

AISS Applicant: **Giovanni Cazzaniga**

To:

Associazione Italiana Sindrome di Shwachman-Diamond (AISS)

Via Pioveghetto 15, - 35136 Padova

Tel - FAX +39 049 8736130

E-mail: aiss@shwachman.it

Associazione italiana Sindrome di Shwachman-Diamond Research Grant: Report del primo anno e richiesta di supporto per il secondo anno.

Titolo: Caratterizzazione degli eventi molecolari e genetici alla base dell' evoluzione a mielodisplasia e/o leucemia mieloide acuta nei pazienti affetti da Sindrome di Shwachman-Diamond

La Sindrome di Shwachman-Diamond (SDS) è una malattia ereditaria caratterizzata da insufficienza midollare che può presentare diversi gradi di citopenia, disfunzione pancreatica, e disostosi metafisaria. Circa un terzo dei pazienti con SDS può evolvere in mielodisplasia e/o leucemia. A tutt'oggi non è ancora noto il meccanismo per cui questi pazienti presentano una maggior predisposizione al cancro.

Nel primo anno del progetto abbiamo studiato la presenza di nuove lesioni genetiche submicroscopiche che possono partecipare alla fisiopatologia della malattia mediante analisi con SNP array .

Analisi del profilo genomico delle cellule ottenute dal midollo osseo di pazienti SDS

Abbiamo eseguito l'analisi genomica delle variazioni del contenuto genico delle cellule ottenute dal midollo osseo di pazienti che presentavano aberrazioni clonali (7)(q10) o del (20)(q11) in almeno il 50% delle cellule. Per questo studio sono stati arruolati 9 pazienti con SDS (età media, 13 anni, range 3-32 anni) (Tabella 1). Il midollo osseo ottenuto da individui sani (n = 10) è stato utilizzato come controllo.

Tabella1

Patient	Sex	SBDS mutation		Chromosomal alteration
UPN1	M	c.258+2T>C	c.183.184TA>CT;c.258+2T>C	del(20)(q11)
UPN2	M	c.258+2T>C	c.183.184TA>CT	i(7)(q10)
UPN3	M	c.258+2T>C	c.183.184TA>CT	i(7)(q10)
UPN4	F	c.258+2T>C	c.183.184TA>CT	i(7)(q10)
UPN5	F	c.258+2T>C	c.183.184TA>CT	i(7)(q10)
UPN6	M	c.258+2T>C	c.183.184TA>CT	der(7)add(7)
UPN7	M	c.258+2T>C	c.183.184TA>CT	del(20)(q11)
UPN8	M	c.258+2T>C	c.183.184TA>CT	i(7)(q10)
UPN9	M	c.258+2T>C	g.IVS1-71del83bp	del(20)(q11)

E' stata eseguita l'analisi genomica dei **polimorfismi a singolo nucleotide** (definiti in inglese *Single Nucleotide Polymorphism* o **SNP**). Gli SNP sono una variazione del materiale genico a carico di un unico nucleotide, tale per cui l'allele polimorfico risulta presente nella popolazione in una proporzione superiore all'1%. Gli SNP array permettono di determinare la variazione del numero di copie geniche, con risoluzione dell'ordine della Kb, e degli eventi di *Loss of Heterozygosity* (LOH) e *Uniparental Disomy* (UPD). Per il nostro studio è stato utilizzato il **“Whole Genome Cytogenetics 2.7M”** (Affymetrix) che rappresenta il chip di nuova generazione per analisi citogenetiche. Fornisce la più alta risoluzione, con più di 2.7 milioni di marcatori di variazione del numero di copie (CNV). Tutte le anomalie rilevate nei campioni di pazienti e controlli sono state considerate alterazioni costitutive del numero di copie (CNA). Anomalie rilevate in almeno due pazienti sono state considerate come ricorrenti.

L'analisi di SNP array conferma i risultati di citogenetica: in tutti i pazienti è stata rilevata almeno una aberrazione (Media 14,3, range 4-26). Il numero totale delle lesioni rilevate è stato di 129 (25 amplificazioni, 51 delezioni e 53 LOH). Nell' UPN2 è stata determinata una regione deleta di 10 kb sul cromosoma 1p13.2, che non presenta geni, mentre nell' UPN4 è presente LOH nella stessa regione. E' stata determinata un'amplificazione genica sul cromosoma 3q13.32 che coinvolge il gene IGSF11, in due casi. Questa era l' unica anomalia rilevata nell'UPN6. La Perdita del braccio corto del cromosoma 7 e la duplicazione del braccio lungo del cromosoma stesso [iso (7) (q10)] è stata osservata nell' UPN2, UPN4 e UPN5 (anche confermata mediante FISH). E' stata osservata nell' UPN1, così come nell'UPN2, una perdita di 189 kb a livello del cromosoma 15q11.2. Tale regione contiene geni diversi (OR4N4, OR4M2, OR4N3P, LOC727924). Inoltre, nell'UPN1 e nell'UPN9 è presente una perdita di 44 kb a livello del cromosoma 15q25.3. Tale regione non presenta geni. Come previsto, l'alterazione più comune coinvolge il braccio lungo del cromosoma 20 (5 su 9 pazienti). E' stata infine evidenziata la perdita di una regione minima di 12 kb a livello 20q13.2.

Piano sperimentale per il prossimo anno:

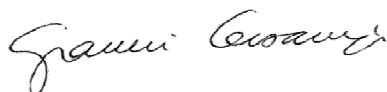
Al fine di confermare le nostre osservazioni:

- Verrà aumentato il numero di pazienti analizzati mediante citogenetica e SNP array
- abbiamo già avviato il “next generation high throughput sequencing” delle regioni cromosomiche alterate grazie alla straordinaria possibilità di collaborare con il Prof. Alan Warren, (Cambridge, Inghilterra). Come controllo di cellule di origine non-ematopoietica verranno utilizzate le cellule dell'epitelio buccale ottenute da ogni singolo paziente.

Inoltre, regioni selezionate del genoma saranno isolate mediante frammentazione random del DNA ed ibridazione a microarrays. Geni specifici saranno sequenziati mediante sequenziamento degli ampliconi utilizzando la piattaforma Illumina. I dati ottenuti saranno poi analizzati utilizzando strumenti informatici in fase di sviluppo da parte del gruppo collaborante.

Dopo il sequenziamento, verranno effettuate analisi di FISH con sonde specifiche, PCR e sequenziamento Sanger al fine di confermare nel dettaglio le anomalie osservate. Infine, un test di conferma sarà effettuato mediante analisi di PCR o FISH su una coorte più ampia di pazienti, grazie alla raccolta di casi da parte della AISS.

Ottenibile in 12 mesi.



Firma

Monza, 18/04/2012

data