

Associazione Italiana Sindrome di Shwachman-Diamond (AISS)

Progetti di ricerca sulla Sindrome di Shwachman-Diamond

Gruppo di ricerca:

Francesco Pasquali, coordinatore; Francesco Lo Curto, Emanuela Maserati, Roberto Valli, Barbara Pressato, Cristina Marletta, Antonella Minelli

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università dell'Insubria, Via J. H. Dunant, 5, Varese
francesco.pasquali@uninsubria.it

Progetto di Ricerca: Instabilità del cariotipo e rischio di sindrome mielodisplastica (SMD) e leukemia mieloide acuta (LMA) della Sindrome di Shwachman-Diamond (SDS) indagati mediante ibridazione genomica comparativa su microarray (a-CGH) – Karyotype instability and risk of myelodysplastic syndrome (MDS) and acute myeloid leukaemia (AML) in Shwachman-Diamond Syndrome (SDS) investigated by Comparative Genomic Hybridization on microarray (a-CGH)

Relazione conclusiva

Riassunto dei risultati ottenuti:

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale – laboratori di Genetica Umana e Medica – dell'Università dell'Insubria è la denominazione attuale del disciolto Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche, in cui il Gruppo di Ricerca continua la sua attività. Il nostro gruppo è il Referente Nazionale per la citogenetica su sangue periferico e midollo osseo dei pazienti affetti da Sindrome di Shwachman-Diamond (SDS). Il numero di pazienti studiati a dicembre 2012 è 69, ed ogni paziente è stato monitorato almeno una volta all'anno dall'epoca della diagnosi.

Sono state usate tecniche di analisi cromosomica standard e di ibridazione in situ fluorescente (FISH) con sonde e libraries informative in parallelo alle indagini mediante Ibridazione Genomica Comparativa su microarray (a-CGH) (Sistema Agilent, piattaforma 244K). I dati ottenuti sono stati oggetto di pubblicazione scientifica, e si sono dimostrati rilevanti per una migliore comprensione della storia naturale della SDS, ed hanno anche fornito informazioni di immediata importanza clinica:

1 – Il ritrovamento di anomalie cromosomiche durante il follow-up, e non presenti alla diagnosi, ci ha permesso di correlare la comparsa di cloni anomali con aumentare dell'età dei pazienti: questo fatto può essere messo in relazione con l'aumento con l'età di rischio di sviluppare una Sindrome Mielodisplastica (SMD) e/o una Leucemia Mieloide Acuta (LMA), che è già stato osservato.

2 – Anomalie cromosomiche clonali nel midollo osseo (MO) sono state identificate fin dalla prima analisi effettuata in 28 dei 69 pazienti:

i(7)(q10) in 13 pazienti;

int del(20)(q11.21q13.32) in 9;

un cariotipo complesso in una paziente che aveva sviluppato una LMA;

int del(7)(q22q32) in uno;

der(7)add(?) in uno;
del(X)(q23) in uno;
der(6)t(3;6)(q24;q13) in uno;
der(16)t(1;16)(q21;q23) in uno.

2 – Sono stati studiati mediante FISH tutti i pazienti alla diagnosi e durante il follow-up con sonde informative per identificare con maggior efficienza le anomalie cromosomiche più comuni nel MO, la delezione interstiziale delle braccia lunghe di un cromosoma 20, int del(20), e l'isocromosoma per le braccia lunghe del cromosoma 7, i(7)(q10), anche su nuclei interfascici. Questo monitoraggio accurato ha rivelato anomalie clonali dei cromosomi 7 e 20, non identificate con la citogenetica convenzionale in 6 pazienti. Altre libraries e sonde sono state usate in molti pazienti in relazione ai risultati delle analisi cromosomiche.

3 – Il monitoraggio citogenetico della nostra coorte di 69 pazienti è durato molti anni: il periodo per il quale sono stati seguiti, fino a fine 2012, è stato di 1-13 anni, e, se escludiamo i pazienti persi al follow-up o diagnosticati recentemente, possiamo considerare per valutare l'importanza del monitoraggio stesso un totale di 49 pazienti con un follow-up medio di 5 anni (mediana 5).

4 – La "Comparative Genomic Hybridization on microarray" (a-CGH) è stata effettuata sul DNA di 29 campioni biologici di 22 pazienti, su MO e, in qualche caso, anche su Sangue Periferico (SP): nessuna coorte di pazienti con SDS paragonabile per numero è stata studiata con a-CGH nella letteratura. I risultati della a-CGH sono stati essenziali per raggiungere conclusioni significative su molti dei punti seguenti.

Le principali conclusioni del nostro lavoro, oggetto delle pubblicazioni elencate più sotto, possono essere riassunte come segue.

- La comparsa di cloni con anomalie nel MO è in relazione con l'aumentare dell'età dei pazienti: questo fatto può essere associato all'aumento di rischio di sviluppare SMD/LMA, che era già stato osservato.
- Si può concludere in modo definitivo che la SDS non è associata ad un aumento nella frequenza di rotture cromosomiche spontanee, ma un tipo specifico di instabilità del cariotipo è presente, in particolare a carico dei cromosomi 7 e 20, ed è possibile che sia associato al rischio di SMD/LMA, sebbene le anomalie cromosomiche che ne derivano possono essere presenti nel MO per lungo tempo senza alcuna progressione.
- La a-CGH ha permesso di rilevare la presenza di i(7)(q10) in un campione di DNA da SP in una paziente in cui era già nota la presenza di i(7)(q10) nel MO; l'anomalia non veniva scoperta nel SP con la citogenetica standard a causa della sua presenza in una bassa percentuale di cellule.
- In un altro paziente, positivo per l'i(7)(q10) nel MO, la a-CGH ha dimostrato la presenza di una piccola delezione interstiziale di un cromosoma 20, del(20)(q11.22), differente dalla comune delezione interstiziale che si trova in molti pazienti con SDS: questa anomalia addizionale era presente nel 19% delle cellule, e questo risultato è stato confermato con la FISH.
- In due pazienti la a-CGH ha permesso di chiarire precisamente la composizione in sequenze di DNA di due cromosomi strutturalmente anomali derivati dal 20, der(20)?r(20) e der(20)del(20)(p11)(q11): più di

una linea cellulare clonale anomala era presente nel MO, e le percentuali definite tramite a-CGH si sono dimostrate corrispondenti a quelle valutate tramite FISH su nuclei interfascici.

- Abbiamo potuto dimostrare in modo definitivo la precisa natura dell'isocromosoma i(7)(q10) grazie ai risultati integrati di FISH e a-CGH applicate a DNA da MO di sette pazienti SDS con quest'anomalia: l'i(7)(q10) è costituito da solo materiale delle braccia lunghe del cromosoma 7, contrariamente all'evidenza di alcuni dati precedentemente pubblicati, senza presenza di sequenze delle braccia corte; la struttura al centromero dell'i(7)(q10) è linearmente composta dalla sequenza alfoide D7Z1, un intervallo lungo fino a 1 Mb, la sequenza alfoide D7Z2, e quindi ancora lo stesso intervallo, e ancora D7Z1.
- Abbiamo potuto definire anche la precisa natura dell'altra anomalia ricorrente nel MO dei pazienti SDS, la int del(20), a livello dei dati ottenuti con l'a-CGH, introducendo una formulazione assolutamente nuova per la descrizione citogenetica di questa delezione (nella letteratura era descritta come del(20)(q11)): int del(20)(q11.21q13.32).
- Il fatto che le anomalie cromosomiche nel MO sono presenti solo in una parte, in qualche caso piccola, delle cellule, ci ha spinto a stabilire sperimentalmente la sensibilità del nostro metodo di a-CGH: nessun dato affidabile di questo tipo era disponibile in letteratura, e noi abbiamo potuto stabilire un valore soglia di sensibilità attorno a 8%. Abbiamo anche elaborato una formula per inferire la percentuale di cellule con l'anomalia cromosomica dai risultati numerici dell'analisi dei dati di a-CGH. Questi due metodi innovativi sono stati usati nell'analisi dei dati citogenetici dei pazienti SDS, ma sono stati anche offerti alla letteratura per l'uso in tutti i casi di mosaicismi cromosomici, sia costituzionale che acquisito.
- Con gli stessi metodi applicati nella SDS abbiamo studiato alcuni casi di citopenia periferica e ipoplasia midollare, con una diagnosi iniziale di sospetta SDS, che non è poi stata confermata. Quattro di questi casi si sono dimostrati di elevato interesse scientifico e sono stati oggetto di pubblicazione: questi casi indicavano la possibilità, non così rara se prendiamo in considerazione la coorte di pazienti analizzati, che un'anomalia cromosomica, sia costituzionale che acquisita nel MO, può portare ad effetti su specifici geni che causano a loro volta ben definite condizioni citopeniche. Nei pazienti descritti si trattava di effetti sui geni *RUNX1* (cromosoma 21), *MPL* (cromosoma 1) e *FLI1* (cromosoma 11) e portavano a Anemia Aplastica Grave (Severe Aplastic Anaemia – SAA), Trombocitopenia congenita lieve, Trombocitopenia Congenita Amegacariocitica (CAMT), Trombocitopenia del tipo Paris-Trousseau.
- Abbiamo contribuito, insieme ad altri gruppi, alla definizione della prevalenza della SDS in Italia.
- E' stato suggerito in anni recenti che l'i(7)(q10) nel MO sia associato ad una prognosi favorevole per quanto riguarda il rischio di SMD/LMA: nessun caso con i(7)(q10) come unica anomalia ha sviluppato SMD/LMA. Abbiamo dimostrato, insieme ad un altro gruppo con cui collaboriamo, che l' i(7)(q10) porta in doppia dose la mutazione c.258+2t>c del gene *SBDS* in tutti i pazienti indagati, che erano eterozigoti composti per mutazioni di *SBDS*: dato che la mutazione presente in doppia dose permette la produzione di una certa quantità di proteina SBDS, la nostra osservazione

può spiegare la bassa incidenza di SMD/LMA in questo sottogruppo di pazienti.

- Una prognosi piuttosto buona per quel che riguarda il rischio di SMD/LMA è stata proposta anche per la int del(20) quando è presente quale unica anomalia, a differenza di quanto ritenuto per le altre anomalie cromosomiche descritte nel MO dei pazienti SDS. Abbiamo potuto provare che tutte le delezioni implicano la perdita del gene *EIF6*, che è importante nella biogenesi dei ribosomi ed interagisce con la proteina SBDS. Abbiamo proposto che la prognosi benigna sia dovuta ad effetto di dosaggio genico per la proteina eIF6 nelle cellule del clone anomalo nel MO: la quantità diminuita di eIF6 faciliterebbe la biogenesi dei ribosomi in queste cellule, con una sorta di meccanismo di salvataggio innescato dalla perdita acquisita di materiale cromosomico.
- Il follow-up citogenetico prolungato della nostra coorte of pazienti ci ha permesso alcune conclusioni di carattere generale, di importanza sia teorica che pratica:
 - Un'osservazione confermatrice concerne i casi senza modificazioni del quadro citogenetico durante il follow-up: il clone iniziale con l'i(7)(q10) può essere presente in una minoranza o in una maggioranza delle cellule del MO per anni, nella maggior parte dei casi senza evoluzione in SMD/LMA, e può anche regredire; ciononostante, alcuni casi con uno sviluppo francamente maligno sono stati descritti.
 - Un dato interessante è costituito dal fatto che in nessun caso con i(7)(q10) ha avuto luogo un'evoluzione clonale: anomalie addizionali non sono mai state osservate nel clone con l'i(7)(q10).
 - Il comportamento del clone anomalo con la int del(20) nel corso degli anni era esattamente lo stesso: decorso indolente con numero fluttuante di cellule anomale, nessuna evoluzione maligna, nessuna evoluzione citogenetica clonale.
 - I cambiamenti del quadro citogenetico del MO durante il follow-up hanno luogo con l'acquisizione di anomalie differenti da quella trovata inizialmente in cloni indipendenti. Questa evoluzione ha avuto luogo in otto dei nostri pazienti, e, considerando 14 casi simili reperiti in una revisione completa della letteratura, abbiamo potuto raggiungere conclusioni che non erano state mai espresse chiaramente in letteratura e che sono di importanza fondamentale nella valutazione prognostica dei pazienti con SDS, in relazione al rischio di sviluppare SMD/LMA e aplasia midollare.

Prodotti del Progetto di Ricerca:

I risultati del progetto di ricerca sono stati inclusi in pubblicazioni scientifiche su riviste di elevato livello scientifico, con sistema di peer-review, ed in comunicazioni a Congressi Internazionali e Nazionali, anche su invito. In particolare nel periodo 2009-2011 il nostro gruppo ha partecipato e portato contributi al 5°, 6° e 7° Congresso Internazionale sulla sindrome di Shwachman-Diamond. In tutti i prodotti, pubblicazioni su riviste e comunicazioni a congressi, è stato citato esplicitamente il contributo dell'Associazione Italiana Sindrome di Shwachman (AISS).

Pubblicazioni:

Minelli A, Maserati E, Nicolis E, Zecca M, Sainati L, Longoni D, Lo Curto F, Menna G, Poli F, De Paoli E, Cipolli M, Locatelli F, Pasquali F, Danesino C: The isochromosome i(7)(q10) carrying c.258+2t>c mutation of the *SBDS* gene does not promote development of myeloid malignancies in patients with Shwachman syndrome. *Leukemia*, 23:708-11, 2009

Maserati E, Pressato B, Valli R, Minelli A, Sainati L, Patitucci F, Marletta C, Mastronuzzi A, Poli F, Lo Curto F, Locatelli F, Danesino C, Pasquali F: The route to development of myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukaemia in Shwachman-Diamond syndrome: the role of ageing, karyotype instability, and acquired chromosome anomalies. *Br J Haematol*, 145:190-197, 2009

Pressato B, Marletta C, Montalbano G, Valli R, Maserati E: Improving the definition of the structure of the isochromosome i(7)(q10) in Shwachman-Diamond Syndrome. *Br J Haematol*, 150:632-633, 2010.

Valli R, Marletta C, Pressato B, Montalbano G, Lo Curto F, Pasquali F, Maserati E: Comparative genomic hybridization on microarray (a-CGH) in constitutional and acquired mosaicism may detect as slow as 8% abnormal cells. *Molecular Cytogenetics* 4:13, 2011.

Valli R, Maserati E, Marletta C, Pressato B, Lo Curto F, Pasquali F: Evaluating chromosomal mosaicism by array comparative genomic hybridization in haematological malignancies: the proposal of a formula. *Cancer Genet*, 204:216-218, 2011.

Pressato B, Valli R, Marletta C, Mare L, Montalbano G, Lo Curto F, Pasquali F, Maserati E: Deletion of chromosome 20 in bone marrow of patients with Shwachman-Diamond syndrome, loss of the *EIF6* gene and benign prognosis. *Br J Haematol* 157:503-505, 2012.

Noris P, Valli R, Pecci A, Marletta C, Invernizzi R, Mare L, Balduini CL, Maserati E.: Clonal chromosome anomalies affecting *Fli1* mimic inherited thrombocytopenia of the Paris-Trousseau type. *Eur J Haematol* 89:345-349, 2012.

Minelli A, Danesino C, Nicolis E, Cannioto Z, Longoni D, Perobelli S, Cipolli M, Pasquali F, Sainati L, Poli F: Incidence of Shwachman-Diamond syndrome. *Pediatr Blood Cancer* 59:1334-1335, 2012.

Marletta C, Valli R, Pressato B, Mare L, Montalbano G, Menna G, Loffredo G, Bernardo ME, Vinti L, Ferrari S, Di Cesare-Merlone A, Zecca M, Lo Curto F, Locatelli F, Pasquali F, Maserati E: Chromosome anomalies in bone marrow as primary cause of aplastic or hypoplastic conditions and peripheral cytopenia: disorders due to secondary impairment of *RUNX1* and *MPL* genes. *Mol Cytogenet* 5:39, 2012.

André V, Longoni D, Bresolin S, Cappuzzello C, Dander E, Galbiati M, Bugarin C, Di Meglio A, Nicolis E, Maserati E, Serafini M, Warren AJ, te Kronnie G, Cazzaniga G, Sainati L, Cipolli M, Biondi A, D'Amico G: Mesenchymal stem cells from Shwachman-Diamond syndrome patients display normal functions and do not contribute to hematological defects. *Blood Cancer J.* 2012 doi:10.1038/bcj.2012.40

Contributi a Congressi:

Danesino C, Minelli A, De Paoli E, Maserati E, Lo Curto F, Pasquali F, Nicolis E, Cipolli M, Zecca M, Locatelli F, Sainati L, Longoni D, Menna G, Poli F: i(7)(q10) carrying c.258+2T>C mutation and risk of myeloid malignancies in patients with SDS. 5th International Congress on Shwachman-Diamond Syndrome, Amsterdam, The Netherlands, June 19-20, 2009, abstracts, p. 49, 2009.

Pressato B, Valli R, Marletta C, Sainati L, Minelli A, Locatelli F, Lo Curto F, Danesino C, Pasquali F, Maserati E: Age related acquisition of clonal chromosome anomalies in bone marrow cells of SDS patients. 5th International Congress on Shwachman-Diamond Syndrome, Amsterdam, The Netherlands, June 19-20, 2009, abstracts, p. 56, 2009.

Valli R, Marletta C, Pressato B, Lo Curto F, Maserati E, Pasquali F: The degree of karyotype instability in SDS evaluated by a-CGH is higher than previously established. 5th International Congress on Shwachman-Diamond Syndrome, Amsterdam, The Netherlands, June 19-20, 2009, abstracts, p. 58, 2009.

Pasquali F, Valli R, Pressato B, Marletta C, Morerio C, Zecca M, Panarello C, Lo Curto F, Maserati E: Karyotype instability evaluated by array-CGH and risk of myeloid malignancy in Shwachman Diamond syndrome. 7th European Cytogenetics Conference, Stockholm, July 4-7, 2009, Abstracts, *Chromosome Res* 17 (suppl 1):S136, 2009.

Minelli A, Maserati E, Pressato B, Valli R, Marletta C, Zecca M, Longoni D, Locatelli F, Pasquali F, Danesino C: Sindrome di Shwachman: anomalie cromosomiche clonali nel midollo osseo e differenziamento della linea mieloide. 12° Congresso Nazionale SIGU, Torino, 8-10 Novembre 2009, Abstracts, n 390, 2009.

Pressato B, Valli R, Marletta C, De Paoli E, Scuvera G, Sainati L, Minelli A, Locatelli F, Lo Curto F, Danesino C, Pasquali F, Maserati E: Acquisizione di anomalie cromosomiche clonali nel midollo osseo di pazienti con sindrome di Shwachman Diamond in relazione all'età. 12° Congresso Nazionale SIGU, Torino, 8-10 Novembre 2009, Abstracts, n 391, 2009.

Cannioto Z, Poli F, Cipolli M, Danesino C, Longoni D, Minelli A, Nicolis E, Pasquali F, Perobelli S, Sainati L: Italian registry of SDS: clinical and epidemiological features. 6th International Congress on Shwachman-Diamond Syndrome, New York, June 28-30, 2011, abstracts, pp. 3-4, 2011.

Danesino C, Fergnani V, Nicolis E, Cannioto Z, Longoni D, Perobelli S, Maserati E, Pasquali F, Sainati L, Poli F, Cipolli M, Minelli A: Incidence of Shwachman-Diamond syndrome in Italy. 6th International Congress on Shwachman-Diamond Syndrome, New York, June 28-30, 2011, abstracts, pp. 5-6, 2011.

Maserati E, Pressato B, Marletta C, Valli R, Mare L, Montalbano G, Lo Curto F, Pasquali F: The use of microarray-based comparative genomic hybridization (a-CGH) to detect and define chromosome imbalances in the bone marrow of SDS patients. 6th International Congress on Shwachman-Diamond Syndrome, New York, June 28-30, 2011, abstracts, pp. 9-10, 2011.

Minelli A, Maserati E, Pressato B, Valli R, Zecca M, Longoni D, Sainati L, Cipolli M, Poli F, Cannioto Z, Zavras N, Pasquali F, Danesino C: Clonal bone marrow cytogenetic abnormalities in SDS patients persist in peripheral blood mature cells. 6th International Congress on Shwachman-Diamond Syndrome, New York, June 28-30, 2011, abstracts, pp. 11-12, 2011.

Di Meglio A, Leszl A, Maserati E, Pasquali F, Cipolli M, Danesino C, Longoni D, Minelli A, Nicolis E, Poli F, Sainati L, Tridello G, Basso G, Biondi A, Fenu S, Francescato S, Zecca M: Shwachman-Diamond syndrome (SDS): results of an Italian cytogenetic and haematological multicentric study (1997-2007). 8th European Cytogenetics Conference, Porto, July 2-5, 2011, abstracts, Chromosome Res 19 (suppl 1):S156, 2011.

Minelli A, Fergnani V, Nicolis E, Cannioto Z, Longoni D, Perobelli S, Maserati E, Pasquali F, Sainati L, Poli F, Cipolli M, Danesino C: Incidenza della sindrome di Shwachman-Diamond in Italia. 14° Congresso Nazionale SIGU, Milano, 13-16 Novembre 2011, Abstracts, n 150, 2011.

Valli R, Pressato B, Marletta C, Mare L, Montalbano G, Zecca M, Loffredo G, Lo Curto F, Pasquali F, Maserati E: Le anomalie cromosomiche nel midollo come causa primaria di aplasia o ipoplasia a rischio di mielodisplasia e leucemia acuta: coinvolgimento del gene *RUNX1*. 14° Congresso Nazionale SIGU, Milano, 13-16 Novembre 2011, Abstracts, n 393, 2011.

Marletta C, Pressato B, Valli R, Mare L, Montalbano G, Lo Curto F, Pasquali F, Maserati E: L'utilizzo della comparative genomic hybridization su microarray (a-CGH) per rilevare e definire sbilanci cromosomici nel midollo osseo di pazienti affetti dalla sindrome di Shwachman-Diamond. 14° Congresso Nazionale SIGU, Milano, 13-16 Novembre 2011, Abstracts, n 394, 2011.

Pasquali F, Pressato B, Valli R, Marletta C, Mare L, Montalbano G, Zecca M, Di Cesare-Merlone A, Noris P, Lo Curto F, Balduini C, Maserati E: Le anomalie cromosomiche nel midollo come causa primaria di aplasia o ipoplasia a rischio di mielodisplasia e leucemia acuta: coinvolgimento dei geni *FLI1* e *MPL*. 14° Congresso Nazionale SIGU, Milano, 13-16 Novembre 2011, Abstracts, n 395, 2011.

Maserati E: Cytogenetic and molecular determinants of transformation in SDS. EHA-SWG Scientific Meeting, Focus on neutropenia & other genetic marrow failures, Genova, September 14-16, 2012, abstracts, p. 35, 2012.

Valli R, Pressato B, Marletta C, Mare L, Montalbano G, Lo Curto F, Pasquali F, Maserati E: Delezione interstiziale clonale del cromosoma 20 nel midollo osseo di pazienti con sindrome di Shwachman-Diamond: perdita del gene eif6 e prognosi favorevole. 15° Congresso Nazionale SIGU, Sorrento, 21-24 Novembre 2012, Abstracts, P376, 2012.

Pressato B, Valli R, Marletta C, Mare L, Montalbano G, Marenghi L, Lo Curto F, Pasquali F, Maserati E: Monitoraggio citogenetico nella sindrome di Shwachman-Diamond: valore prognostico delle anomalie clonali midollari. 15° Congresso Nazionale SIGU, Sorrento, 21-24 Novembre 2012, Abstracts, P382, 2012.