

LINEE DI RICERCA

Studio e trattamento dei tumori del sistema nervoso centrale nel bambino di età inferiore ai tre anni

Studio SIOP tumori a cellule germinali intracranici (GCTs)

Studio di geni coinvolti nell'aggressività del medulloblastoma del bambino

Studio genetico-molecolare dell'ependimoma intracranico e spinale nel bambino molto piccolo

Analisi globale dei gliomi del bambino (studio clinico, neuroradiologico, neurochirurgico, oncologico e molecolare)

Analisi dei geni del PCP pathway nella patogenesi dei Difetti del Tubo Neurale (DTN)

Studio epidemiologico mediante interviste a famiglie di bambini affetti da DTN.

RICERCA

a) ATTIVITA' DI RICERCA del LABORATORIO U.O. NEUROCHIRURGIA
coordinati dalla Dott. Valeria Capra

Personale del Laboratorio: Dott. Valeria Capra, medico
Dott. Patrizia De Marco, biologa
Dott. Elisa Merello, biologa
Dott. Alessandro Raso, biologo
Dott. Samantha Mascelli, biologa

a) ATTIVITA' ASSISTENZIALE ALLE FAMIGLIE: Consulenza Genetica Dr. Valeria Capra

a) ATTIVITA' DI RICERCA

Progetti in corso: DIFETTI DEL TUBO NEURALE



TUMORI CEREBRALI DEL BAMBINO

1) Titolo del progetto: Difetti del Tubo Neurale (DTN): Studio Caso-Controllo su famiglie al fine di identificare possibili fattori di rischio predisponenti.

Difetti del Tubo Neurale (DTN) sono gravi malformazioni congenite che insorgono durante le precoci fasi dello sviluppo embrionale, in seguito ad una imperfetta fusione e differenziazione del tubo neurale e delle strutture ad esso strettamente connesse (cute, osso, meningi). L'anencefalia, l'encefalocele ed il mielomeningocele (detto anche comunemente Spina Bifida) sono le forme più frequenti di DTN. La spina bifida è caratterizzata dall'esposizione, a causa della mancata chiusura degli archi posteriori delle vertebre, del tessuto midollare spinale, delle meningi o di entrambi. La sintomatologia è molto varia e comprende la paralisi degli arti inferiori, l'incontinenza e la deformità dei piedi. I DTN perciò rappresentano una delle maggiori cause di mortalità e morbilità fetoneonatale, oltre che una delle patologie croniche più invalidanti che colpiscono l'infanzia. I DTN sono malformazioni ad eredità multifattoriale, dovute cioè all'interazione di fattori genetici con fattori di natura ambientale (dietetici, razziali e geografici). La loro incidenza nella popolazione italiana è di 1 bambino affetto ogni 1500 nati (periodo 1980-1988) e da ciò risulta che l'Italia è un paese a bassa incidenza. Donne con anamnesi positiva per precedenti gravidanze affette presentano un rischio di ricorrenza dieci volte superiore rispetto alla popolazione generale. Occorre tener presente che circa il 95% dei soggetti nasce da coppie senza precedenti anamnestici. Da studi di tipo epidemiologico è emerso che la supplementazione periconcezionale con acido folico riduce sia l'insorgenza che la ricorrenza di tali malformazioni del 75%. L'assunzione di acido folico infatti è in grado di compensare: a) errori congeniti di attività enzimatiche coinvolte nel metabolismo del folato; b) una sua carenza nella dieta, specialmente per le persone con basso livello socio-

economico e per le persone che non seguono una dieta bilanciata; c) un difetto nel suo assorbimento; d) l'azione di farmaci che interferiscono con il suo metabolismo come l'acido valproico, l'acido retinoico e la fenilidantoina; e) un aumento del fabbisogno, come in caso di gravidanza ed allattamento. L'acido folico è presente, come coenzima, in numerose reazioni metaboliche essenziali, svolgendo un ruolo importante nel metabolismo degli aminoacidi, nella sintesi degli acidi nucleici, nonché nella formazione delle cellule del sangue e di alcuni costituenti del tessuto nervoso. Recentemente, gruppi di ricerca internazionali hanno studiato i geni codificanti per le diverse attività enzimatiche coinvolte nel metabolismo dell'acido folico e hanno identificato in essi delle varianti polimorfiche che sono considerate importanti fattori genetici di rischio per i DTN. Il difetto genetico più comune è rappresentato dalla mutazione C677T del gene *MTHFR* (metilene tetraidrofolato reduttasi) che svolge un ruolo chiave per il metabolismo del folato. L'omozigosità 677T/T per il polimorfismo *MTHFR* C677T, costituisce un importante fattore di rischio per molte popolazioni, tra le quali anche quella italiana, con un incremento del rischio di 1,5 volte in pazienti con il genotipo omozigote mutante 677T/T. Tra i fattori ambientali che possono avere un ruolo nell'insorgenza dei DTN, sia il diabete materno che l'iperglicemia sono tra i fattori di rischio più importanti. Inoltre, l'obesità materna può conferire un rischio da 1,5 a 3 volte superiore rispetto a donne con massa corporea nella norma. Infine, ci sono forti evidenze sperimentali a favore di un ruolo critico svolto dalla ipertermia materna nella patogenesi dei DTN.

L'obiettivo dello studio è l'identificazione di fattori di rischio non genetici (stile di vita, assunzione di farmaci, tipo di alimentazione, malattie acute e croniche durante la gravidanza) e fattori genetici predisponenti (familiarità o aggregazione di certi tipi di malattie nel genitizio materno o paterno) per l'insorgenza dei DTN, mediante interviste fatte ai genitori dei pazienti con DTN che affluiscono presso il Day Hospital della U.O. di Neurochirurgia e genitori di controllo arruolati presso U.O. di Ostetricia e Ginecologia dell'Istituto G. Gaslini. Lo scopo ultimo di questo studio è quello di individuare, seppure in maniera preliminare, qualche fattore che permetta di comprendere meglio la patogenesi dei DTN. Tale fattore dovrà essere poi confermato in maniera più specifica da ulteriori studi caso-controllo, al fine ultimo di poter migliorare la consulenza genetica alle famiglie ed elaborare strategie di prevenzione mirate. Questo è uno studio caso-controllo, prospettico, "hospital based", basato su interviste/questionari in cui gli intervistati (genitori di pazienti affetti da DTN e genitori di bambini nati sani) devono rispondere in merito a: a) stato di salute personale; b) stile di vita personale; c) eventuali malattie, malformazioni, cause di morte di altri figli, dei parenti di secondo e terzo grado del paziente. Inoltre le madri sono chiamate a rispondere su eventuali disturbi e comportamenti a rischio della gravidanza in oggetto. Le donne di controllo devono fornire le informazioni sulla loro ultima gravidanza (in quanto si suppone che possano meglio ricordare). Il rapporto fra casi e controlli è di 1:1. Casistica è costituita dalle famiglie dei pazienti con DTN che partecipano allo studio sono reclutate fra quelle che affluiscono presso la U.O. di Neurochirurgia per il trattamento neurochirurgico dei loro bambini o per le visite ambulatoriali di controllo. Un piccolo numero di genitori costituiscono coppie che hanno richiesto una consulenza genetica dopo avere deciso di interrompere la gravidanza, in seguito a diagnosi prenatale di DTN. Ci prefiggiamo di reclutare 300 genitori, sia padri che madri, di pazienti con DTN e 300 genitori di controllo di bambini che non presentavano alcun tipo di malformazione congenita. I genitori di controllo sono reclutati fra le coppie afferenti alla U.O. di Ostetricia e Ginecologia dell'Istituto G. Gaslini.

2) Titolo del progetto: Studio multicentrico dei geni della via di segnale della Polarità Cellulare Planare (PCP) nella patogenesi dei DTN

Di recente l'equipe dell'U.O. Neurochirurgia del Gaslini, in collaborazione con un gruppo di ricercatori canadesi dell'Università McGill di Montreal, ha identificato il gene *VANGL1*, quale primo gene responsabile della spina bifida. Lo studio, pubblicato sulla più autorevole e prestigiosa rivista medica internazionale, *The New England Journal of Medicine* (Kibar et al., *N Engl J Med.* 2007 Apr 5;356(14):1432-7). I ricercatori hanno scoperto che mutazioni a carico del gene *VANGL1* compromettono un processo embrionale che è alla base della corretta formazione del sistema nervoso centrale: la corretta organizzazione spaziale delle cellule embrionali che si intercalano l'una sull'altra lungo la linea mediana dell'embrione, permette infatti al primordio del sistema nervoso centrale di trasformarsi da una struttura piatta, ad una struttura cilindrica ed allungata (cioè di prendere la forma corretta propria del Sistema Nervoso Centrale definitivo). Questo meccanismo, che si suppone governato da alcune proteine fondamentali, tra cui *VANGL1*, ed altre accessorie, era da tempo conosciuto in vertebrati quali la rana ed il topo; con questa scoperta i ricercatori italiani e canadesi hanno confermato che tale processo risulta fondamentale anche per la corretta formazione del Sistema Nervoso Centrale nell'uomo. In questo studio sono state trovate tre mutazioni missenso del gene *VANGL1* (V239I, R274Q, e M328T) a carico di residui aminoacidici altamente conservati in tutte le sequenze omologhe di *VANGL1* nelle diverse specie animali. Tali mutazioni non erano presenti in una serie di 134 controlli sani, a dimostrazione che queste mutazioni non sono dei rari polimorfismi. I pazienti che presentavano le mutazioni V239I e R274Q avevano una ricorrenza della patologia nella loro famiglia (erano perciò dei casi familiari), a differenza del paziente con la mutazione M328T che rappresentava un caso sporadico della patologia. Alla luce di questi risultati, è importante proseguire questo filone di ricerca studiando nell'uomo tutte le altre proteine che, insieme a *VANGL1*, collaborano, durante lo sviluppo, a determinare l'orientamento corretto delle cellule embrionali nervose nello spazio in modo da identificare altri geni che svolgano un ruolo chiave nella patogenesi dei DTN. Nella prosecuzione del progetto ci proponiamo di estendere l'analisi in un altro gruppo di pazienti con DTN al fine di identificare la frequenza delle mutazioni del gene *VANGL1* nella patogenesi di queste malformazioni. Inoltre ci proponiamo di identificare nuovi geni malattia che predispongono all'insorgenza dei DTN nell'uomo, mediante lo studio di geni che controllano la via della Polarità Cellulare Planare (PCP) durante il processo di chiusura del tubo neurale. Questa via di segnale è composta da numerose molecole regolatrici, alcune proteine fondamentali ed altre accessorie, i cui omologhi sono implicati nel topo e nei vertebrati inferiori nel processo di chiusura e fusione del sistema nervoso centrale. La recente identificazione in tre pazienti di mutazioni a carico del gene *VANGL1*, un gene di questa via di segnale che trasmette all'interno della cellula un segnale che la modifica rendendola capace di muoversi in maniera ordinata nello spazio, supporta fortemente l'ipotesi che le molecole di questa via siano implicate nei meccanismi molecolari che governano la formazione e la chiusura del tubo neurale anche nell'uomo.

1) analisi mutazionale ovvero la ricerca di mutazioni di 8 geni coinvolti nella via della PCP in una serie di 360 pazienti affetti da varie forme di DTN (spina bifida aperta, spina bifida occulta, encefalocele e regressione caudale) reclutati presso il centro Spina Bifida della U.O. di Neurochirurgia dell'Istituto Gaslini. Questi geni includono: *Dishevelled (DVL1 e DVL2)*, *Frizzled (FZ3 e FZ6)*, *CELSR1*, *Prickle (PK1)*, *Diego (DGO)*, *Protein Tyrosine kinase 7 (PTK7)*. Le mutazioni identificate saranno ricercate anche nel DNA di una serie di 300 controlli sani, al fine di escludere che tali mutazioni rappresentino dei polimorfismi. 2) messa a punto di saggi per valutare *in vitro* l'effetto delle mutazioni umane sulla capacità delle proteine della via della PCP di interagire tra di loro; infatti, le interazioni proteina-proteina sono fondamentali per il corretto funzionamento di questa via di segnale. 3) messa a punto di saggi specifici per testare l'effetto delle mutazioni umane identificate *in vivo*, su embrioni di

pesce *Zebrafish* (o *Danio rerio*), che rappresenta un ottimo modello animale per lo studio dei meccanismi molecolari e cellulari che avvengono durante la gastrulazione e la chiusura del tubo neurale. Questo progetto verrà svolto in collaborazione con Philippe Gros dell'Università Mc Gill di Montreal, Canada e Zoha Kibar, CHU, Montreal.

3) Titolo del progetto: Studio multicentrico del gene *PCSK5* in pazienti con malformazioni multisistemiche quali la VATER/VACTERL, la Sindrome da Regressione Caudale (SRC) e la Sindrome di Currarino (SC).

La Sindrome da Regressione Caudale (SRC) detta anche displasia caudale o disgenesia caudale, comprende uno spettro di malformazioni variamente combinate che includono: diversi gradi di anomalie sacro-coccigee (Pang, 1993), anomalie ano-rettali, anomalie genito-urinarie, agenesia renale mono- o bi-laterale, anomalie degli arti inferiori, con fusione degli arti nei casi più gravi (sirenomelia), malformazione delle ali iliache; talvolta, possono essere presenti mielomeningocele con lipoma e/o midollo ancorato, ipoplasia polmonare e malformazioni cardio-vascolari (Cama et al., 1996a). La diagnosi di SRC viene fatta nei primi anni di vita ed, in caso di segni neurologici, i pazienti devono essere sottoposti ad intervento neurochirurgico (Cama et al., 1996b). L'incidenza della SRC è di 1/7500 nati, ma alcuni autori riportano un'incidenza di 1/200-1/1000 (Kallen et al., 1974). Tra i fattori di rischio della SRC esiste una documentata associazione con il diabete mellito materno (Passarge and Lenz, 1966; Reece et al., 1996), che comporta per il nascituro un rischio relativo dell'1%. Altri fattori di rischio sono alcune sostanze teratogene, problemi vascolari e fattori genetici. Studi su animali hanno dimostrato che un fenotipo simile a quello della SRC può essere indotto da sostanze quali l'acido retinoico, il litio, il cadmio, la sulfamide, i solventi organici, dalla deficienza di vitamina A e dall'ipertermia (Padmanbhan, 1998; Rojansky et al., 2002; Ross et al., 2000). Due nostri recenti studi hanno indagato il ruolo di due geni, *HLXB9* (un gene omeotico) e *CYP26A1* (un gene coinvolto nel metabolismo dell'acido retinoico) nella patogenesi della SRC, senza individuare alcuna associazione significativa (Merello et al., 2006; De Marco et al., 2006). Di recente, il nostro gruppo ha identificato in un caso familiare di SRC una mutazione (V239I) a carico di un gene, *VANGL1*, che fa parte della via di segnale della polarità planare cellulare (PCP). Tale mutazione, che riguardava un aminoacido altamente conservato tra le specie, aboliva il legame della proteina *VANGL1* con gli altri membri della via di segnale di cui fa parte, indicando che questo gene costituisce un importante fattore di rischio per questa grave malformazione congenita (Kibar et al., 2007). La Sindrome di Currarino (SC) (OMIM 176450) è una forma particolare di CRS. Essa è caratterizzata da una triade clinica costituita da agenesia parziale del sacro (agenesia di tipo IV), massa presacrale e malformazione ano-rettale (Currarino, 1981). La massa presacrale, ben visibile mediante risonanza magnetica, può essere un meningocele anteriore, una ciste enterica o un teratoma presacrale. Altri sintomi associati sono costipazione, incontinenza urinaria. In certi casi l'associazione dei tre segni clinici è incompleta, anche se la presenza dell'emisacro è una caratteristica costante. Si tratta di un complesso sindromico in cui le tre anomalie che la caratterizzano sono riconducibili ad un difetto embrionale comune: secondo Currarino, il meccanismo patogenetico responsabile della genesi del complesso malformativo consisterebbe in un difetto o anomalia notocordale negli stadi precoci dell'embriogenesi. E' verosimile, infatti, che un anomalo o incompleto sviluppo della notocorda nelle porzioni più caudali dell'embrione possa determinare le anomalie riscontrate nella triade di Currarino. Questa malformazione si presenta sia in forma sporadica che a ricorrenza familiare con trasmissione autosomica dominante a penetranza incompleta (Lynch et al., 2000). Il gene responsabile è stato mappato su 7q36 (Lynch et al., 1995; Seri et al., 1999). Mediante sequenziamento dei geni compresi nell'intervallo critico di pazienti con SC in tre studi indipendenti, sono state trovate mutazioni del gene *HLXB9* sia in casi sporadici che in casi familiari dimostrando il coinvolgimento di questo gene nella patogenesi della SC. Questo gene codifica per una proteina a localizzazione nucleare contenente un dominio homeobox, che è

espressa precocemente durante lo sviluppo embrionale a livello della regione ventrale dello midollo spinale, nel faringe, esofago, stomaco e pancreas. Tutte le mutazioni identificate, missenso, non-senso, "frameshift" e delezioni dell'intero gene, rappresentano mutazioni con perdita di funzione (Scherer et al., 2004; Belloni et al., 2000). La sindrome di VATER (OMIM [192350](#)) è un acronimo che indica l'associazione di malformazioni vertebrali, atresia anale, fistola tracheoesofagea e atresia esofagea e displasia radiale (Quan and Smith, 1973). E' stata descritta per la prima volta nel 1973 e rappresenta un'anomalia dello sviluppo del mesoderma (Rittler et al., 1996). Tutti i casi riportati sono sporadici, anche se è stata osservata una maggiore frequenza tra i figli di madri diabetiche (Khoury et al., 1983; McMullen et al., 1996). La sindrome di VACTERL (con lo stesso codice OMIM [192350](#)), include anche la presenza di malformazioni cardiache, anomalie renali (atresia dell'uretra, idronefrosi) e degli arti (esadattilia, ipoplasia omerale, aplasia radiale). Sono stati descritti in letteratura casi familiari di VACTERL con idrocefalo per i quali si ipotizzava una trasmissione X-linked (Froster et al., 1996). Si parla di VACTERL anche in presenza di solo 3 delle diverse anomalie. Il difetto più frequente è l'associazione della fistola tracheoesofagea con malformazioni dell'ano e delle vertebre. In un paziente con VACTERL è stata trovata una mutazione nel DNA mitocondriale codificante per una subunità del complesso I della catena respiratoria mitocondriale (Damian et al., 1996). Esistono alcuni modelli animali che presentano segni clinici, anche se non tutti, tipici della VACTERL (Kim et al., 2001). Il topo *Shh*^{-/-} presenta oltre a difetti della trachea e dell'esofago, assenza della colonna vertebrale, anomalie del cuore, del rene e degli arti. Il topo *Gli2*^{-/-} ha assenza dei corpi vertebrali, ano imperforato, ipoplasia degli arti, ma non presenta anomalie renali e cardiache. I topi *Gli3*^{-/-} hanno stenosi anale, polidattilia ma non presentano anomalie renali, cardiache o tracheo-esofagee (Mo et al., 1997). Infine, un modello animale per le malformazioni tracheoesofagee è rappresentato dal topo trattato con adriamicina che presenta atresia esofagea nel 15.6% dei feti, agenesia della trachea nel 3.1% dei feti e presenza di un setto tra l'esofago e la laringo-trachea nel 10.4% dei casi (Dawrant et al., 2007). Lo screening di topi mutanti chimicamente indotti mediante trattamento con un agente mutagenizzante quale l'etil-nitroso-urea (ENU) è utile per l'identificazione di modelli animali nello studio di malattie umane (phenotype-driven genetics) (Russell et al., 1979). Le mutazioni indotte dal trattamento con ENU sono mutazioni puntiformi o piccole lesioni intrageniche e risultano, per lo più, in alleli ipomorfi o con perdita di funzione (Popp et al. 1983). Al fine di identificare malformazioni embrionali recessive durante le fasi tardive di sviluppo embrionale (15 giorni d.p.c.), presso il Wellcome Trust Centre for Human Genetics di Oxford, è stato messo a punto uno screening tri-generazionale che prevedeva il trattamento di topi maschio mediante iniezioni intraperitoneali con ENU; tali topi erano poi incrociati con femmine per produrre la progenie F1 che, a sua volta, veniva incrociata con femmine F2 eterozigoti, al fine di ottenere omozigoti mutanti recessivi, F3. Uno di questi topi mutanti presentava esternamente assenza della coda, arti inferiori molto corti ed onfalocela. L'ulteriore caratterizzazione di questo topo mutante presso il laboratorio di Shoumo Bhattacharya, veniva fatta mediante Risonanza Magnetica (RM) ad alta risoluzione, in una singola corsa overnight, di 32 embrioni mutanti. Questa tecnica di imaging ad alta definizione permette di identificare rapidamente malformazioni viscerali non sospettate (con risoluzione inferiore ai 20 micron, che è il limite della RM convenzionale) (Herron et al., 2002). La caratterizzazione fenotipica del topo sembra avere segni clinici della Sindrome da Regressione Caudale, della Sindrome di VATER e della Sindrome di Currarino è ora in corso. Stiamo analizzando i pazienti affetti da queste tre sindromi al fine di identificare se il gene mutato nel topo ha un ruolo fondamentale nella patogenesi di queste malformazioni del bambino. Lo studio prevederà l'analisi mutazionale dell'intero gene che comprende di tutti gli esoni e la messa a punto di saggi per valutare *in vitro* l'effetto delle mutazioni umane. Studio genetico multicentrico effettuato su casi di italiani di Sindrome da Regressione Caudale, Sindrome di Currarino e Sindrome di Vater. I pazienti saranno reclutati da parte del laboratorio della U.O. di Neurochirurgia dell'Istituto G. Gaslini, che si occuperà anche di estrarre il DNA a partire dai prelievi di sangue venoso. Tutta la rimanente parte sperimentale, ovvero l'analisi

mutazionale e gli studi funzionali *in vitro*, saranno invece svolti presso il Dipartimento di Medicina Cardiovascolare, dell'Università di Oxford da Shoumo Bhattacharya, dove i DNA saranno spediti.

La U.O. di Neurochirurgia recluta regolarmente pazienti affetti dalle tre sindromi per il trattamento chirurgico delle complicanze a carico del midollo. Pensiamo di utilizzare per lo studio in oggetto sia i pazienti che si presentano in day hospital per i controlli di routine che i nuovi casi reclutati entro un anno dall'inizio dello studio. Inoltre solo per i casi con sospetta Sindrome di Currarino, saranno inclusi pazienti che sono stati mandati al laboratorio della U.O. di Neurochirurgia per la diagnosi molecolare del gene *HLXB9*. Infatti, la U.O. di Neurochirurgia è da qualche anno centro di riferimento italiano per la diagnosi molecolare della Sindrome di Currarino e viene contattata per questo servizio mediante il sito Orphanet (<http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/home>). I pazienti risultati negativi all'analisi di questo gene, saranno ricontattati per essere inclusi in questo studio. La partecipazione è ovviamente vincolata dalla sottoscrizione dell'apposito consenso informato. Per escludere che le mutazioni identificate nelle famiglie rappresentino dei polimorfismi, saranno testate anche in un gruppo di DNA di individui controllo già disponibili e raccolti in modo anonimo, usando i campioni ematici di scarto dei laboratori Centrali e del Servizio Trasfusionale dell'istituto G. Gaslini. Speriamo di reclutare almeno 40 casi di Sindrome da Regressione Caudale, che è la patologia più frequente delle tre, 10 casi di Sindrome di Currarino e 5 casi di VACTERL.

4) Titolo del progetto: Progetto Regionale AIRC 2005: Identification of genes related to aggressiveness and poor-response in CNS tumors and leukemia in infancy.

Il medulloblastoma costituisce il 20% di tutti i tumori cerebrali primitivi pediatrici (Parker et al., 1999). Sebbene l'avanzamento nel trattamento chirurgico, radioterapico e chemioterapico hanno determinato un'aumento della sopravvivenza a cinque anni a circa il 70% (Parker et al., 1999, 2003), l'identificazione del coinvolgimento di signalling pathways potrà favorire l'utilizzo di terapie innovative e più specifiche. Recenti studi hanno permesso di identificare che l'aggressività tumorale può dipendere da diversi meccanismi, quali mutazioni e perdita di eterozigosità, causando perdita del controllo della proliferazione cellulare (MacDonald et al., 2003) o da meccanismi di silenziamento epigenetico di diversi geni che possono indurre la formazione del medulloblastoma, quali ad esempio il gene *DKK1* che appartiene al Wnt pathway (Vibhakar et al., 2007).

In collaborazione con GianPaolo Tonini (CBA, Genova) e su una casistica di 21 medulloblastomi classici reclutati presso l'IGG di Genova (in collaborazione con tra la U.O. Neurochirurgia, MD di NeuroOncologia, Dipartimento di Emato-Oncologia Pediatrica e U.O. Anatomia Patologica) ed in 8 casi forniti dal CEINGE biotecnologie avanzate di Napoli (Prof. A. Iolascon) è stata fatta un'analisi mediante l'ibridazione genomica comparativa (CGH) per individuare le aberrazioni cromosomiche sbilanciate ricorrenti. Tale indagine ha permesso di identificare che l'anomalia cromosomica più frequente è risultata essere la presenza di più copie del braccio lungo del cromosoma 17 (20 casi). La delezione del braccio corto del cromosoma 17 era presente in 12 casi. La presenza di più copie del braccio lungo del cromosoma 17 era associata con la delezione 17p in 11 casi suggerendo la presenza di un isocromosoma per le braccia lunghe del cromosoma 17 i(17q). È stata eseguita l'analisi mediante FISH interfascica, con sonde specifiche per le braccia p- e q- del cromosoma 17 per meglio definire i punti di rottura dell'i(17q) in particolare i punti di rottura che hanno dato origine al cromosoma anomalo erano in 17p11.2 o in 17p13.3. Probabilmente sono numerosi i meccanismi che sono alla base della delezione 17p nel medulloblastoma quali ad esempio: delezioni terminali, possibili rotture dell'i(17q), traslocazioni sbilanciate tra due cromosomi 17 (formazione di un i(17q) apparente), e ricombinazione tra cromosomi omologhi. Sono stati raggruppati gli sbilanciamenti genomici e sono state definite le regioni

minime di delezione, come riportato dall'analisi della CGH. Per meglio mappare le regioni genomiche 8p22-23 e 10q25-26, sono stati selezionati dei marcatori microsatelliti per eseguire l'analisi mediante LOH. L'analisi delle LOH verrà effettuata nei medulloblastomi con metodica di PCR-fluorescente utilizzando markers per microsatelliti e sequenziatore automatico di DNA. Tale metodica consente una rapida e precisa quantificazione dei prodotti di amplificazione e quindi una obiettiva e riproducibile determinazione delle LOH. I marcatori utilizzati sono localizzati nelle regioni 8p22-23 e 10q25-26 e sono utilizzati per studi mediante LOH su 17 casi di medulloblastoma, che costituiscono solo la porzione dei casi della Banca Tumori in cui è disponibile sia il sangue periferico che il tumore d'origine al fine di restringere l'intervallo minimo di delezione per guidarci all'identificazione di geni biologicamente significativi coinvolti nell'insorgenza del medulloblastoma. In particolare nel locus 8p23.1 sono stati scelti due geni che potrebbero essere coinvolti nella patogenesi del medulloblastoma, il gene MCPH1 (Chaplet M, et al., 2006) ed il gene ANGPT2 (Cao Y et al., 2007), mentre nell'intervallo 10q25.3-q26.3 sono stati identificati come geni candidati il gene CASP-7 (Kuwahara D et al., 2000), il gene TXNL2 (Brynczka C et al., 2007) e il gene FGFR2 (Zhu X et al. 2007). E' in corso l'analisi mediante PCR quantitativa al fine di ricercare alterazione dell'espressione di questi geni sopraelencati nella nostra casistica di medulloblastomi classici al fine di correlarli alla progressione o alla invasione tumorale.

5) Titolo del progetto: Progetto Regionale AIRC 2004: Comprehensive diagnosis and treatment for intracranial pediatric Ependymoma.

Lo studio si basa su una casistica di pazienti affetti da ependimoma reclutati dalla U.O. Neurochirurgia e dal MD Neuro-Oncologia nel periodo 1990-2003 in collaborazione con U.O. Anatomia Patologica e la U.O. Neuroradiologia. I casi reclutati erano 27 di cui 11 erano sotto i 3 anni d'età e 16 erano più grandi, tra i quali 4 avevano sede spinale. Il trattamento era applicato secondo protocolli istituzionali ed il protocollo dello studio AIEOP. Le informazioni genetiche sulle famiglie dei bambini affetti erano raccolte mediante raccolta della storia familiare e revisionate allo scopo di individuare sindromi genetiche specifiche. Tale indagine clinica è stata fatta allo scopo di fornire informazioni specifiche ed approfondite utili per i successivi studi molecolari. I risultati di un primo studio sono stati pubblicati su un lavoro (Garrè ML et al., 2007). E' in costruzione un database nazionale per i casi di ependimoma del bambino molto piccolo, siamo in attesa di completare i dati missing e di collezionare i casi reclutati dai centri AIEOP in Italia. E' in corso la costruzione un database più specifico sugli ependimomi spinali. Dopo una revisione istopatologica eseguita dal Dott.Nozza sono stati utilizzati 21 casi per le successive indagini citogenetico-molecolari. Il DNA genomico estratto dai tumori è stato utilizzato per analisi mediante CGH al fine di determinare i più frequenti riarrangiamenti cromosomici. Sono stati identificati i più comuni riarrangiamenti e sono oggetto di una pubblicazione ora sottomessa (Pezzolo et al., 2007). Sui nuovi casi di ependimoma reclutati presso la nostra U.O., piccoli frammenti tumorali isolati in sede chirurgica e selezionati dall'anato-patologo, sono messi in coltura al fine di stabilizzare a medio e lungo termine linee cellulari stabili. Tali linee sono successivamente analizzate con marcatori per caratterizzare le cellule dal punto di vista immunoistochimico. L'RNA estratto da un gruppo di 14 ependimomi è successivamente utilizzato per studi di espressione. In particolare l'RNA estratto è amplificato a cRNA ed ibridizzato su i GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affimetrix) al fine di ottenere una comprensiva espressione genica su un singolo array di più di 47,000 trascritti e varianti, inclusi 38,500 geni ben caratterizzati. Tale indagine è ora in corso. La successiva analisi mediante software e analisi bioinformatica ci permetterà di identificare alterata espressione in un gruppo di geni. I dati saranno analizzati mediante RT-PCR and Real Time PCR per verificare la differenziale espressione genica. Tale progetto è in collaborazione con M.Massimino (Dep.t Ped.Oncology, Istituto Nazionale Tumori, Milan, Italy).

6) Titolo del progetto: Global studies on brain tumors, Healthy-E-Child- Progetto collaborativo finanziato dalla EU Community.

Il progetto rappresenta un progetto globale e comprensivo sullo studio dei gliomi del bambino eseguito da un team multidisciplinare composto di neuroradiologi, neurochirurghi, neuropatologi, neuro-oncologi, geneticisti e di altri subspecialisti allo scopo di integrare le informazioni cliniche, di immagini, patologiche e genetiche e di incorporarle in un "support decision system" utile al fine di fornire specifici algoritmi utili ai pediatri per identificare e appropriatamente approcciare bambini affetti da gliomi. Il progetto è svolto con l'utilizzo della tecnologia "WEB based".

I gliomi sono classificati secondo l'istologia (tipo di tumore e malignità), la sede e la diffusione. Tali caratteristiche sono molto importanti e determinano il diverso trattamento e la prognosi. Gli studi immunoistochimici, citogenetici e di biologia molecolare e gli studi dell'attività mitotica sono utilizzati per la diagnosi tumorale e la classificazione. L'età di insorgenza del tumore, la presenza di sindromi genetiche o la presenza di metastasi sono ulteriori fattori che determinano la scelta terapeutica. I gliomi del bambino sono classificati secondo la recente classificazione della World Health Organization.

Il progetto rappresenta uno studio globale sui gliomi nelle diverse sedi del CNS trattati presso l'Istituto G.Gaslini dal 1990 ad oggi con trattamento multimodale con uniforme diagnosi, trattamento chirurgico e oncologico da un team multidisciplinare. Lo studio clinico e neuroradiologico è retrospettivo per i casi reclutati dal 1990 al 2005 e dei quali è disponibile materiale tumorale criopreservato, mentre per i casi reclutati dopo giugno 2006 lo studio è prospettico. Sono stati reclutati un totale di 108 casi nel gruppo dei pazienti diagnosticati dal 1990 al 2005 e si pensa di poter reclutare altri 25-30 casi fino alla fine dello studio. I casi sono quindi stati divisi secondo la sede, il tipo istologico e l'età alla diagnosi. I nostri sforzi genetici sono diretti all'identificazione di geni chiave che permettano il disegno degli eventi sequenziali che hanno indotto la trasformazione neoplastica e la progressione. In questo progetto stiamo esaminando il profilo di espressione globale di 47.000 geni utilizzando la tecnologia della Affymetrix oligonucleotide-based microarray GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affimetrix) su 108 gliomi pediatrici selezionati dalla Bio-Banca Neuro-Oncologica dell'IGG e così suddivisa:

√ 73 astrocitomi a basso grado, specificamente astrocitomi pilocitici (WHO grade I) localizzati in tutte le sedi: maggiormente cervelletto, tronco encefalico, emisferi, 3° ventricolo/vie ottiche, midollo spinale.

√ 35 gliomi infiltranti, WHO grades II-IV e composti da oligodendrogliomi, ganglioglioma, astrocitoma ad alto grado e pochi casi miscelanei. Pochi casi sono associati a sindromi specifiche (Sclerosi Tuberosa, NF1, sindrome di Turcot e sindrome di Li-Fraumeni) e non sono presenti casi metastatici. L'analisi degli astrocitomi pilocitici mediante microarray è svolta utilizzandoli come riferimento verso i quali paragonare il profilo trascrizionale dei gliomi infiltranti e maligni con bassa prognosi. I dati di espressione saranno confermati mediante real-time PCR quantitativa e a seconda dei dati ottenuti il profilo di espressione sarà validato su un gruppo indipendente di gliomi WHO grades I-IV. Utilizzando questo approccio vorremo identificare geni candidati il cui livello trascrizionale sia correlato con il comportamento maligno e i dati clinici dei gliomi pediatrici.

In aggiunta saranno analizzati i seguenti geni mediante ricerca di mutazioni sul DNA tumorale o mediante LOH:

NF1 (determinazione dell'LOH negli astrocitomi pilocitici)

PTEN (Analisi di mutazioni dell'esone 5 e successivamente degli altri esoni, nei gliomi di grado III/IV)

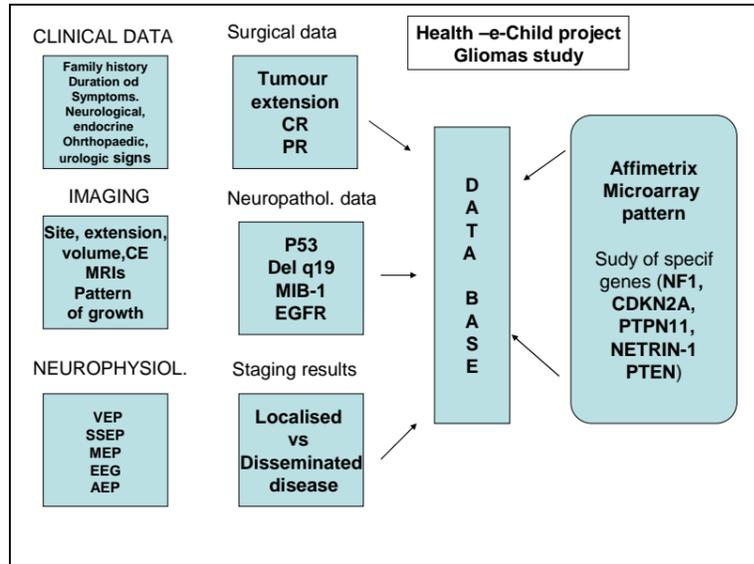
CDKN2A (Analisi di mutazioni nei gliomi di grado III/IV)

PTPN11 (Analisi di mutazioni dell'esone 4 e successivamente negli altri esoni in tutti i gliomi e oligodendroglioma)

Netrin-1 (Analisi di mutazioni nei gliomi a basso grado).

Lo scopo è di definire il ruolo di specifici geni nella gliomagenesi del bambino e correlarla con il profilo di espressione, la presentazione clinica e la risposta al trattamento.

Rappresentazione schematica dello studio:



ATTIVITA' ASSISTENZIALE ALLE FAMIGLIE

Consulenza Genetica

La Dott. Valeria Capra svolge inoltre attività di consulenza genetica per la U.O. Neurochirurgia per le patologie di interesse chirurgico al fine di meglio definire la diagnosi clinico-molecolare, fornire dei rischi di ricorrenza della malattia e fornire strumenti di prevenzione primaria.

In particolare svolge consulenze per:

- Difetti del Tubo Neurale (Spina Bifida ed altre varianti) e sindromi ad essi correlate
- Craniostenosi e sindromi con associata malformazione cranio-facciale
- Cavernomi cerebrali
- Sindromi tumorali familiari in cui si sia presentato un tumore cerebrale nel bambino
- Facomatosi

La Dott.ssa Valeria Capra, riceve il giovedì e il venerdì dalle 15 presso il Day-Hospital di Neurochirurgia.

Per appuntamenti per consulenze genetiche ambulatoriali chiamare la segreteria al n° telefonico 010-5636604 il giovedì ed il venerdì dalle 13,30 alle 14,30.

Diagnosi molecolare

A) Diagnosi e prevenzione dei Difetti del Tubo Neurale (DTN)

I DTN sono gravi malformazioni congenite che insorgono durante le precoci fasi dello sviluppo embrionale dovute ad una imperfetta fusione e differenziazione del tubo neurale e delle strutture ad esso strettamente connesse (cute, osso, meningi). L'anencefalia, l'encefalocele ed il mielomeningocele (detto anche comunemente Spina Bifida) sono le forme più frequenti di DTN. L'anencefalia è letale, mentre le altre forme sono compatibili con la vita, pur comportando gravi disabilità motorie e funzionali a carico dei diversi organi e apparati. I DTN perciò rappresentano una delle maggiori cause di mortalità e morbilità fetoneonatale, oltre che una delle patologie croniche più invalidanti che colpiscono l'infanzia. I costi che sostiene il Sistema Sanitario nazionale per il trattamento neurochirurgico di tali malformazioni e per la successiva assistenza clinica è molto elevato. La loro prevenzione è affidata fino ad ora esclusivamente alle tecniche ultrasonografica prenatale e sullo screening dei livelli di α -fetoproteina nel siero materno. I DTN sono malformazioni ad eredità multifattoriale dovute cioè all'interazione di fattori genetici con fattori di natura ambientale (dietetici, razziali e geografici). La loro incidenza nella popolazione italiana è di 5 bambini affetti ogni 10000 nati (periodo 1980-1988) e da ciò risulta che l'Italia è un paese a bassa incidenza. Da studi di tipo epidemiologico è emerso che la supplementazione periconcezionale con acido folico riduce sia l'insorgenza che la ricorrenza di tali malformazioni del 70% 2-3. L'assunzione di acido folico infatti è in grado di compensare: a) errori congeniti di attività enzimatiche coinvolte nel metabolismo del folato; b) una sua carenza nella dieta, specialmente per quelle persone con basso livello socio-economico; c) un difetto nel suo assorbimento; d) l'azione di farmaci che interferiscono con il suo metabolismo come l'acido valproico, l'acido retinoico e la fenilidantoina. Una moderata iperomocistinemia e ridotti livelli plasmatici di acido folico è stata riscontrata nelle madri di bambini affetti; ciò ha fatto pensare che un deficit dietetico

e/o di tipo metabolico di folato siano effettivamente la causa della maggior parte di questi difetti. Il metabolismo del folato e quello ad esso strettamente connesso dell'omocisteina coinvolge una serie complessa di trasformazioni metaboliche in cui sono coinvolti diverse molecole trasportatrici e molteplici attività enzimatiche. Recentemente diversi gruppi di ricerca hanno studiato i geni codificanti per le diverse attività enzimatiche coinvolte nel metabolismo dell'omocisteina e dell'acido folico e hanno identificato delle varianti polimorfiche in essi che sono considerate tuttora importanti fattori genetici di rischio per i DTN. Per esempio, la MTHFR (metilene-tetraidrofolato reduttasi), svolge un ruolo chiave per il metabolismo del folato e dell'Hcy. L'omozigotità per un comune polimorfismo in questo gene, la C677T, costituirebbe un importante fattore di rischio per molte popolazioni 4-8, tra le quali anche quella italiana, con un incremento del rischio di 1,5 volte in pazienti con il genotipo T/T 9. Attualmente, altri fattori di rischio genetici sono stati identificati; tra essi, la combinata eterozigotità per la mutazione A1298C e C677T della MTHFR, l'inserzione di 68 bp nel gene CBS (cistationina beta sintasi), il polimorfismo A66G della MTRR (metionina sintasi reduttasi), e più recentemente la variante A2756G della MS (metionina sintasi), la A80G del gene RFC1 (reduced folate carrier 1) e il polimorfismo C1561T del gene FGCP (folil-gamma-carbossi peptidasi). Alla luce di questi risultati molecolari, è possibile perciò presso il nostro centro, affiancare alle attività clinico-assistenziali sui pazienti, un'analisi della valutazione della suscettibilità genetica che ciascun individuo ha per tali patologie in base a semplici dosaggi plasmatici e a screening di natura molecolare. La valutazione della predisposizione genetica di un individuo è importante alla luce del fatto che solo l'8% delle famiglie presenta più di un individuo affetto; ciò implica che la maggior parte dei casi di DTN si manifesta in modo sporadico, ovvero che qualunque coppia è a rischio di avere bambini affetti da DTN. In particolare, della predisposizione genetica è particolarmente importante nelle donne che programmano una gravidanza, dal momento che è stato dimostrato che il metabolismo materno influenza la quantità di folato che viene passata al feto. Conseguentemente l'identificazione nella madre di una preponderante predisposizione genetica, consente di elaborare per quella donna un protocollo di prevenzione farmacologica che consiste nell'integrazione periconcezionale di un'adeguata dose di acido folico.

Qualsiasi persona che si presenti al nostro centro e che desidera sapere se è a rischio di avere bambini affetti da DTN, deve sottoporsi alla seguente procedura:

1) consulenza genetica preliminare che si prefigge di identificare le persone con un rischio a priori maggiore rispetto a quello della popolazione generale. Devono ritenersi incluse in questa categoria: individui con figli e/o parenti di primo e secondo grado affetti da DTN; individui con patologie e/o disfunzioni dell'assorbimento intestinale di nutrienti; individui sottoposti a terapie con farmaci interferenti con il metabolismo dell'acido folico. L'intervista con la persona deve essere volta anche a capire le sue abitudini di vita, il regime alimentare, la presenza in famiglia e in collaterali di altre malformazioni congenite o altre patologie ad eziologia multifattoriale (diabete, ipertensione, malattie cardio-vascolari). A tale scopo l'interessato viene invitato a compilare una scheda che raccoglie tali informazioni. Inoltre l'intervista con l'interessato/a si conclude con l'autorizzazione firmata ai dosaggi e alle indagini molecolari che seguiranno.

2) prelievo ematico di sangue venoso periferico in provette da emocromo contenenti alcune gocce di EDTA che viene utilizzato per l'isolamento delle frazioni linfocitaria e successivamente per l'estrazione di DNA genomico. Per casi particolari (ad esempio un individuo che ha una storia familiare di DTN o di poliabortività), si provvederà ad una analisi del cariotipo volta ad identificare riarrangiamenti cromosomici.

3) valutazione dei livelli di omocisteina, folato, vitamina B12 e B6 sono utili al fine della valutazione di un eventuale difetto metabolico.

4) analisi dei polimorfismi fino ad oggi noti in attività enzimatiche coinvolte nel metabolismo del folato e dell'omocisteina:

- enzima metilentetraidrofolato reduttasi (MTHFR): ricerca dei polimorfismi C677T e A1298C;
- enzima metionina sintasi reduttasi (MTRR): ricerca del polimorfismo A66G;
- enzima folil-poliglutammato carbossipeptidasi (FGCP): ricerca del polimorfismo C1561T;
- enzima cistationina beta sintasi (CBS): ricerca del polimorfismo 68bp ins;
- carrier del folato (RFC-1): ricerca del polimorfismo A80G;
- recettore alfa del folato (FR): ricerca di mutazioni (solo in casi selezionati).

Il risultato di tutti questi esami verrà firmato dalla responsabile del servizio (Dott.ssa V. Capra) e consegnato all'interessato; in particolare nel caso in cui verrà segnalata un'eventuale iperomocistinemia ed una forte suscettibilità genetica dovuta ad omozigotità per più di uno dei polimorfismi indagati verrà consigliata la somministrazione di una dose superiore di acido folico. Infatti, normalmente per individui a bassa predisposizione genetica la dose giornaliera di acido folico raccomandata è di 0.8 mg al giorno. Tale dose va aumentata a 4 mg nel caso di persone che evidenzino un'alta suscettibilità genetica. Il risultato dei test saranno consegnati personalmente all'interessato entro un massimo di 3 settimane e verranno discussi con personale qualificato. Va ricordato che l'acido folico può essere assunto con la dieta in quanto è presente in alcuni frutti (arancia, lamponi, ananas e papaya), in alcuni vegetali e legumi (lenticchie, spinaci, fagioli, asparagi, rape), nei cereali non raffinati, nelle arachidi, semi di girasole, nel fegato. L'apporto dietetico di folato può comunque non essere sufficiente per individui con forte suscettibilità genetica ai quali perciò deve essere assolutamente raccomandata una integrazione di tipo farmacologico. Infine l'interessato verrà chiaramente informato che questo programma di prevenzione con l'acido folico contribuisce a ridurre il rischio ma non ad eliminare completamente la patologia (che potrebbe intervenire per altre cause ancora sconosciute).

b) Diagnosi del gene HLXB9 nella sindrome di Currarino

La SRC comprende uno spettro di malformazioni neurologiche, somatiche e viscerali variamente combinate che includono: vari gradi di agenesia sacro-coccigea. (Pang et al. 1993), anomalie anorettali, anomalie genitourinarie, agenesia renale mono- o bi-laterale, anomalie degli arti inferiori, con fusione degli arti nei casi più gravi (sirenomelia), malformazione delle ali iliache; talvolta, possono essere presenti mielomeningocele con lipoma e/o midollo ancorato, ipoplasia polmonare e malformazioni cardio-vascolari. (Duhamel, 1961; Cama et al., 1996). Tra i fattori di rischio della SRC esiste una documentata associazione con il diabete mellito materno (Passarge and Lenz, 1966). Nel tratto interessato (frequentemente nella regione lombare o toraco-lombare) si rilevano: la totale assenza o l'ipoplasia dei corpi vertebrali (spesso l'arco posteriore è mancante); anomalie del midollo spinale e delle radici nervose (il midollo è assottigliato e, frequentemente, il cono midollare è ancorato caudalmente mediante un filum terminale ispessito); l'alterazione degli involucri durali. Gli individui affetti presentano paraplegia o paraparesi congenita e deformità congenite agli arti inferiori (Tortori-Donati et al., 1999). CRS può essere associata all'onfalocele, estrofia della cloaca, ano imperforato ed anomalie spinali (sindrome di OEIS) oppure associata ad anomalie vertebrali, ano-rettali, cardiache, tracheo-esofagee, renali e deformità degli arti (sindrome di VACTERL). Inoltre la combinazione di una particolare forma di emisacro, anomalie ano-rettali e massa presacrale (teratoma o mielomeningocele anteriore) costituiscono la sindrome di Currarino (CS). Alcuni lavori hanno ormai dimostrato che il gene HLXB9 è responsabile del gene della CS (Ross et al., 1998, Belloni et al., 2000, Hagan et al., 2000). Questo è un gene homeobox che era stato isolato da una library umana di cDNA e che è espresso nel tessuto pancreatico e nei tessuti linfonodali (Harrison et al., 1994). *HLXB9* ha tre esoni e codifica per una proteina di 403 aminoacidi. Alcuni lavori hanno studiato il gene *HLXB9* in pazienti con di CRS (Belloni et al., 2000, Merello et al., 2006) senza identificare alcuna mutazione patogenetica, ma sono state

studiate alterazioni di triplette ripetute al fine di poter identificare una combinazione genotipica che possa contribuire al rischio di insorgenza della CRS.

Presso la nostra U.O. dopo consulenza genetica e valutazione clinica, radiologica e neuroradiologica può essere indicata l'analisi del gene *HLXB9* che viene fatta nel nostro laboratorio.

1) Valutazione clinica

2) Consulenza genetica preliminare che si prefigge di identificare le persone a rischio. L'intervista con la persona deve essere volta anche a capire le sue abitudini di vita, il regime alimentare, la presenza in famiglia e in collaterali di altre malformazioni congenite o altre patologie ad eziologia multifattoriale (diabete, ipertensione, malattie cardio-vascolari). Inoltre l'intervista con l'interessato/a si conclude con l'autorizzazione firmata allo studio del gene *HLXB9* che seguiranno.

3) prelievo ematico di sangue venoso periferico in provette da emocromo contenenti alcune gocce di EDTA che viene utilizzato per l'isolamento delle frazione linfocitaria e successivamente per l'estrazione di DNA genomico. Per casi particolari si provvederà ad una analisi del cariotipo volta ad identificare riarrangiamenti cromosomici.

I metodi di indagine di tale gene coinvolgono l'amplificazione mediante PCR con l'impiego di primers specifici dei tre esoni, delle regioni immediatamente fiancheggianti, dell'introne 2, e delle intere regioni 5' e 3' UTR e successivo sequenziamento in automatico dei prodotti amplificati con l'impiego della tecnologia CEQ2000XL DNA Analysis System (Beckmann Coulter).