



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PAVIA
DIPARTIMENTO DI MEDICINA MOLECOLARE

Biologia Generale e Genetica Medica
Via Forlanini, 14
27100 PAVIA

tel 0382 987729 (segreteria dipartimento)
0382 987521 (segreteria sezione)
0382 987519 (laboratorio)
fax 0382 525030

Attività di Ricerca 2011-2012. Dott.ssa Paola De Filippi

JMML (Leucemia Mielomonocitica Giovanile).

La JMML (OMIM 607785) 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 4×10^{-6} 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)

La JMML è dovuta a mutazioni somatiche a carico dei geni *PTPN11* (35%; *Esoni 3 e 13*), *NRAS* o *KRAS* (20%; *esoni 1 e 2*), *NF1* (15%) e *CBL* (22,6%; *esoni 8 e 9*).

L'EWOG-MDS ha definito dei criteri diagnostici ritenuti necessari e sufficienti per formulare una diagnosi di JMML.

Per il 70% dei pazienti la diagnosi viene fatta sulla base di:

- manifestazioni cliniche quali: epatomegalia, linfadenopatia, pallore, febbre e rash cutaneo;
- dati ematologici quali: monocitosi $>1000/\mu\text{l}$ e presenza di blasti $< 20\%$;
- **analisi di mutazione genica a carico di PTPN11 / RAS/NF1;**
- diagnosi clinica di NF1 o monosomia 7.

È quindi chiaro come l'analisi genetica svolga un ruolo chiave nel processo diagnostico nella JMML.

Il restante 30% dei pazienti, che non mostra mutazioni note nei geni indicati o monosomia 7, ma presenta comunque il quadro clinico e morfologico di JMML, deve soddisfare altre due condizioni prima di poter essere considerati affetti da tale disordine:

- assenza di traslocazione bcr/abl (cromosoma Philadelphia)
- crescita spontanea o ipersensibilità dei progenitori mieloidi a GM-CSF in vitro.



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PAVIA
DIPARTIMENTO DI MEDICINA MOLECOLARE

Biologia Generale e Genetica Medica
Via Forlanini, 14
27100 PAVIA

tel 0382 987729 (segreteria dipartimento)
0382 987521 (segreteria sezione)
0382 987519 (laboratorio)
fax 0382 525030

L'attività svolta nel laboratorio di Genetica Medica – Dipartimento di Medicina Molecolare dell'Università di Pavia coordinato dal Prof. Cesare Danesino, prevede l'analisi dei geni implicati nella JMML (PTPN11, NRAS, KRA e CBL) per la ricerca della mutazione somatica responsabile della patologia in pazienti con sospetto diagnostico di JMML.

A causa della natura somatica della mutazione, il materiale su cui si basano i nostri studi è costituito da campioni di DNA estratto da cellule mononucleate di sangue periferico.

Il protocollo di studio prevede l'amplificazione dei geni coinvolti nella JMML attraverso reazioni di PCR (Polymerase chain reaction). Il prodotto amplificato è quindi sottoposto ad un processo di purificazione e successiva reazione di sequenziamento.

Nel corso di questo ultimo anno sono giunti al nostro laboratorio un totale di 27 nuovi campioni di DNA di pazienti con sospetta diagnosi di JMML. Undici sono risultati essere portatori di una mutazione somatica nel gene PTPN11 (10 nell'esone 3 ed 1 nell'esone 13); un paziente è portatore di una mutazione in NRAS (esone 2); un paziente presenta una mutazione in KRAS (esone 1) ed un paziente è portatore di una mutazione nell'esone 8 di CBL. Per i rimanenti 13 pazienti non sono state individuate alterazioni.

Tutte le mutazioni individuate sono riportate in letteratura in associazione a JMML.

Per alcuni di questi pazienti è stato analizzato anche un campione di DNA estratto da tampone buccale per escludere/confermare la natura costituzionale della mutazione identificata.

Due pazienti sono giunti al nostro laboratorio con sospetto diagnostico di Sindrome di Noonan e JMML. L'analisi di mutazione in questi pazienti ha evidenziato l'alterazione c.218C>T nell'esone 3 di PTPN11. La mutazione è stata poi confermata su un campione di DNA da tampone buccale. Pazienti affetti da S. di Noonan portatori di tale mutazione hanno un rischio aumentato di sviluppare anche una JMML.



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PAVIA
DIPARTIMENTO DI MEDICINA MOLECOLARE

Biologia Generale e Genetica Medica
Via Forlanini, 14
27100 PAVIA

tel 0382 987729 (segreteria dipartimento)
0382 987521 (segreteria sezione)
0382 987519 (laboratorio)
fax 0382 525030

Un caso particolare che è giunto alla nostra attenzione nel corso di quest'anno riguarda due gemelli monozigoti affetti da JMML e portatori di una alterazione cromosomica a carico del cromosoma 7, ma con profili di espressione genica (GEP signature) differenti. L'analisi di sequenza ha permesso identificare la mutazione E76G nell'esone 3 di PTPN11 in entrambi i gemelli.

Lo studio su campioni di DNA estratti da sangue periferico dei genitori non ha evidenziato alterazioni. Sono stati quindi utilizzati dei marcatori STR (Short Tandem Repeat) per lo studio dell'origine parentale del cromosoma 7 alterato. In collaborazione con i colleghi di Padova (SSD Clinica Sperimentale-Ematologia, Dipartimento di Pediatria, Università di Padova) sono stati studiati con la tecnica dell'NGS (Next Generation Sequencing) campioni di DNA estratti da popolazioni cellulari diverse in modo da cercare di studiare la patogenesi della malattia. I risultati ottenuti a Padova sono stati quindi confrontati con quelli ottenuti da noi con il sequenziamento Sanger.

Il lavoro ed i risultati ottenuti sono stati raccolti in un paper che verrà a breve sottoposto per la pubblicazione ad una rivista scientifica internazionale ed è stato accettato come breve comunicazione orale al 6th International Symposium EWOG MDS che si terrà a Praga il 7-9 Novembre 2012 dal titolo:

A Case of Two Monozygotic Twins with Concordant Juvenile Myelomonocytic Leukemia in the Era of New Genomic Technologies: Insight in the Course of the Disease

Silvia Bresolin¹, Paola De Filippi², Claudia Cagioni², Annamaria Di Meglio⁶, Anna Leszl¹, Chiara Frasson⁶ Simone Cesaro³, Giuseppe Basso¹, Marco Zecca⁴, Cesare Danesino²⁻⁵ and Geertruy te Kronnie¹

1. SSD Clinica Sperimentale-Ematologia, Dipartimento di Pediatria, Università di Padova, Italy
2. Dipartimento di Medicina Molecolare, Università degli Studi di Pavia, Pavia, Italy
3. Oncoematologia Pediatrica, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata Verona, Verona, Italy
4. Oncoematologia Pediatrica, Fondazione IRCSS Policlinico San Matteo di Pavia, Pavia, Italy
5. Fondazione IRCSS Policlinico San Matteo di Pavia, Pavia, Italy



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PAVIA
DIPARTIMENTO DI MEDICINA MOLECOLARE

Biologia Generale e Genetica Medica
Via Forlanini, 14
27100 PAVIA

tel 0382 987729 (segreteria dipartimento)
0382 987521 (segreteria sezione)
0382 987519 (laboratorio)
fax 0382 525030

6. SSD Clinica Sperimentale-Ematologia, Dipartimento di Pediatria, Università di Padova, Italy –
Fondazione Città della Speranza

Introduction and Objectives

Juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) is a rare early childhood disorder characterized by excessive proliferation of myelomonocytic cells and hypersensitivity to GM-CSF in culture. About 85-90% of patients harbor mutations in the RAS signaling pathway and 25% show monosomy of chromosome 7.

We report on a pair of monoplacental monozygotic twins concordant for JMML with *PTPN11* mutation and partial (der(7)) or total loss (-7) of chromosome 7 within 4 months from each other.

Methods

Mutations were searched for using 454 Roche Next Generation Sequencing and validated by Sanger sequencing in bone marrow (BM), peripheral blood (PB) fibroblast, oral swabs and hair bulbs of both twins. In the same BM samples der(7)/-7 were analyzed using conventional cytogenetic/FISH/arrayCGH and STR. To detect mutations and STR of chromosome 7 in hematopoietic lineages were analyzed sorted cells from BM and PB of both patients; patients parents were also analyzed. Gene expression analysis (GEP) was also performed at diagnosis of both twins using Affymetrix HG U133 Plus 2.0 arrays.

Results

The same *PTPN11* mutation (E76G) was found in both twins in BM and PB. Karyotypes were : twin_01: 45,XY,-7[1]/46,XY,der(7)del(7)(p11.2)del(7)(q11.1)[6]/46,XY[1]; twin_02 45,XY,-7[15]/46,XY,der(7)del(7)(p11.2)del(7)(q11.1)[3]/46,XY[3]. STR analysis revealed that the loss of chromosome 7 material is of maternal origin in both twins. No mutations or STR of chromosome 7 were detected in fibroblast, hair bulbs, mesenchymal cells and patients parents', thus excluding a germline origin of the disease. Presence of *PTPN11* mutations and loss of material from chromosome 7 in oral swabs follow the course of disease. Remarkably, amplicon deep sequencing analysis of sorted hematopoietic cells shows a scenario of mosaicism with various percentages of normal and abnormal cells..

GEP analysis of the twins identified two different signatures: an AML-like signature in twin_01 and non AML-like signature in twin_02 . The distinct GEP signatures predicted a different course of



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PAVIA
DIPARTIMENTO DI MEDICINA MOLECOLARE

Biologia Generale e Genetica Medica
Via Forlanini, 14
27100 PAVIA

tel 0382 987729 (segreteria dipartimento)
0382 987521 (segreteria sezione)
0382 987519 (laboratorio)
fax 0382 525030

disease for the twins. Indeed, twin_01 presented a more aggressive disease (relapsed at 8 months after HSCT), whereas twin_02 had a less aggressive disease (in remission at (time) months after HSCT).

Discussion

We suggest that mutation of *PTPN11* and maternal der(7)/-7 occurred as two concurrent prenatal events and concordance of the leukemia in both monoplacental twins may be attributed to the high probability of vascular anastomoses within the common placenta. Remarkably, the different GEP signatures at diagnosis predicted the observed large divergence in the clinical course of the disease, in twins sharing most other biological features.

Dott. Marco Zecca - Oncoematologia Pediatrica, Fondazione IRCSS Policlinico San Matteo di Pavia

Dott.ssa Paola De Filippi – Genetica Medica – Dipartimento di Medicina Molecolare, Università di Pavia

Prof. Cesare Danesino– Genetica Medica – Dipartimento di Medicina Molecolare, Università di Pavia