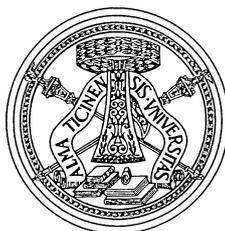


UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PAVIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE PEDIATRICHE
E
PATOLOGIA UMANA ED EREDITARIA

SEZIONE DI BIOLOGIA GENERALE E GENETICA MEDICA



PROGETTO DI RICERCA

Definizione del momento di insorgenza della mutazione somatica responsabile della Leucemia Mielomonocitica Giovanile (JMML) nel corso della maturazione della cellula staminale ematopoietica

Dott.ssa Paola De Filippi

Progetto di ricerca: “Definizione del momento di insorgenza della mutazione somatica responsabile della Leucemia mielomonocitica giovanile (JMML) nel corso della maturazione della cellula staminale ematopoietica”

Basi scientifiche del progetto

La JMML è una rara forma di disordine clonale mieloproliferativo e mielodisplastico che si sviluppa in bambini di età inferiore ai 5 anni, con un rapporto maschio-femmina di 2:1. L'incidenza annuale di questa patologia è di circa 4/1000000 e rappresenta il 2% di tutte le leucemie diagnosticate annualmente.

In media la diagnosi viene fatta all'età di due anni, anche se nel 10% dei casi viene diagnosticata nei primi tre mesi di vita.

I sintomi clinici più comuni sono: febbre, pallore, epatomegalia e linfadenopatia, leucocitosi, monocitosi, presenza di blasti circolanti, elevati livelli di emoglobina fetale (HbF) e ipersensibilità dei progenitori mieloidi al fattore stimolante la formazione di colonie granulocito- macrofagiche (GM-CSF); il 25% dei pazienti presenta monosomia 7 (45XY/XX,-7), il 65% dei pazienti ha un cariotipo normale, mentre il restante 10% ha altre alterazioni cromosomiche.

Diversamente dai soggetti normali, nei progenitori provenienti dal sangue dei pazienti affetti da JMML predominano macrofagi e monociti. È da notare tuttavia che in un campione di sangue periferico è possibile trovare cellule di tutta la linea differenziativa dei monociti, ossia blasti, promonociti, monociti e macrofagi. Questa caratteristica indica che la JMML non è una patologia indotta da un blocco completo della differenziazione ematopoietica (come osservato nelle leucemie acute) bensì il risultato di un errore nel pathway di differenziazione dei monociti durante l'ematopoiesi.

La JMML è dovuta a mutazioni somatiche a carico dei geni *PTPN11*, *NRAS* o *KRAS*, *NF1* e *CBL*.

Mutazioni somatiche a carico di *PTPN11* sono state osservate nel 35% dei casi di JMML, queste mutazioni determinano un guadagno di funzione e avvengono a livello dell'esone 3 (circa il 90% dei casi) o a livello dell'esone 13 (circa il 10% dei casi). Mutazioni costituzionali a carico di *PTPN11* causano la *sindrome di Noonan* (OMIM 163950), una patologia geneticamente eterogenea, a trasmissione autosomica dominante caratterizzata da dismorfismo facciale, bassa statura e difetti cardiaci. Ha un'incidenza compresa fra 1/1000-2500 nati vivi. È causata nel 50% dei casi da

mutazioni missenso che comportano un guadagno di funzione e che sono quindi la base molecolare della patologia.

Mutazioni somatiche puntiformi a carico dei geni *NRAS* e *KRAS* sono state trovate nel 20% dei casi di JMML e coinvolgono i codoni 12 e 13 (esone 1) e il codone 61 (esone 2). Il risultato di queste alterazioni è la produzione di una proteina Ras permanentemente attiva.

Il 15% dei pazienti affetti da JMML possono presentare alterazioni a livello del gene *NFI* che è composto da 57 esoni e che codifica per la proteina neurofibromina.

Mutazioni costituzionali a carico di *NFI* causano la *Neurofibromatosi di tipo 1*, una patologia a trasmissione autosomica dominante con una frequenza pari a 1/4000 nati vivi a penetranza completa e con un alto tasso di mutazione dato che il 30-50% dei pazienti affetti da neurofibromatosi presentano nuove mutazioni.

Individui affetti da *Neurofibromatosi* hanno un aumentato rischio di sviluppare disordini mieloidi come la JMML. Questi pazienti presentano una mutazione germinale a carico di un allele di *NFI*, mentre l'altro è normale; affinché sviluppino la JMML è necessario però che avvenga un secondo "hit" somatico a carico dell'altro allele wild-type.

Mutazioni somatiche a carico degli esoni 8 e 9 in *CBL* sono riportate in associazione a disordini mieloproliferativi; circa il 20% dei pazienti affetti da JMML presenta mutazioni in questo gene.

Attività di ricerca (piano sperimentale)

Abbiamo intenzione di proseguire l'attività diagnostica per i pazienti affetti da JMML analizzando i geni *PTPN11*, *NRAS*, *KRAS* e *CBL*. Per quanto riguarda *NFI*, la dimensione del gene (57 esoni) ne preclude l'analisi di routine, in particolare in una situazione in cui mutazioni somatiche clonali possono essere presenti in cloni di piccole dimensioni; siamo tuttavia attrezzati per l'eventuale analisi di sequenze microsatelliti intrageniche per l'identificazione di grosse delezioni/inserzioni. La attività diagnostica sarà la base su cui inserire il progetto di ricerca.

La presenza di mutazioni somatiche in pazienti JMML è oramai un dato di fatto supportato da numerosi dati di letteratura; rimane tuttavia ancora da chiarire il momento differenziativo in cui tale mutazione insorga.

L'emopoiesi prevede la formazione e la maturazione di tutti i tipi di cellule del sangue a partire da una cellula staminale multipotente. Una *cellula staminale ematopoietica multipotente* dà origine ad un *progenitore mieloide comune* e ad un *progenitore linfoide comune*. I primi daranno origine a trombociti, eritrociti, granulociti e monociti; i secondi ai linfociti.

Abbiamo quindi intenzione di cercare di valutare se la mutazione somatica associata allo sviluppo di JMML sia limitata ai monociti ed ai loro precursori o possa essere osservata anche in altri tipi cellulari (linea linfoide).

In collaborazione con il Dott. Marco Zecca (Direttore della Oncoematologia Pediatrica, Fondazione IRCCS San Matteo, Pavia) abbiamo intenzione di ottenere campioni di sangue periferico in occasione dei regolari controlli ematologici previsti per questi pazienti, per analizzare popolazioni cellulari specifiche quali linea linfoblastoide T, linea linfoblastoide B, monociti, colonie CFU-GM e colonie a lungo termine e colonie eritroidi. L'allestimento delle popolazioni cellulari soprariportate viene effettuato grazie alla collaborazione con il Dott. Vittorio Rosti (Unità di Epidemiologia Clinica, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia) e il Dott. Carmelo Carlo Stella (Oncologia medica, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale Tumori, Milano).

Tali popolazioni cellulari sono state selezionate in modo da valutare diversi momenti della differenziazione della cellula staminale ematopoietica.

Nostri dati preliminari indicano che la mutazione somatica nei pazienti JMML non avviene sempre nello stesso momento differenziativo, non sono sempre coinvolti gli stessi tipi cellulari ed insorge più precocemente di quanto pensato. E' tuttavia da valutare se l'insorgenza più o meno precoce della mutazione possa avere una certa influenza sul decorso clinico della malattia in modo tale da identificare pazienti con una storia clinica più o meno aggressiva.

Abbiamo inoltre intenzione, quando possibile, di estendere lo studio anche a colonie endoteliali, fibroblasti e tampone buccale per valutare la natura costituzionale della mutazione identificata.

Il programma di lavoro si svilupperà secondo queste fasi:

- Continuare l'attività diagnostica su nuovi casi.
- Una volta identificata la mutazione in un paziente, al successivo controllo, estendere lo studio a tutti i tipi cellulari/colonie soprariportati.
- Dopo avere identificato il momento di insorgenza della mutazione somatica, valutare la ipotesi di una possibile natura costituzionale della stessa.

- Nei casi in cui fosse identificata una mutazione costituzionale, estendere lo studio ai genitori per verificare che si tratti di una mutazione “de novo”.
- Una volta acquisiti i dati sul momento di origine delle mutazioni somatiche in un congruo numero di pazienti, verificare la possibilità di stabilire correlazioni tra il dato biologico (momento differenziativo in cui insorge la mutazione somatica) il conseguente interessamento delle varie popolazioni cellulari e parametri clinici quali il decorso della malattia.

Considerata la rarità della malattia, riteniamo che ottenere questi dati su un campione di 10-15 pazienti, campione minimo per poter valutare in modo appropriato correlazioni clinico biologiche, possa richiedere un lavoro di uno-due anni.

Al termine del lavoro avremo comunque raccolto un cospicuo numero di campioni di DNA di pazienti selezionati con mutazione nota che potrà essere oggetto di ulteriori studi futuri per l'identificazione di fattori genetici rilevanti per il management della malattia.

Attrezzature disponibili e metodi utilizzati

Le metodiche per lo studio di tali mutazioni sono già in atto da tempo presso il nostro laboratorio e prevedono l'amplificazione attraverso reazioni di PCR degli esoni di interesse ed il successivo sequenziamento diretto.

Il nostro laboratorio è dotato di quattro termociclatori (il più recente dei quali è predisposto per l'estensione alla reazione di realtime PCR), quattro apparecchi per l'elettroforesi, due minicentrifughe ed una centrifuga da banco, due termoblocchi ed una centrifuga refrigerata.

La reazione di sequenziamento sarà completata presso la “BMR Genomics di Padova”, sugli amplificati allestiti nel nostro laboratorio.

Pavia, 03 maggio 2011

Dott.ssa Paola De Filippi