S, Lavastre V, Shekarabi M, Holbert S, Lafontaine J, Srouf M, Merner N, Rochefort D, Hince P, Gaudet R, Mes-Masson AM, Baets J, Houlden H, Brais B, Nicholson GA, Van Esch H, Nafissi S, De Jonghe P, Reilly MM, Timmerman V, Dion PA, Rouleau GA. KIF1A, an axonal transporter of synaptic vesicles, is mutated in hereditary sensory and autonomic neuropathy type 2. *Am J Hum Genet*. 2011 Aug;89:219-30. doi: 10.1016/j.ajhg.2011.06.013. PMID: 21820098; PMCID: PMC3155159.
- Rosser MF, Washburn E, Muchowski PJ, Patterson C, Cyr DM. Chaperone functions of the E3 ubiquitin ligase CHIP. *J Biol Chem*. 2007 Aug;282:22267-77. doi: 10.1074/jbc.M700513200. PMID: 17545168.
- Roux T, Barbier M, Papin M, Davoine CS, Sayah S, Coarelli G, Charles P, Marelli C, Parodi L, Tranchant C, Goizet C, Klebe S, Lohmann E, Van Maldergem L, van Broeckhoven C, Coutelier M, Tesson C, Stevanin G, Duyckaerts C, Brice A, Durr A; SPATAX network. Clinical, neuropathological, and genetic characterization of STUB1 variants in cerebellar ataxias: a frequent cause of

- predominant cognitive impairment. *Genet Med*. 2020 Nov;22:1851-1862. doi: 10.1038/s41436-020-0899-x. PMID: 32713943.
- Schmitz-Hübsch T, du Montcel ST, Baliko L, Berciano J, Boesch S, Depondt C, Giunti P, Globas C, Infante J, Kang JS, Kremer B, Mariotti C, Melegh B, Pandolfo M, Rakowicz M, Ribai P, Rola R, Schöls L, Szymanski S, van de Warrenburg BP, Dürr A, Klockgether T, Fancellu R. Scale for the assessment and rating of ataxia: development of a new clinical scale. *Neurology*. 2006 Jun 13;66(11):1717-20. doi: 10.1212/01.wnl.0000219042.60538.92. PMID: 16769946.
 - Sequeiros J, Seneca S, Martindale J. Consensus and controversies in best practices for molecular genetic testing of spinocerebellar ataxias. *Eur J Hum Genet* 2010;18:1188–1195.
 - Shi CH, Rubel C, Soss SE, Sanchez-Hodge R, Zhang S, Madrigal SC, Ravi S, McDonough H, Page RC, Chazin WJ, Patterson C, Mao CY, Willis MS, Luo HY, Li YS, Stevens DA, Tang MB, Du P, Wang YH, Hu ZW, Xu YM, Schisler JC. Disrupted structure and aberrant function of CHIP mediates the loss of motor and cognitive function in preclinical models of SCAR16. *PLoS Genet*. 2018 Sep 17;14:e1007664. doi: 10.1371/journal.pgen.1007664. PMID: 30222779; PMCID: PMC6160236.
 - Shi CH, Schisler JC, Rubel CE, Tan S, Song B, McDonough H, Xu L, Portbury AL, Mao CY, True C, Wang RH, Wang QZ, Sun SL, Seminara SB, Patterson C, Xu YM. Ataxia and hypogonadism caused by the loss of ubiquitin ligase activity of the U box protein CHIP. *Hum Mol Genet*. 2014 Feb;23:1013-24. doi: 10.1093/hmg/ddt497. PMID: 24113144; PMCID: PMC3900109.
 - Shi Y, Wang J, Li JD, Ren H, Guan W, He M, Yan W, Zhou Y, Hu Z, Zhang J, Xiao J, Su Z, Dai M, Wang J, Jiang H, Guo J, Zhou Y, Zhang F, Li N, Du J, Xu Q, Hu Y, Pan Q, Shen L, Wang G, Xia K, Zhang Z, Tang B. Identification of CHIP as a novel causative gene for autosomal recessive cerebellar ataxia. *PLoS One*. 2013 Dec; 8:e81884. doi: 10.1371/journal.pone.0081884. PMID: 24312598; PMCID: PMC3846781.
 - Shirafuji T, Shimazaki H, Miyagi T, Ueyama T, Adachi N, Tanaka S, Hide I, Saito N, Sakai N. Spinocerebellar ataxia type 14 caused by a nonsense mutation in the PRKCG gene. *Mol Cell Neurosci*. 2019 Jul;98:46-53. doi: 10.1016/j.mcn.2019.05.005. PMID: 31158466.
 - Syrbe S, Harms FL, Parrini E, Montomoli M, Mütze U, Helbig KL, Polster T, Albrecht B, Bernbeck U, van Binsbergen E, Biskup S, Burglen L, Denecke J, Heron B, Heyne HO, Hoffmann GF, Hornemann F, Matsushige T, Matsuura R, Kato M, Korenke GC, Kuechler A, Lämmer C, Merckenschlager A, Mignot C, Ruf S, Nakashima M, Saitsu H, Stamberger H, Pisano T, Tohyama J, Weckhuysen S, Werckx W, Wickert J, Mari F, Verbeek NE, Møller RS, Koeleman B, Matsumoto N, Dobyns WB, Battaglia D, Lemke JR, Kutsche K, Guerrini R. Delineating SPTAN1 associated phenotypes: from isolated epilepsy to encephalopathy with progressive brain atrophy. *Brain*. 2017 Sep 1;140:2322-2336. doi: 10.1093/brain/awx195. PMID: 29050398; PMCID: PMC6248409.
 - Trojano L, Chiacchio L, Grossi D, Pisacreta AI, Calabrese O, Castaldo I, De Michele G, Filla A. Determinants of cognitive disorders in Autosomal Dominant Cerebellar Ataxia type 1. *J Neurol Sci*. 1998 May;157:162-7. doi: 10.1016/s0022-510x(98)00070-7. PMID: 9619640.
 - Vecchia SD, Tessa A, Dosi C, Baldacci J, Pasquariello R, Antenora A, Astrea G, Bassi MT, Battini R, Casali C, Cioffi E, Conti G, De Michele G, Ferrari AR, Filla A, Fiorillo C, Fusco C, Gallone S, Germiniasi C, Guerrini R, Haggiag S, Lopercolo D, Martinuzzi A, Melani F, Mignarri A, Panzeri E, Pini A, Pinto AM, Pochiero F, Primiano G, Procopio E, Renieri A, Romaniello R, Sancricca C, Servidei S, Spagnoli C, Ticci C, Rubegni A, Santorelli FM. Monoallelic KIF1A-related disorders: a multicenter cross sectional study and systematic literature review. *J Neurol*. 2022 Jan;269:437-450. doi: 10.1007/s00415-021-10792-3. PMID: 34487232.
 - Wang X, Wang Q, Tang H, Chen B, Dong X, Niu S, Li S, Shi Y, Shan W, Zhang Z. Novel Alanine-tRNA Synthetase 2 Pathogenic Variants in Leukodystrophies. *Front Neurol*. 2019 Dec 17;10:1321. doi: 10.3389/fneur.2019.01321. PMID: 31920941; PMCID: PMC6928200.

- Warner JP, Barron LH, Goudie D, Kelly K, Dow D, Fitzpatrick DR, Brock DJ. A general method for the detection of large CAG repeat expansions by fluorescent PCR. *J Med Genet.* 1996 Dec;33:1022-6. doi: 10.1136/jmg.33.12.1022. PMID: 9004136; PMCID: PMC1050815.
- Xie F, Chen S, Liu P, Chen X, Luo W. SPTAN1 variants likely cause autosomal recessive complicated hereditary spastic paraplegia. *J Hum Genet.* 2022 Mar;67:165-168. doi: 10.1038/s10038-021-00975-1. PMID: 34526651.