



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

Dr. Paola De Filippi
Attività di Ricerca 2013

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; l'incidenza annuale di questa patologia è di circa 4×10^{-6} e rappresenta il 2% di tutte le leucemie diagnosticate annualmente.

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

Nella maggior parte dei casi, il materiale su cui si basano i nostri studi è costituito da campioni di DNA estratto da cellule mononucleate di sangue periferico o da campioni di DNA estratti da un prelievo di sangue midollare.

Il protocollo di studio prevede l'amplificazione dei geni coinvolti nella JMML attraverso reazioni di PCR (Polymerase chain reaction) e successiva reazione di sequenziamento.

Grazie alla Borsa di Studio della Fondazione Rebuffat, ho potuto continuare l'attività di ricerca relativa allo studio di mutazioni in pazienti con sospetto diagnostico di JMML.

Nel corso di questo ultimo anno sono giunti al nostro laboratorio un totale di 10 nuovi campioni di DNA di pazienti con sospetta diagnosi di JMML: 1 paziente è risultato essere portatore di una mutazione somatica nel gene *CBL*, 4 pazienti presentano mutazioni somatiche a carico dei geni *NRAS* o *KRAS* mentre non sono state identificate mutazioni nei rimanenti 5 pazienti. Le mutazioni individuate sono riportate in letteratura in associazione a JMML ad eccezione di quelle identificate in due pazienti (*KRAS*). In questi pazienti, la "posizione" della mutazione è "tipica" delle JMML, ma il cambiamento di base non è stato riportato in letteratura. Per questi casi abbiamo analizzato campioni di DNA estratti da tamponi buccali o fibroblasti per escludere/confermare la natura costituzionale della mutazione identificata. In entrambi i casi le mutazioni sono risultate essere assenti in questi campioni.

Durante questo anno è stato inoltre necessario lo svolgimento di approfondimenti molecolari sul caso dei due gemelli monozigoti affetti da JMML e portatori di una alterazione cromosomica a carico del cromosoma 7 già citati nella relazione sull'attività di ricerca del 2011. Il lavoro così ampliato è stato sottoposto per la pubblicazione alla rivista internazionale "International Journal of

Hematology” come paper dal titolo “**Different outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplant in a pair of twins affected by Juvenile Myelomonocytic Leukemia**”. Nel mese di Dicembre 2012 abbiamo avuto la conferma di accettazione per la pubblicazione del lavoro.

Different outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplant in a pair of twins affected by Juvenile Myelomonocytic Leukemia

Simone Cesaro¹, Paola De Filippi², Annamaria di Meglio³, Anna Leszl³, Svetlana Donska⁴, Ada Zaccaron¹, Claudia Cagioni², Roberta Galavotti⁵, Cesare Danesino², Fiorenza Aprili⁶, Chiara Cugno¹, Geertruy te Kronnie³, Marco Zecca⁷, Silvia Bresolin³

1 Pediatric Hematology Oncology, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata, Verona, Italy;

2 Medical Genetics, Department of Molecular Medicine, University of Pavia, Italy;

3 Pediatric Hematology Oncology, Department of Pediatrics, University of Padova, Italy;

4 Pediatric Hematology Oncology, Children Hematology Center, Okhmatdet Hospital, Kiev, Ukraine;

5 Department of Life Science and Reproduction, University of Verona, Italy;

6 Cytogenetics, Department of Pathology and Diagnostics, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata, Verona, Italy;

7 Pediatric Hematology Oncology, Department of Pediatrics, IRCS San Matteo, Pavia, Italy.

Abstract

A twin pair affected by juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) with the same somatic *PTPN11* mutation and abnormal chromosome 7 in bone marrow samples but distinct prognostic gene expression signatures, received a matched-unrelated-donor and matched-unrelated cord blood transplant, respectively. Both twins fully engrafted but, after 6 months, the twin with an acutemyeloid-like (AML-like) signature at diagnosis rejected the graft and had an autologous reconstitution. A second transplant with an unrelated 5/6-HLA-matched-loci cord blood performed after 4 months from rejection was unsuccessful. After 25 months from diagnosis, the twin with the AML-like gene expression signature died of liver failure while on progression of his JMML. The other twin, who had a non acute-myeloid-like (non AML-like) gene expression signature at diagnosis is in complete hematological remission with full donor chimera. This observation suggests a biological diversity of JMML also in patients with a common genetic background.

Nel corso di quest’anno è stato pubblicato un paper da un gruppo di colleghi giapponesi (Sakaguchi H et al., Nat Genet. 2013 Aug; 45 (8), pp. 937-41) che riporta l’importanza di seconde mutazioni nei geni *JAK3* e *SETBP1* come fattori prognostici sfavorevoli alla progressione della malattia. In collaborazione con la Dott.ssa Silvia Bresolin (Università di Padova), abbiamo deciso di estendere l’analisi di mutazione in pazienti affetti da JMML anche ai geni *JAK3* e *SETBP1*. Il finanziamento avuto dalla Fondazione Rebuffat è stato fondamentale per iniziare gli approfondimenti diagnostici sui 5 pazienti con sospetto diagnostico di JMML non confermato dalle indagini molecolari giunti alla nostra attenzione durante questo ultimo anno. Abbiamo inoltre intenzione di estendere le analisi dei geni *JAK3* e *SETBP1* anche ai pazienti con sospetto diagnostico di JMML non confermato dalle analisi molecolari raccolti negli anni precedenti (circa 40) e successivamente anche ai pazienti con mutazione nota.

Il lavoro cominciato durante questo ultimo anno ha la certezza di essere proseguito anche nel 2014.

Il lavoro complessivo degli ultimi anni di attività è stato riassunto in un poster presentato al “**Terzo workshop AIEOP... in lab**” tenutosi a Pavia ad inizio Ottobre.

Pavia, 13/12/2103

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

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

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