



Programma di ricerca
Aplasie midollari congenite: anemia di Blackfan-Diamond

RELAZIONE sull'ATTIVITÀ di RICERCA svolta nel 2019

PREMESSA.

Il progetto è rivolto allo studio dei meccanismi patogenetici di alcune ipoplasie midollari, nello specifico della anemia di Blackfan-Diamond (DBA, OMIM 105650), un difetto congenito che colpisce selettivamente i progenitori eritroidi (globuli rossi) provocando una grave anemia che si manifesta alla nascita o dai primi mesi di vita, frequentemente associata a malformazioni e ad un aumentato rischio di sviluppare neoplasie.

Si tratta di una malattia rara con un'incidenza riportata in letteratura di 6-7 casi ogni milione di nati; il dato risulta però essere sottostimato, come dimostrano i lavori svolti negli ultimi anni dal nostro gruppo di lavoro. Il nostro centro effettua ciò che potremmo definire "service clinico" volto alla ricerca di mutazioni genetiche a livello italiano, in modo da confermare diagnosi cliniche e fornire le basi per una valutazione genetica specifica. I dati in nostro possesso, basati sulla diagnosi molecolare, dimostrerebbero un'incidenza più elevata rispetto a quella riportata in letteratura: circa 15 casi ogni milione di nati.

La maggioranza dei pazienti affetti da DBA risponde adeguatamente alla somministrazione di steroidi, alcuni però necessitano di dosi troppo elevate di farmaco. Per questi pazienti e per quella percentuale che non risponde al trattamento con cortisone, risulta obbligatorio attivare un regime trasfusionale cronico unito ad una terapia per l'eliminazione dell'accumulo di ferro epatico e cardiaco.

Via Pindemonte 15 37126 Verona
C.F./P.IVA 04373320235



Attualmente l'unico approccio terapeutico curativo risulta essere il trapianto di cellule staminali emopoietiche.

A livello genetico, la DBA è una malattia ereditaria causata da mutazioni che codificano per le proteine del ribosoma.

La nostra ricerca è volta allo studio delle relazioni tra anemia e le alterazioni nella formazione del ribosoma, passo necessario per l'identificazione di un possibile trattamento della malattia.

ASPETTI DIAGNOSTICI.

Il nostro laboratorio riceve campioni dai centri di ematologia pediatrica di tutta Italia e provvede all'estrazione del DNA e alla sua analisi con due metodiche: l'analisi di sequenza "tradizionale" (metodica di Sanger) e la metodica MLPA (multiplex ligation-dependent probe assay), per ricercare eventuali delezioni dell'intero gene o di sue parti (perdita di parte del DNA).

Questa strategia è necessaria in quanto la DBA è una malattia "dominante" e presenta quindi alterazioni su soltanto una delle due copie del gene (allele): l'analisi di sequenza tradizionale non rileva eventuali parti mancanti (delezioni).

Attualmente, abbiamo identificato alterazioni genetiche in 183 pazienti su 270 analizzati. Nel 2019, in particolare, abbiamo ricevuto circa 43 campioni di probabili pazienti (già noti o nuovi sospetti) inviati dai centri AIEOP italiani.

Oltre all'analisi molecolare, sui tutti i nuovi pazienti è stata effettuata un'analisi dell'RNA ribosomiale sui linfociti: tale test da un lato ci permette di confermare rapidamente il sospetto diagnostico, dall'altro è in grado di orientare la successiva diagnosi molecolare. Analizziamo infatti i geni delle proteine della subunità del ribosoma che risulta alterata.



STUDIO OSSERVAZIONALE (già REGISTRO ITALIANO DBA).

In costante aggiornamento il registro italiano della malattia, di cui siamo curatori, e il "data-base" internazionale delle mutazioni (<http://www.dbagenes.unito.it/>).

La normativa sulla privacy ha comportato la trasformazione del registro in studio osservazionale prospettico, cosa che è stata effettuata nel 2016.

RICERCA NUOVI GENI MALATTIA.

Per quanto riguarda l'identificazione dei geni responsabili di DBA in quel terzo di pazienti in cui non è stata ancora identificata alcuna alterazione, è stato studiato l'intero esoma (il DNA codificante di tutti i geni) grazie alla tecnica del Next Generation Sequencing in un gruppo di pazienti DBA. Lo studio, particolarmente complesso a causa della presenza di numerosi pseudogeni, non ha evidenziato mutazioni patogene nei geni noti per essere coinvolti nell'assemblaggio del ribosoma.

RICERCA DEI MECCANISMI DI REMISSIONE DELLA MALATTIA.

Nella DBA un 20% dei pazienti "guarisce", diventa cioè indipendente dal trattamento trasfusionale.

Abbiamo identificato e dimostrato la causa della remissione in 2 pazienti: uno italiano che seguiamo da 30 anni e uno olandese. In entrambi i casi si è verificata una disomia uniparentale: una duplicazione della copia sana del gene (allele) ereditata da un genitore. In pratica l'allele mutato ereditato da un genitore è stato sostituito dall'allele sano ereditato dall'altro genitore (come se fosse stato ereditato da un solo genitore, da qui il termine uniparentale),



questo processo determina la scomparsa della mutazione nel DNA delle cellule che producono i globuli rossi.

VALUTAZIONE DELLA PATOGENICITA' DELLE MUTAZIONI.

In collaborazione con l'Università del Piemonte Orientale (dott.ssa Anna Aspesi) è stato messo a punto un test per valutare se una alterazione di sequenza del DNA sul gene di una proteina ribosomiale possa essere responsabile della malattia. Alcune variazioni della sequenza del DNA, pur non essendo presenti nei soggetti normali, possono essere prive di significato clinico. Se linee cellulari di pazienti con una grave mutazione vengono infettate con un lentivirus con la mutazione da testare, producono un RNA ribosomiale normale, significa che la alterazione di sequenza non era responsabile della malattia.

La pubblicazione che descrive il test ha riscontrato molto interesse e alcune nazioni (Gran Bretagna e USA) hanno chiesto di valutare le mutazioni nei loro pazienti.

PROGRAMMA PER IL 2020.

STUDIO PROSPETTICO OSSERVAZIONALE e ANALISI delle GRAVIDANZE.

Proseguirà l'aggiornamento dei dati clinici per lo studio prospettico osservazionale in corso.

Proseguirà in particolare e verrà implementato il monitoraggio e la raccolta dati a livello nazionale sulle gravidanze nelle pazienti affette da DBA (prevalentemente con mutazione genetica riconosciuta) iniziato nel 2018.

**Via Pindemonte 15 37126 Verona
C.F./P.IVA 04373320235**



L'analisi riguarda lo stato di salute della madre e le modificazioni della terapia effettuata (prima/durante/dopo la gravidanza), il decorso e le modalità del parto, le cause delle eventuali interruzioni di gravidanza, lo stato di salute dei neonati al momento della nascita (malformazioni correlate alla malattia, valori di emoglobina e il riscontro della mutazione materna alle analisi genetiche). Tutti i centri AIEOP partecipanti sono stati contattati e sensibilizzati per effettuare una valutazione più corretta e ampia possibile.

MECCANISMI DI REMISSIONE.

Proseguiamo la nostra ricerca sui possibili meccanismi che possono essere responsabili della remissione.

I pazienti affetti che sperimentano clinicamente una remissione sono circa il venti per cento del totale. Tra i possibili meccanismi responsabili, oltre alla disomia uniparentale esiste la possibilità della comparsa di una nuova mutazione in grado di neutralizzare l'effetto di quella patogena, oppure la presenza di un "mosaicismo" (presenza di cellule mutate e cellule normali) e la crescita nel tempo del clone "sano" sino all'indipendenza dalle trasfusioni.

Con le nuove tecniche di NGS (next generation sequencing) valuteremo la presenza eventuale di mosaicismo.

Grazie alla attiva collaborazione dei centri abbiamo un costante aggiornamento sui pazienti che diventano indipendenti dal trattamento (remissione), sia che siano stati trattati con corticosteroidi sia che siano sottoposti a trasfusioni periodiche.

Stiamo esaminando tutte le possibili variabili cliniche in questi pazienti: età al momento della remissione, relazione con il tipo di mutazione e con il gene interessato, eventuale ricaduta di malattia (la remissione può essere transitoria in alcuni pazienti).

**Via Pindemonte 15 37126 Verona
C.F./P.IVA 04373320235**



La raccolta di queste informazioni e il ricontrollo periodico di alcuni parametri negli anni (Adenosina deaminasi eritrocitaria, elevata nella DBA, precursori dell'RNA ribosomiale) potrebbe condurre ad evidenziare parametri predittivi di remissione o parametri che permettano di distinguere le remissioni "stabili" da quelle "instabili".

DIAGNOSI.

Proseguirà il servizio di diagnosi dei nuovi pazienti affetti da DBA attraverso l'analisi dell'RNA ribosomiale e la ricerca di mutazioni nel DNA.

VALUTAZIONE DELLA PATOGENICITA' DELLE MUTAZIONI.

Abbiamo deciso di mettere a disposizione della comunità internazionale il test che valuta se l'alterazione di sequenza riscontrata nel paziente possa essere ritenuta la causa della malattia (test descritto nella sezione precedente). Effettueremo il test per tutti i nostri pazienti in cui la mutazione è "dubbia" e per alcuni pazienti non italiani (la valutazione ci è stata richiesta oltre che dagli inglesi, anche dai francesi e dagli israeliani).



Publicazioni Scientifiche (2018 - 2019)

Publicazioni su riviste internazionali inerenti la ricerca sulla DBA

- 1) Aspesi A, Betti M, Sculco M, Actis C, Olgasi C, Wlodarski MW, Vlachos A, Lipton JM, Ramenghi U, Santoro C, Follenzi A, Ellis SR, Dianzani I. A functional assay for the clinical annotation of genetic variants of uncertain significance in Diamond-Blackfan anemia. *Human Mutation*. 2018 Aug;39(8):1102-1111.
- 2) Vlachos A, Osorio DS, Atsidaftos E, Kang J, Lababidi ML, Seiden HS, Gruber D, Glader BE, Onel K, Farrar JE, Bodine DM, Aspesi A, Dianzani I, Ramenghi U, Ellis SR, Lipton JM. Increased Prevalence of Congenital Heart Disease in Children With Diamond Blackfan Anemia Suggests Unrecognized Diamond Blackfan Anemia as a Cause of Congenital Heart Disease in the General Population: A Report of the Diamond Blackfan Anemia Registry. *Circulation: Genomic and Precision Medicine*. 2018 May;11(5):e002044.
- 3) Da Costa L, O'Donohue MF, van Dooijeweert B, Albrecht K, Unal S, Ramenghi U, Leblanc T, Dianzani I, Tamary H, Bartels M, Gleizes PE, Wlodarski M, MacInnes AW. Molecular approaches to diagnose Diamond-Blackfan anemia: The EuroDBA experience. *European Journal of Medical Genetics*. 2018 Nov;61(11):664-673.



- 4) Aspesi A, Monteleone V, Betti M, Actis C, Morleo G, Sculco M, Guarrera S, Wlodarski MW, Ramenghi U, Santoro C, Ellis SR, Loreni F, Follenzi A, Dianzani I. Author Correction: Lymphoblastoid cell lines from Diamond Blackfan anaemia patients exhibit a full ribosomal stress phenotype that is rescued by gene therapy. *Scientific Reports*. 2018 Nov 16;8(1):17227.
- 5) Wlodarski MW, Da Costa L, O'Donohue MF, Gastou M, Karboul N, Montel-Lehry N, Hainmann I, Danda D, Szvetnik A, Pastor V, Paolini N, di Summa FM, Tamary H, Quider AA, Aspesi A, Houtkooper RH, Leblanc T, Niemeyer CM, Gleizes PE, MacInnes AW. Recurring mutations in RPL15 are linked to hydrops fetalis and treatment independence in Diamond-Blackfan anemia. *Haematologica*. 2018 Jun;103(6):949-958.
- 6) Aspesi A, Borsotti C, Follenzi A. Emerging Therapeutic Approaches for Diamond Blackfan Anemia. *Current Gene Therapy*. 2018;18(6):327-335.
- 7) Garelli E, Quarello P, Giorgio E, Carando A, Menegatti E, Mancini C, Di Gregorio E, Crescenzo N, Palumbo O, Carella M, Dimartino P, Pippucci T, Dianzani I, Ramenghi U, Brusco A. Spontaneous remission in a Diamond-Blackfan anaemia patient due to a revertant uniparental disomy ablating a de novo RPS19 mutation. *British Journal of Haematology*. 2019 Jun;185(5):994-998.
- 8) Quarello P, Garelli E, Carando A, Cillario R, Brusco A, Giorgio E, Ferrante D, Corti P, Zecca M, Luciani M, Pierri F, Putti M C, Cantarini M E, Farruggia P, Barone A, Cesaro S, Russo G, Fagioli F, Dianzani I, Ramenghi U on behalf of the AIEOP working group on Diamond Blackfan

Via Pindemonte 15 37126 Verona
C.F./P.IVA 04373320235



Anaemia. A 20-year long experience of the Diamond-Blackfan Anaemia Italian Registry: RPS and RPL genes, different faces of the same disease?
Submitted to British Journal of Haematology.

**PUBBLICAZIONI INTERNAZIONALI CON RINGRAZIAMENTO PER IL
CONTRIBUTO RICEVUTO DALLA BANCA DEL PIEMONTE**

- 1) Aspesi A, Monteleone V, Betti M, Actis C, Morleo G, Sculco M, Guarrera S, Wlodarski MW, Ramenghi U, Santoro C, Ellis SR, Loreni F, Follenzi A, Dianzani I. Lymphoblastoid cell lines from Diamond Blackfan anaemia patients exhibit a full ribosomal stress phenotype that is rescued by gene therapy. Sci Rep. 2018 Nov 16;8(1):17227.