

YOUNG SCIENCE FORUM: IL FUTURO NASCE IN LABORATORIO



Episignature nell'Anemia di Blackfan-Diamond

Dott.ssa Francesca Torchio

S.C. Oncoematologia Pediatrica Ospedale Infantile Regina Margherita

Sindrome di Blackfan-Diamond

Inherited Bone Marrow Failure Syndrome (IBMFS)

- **Aplasia eritroide** (anemia macrocitica, reticolocitopenia)
- **Malformazioni congenite**
- **Aumentato rischio oncologico**

Genetica

- Mutazione identificata nel **70-80% dei casi**
- Mutazioni eterozigoti *loss-of-function* in **geni ribosomali** (70-80%)
- Mutazione eterozigoti in **geni non ribosomali** (es. GATA1, TP53)

TERAPIA

- ★ Supporto trasfusionale cronico + chelazione
- ★ Terapia steroidea
- ★ TCSE

- *Trattamento - indipendenza*

Diagnostic Challenge

Variabilità clinica e limiti dei marcatori

1. **Assenza di diagnosi genetica con test standard:** 20-30 % dei pazienti.
2. **Fenotipo variabile:** individui clinicamente silenti o quadri ematologici lievi.
3. **Assenza di un biomarker diagnostico:** eADA elevata o alterazioni del processamento dell'rRNA sono utili ma non conclusivi.

Episignature e IBMFS

ARTICLE

Identification of a robust DNA methylation signature for Fanconi anemia

Daria Pagliara,^{1,15} Andrea Ciolfi,^{2,15} Lucia Pedace,^{1,15} Sadegheh Haghshenas,^{3,16} Marco Ferilli,^{2,16} Michael A. Levy,³ Evelina Miele,¹ Claudia Nardini,¹ Camilla Cappelletti,² Raissa Relator,³ Angela Pitisci,¹ Rita De Vito,⁴ Simone Pizzi,² Jennifer Kerkhof,³ Haley McConkey,^{3,5} Francesca Nazio,¹ Sarina G. Kant,⁶ Maddalena Di Donato,⁷ Emanuele Agolini,⁷ Marta Matraxia,⁷ Barbara Pasini,⁸ Alessandra Pelle,⁸ Tiziana Galluccio,⁹ Antonio Novelli,⁷ Tahsin Stefan Barakat,^{6,10} Marco Andreani,⁹ Francesca Rossi,¹¹ Cristina Mecucci,¹² Anna Savoia,¹³ Bekim Sadikovic,^{3,5,17} Franco Locatelli,^{1,14,17,*} and Marco Tartaglia^{2,17,*}

LETTERS TO THE EDITOR

Epigenome profiling reveals aberrant DNA methylation signature in GATA2 deficiency

Oskar Marín-Bejar , Damia Romero-Moya , Javier Rodriguez-Ubreva , Maximiliano Distefano , Francesca Lessi , Paolo Aretini , Alessandro Liquori , Julio Castaño , Emilia Kozyra , Lili Kotmayer , Clara Bueno , José Cervera , José Carlos Rodríguez-Gallego , Josep F Nomdedeu , Laura Murillo-Sanjuán , Cristina Díaz de Heredia , Antonio Pérez-Martínez , Félix López-Cadenas , Carolina Martínez-Laperche , Nieves Dorado-Herrero , Francisco M Marco , Felipe Prósper , Pablo Menéndez , David Valcárcel , Esteban Ballestar , Csaba Bödör , Anna Bigas , Albert Catalá , Marcin W Włodarski , Alessandra Giordetti

Vol. 108 No. 9 (2023): September, 2023 <https://doi.org/10.3324/haematol.2022.282305>

- ❖ Studio del profilo di metilazione del DNA → nuovo strumento diagnostico.






American Journal of Hematology

WILEY



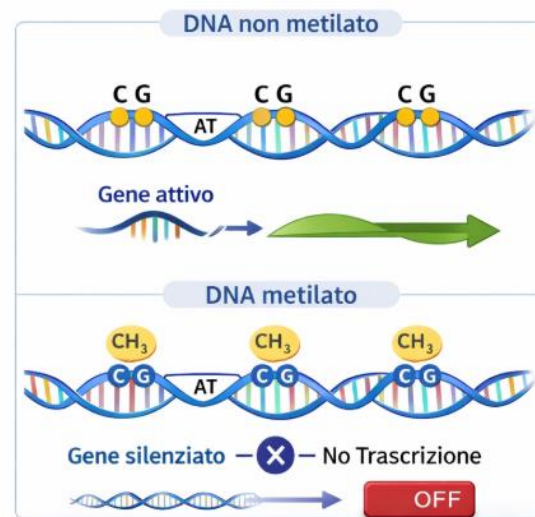
RESEARCH ARTICLE **OPEN ACCESS**

DNA Methylation Episignature as a Novel Diagnostic Tool for Diamond-Blackfan Anemia Syndrome

Paola Quarello^{1,2}  | Karim Karimi³ | Slavica Trajkova⁴ | Emanuela Garelli² | Mehdi Samadieh³ | Emanuela Iovino⁵ | Tommaso Pippucci⁵ | Giovanni Papagni⁶ | Sandra Dalfonso⁶ | Lucia Corrado⁶ | Serena Rizzo^{4,7} | Adriana Carando² | Jennifer Kerkhof^{2,3} | Jessica Rzasas³ | Haley McConkey³ | Michael Levy³ | Marco Zecca⁸ | Francesca Fioredda⁹  | Angelica Barone¹⁰ | Simone Cesaro¹¹ | Maria Gabelli¹² | Francesca Torchio¹ | Giulia Zucchetti¹ | Maria Elena Cantarini¹³ | Paola Corti¹⁴ | Ugo Ramenghi² | Franco Locatelli^{15,16}  | Franca Fagioli^{1,2} | Bekim Sadikovic^{3,17}  | Alfredo Brusco^{4,7} 

Metilazione del DNA

- È uno dei principali meccanismi epigenetici con cui le cellule controllano quali geni vengono **attivati o silenziati**.
- *DNA metiltransferasi (DNMT)*, che catalizza l'aggiunta di un gruppo metile ($-CH_3$) alla **citocina** nel contesto dei **dinucleotidi CpG**.
- Le **regioni CpG** sono tratti di DNA ricchi di coppie citosina-guanina. Quando si concentrano formano le **isole CpG**, spesso localizzate nei **promotori genici**.
- La **metilazione** di queste regioni è spesso associata al **silenziamento trascrizionale**, rappresentando un **meccanismo chiave di regolazione genica** durante sviluppo e differenziamento.



Obiettivi

OBIETTIVO PRIMARIO

- Identificare e validare una nuova e specifica DNAm (DNA methylation) Episignature della DBAS.

OBIETTIVI SECONDARI

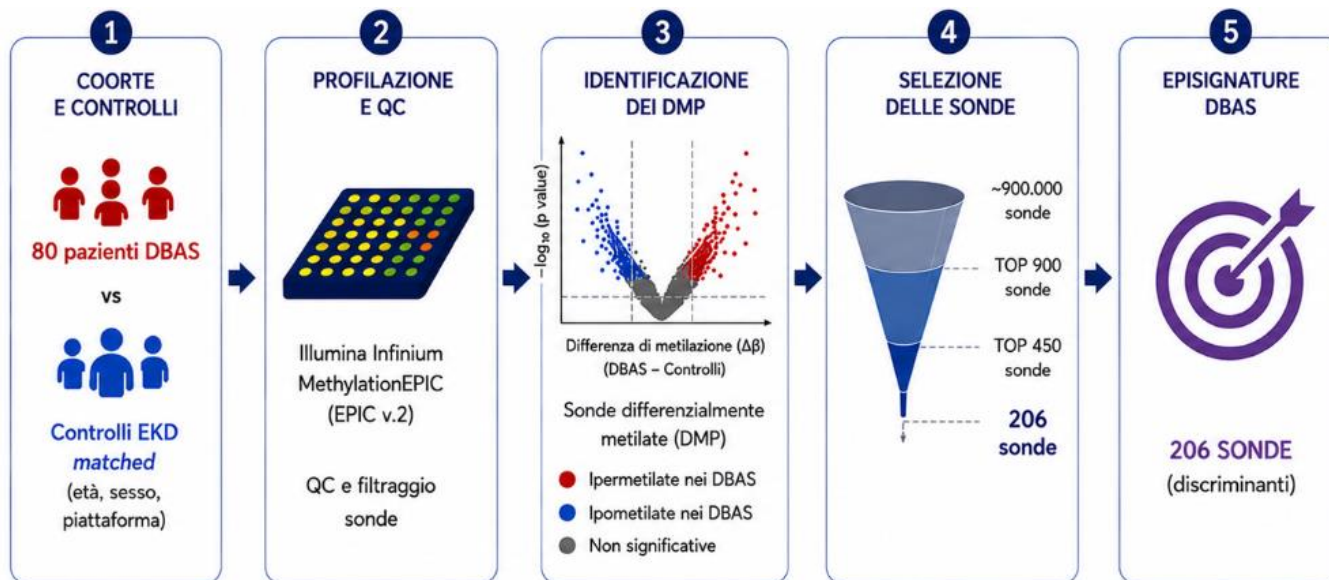
- Verificare la specificità dell'Episignature DBAS ed identificare sub-episignature gene-specifiche.
- Applicare lo studio dell'Episignature a pazienti geneticamente irrisolti o clinicamente revertiti.
- Studiare il significato biologico dell'Episignature.

Popolazione

Coorte complessiva
Totale: 86 pazienti
80 con diagnosi molecolare (varianti LP/P in geni DBAS)
6 pazienti con varianti « gene orphan »

Caratteristiche cliniche coorte 80 pazienti
Sesso: 44 M; 36 F
Età mediana alla diagnosi: 2 mesi (range 0–209)
Malformazioni congenite: 54% (43/80), > cranio-facciali e arti superiori
Terapia steroidea: 82,5% (66/80) <ul style="list-style-type: none">• Risposta parziale/completa: 57%• Dipendenza: 29%
Eventi avversi: 6 neoplasie, 5 decessi
Indipendenza terapeutica: 2 pazienti per somatic genetic rescue

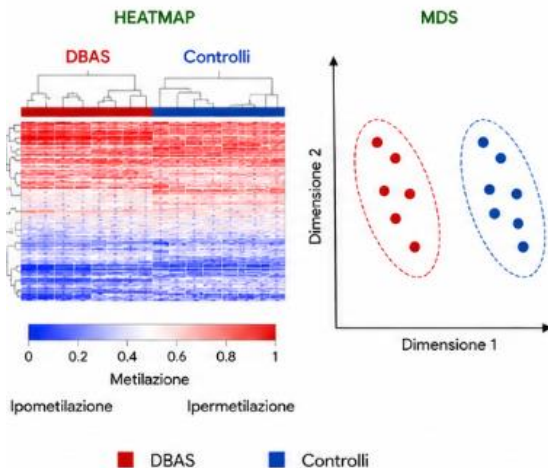
Identificazione dell'Episignatura DBAS



Validazione dell'Episignature

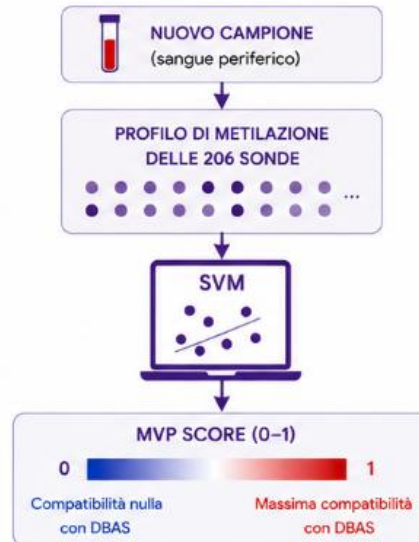
1 ANALISI NON SUPERVISIONATA

Separazione spontanea dei campioni



2 CLASSIFICATORE SVM

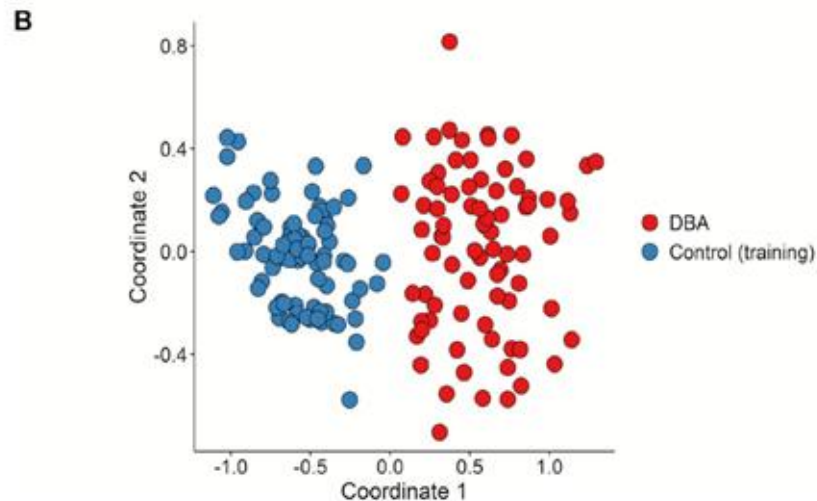
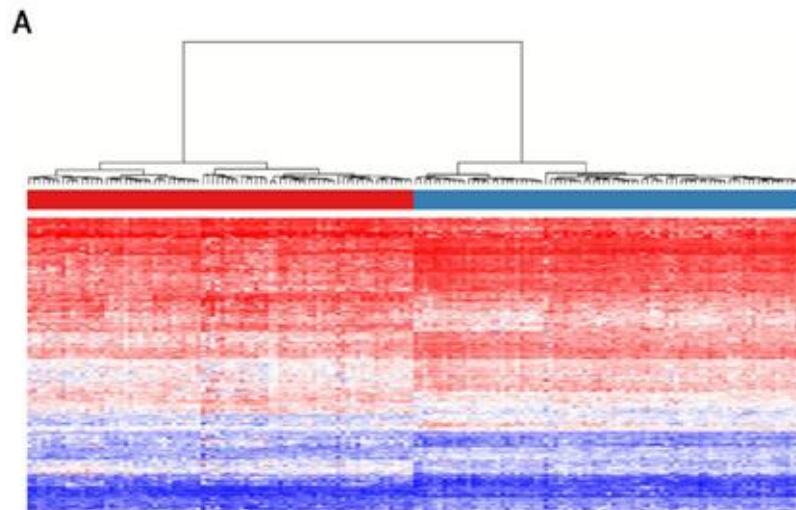
Il modello restituisce un MVP score per ogni nuovo campione



Il punteggio rappresenta la compatibilità del campione con il profilo epigenetico della DBAS.

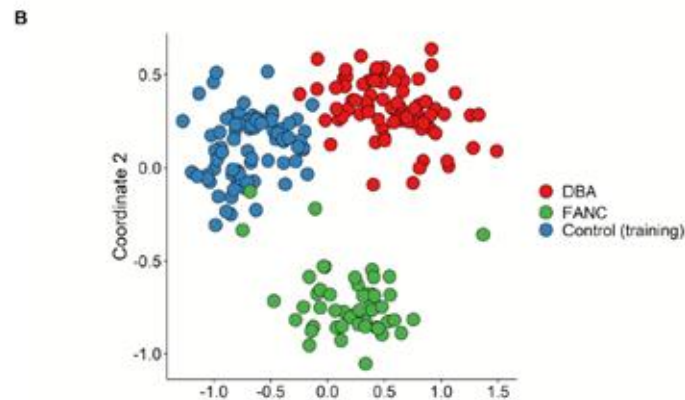
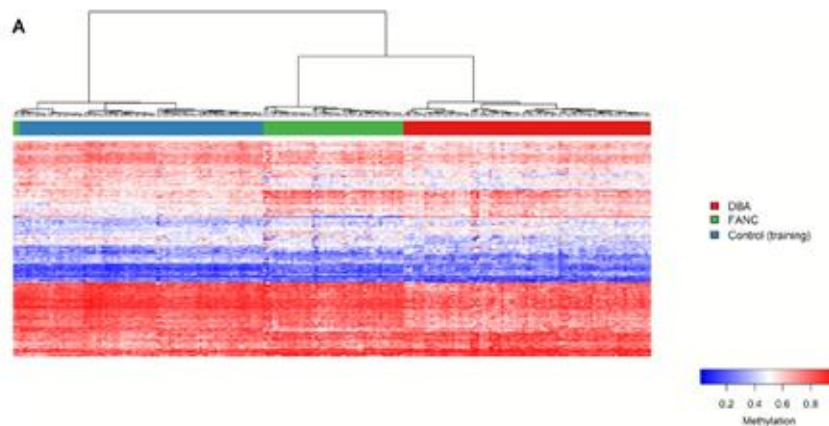
Episignature Pazienti DBAS vs controlli

- Le 206 sonde identificano una **distinta Episignature** associata alla DBAS.



Episignature Pazienti DBAS vs FA

- L'Episignature DBAS è **altamente specifica** e non si sovrappone all'Anemia di Fanconi.



→ I pazienti FA presentano MVP score prossimi a 0.

Episignature DBAS vs Patologie genetiche

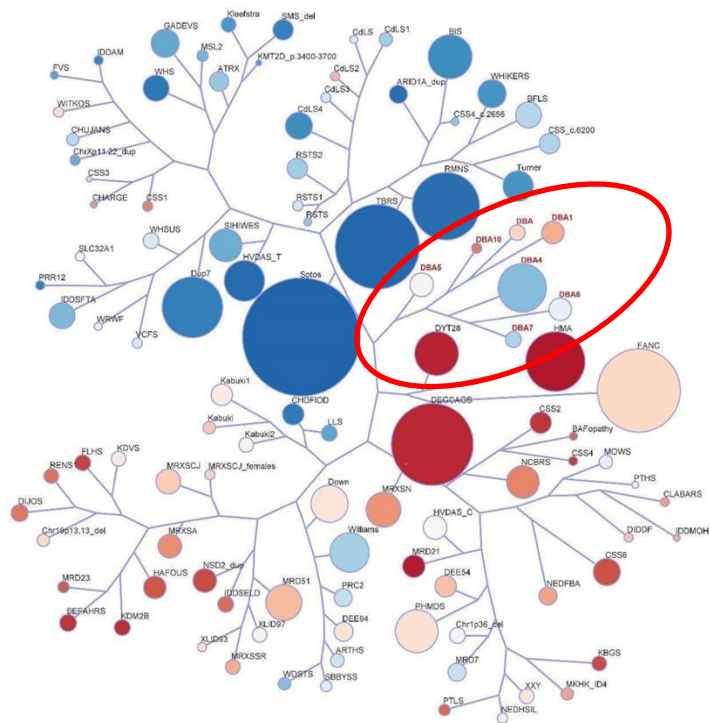
Confronto con altre episignature (EpiSign v5)

% overlap di DMP con la coorte DBAS

Mowat-Wilson syndrome (MOWS)	25%
Velocardiofacial syndrome (VCFS)	23%
NEDHSIL	22%
Fanconi anemia (FA)	17%
DEGCAGS syndrome	16%
Altre episignature (91 disturbi)	≤15%



Nessuna delle 99 episignature mostra una sovrapposizione rilevante con la DBAS (≤25% dei DMP)

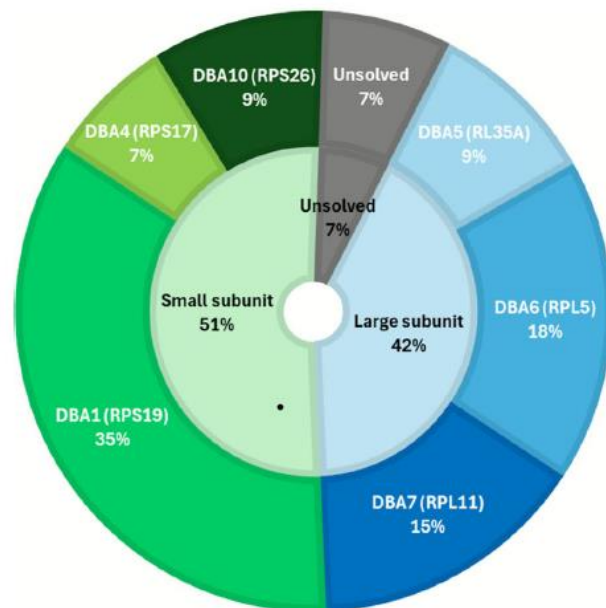


Sottogruppi genetici

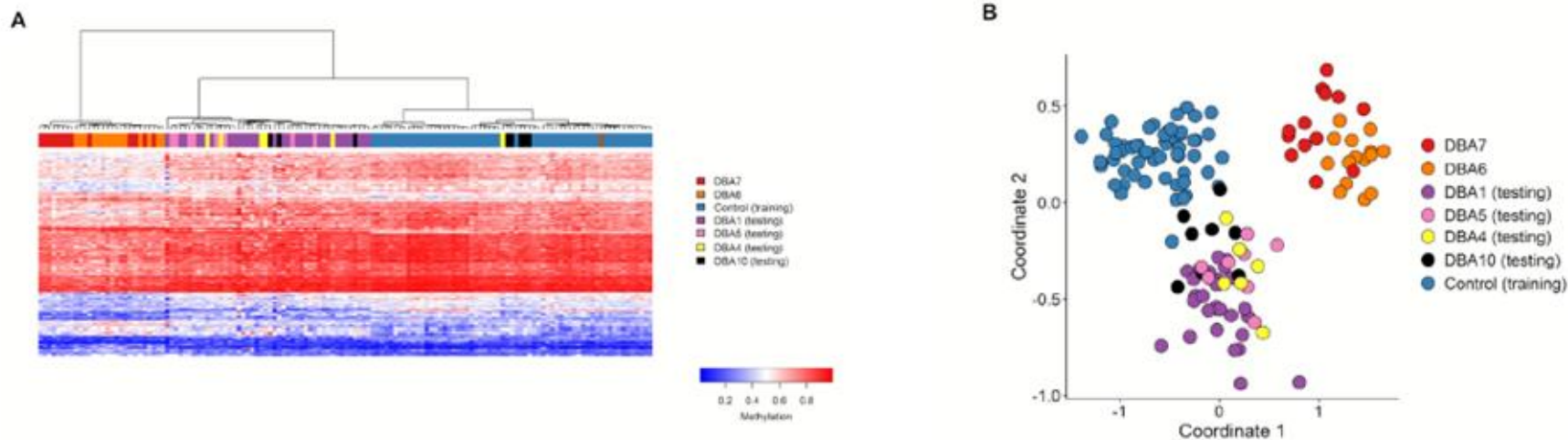
Sottogruppi genetici (n=80)

- DBA1 (RPS19; n=30)
- DBA4 (RPS17; n=6)
- DBA5 (RPL35A; n=8)
- DBA6 (RPL5; n=15)
- DBA7 (RPL11; n=13)
- DBA10 (RPS26; n=8)

Ereditarietà: 47 *de novo*, 24 sporadiche, 9 ereditarie.



Episignature e sottogruppi DBAS



- I pazienti RPL5 e RPL11-mutati condividono una specifica firma di metilazione, sovrapponibile, ma distinta dagli altri sottogruppi DBAS.
- L'epigenetica potrebbe contribuire a definire ulteriormente le correlazioni genotipo-fenotipo.

Episignature e casi «gene orphans»

- 6 pazienti «gene orphans»
- 3 pazienti (**#82,#83,#81**) clusterizzano (heatmap, MDS) con i DBAS confermati e mostrano **MVP alti**.

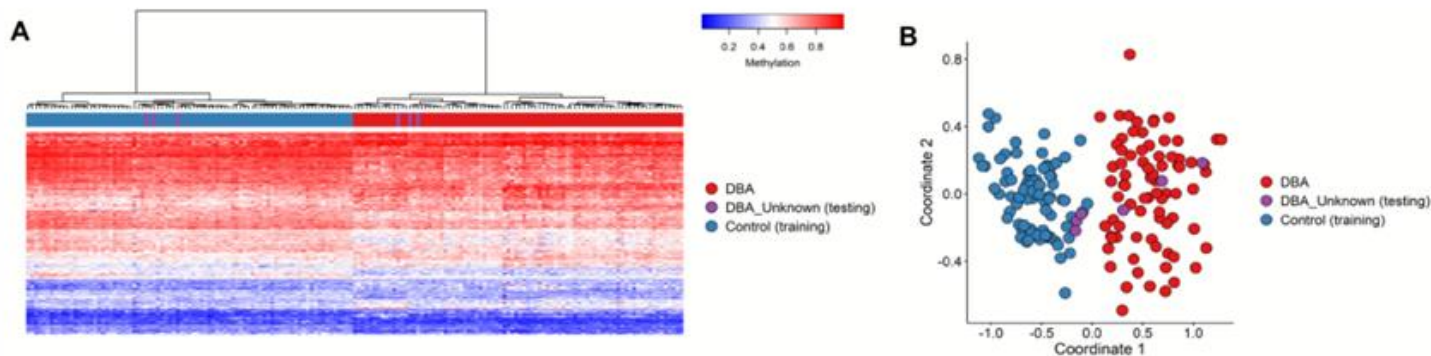
Genome sequencing

#82 (malformazioni, steroide-dipendenza, eADA ↑, profilo rRNA compatibile) → variante intronica in *RPL5* (c.325- 380A>G:p.?)

#83 (malformazione del pollice, eADA ↑, profilo rRNA compatibile) → variante LP *RPL26* (c.- 6 + 3_- 6 + 25del:p.?)

#81 (anemia neonatale, trasfusioni croniche, TCSE, eADA ↑) → nessuna variante identificata

#84, #85, #86 (ADA ↑, profilo rRNA non suggestivo, trattamento indipendenza) → nessuna variante identificata



Episignature e reversione somatica

2 Pazienti revertiti in **indipendenza terapeutica**

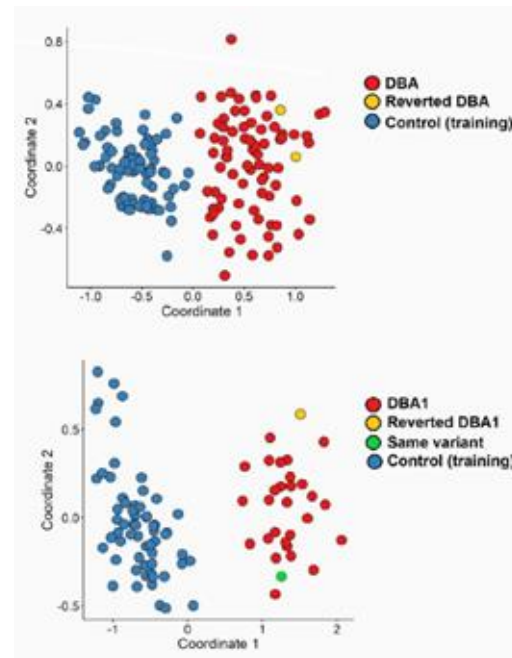
#25 (RPS19 p.Pro47Leu)

- Anemia macro-iporigenerativa severa alla nascita, eADA elevata
- Malformazione del tenar
- Steroid-non-responsive, trasfusioni croniche
- Reversione a 8 anni → indipendenza stabile
- SNP array: **UPD 19q12–q13.43** (mosaicismo)
- Il paziente #26, con la stessa mutazione ma **non revertito**, mostra **lo stesso profilo DNAm**

#35 (delezione completa RPS17)

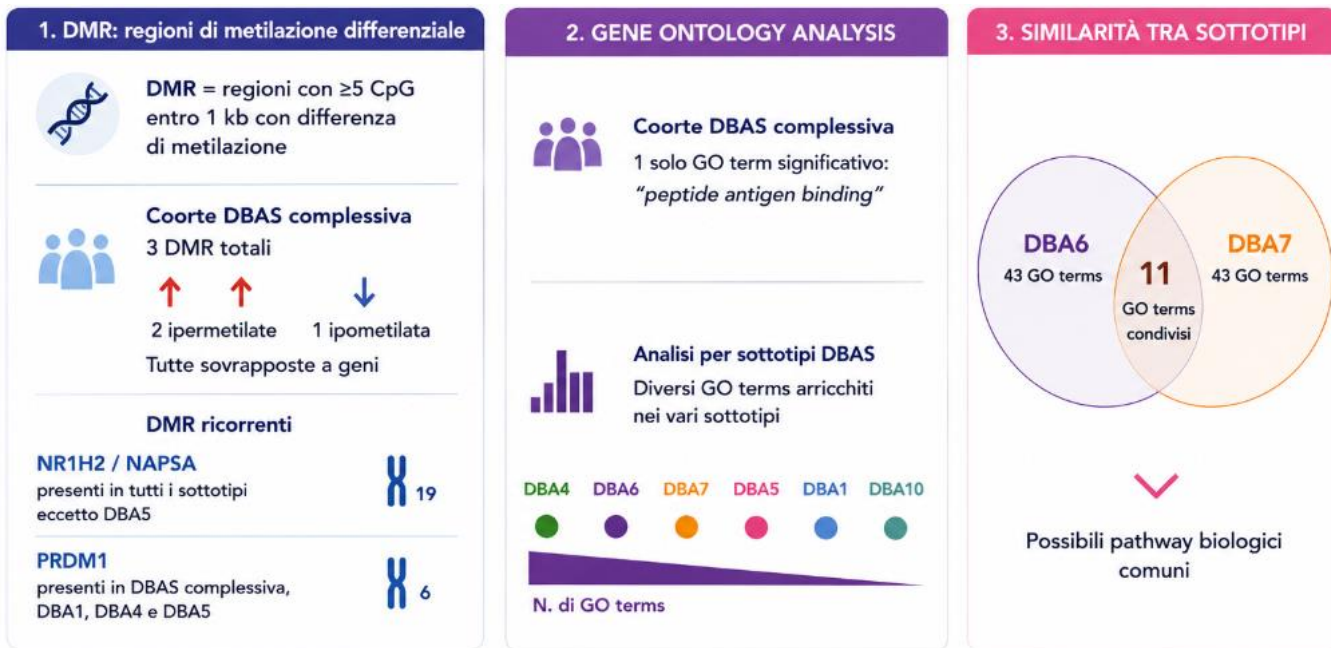
- Lunga terapia steroidea → normalizzazione eADA
- Reversione attribuita a **UPD revertente** che abolisce la delezione
- Profilo DNAm comunque **coerente con DBAS**

La reversione clinica conseguente a meccanismi di SGR **non ripristina il profilo epigenetico**.



Oltre la diagnosi: significato biologico dell'episignatura

DMR e Gene Ontology Analysis



Conclusioni e Prospettive Future

L'analisi epigenetica rappresenta una risorsa promettente per migliorare la diagnosi e comprendere la patogenesi della DBAS.

- **Validazione ulteriore dell'Episignature**
- Aumento della coorte di pazienti
- Confronto con altre IBMFs
- **Non solo strumento diagnostico, ma test funzionale per VUS?**
- **Approfondimenti biologici**

Prof.ssa Franca Fagioli

Dott. Bekim Salikovic
Dott. Karim Karimi

GRAZIE PER L'ATTENZIONE!

Prof.ssa Paola Quarello
Dott.ssa Emanuela Garelli
Dott.ssa Adriana Carando



Prof. Alfredo Brusco
Dott.ssa Serena Rizzo