

**Clinical characterization, genetic screening and genotype-phenotype associations
in cerebellar and brainstem congenital defects**

Cerebellar and brainstem congenital defects (CBCDs) represent a wide spectrum of malformative disorders resulting from abnormal development of midbrain-hindbrain and characterised by high clinical and genetic heterogeneity. Due to the uncommonness of these conditions and the substantial under-recognition on brain imaging studies, limited information is available on their prevalence, genetic causes, natural history, and genotype-phenotype associations. Such a contingency of factors leads to uncertain prognosis and wrong counselling.

The aim of this thesis was to improve current knowledge of CBCDs through the creation of a multidisciplinary European network, involved in the collection of clinical-neuroradiological data and biological samples of the affected individuals. The genetic basis of mendelian CBCDs have been investigated through complementary molecular approaches, including Sanger sequencing, multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), next-generation sequencing (NGS) techniques, and high-resolution targeted array comparative genomic hybridization (aCGH). Multivariate statistical methods have been applied to analyse genotype-phenotype associations and define predictors of disease progression. Bioinformatics modeling and functional studies have been performed to investigate the effect of genomic variants affecting known genes and to confirm the pathogenic role of new candidate disease-genes identified through whole exome sequencing (WES).

Among CBCDs-associated diseases, Joubert syndrome (JS), pontocerebellar hypoplasia (PCH), tubulinopathies and shrunken cerebellum have been explored in more detail and are discussed in distinct sections.

- i. Population-based prevalence rates of JS in Italy have been estimated applying the standards of descriptive epidemiology. Mutational frequency and phenotypic spectrum of JS have been defined through collection and targeted resequencing of over 400 patients followed by aCGH analysis of selected cases. A retrospective collection of biochemical and clinical data of a subset of JS patients has been conducted to assess the frequency of chronic kidney disease (CKD) and identify a quantitative biomarker of the risk of CKD progression. A new JS-causing gene has been identified through WES analysis and confirmed by functional studies.
- ii. Genetic causes of PCH have been investigated in more than 50 patients by Sanger sequencing, MLPA and targeted resequencing. Genotype-phenotype associations have been

explored through a statistical approach combining unsupervised hierarchical clustering and logistic regression analysis.

- iii. Frequency and type of CBCDs have been investigated in 20 patients with mutations in tubulin genes through magnetic resonance and diffusion tensor imaging. A new gene has been identified by WES causing an autosomal recessive tubulinopathy-like disorder.
- iv. Two patients presenting with shrunken cerebellum and non-progressive congenital ataxia due to mutations in different genes have been identified. In the first case, the existence of a mutation-specific atypical inheritance pattern has been ascertained; in the second case, an expansion of clinical and mutational spectrum has been observed.

Altogether, the results of our study demonstrate that the creation of a clinical and research network represents a valuable strategy for the study of rare diseases such as CBCDs, providing expertise for patient assessment, genetic characterization and functional validation of new candidate genes. Furthermore, the proposed molecular workflow has proved to be a successful, cost-effective strategy for the identification of the genetic cause in many different CBCDs, showing detection rates equal to or greater than values reported in the literature. Besides increasing knowledge about the genetic causes of CBCDs, our findings give new insight on the epidemiology, phenotypic spectrum, natural history, and inheritance pattern of this group of disorders.

Caratterizzazione clinica, screening genetico e associazioni genotipo-fenotipo nei difetti congeniti del cervelletto e del tronco encefalico

I difetti congeniti del cervelletto e del tronco encefalico (CBCDs) costituiscono un ampio spettro di disordini malformativi derivanti da un'anomalia di sviluppo del mesencefalo-romboencefalo e caratterizzati da un'elevata eterogeneità clinica e genetica. A causa della rarità di queste condizioni e della loro sottostima negli studi di imaging dell'encefalo, le informazioni disponibili sulla prevalenza, eziologia genetica, storia naturale e associazioni genotipo-fenotipo sono limitate. Sul piano clinico, ciò si traduce in un'incertezza prognostica e in un counseling genetico spesso impreciso.

L'obiettivo di questa tesi è stato quello di ampliare la conoscenza dei CBCDs grazie al lavoro di un network europeo multidisciplinare, coinvolto nella raccolta di dati clinico-neuroradiologici e di campioni biologici degli individui affetti. Le basi genetiche delle forme mendeliane di CBCDs sono state indagate attraverso approcci molecolari complementari, che hanno incluso sequenziamento Sanger, MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification), tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS), ed ibridazione genomica comparativa su array (aCGH) customizzata ad elevata risoluzione. Sono stati applicati metodi statistici multivariati per l'analisi delle associazioni genotipo-fenotipo e per la definizione dei predittori di progressione di malattia. L'effetto di varianti di sequenza a carico di geni noti è stato valutato mediante approcci di modelling molecolare e studi funzionali, così come il ruolo patogenetico di nuovi geni-malattia identificati mediante sequenziamento completo dell'esoma (whole exome sequencing, WES).

Nell'ambito delle patologie associate a CBCDs, la Sindrome di Joubert (SJ), l'ipoplasia pontocerebellare (PCH), le tubulinopatie e le atassie congenite non progressive sono state analizzate in dettaglio e discusse in sezioni distinte.

- i. I tassi di prevalenza globale, età- e sesso-specifici della SJ in Italia sono stati stimati applicando gli standard dell'epidemiologia descrittiva. La frequenza mutazionale e lo spettro fenotipico della SJ sono stati definiti mediante il reclutamento di oltre 400 pazienti, sottoposti ad analisi NGS di un pannello di geni causativi della patologia (targeted resequencing), seguita da analisi aCGH in casi selezionati. La raccolta retrospettiva dei dati clinici e biochimici in un sottogruppo di pazienti con SJ ha consentito di determinare la frequenza di malattia renale cronica (CKD) e di identificare un biomarcatore che permetta di

quantificare il rischio di progressione verso la CKD. L'analisi mediante WES ha infine portato all'identificazione di un nuovo gene causativo di SJ, il cui ruolo è stato confermato attraverso studi funzionali.

- ii. I geni causativi noti di PCH sono stati analizzati in oltre 50 pazienti mediante sequenziamento Sanger, MLPA e targeted resequencing. Le associazioni genotipo-fenotipo sono state studiate mediante un approccio statistico basato sulla combinazione di analisi di cluster gerarchica (classificazione non supervisionata) ed analisi di regressione logistica.
- iii. La frequenza e la tipologia di CBCDs sono state indagate in 20 pazienti con mutazioni in uno dei geni causativi di tubulinopatia mediante risonanza magnetica encefalica ed imaging con tensore di diffusione (DTI). L'approccio basato sul WES ha permesso l'identificazione di un nuovo gene-malattia, causativo di una condizione analoga alle tubulinopatie, trasmessa con modalità autosomica recessiva.
- iv. Le tecniche di sequenziamento NGS hanno permesso l'identificazione di due pazienti con cervelletto *shrunk* ed atassia congenita non progressiva, mutati in geni differenti. Nel primo caso, è stata dimostrata l'esistenza di un pattern di ereditarietà atipico e mutazione-specifico; nel secondo caso, è stata documentata un'espansione dello spettro clinico e mutazionale.

Nel complesso, i risultati presentati forniscono un esempio di come la creazione di un network clinico e di ricerca rappresenti una valida strategia per lo studio delle malattie rare come i CBCDs, integrando le competenze necessarie per la valutazione dei pazienti, la loro caratterizzazione genetica e la validazione funzionale di nuovi geni candidati. In particolare, il flusso di lavoro proposto si è rivelato essere un approccio efficace e vantaggioso per l'identificazione delle cause genetiche di diversi CBCDs, mostrando una detection rate uguale o superiore ai valori riportati in letteratura. Oltre ad espandere le conoscenze sulle cause genetiche dei CBCDs, i risultati esposti forniscono nuove informazioni sull'epidemiologia, lo spettro fenotipico, la storia naturale e il pattern di ereditarietà di questo gruppo di condizioni.