



Aplasie midollari congenite: anemia di Blackfan-Diamond

RELAZIONE SOCIALE SULL'ATTIVITA' SVOLTA 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. 93185210239**



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.

**Via Pindemonte 15 37126 Verona
C.F. 93185210239**



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),

**Via Pindemonte 15 37126 Verona
C.F. 93185210239**



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.

Pubblicazioni Scientifiche (2018 - 2019)

Pubblicazioni 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.

**Via Pindemonte 15 37126 Verona
C.F. 93185210239**



- 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 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*.