

Tonin R.¹, Rinaldi M.¹, Feo F.¹, Cardona F.², Matassini C.², Ramat S.³, Caremani L.³, Della Bona M.⁴, la Marca G.⁴, Mannaioni G.⁵, Renzo Guerrini⁵, Amelia Morrone^{1,5}

¹Laboratorio di Biologia Molecolare delle Malattie Neurometaboliche, AOU Meyer, Firenze; ²Dipartimento di Chimica "Ugo Schiff", Università di Firenze, Firenze; ³Parkinson Unit, AOU Careggi Firenze, FIRENZE, ITALY

⁴Dip. Sc. Biom. Speriment. Clin. Mario Serio, FIRENZE, ITALY; ⁵Department of NEUROFARBA, University of Florence, Italy

email to: amelia.morrone@meyer.it; rodolfo.tonin@meyer.it

INTRODUZIONE

La malattia di Gaucher (GD) è una delle più comuni malattie da accumulo lisosomiale (LSD), caratterizzata da uno spettro di segni e sintomi causati dal deficit dell'enzima lisosomiale glucocerebrosidasi (GCase). Diverse varianti del gene *GBA* sono responsabili dell'assenza o riduzione dell'enzima GCase.

Il morbo di Parkinson è la seconda patologia degenerativa più diffusa. Sebbene la malattia sia stata scoperta più di 200 anni fa, i suoi meccanismi patogenetici non sono ancora stati descritti in modo completo.

Negli ultimi anni, è stata descritta una forte correlazione tra Malattia di Parkinson (PD) e varianti a carico del gene *GBA*, sia in pazienti che nei portatori di GD, rendendo più facile la comprensione di questo disturbo (figura 1).

Varianti nel gene *GBA* risultano essere pertanto un importante fattore di rischio per PD, forse il più importante dopo l'età. I meccanismi fisiopatologici alla base del legame tra un'alterata funzione di GCase e lo sviluppo del PD non sono ancora ben chiari e sono attualmente oggetto di studio. Ridotta attività di GCase è riportata in pazienti PD con e senza varianti nel gene *GBA*.

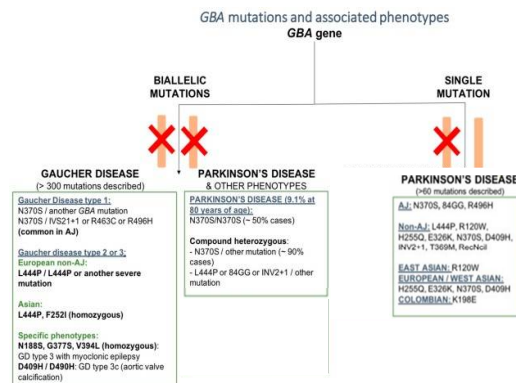


Figura 1. Associazione delle più comuni varianti del gene *GBA* e fenotipi clinici associati. (Riboldi et al. Cells 2019)

SCOPO

Determinare la frequenza della presenza di varianti del gene *GBA* in un'ampia coorte di pazienti con diagnosi clinica di malattia di Parkinson e con dosaggio dell'attività GCase.

MATERIALI E METODI

Il dosaggio dell'enzima glucocerebrosidasi (Gcase) è stato effettuato su sangue intero, sfruttando come metodica di campionamento del Dried Blood Spot (DBS) ed analizzati in spettrometria di massa accoppiata ad un cromatografo liquido (LC-MS/MS) mediante l'utilizzo del kit NeoLSD, fornito dalla ditta PerkinElmer.

Le analisi genetico-molecolari sono state effettuate mediante target resequencing degli esoni e dei siti di splicing del gene *GBA* con protocollo Paired-End 150 bp su MiniSeq (Illumina). L'analisi dei dati è stata effettuata mediante la piattaforma BaseSpace Sequence Hub con DNA Amplicon (v2.1.0). Le varianti ottenute sono state filtrate eliminando possibili artefatti di sequenziamento/allineamento. L'annotazione è stata effettuata mediante Annovar (v16Apr18).

RISULTATI

- 223 pazienti affetti da Parkinson sono stati arruolati e testati per l'attività della glucocerebrosidasi (GCase) su Dried Blood Spot (DBS) (NV>2.10 $\mu\text{mol/L/h}$).
- 74 pazienti sui 223 (33%) presentavano un'attività di GCase <5.00 $\mu\text{mol/L/h}$ e selezionati per le indagini molecolari del gene *GBA*. (Fig.2)
- 16 pazienti sono risultati portatori di varianti patogenetiche del gene *GBA*, il 7% della intera coorte di studio ed il 33% del gruppo di pazienti con dosaggio di GCase <5.00 $\mu\text{mol/L/h}$. (Fig.2)(Tab.1)
- 9 differenti varianti patogenetiche del gene *GBA* sono state identificate (Fig.3):
 - p.Asn370Ser (6/20) 30%
 - p.Thr369Met (3/20) 15%
 - p.Leu444Pro (3/20) 15%
 - p.Glu326Lys (2/20) 10%
 - p.Val14Met, p.Glu388Lys, p.His255Gln, p.Val172Ile, p.Asp409His, p.Asp409Glu; 30%
- 4 pazienti (GBA080, GBA155, GBA122, GBA094) sono risultati portatori di un allele complesso per varianti patogenetiche del gene *GBA*;

Samples	Enzyme Activity Analysis GCase (>2.10)	Identified Variants NGS GBA gene			
GBA 196	1.85	p.Glu365Lys	c.1093G>A	Glu326Lys	+/-
GBA 002	2.60	Thr408Met	c.1223C>T	Thr369Met	+/-
GBA 025	2.79	Leu483Pro	c.1448T>C	Leu444Pro	+/-
GBA 048	2.92	Glu365Lys	c.1093G>A	Glu326Lys	+/-
GBA 080	2.99	Asn409Ser Thr408Met	c.1226A>G c.1223C>T	Asn370Ser Thr369Met	+/-
GBA 175	2.74	Asn409Ser	c.1226A>G	Asn370Ser	+/-
GBA 145	3.11	Val53Met	c.157G>A	Val14Met	+/-
GBA 173	3.17	Leu483Pro	c.1448T>C	Leu444Pro	+/-
GBA 155	3.35	Glu427Lys Thr408Met	c.1279G>A c.1223C>T	Glu388Lys Thr369Met	+/-
GBA 076	3.51	Asn409Ser	c.1226A>G	Asn370Ser	+/-
GBA 094	3.70	Asp448His His255Gln	c.1342G>C c.882T>G	Asp409His His255Gln	+/-
GBA 050	4.19	Asn409Ser	c.1226A>G	Asn370Ser	+/-
GBA 122	4.25	Leu483Pro Val111Ile	c.1448T>C c.631G>A	Leu444Pro Val172Ile	+/-
GBA 035	4.27	Asn409Ser	c.1226A>G	Asn370Ser	+/-
GBA 032	4.44	Asn409Ser	c.1226A>G	Asn370Ser	+/-
GBA 138	4.44	Asp448Glu	c.1344C>G	Asp409Glu	+/-

Tabella 1. Valori della GCase su DBS e varianti identificate sul gruppo dei 16 pazienti Parkinson portatori di una variante patogenetica del gene *GBA*. In rosso la vecchia nomenclatura delle varianti *GBA* identificate.

CONCLUSIONI

- Nella coorte di 223 pazienti Parkinson dell'area Fiorentina analizzati 74 pazienti (33%) presentavano un dosaggio della GCase su DBS <5.00 $\mu\text{mol/L/h}$.
- 16 dei 74 pazienti sequenziati (33%), sono risultati portatori di varianti patogenetiche del gene *GBA*.
- Una frequenza pari al 7% dello stato di portatore di varianti *GBA*, in accordo a quanto riportato dalla letteratura scientifica (7-12%), è presente nella coorte dei 223 pazienti sottoposti a screening GCase su DBS.
- Le sostituzioni aminoacidiche p.Glu326Lys, p.Thr369Met, p.Asn370Ser e p.Leu444Pro rappresentano il 70% delle varianti identificate. Queste varianti sono associate ad un rischio più elevato di demenza.
- Le varianti *GBA*, ad oggi, rappresentano una grande rilevanza clinica per la progressione della demenza nella malattia di Parkinson e la modulazione dell'attività della GCase potrebbe essere un interessante bersaglio terapeutico per il PD.

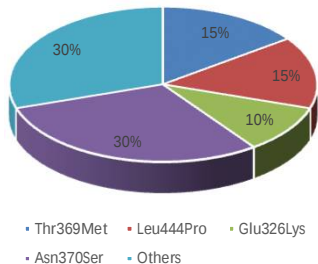
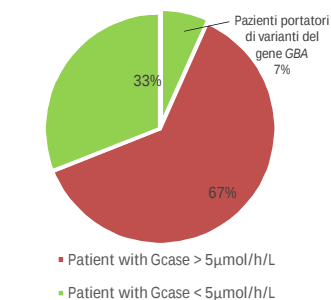


Figura 2. Screening biochimico su DBS dell'attività della coorte dei 223 pazienti affetti da malattia di Parkinson. Il 7% della coorte presenta varianti a carico del gene *GBA*.

Figura 3. Varianti Patogenetiche del gene *GBA* identificate sul gruppo dei 74 pazienti che presentavano dosaggio della GCase < 5.00 $\mu\text{mol/L/h}$