UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Scuola di Medicina e Chirurgia - Dipartimento di Medicina - DIMED

Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico

Presidente: Chiarissimo Prof. Matteo Fassan

TESI DI LAUREA

Analisi dell' Esoma mediante tecnologia Next Generation Sequencing in pazienti affetti da Eritrocitosi Idiopatica.

Relatore: Prof. Ceolotto Giulio

Correlatrice: Dr.ssa Giannella Alessandra

Laureando: Abboud Ali

Matricola:2055123

Anno Accademico 2023 – 2024

Capitolo 1 4
1. Introduzione..... 4
1.1. Definizione di Eritrocitosi 4
1.2 Classificazione dell'Eritrocitosi 4
1.4.1. Eritrocitosi Secondarie Congenite 9
D. Eritrocitosi congenita di tipo 4: mutazioni a carico del gene EPAS1 (HIF-2α) 11
1.4.2. ERITROCITOSI ACQUISITA 11
1.4.3. ERITROCITOSI IDIOPATICA 12
CAPITOLO 2 15
2. SCOPO DELLO STUDIO..... 15
CAPITOLO 3 16
3. PAZIENTI, MATERIALI E METODI..... 16
3.1. Pazienti 16
3.2. Estrazione del DNA..... 16
3.2.1.Estrazione del DNA da buffy-coat 16
3.3. Controlli di qualità e quantità del DNA estratto..... 16
3.3.1 Controllo tramite spettrofotometro..... 16
3.3.2. Controllo di quantità..... 16
3.3.3. Controlli di qualità..... 16
3.3.4.Controllo tramite fluorimetro 17
3.4. Preparazione delle librerie..... 17
3.5. Preparazione dei campioni..... 17
3.5.1.Frammentazione enzimatica del DNA 17
3.5.2.Ligazione 17
3.5.3. Cleanup post-ligazione 18
3.5.4.Amplificazione mediante PCR 18
3.5.5.Cleanup post-PCR 18
3.6. Quantificazione delle librerie 18
3.7. Controllo della qualità e delle dimensioni delle librerie..... 18
3.8. NGS target *enrichment* 19
3.8.1. Protocollo enrichment..... 19
3.9. Sequenziamento NGS..... 20
3.9.1. Analisi bioinformatica 20
CAPITOLO 4 24
4. RISULTATI 24
4.1. Parametri clinici dei pazienti con Eritrocitosi 23
4.9.1. Analisi delle Varianti Esoniche (WES)---------- 23

Discussione e conclusioni..... 32
Bibliografia..... 33

Abstract

Introduzione: L'eritrocitosi è una condizione clinica caratterizzata da aumento dell'emoglobina (Hb) e/o dell'ematocrito (Ht) rispettivamente >165 g/L e >49% per i maschi e >160 g/L e >48% per le femmine che si associa a complicanze trombo-emorragiche e cardiovascolari. Le cause possono essere primarie come la policitemia vera, una rara neoplasia mieloproliferativa causata dalla presenza di una mutazione somatica del gene JAK2 della cellula progenitrice eritroide, o secondarie, causate in parte da elevati livelli di eritropoietina o da uno stato di ipossia cronica. Nella maggior parte di pazienti l'eziopatogenesi di eritrocitosi secondaria non è ancora nota e viene definita come eritrocitosi idiopatica. Recentemente, le nuove tecniche di sequenziamento NGS del genoma umano consentono di identificare varianti geniche che possono consentire un migliore approccio diagnostico nei pazienti affetti da eritrocitosi idiopatica.

Scopo dello studio: Lo scopo di questo studio è stato quello di mettere a punto la tecnologia di sequenziamento NGS "whole exome sequencing" (WES) per l'analisi di mutazioni in pazienti affetti da eritrocitosi idiopatica.

Materiali e metodi: Il DNA è stato estratto e purificato da buffy coat ottenuto da 22 pazienti affetti da eritrocitosi idiopatica. Le librerie per il sequenziamento Next Generation Sequencing (NGS) sono state preparate mediante frammentazione del DNA, ligazione degli adattatori, arricchimento e cattura dei frammenti genici mediante sonde specifiche biotilinate. Il sequenziamento NGS è stato eseguito mediante la piattaforma Next Seq 550. L'analisi bioinformatica è stata eseguita mediante software CLC Genomics con pipelines e workflows specifici per l'identificazione di mutazioni germinali. Infine, le mutazioni identificate sono state analizzate con software bioinformatici per prevedere la patogenicità delle varianti individuate.

Risultati: Sono state identificate alcune mutazioni missenso classificate di significato clinico incerto o probabilmente patologiche in ClinVar nei geni coinvolti nel pathway dell'ipossia (HIF-3α, BHLHE41, VHL), nella regolazione del ferro intracellulare (HFE e SLC40A1), nella forma eritrocitaria (SPTA1, PIEZO1). Alcune di queste varianti germinali sono state validate mediante sequenziamento Sanger.

Conclusione: I risultati ottenuti dimostrano che la tecnologia di sequenziamento NGS rappresenta una strategia valida per l'analisi delle varianti genetiche nei pazienti affetti da eritrocitosi idiopatica.

Abstract

Introduction: Erythrocytosis is a clinical condition characterized by increased hemoglobin (Hb) and/or hematocrit (Ht) >165 g/L and >49% for males and >160 g/L and >48% for females, respectively, that is associated with thrombo-hemorrhagic and cardiovascular complications. Causes may be primary such as polycythemia vera, a rare myeloproliferative neoplasm caused by the presence of a somatic mutation in the JAK2 gene of the erythroid progenitor cell, or secondary, caused in part by elevated erythropoietin (EPO) levels or a chronic hypoxic state. In most patients, the etiopathogenesis of secondary erythrocytosis however, is not yet known and is referred to as idiopathic erythrocytosis. Recently, new DNA sequencing techniques, termed Next Generation Sequencing (NGS), allow the identification of genetic mutations that may allow a better diagnostic approach in patients with EI.

Aim of the study: The aim of this study was to fine-tune NGS whole exome sequencing (WES) technology for the analysis of germline genetic variants in patients with erythrocytosis for whom the causative gene is unknown.

Materials and Methods: DNA was extracted and purified from buffy coat obtained from 22 patients with idiopathic erythrocytosis. Libraries for NGS sequencing were prepared by DNA fragmentation, adaptor ligation, enrichment, and capture of nucleic acid fragments. NGS sequencing was performed using the Next Seq 550 platform. Bioinformatic analysis was performed using CLC Genomics software for identification of germline mutation.

Results: Several missense mutations of uncertain clinical significance or probable pathological significance were identified in ClinVar in genes involved in the hypoxia pathway (HIF-3α, BHLHE41, VHL), intracellular iron regulation (HFE and SLC40A1), and erythrocyte form (SPTA1, PIEZO1). Some of these germline variants were validated by Sanger sequencing.

Conclusion: The results obtained demonstrate that NGS WES sequencing techniques are a valid strategy for the analysis of genetic variants present in patients with idiopathic erythrocytosis.

CAPITOLO 1

1. INTRODUZIONE

1.1. Definizione di Eritrocitosi

La principale sede di produzione delle cellule emopoietiche è il midollo osseo, che ospita le cellule staminali pluripotenti. Queste si differenziano in progenitori mieloidi, eritroblasti e, successivamente, in globuli rossi (GR). La produzione di globuli rossi è regolata dall'ormone eritropoietina, rilasciato principalmente dalle cellule interstiziali del rene e, in misura minore, dal fegato (1,2). I globuli rossi sono cellule anucleate che contengono la proteina emoglobina (Hb), responsabile del trasporto dell'ossigeno ai tessuti e alle cellule dell'organimo
Il termine eritrocitosi si riferisce a una condizione clinica caratterizzata da un aumento del numero di globuli rossi rispetto ai valori di riferimento per soggetti di pari età e sesso, con conseguente aumento della concentrazione di Hb e dell'ematocrito (Ht), che rappresenta la percentuale di globuli rossi nel sangue (3). Esistono condizioni fisiologiche che possono indurre l'eritrocitosi, come l'altitudine, l'etnia (i livelli medi di emoglobina nei soggetti di etnia nera sono generalmente inferiori) e le abitudini di vita (ad esempio, il fumo sembra essere una causa di eritrocitosi). (3) L'eritrocitosi viene distinta in relativa o assoluta. Nella forma relativa l'aumento del numero dei GR non è reale, ma relativo a una riduzione della massa plasmatica (grave disidratazione, uso di farmaci diuretici, diarrea, vomito, ustioni) mentre l'eritrocitosi assoluta è caratterizzata da un incremento assoluto dei GR.

Le linee guida dell'organizzazione WHO definiscono l'eritrocitosi come valori di concentrazione di Hb al di sopra di 165 g/L nell'uomo e 160 g/L nella donna; e di Ht al di sopra di 49% nell'uomo e 48% nella donna (4), confermata in almeno due esami successivi in tempi diversi. I fattori di rischio di questa patologia sono l'età, il body mass index (BMI) il fumo, ipertensione e l'uso di steroidi anabolizzandi (androgeni) (4).

1.2 Classificazione dell'Eritrocitosi

Le forme assolute di eritrocitosi si distinguono in primarie, in cui vi è un difetto intrinseco alla cellula progenitore eritroide midollare che è responsabile di una produzione incontrollata e abnorme di globuli rossi, e secondarie, in cui l'aumentata produzione di globuli rossi è causata da fattori indipendenti dal compartimento eritroide, soprattutto da elevati livelli di eritropoietina (EPO).

Le forme primarie e quelle secondarie di eritrocitosi possono a loro volta essere suddivise in congenite ed acquisite (5). Le forme congenite sono caratterizzate dalla presenza di una alterazione genetica o mutazione genetica identificabile, in genere si presentano in giovaneetà e spesso c'è una storia familiare di malattia. Le forme congenite inoltre, si possono ulteriormente suddividere in base alla concentrazione di EPO plasmatica: nei casi con EPO al di sotto della norma ritroviamo i difetti nella via di segnale dell'eritropoietina, mentre nei casi con EPO elevata si riscontrano alterazioni del pathway sensibile alla concentrazione di ossigeno (oxygen sensing pathway)(6). **(Figura 1).** Dal punto di vista clinico, viene definita Eritrocitosi Idiopatica(EI) tutte le forme patologiche non incluse nei criteri precedentemente descritti.

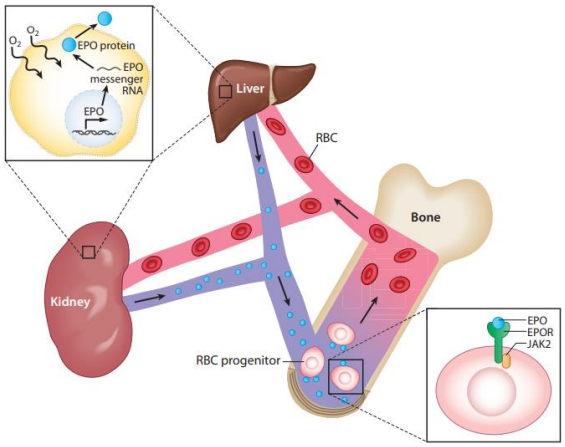

Figura 1 : ***Ruolo della Eritropoietina (EPO nella regolazione della produzione produzione dei globuli rossi (GR).*** Il rene e, in misura minore, il fegato sono le principali fonti di EPO. In condizioni di ipossia, la trascrizione del gene dell'EPO viene attivata da HIF (fattore di ipossia), con aumento dei livelli circolanti di EPO (blu). La proteina EPO si lega quindi al recettore EPOR delle cellule progenitrici dei GR presenti nel midollo osseo (in basso a destra), attivando il pathway della proteina Jak2 chinasi con conseguente aumento del numero dei GR. (da *Blood 2011*).

<u>Le forme primarie congenite di eritrocitosi</u> sono molto rare e sono causate dalla presenza di varianti patologiche nel gene del recettore dell'eritropoietina (EpoR) o nel gene SH2B3 (LNK). Le mutazioni di EpoR, denominate Eritrocitosi Congenita Tipo 1 (ECYT1, OMIM #133100), sono di tipo autosomico dominante e si trovano nell'ottavo esone del gene, caratterizzandosi per la produzione di una proteina alterata che diventa ipersensibile all'EPO, risultando costitutivamente attiva e provocando una produzione continua di globuli rossi da parte delle cellule progenitrici eritroidi (9,10,11). Il gene EPOR è localizzato sul cromosoma 19p13.2, contiene 8 esoni e fa parte della superfamiglia dei recettori per le citochine, privi di attività chinasica intrinseca. Per questo

motivo, dopo la sua attivazione, attraverso il legame con la citochina EPO, viene reclutata la chinasi JAK2. Le proteine JAK2 e STAT5 si autofosforilano, STAT5 si dimerizza, trasloca nel nucleo e innesca la segnalazione a valle e la maturazione dei globuli rossi. Durante questo processo, vengono prodotti anche dei regolatori negativi di questa via di segnalazione, in particolare SHP-1, che, legandosi, inibisce l'attività del recettore (19,20) (Figura 2).

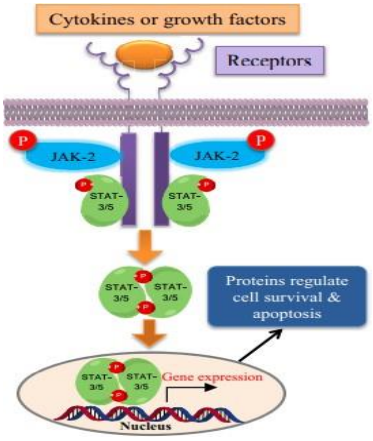

Figura 2: ***Meccansimo di trasduzione del segnale JAK-2. Jak2, (Janus Kinase 2), STAT3/5(Signal Transducer and Activator of Transcription 3)***.

Le mutazioni finora riscontrate in EPOR sono state tutte identificate nell'esone 8 che codifica per la parte C-terminale della proteina responsabile del legame con le proteine che ne inibiscono l'attività. Queste mutazioni con guadagno di funzione determinano un'iperproduzione di globuli rossi anche in assenza di stimolazione con EPO. L'ereditarietà è autosomica dominante, anche se alcune mutazioni de novo danno origine a casi sporadici (19,20,21). La maggior parte dei pazienti presenta sintomi lievi, come cefalea, vertigini, affaticamento, e presenta inoltre livelli sierici di EPO inferiori al range di riferimento, normale affinità dell'emoglobina per l'ossigeno, ipersensibilità dei progenitori eritroidi e assenza di splenomegalia. Non esistono linee guida per il trattamento; tuttavia, sebbene la maggior parte dei pazienti non necessiti di cure regolari, una piccola percentuale di pazienti si sottopone a flebotomie regolari (20,21).

Le forme di eritrocitosi primarie acquisite sono definite come Policitemia Vera (PV). La PV fa parte delle Neoplasie Mieloproliferative (MPN), un gruppo di patologie dovute a un disordine a carico della cellula staminale emopoietica che risulta in una proliferazione incontrollata della linea mieloide nel midollo osseo, in particolare la proliferazione eritroide che provoca un sensibile aumento dei globuli rossi nel sangue periferico (12). Nel gruppo delle MPN sono incluse anche altre patologie come la leucemia mieloide cronica, la trombocitemia essenziale, la

mielofibrosi primaria, la leucemia neutrofilica cronica, leucemia eosinofilica cronica, mastocitosi (12). LA PV è causata da mutazione puntiforme (singola sostituzione nucleotidica G>T al nucleotide 1849, con conseguente sostituzione di un residuo di valina con uno di fenilalanina in posizione 617) nell'esone 14 del gene *JAK2*, codificante per una tirosinchinasi (*Janus Kinase 2*) coinvolta nella via di segnalazione intracellulare *JAK-STAT (13).*

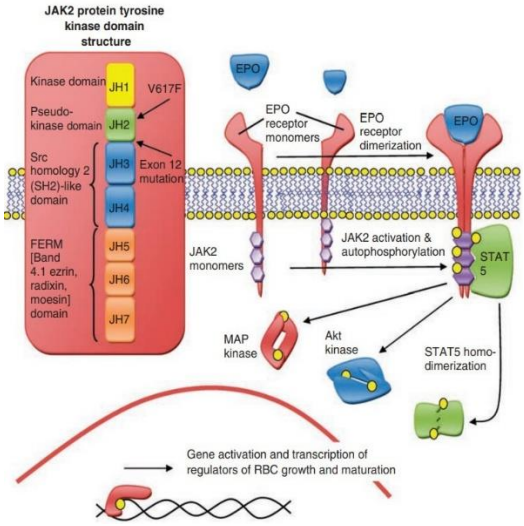

Figura 3: ***Meccanismo di trasduzione del segnale JAK/STAT.***

Tale mutazione, *JAK*2 V617F, è presente nella quasi totalità dei pazienti affetti da Policitemia Vera (95%) e in una proporzione significativa di pazienti affetti da Trombocitemia Essenziale (55%) e Mielofibrosi Primaria (65%) (15). Nella restante, seppur piccola, percentuale di pazienti affetti da Policitemia Vera è possibile trovare mutazioni del gene *JAK2* diverse dalla V617F, ma con analogo significato funzionale in termini di attivazione della proteina mutata; tali mutazioni si concentrano nell'esone 12 e dal punto di vista genetico si caratterizzano per essere inserzioni o delezioni (17,18). Dal punto di vista clinico i pazienti con mutazione a carico dell'esone 12 del gene *JAK2* presentano più spesso un'eritrocitosi isolata, con una prognosi simile ai pazienti portatori della classica mutazione V617F (14) (Figura.3).

Tabella 1: ***Classificazione delle principali forme di eritrocitosi***.

Tipo	Categoria	Causa/Condizione
1. Eritrocitosi Primaria	Congenita	Eritrocitosi familiare di tipo 1 (*EPOR*)
	Acquisita	Policitemia Vera (*JAK2*)
2. Eritrocitosi Secondaria	Congenita	Difetti nella via dell'Oxygen Sensing Pathway -Eritrocitosi familiare di tipo 2 (*VHL*)
		-Eritrocitosi familiare di tipo 3 (*PHD2*)
		-Pathway -Eritrocitosi familiare di tipo 4 (*HIF2α*)
		-Emoglobine ad alta affinità per l'ossigeno
		-Deficit di BPGM
		-Metaemoglobinemia
	Acquisita	Secrezione fisiologica di EPO -Malattie croniche polmonari
		-Difetti cardiaci con shunt dx-sx
		-Elevata altitudine
		- Sindrome delle apnee ostruttive notturne
		-Stenosi dell'arteria renale, Cisti renali
		-Idronefrosi
		Eritrocitosi post-trapianto renaleTumori EPO-secernenti
		-Carcinoma renale a cellule chiare
		-Emangioblastoma cerebellare
		-Feocromocitoma/Paraganglioma
		-Meningioma
		-Leiomioma uterinoEPO esogena
		-Uso medico o volluttuario di EPO
		-Somministrazione di androgeni
3. Eritrocitosi Idiopatica		Causa non ancora nota, forse di natura genetica

1.4.1. Eritrocitosi Secondarie Congenite

A. Difetti congeniti a carico dei fattori inducibili dell'ipossia (Oxygen-sensing Pathway)

La corretta omeostasi dell'ossigeno e la risposta a situazioni di ipossia, che possono portare a danni a cellule e tessuti, coinvolgono alcuni geni della via "Oxygen-sensing Pathway" (22). In risposta a una carenza di ossigeno o ipossia, vengono attivati alcuni fattori di trascrizione inducibili dall'ipossia, detti HIF (Hypoxia Inducibile Factors). HIF è cuna proteina costituita da due dimeri: una subunità β insensibile alla concentrazione di ossigeno molecolare (O_2) e una subunità α che lega O_2. Questi due subunità di HIF sono costituiti da importanti domini capaci di attivare specifici geni del DNA.

HIF è costituita da 3 isoforme : HIF-1α, HIF-2α, e HIF-3α. HIF-1α è una proteina ubiquitaria, HIF-2α è presente in alcuni tipi di cellule come endoteliali, cardiomiociti ed epatociti, HIF-3α, invece, è stata identificata nei reni e nei polmoni. In questi organi, l'espressione di HIF-3α può aumentare in condizioni di ipossia, e sembra agire come un regolatore negativo dell'attivazione di HIF, inibendo l'attivazione di geni target da parte di HIF-1α e HIF-2α. Questo ruolo è particolarmente importante nella regolazione della risposta cellulare all'ipossia, influenzando processi come l'angiogenesi e il metabolismo energetico. Le varianti di HIF-3α possono avere funzioni più complesse e specifiche nella risposta all'ipossia, contribuendo alla complessità del sistema HIF nel mantenimento dell'omeostasi cellulare.

La regolazione di HIF-α è un processo finemente orchestrato, sensibile ai livelli di ossigeno cellulare (Figura. 4). In condizioni di normossia (a), l'enzima prolil-idrossilasi (PHD) utilizza l'ossigeno per idrossilare i residui di prolina di HIF-α. Questa modificazione permette alla proteina Von Hippel-Lindau (VHL), una subunità di un'ubiquitina ligasi E3, di riconoscere e legare HIF-α, innescandone la poliubiquitinazione e la conseguente degradazione proteosomale. Inoltre, il fattore di inibizione di HIF (FIH), un asparaginil-idrossilasi anch'esso dipendente dall'ossigeno, idrossila un residuo di asparagina su HIF-α, impedendo l'interazione con il coattivatore trascrizionale CBP/p300. Di conseguenza, in normossia, l'attività trascrizionale di HIF è soppressa.

In condizioni di ipossia (b), la mancanza di ossigeno inibisce sia PHD che FIH. HIF-α non viene più idrossilato e quindi non è più soggetto alla degradazione mediata da VHL. Questo porta all'accumulo di HIF-α nel citoplasma e alla sua successiva traslocazione nel nucleo. Qui, HIF-α dimerizza con HIF-β, recluta il coattivatore CBP/p300 e si lega agli elementi di risposta ipossica (HRE) presenti nel DNA, attivando la trascrizione di numerosi geni target, tra cui quello dell'eritropoietina (EPO) (22, 23).

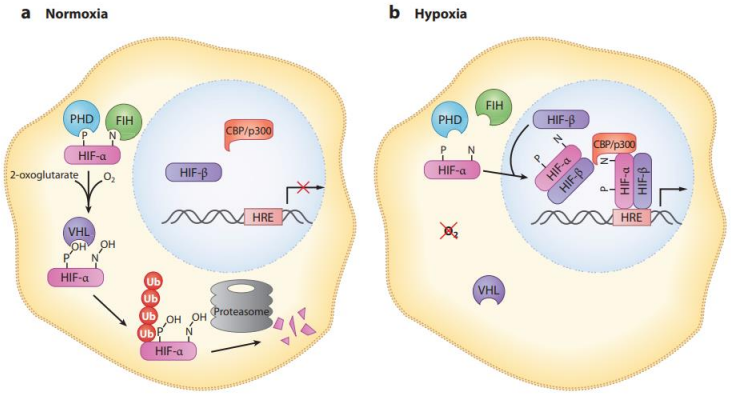

Figura 4: ***Regolazione ossigeno-dipendente del fattore inducibile dell'ipossia (HIF).***

A. In condizioni di normossia, la proteina con dominio prolilidrossilico (PHD) idrossila costitutivamente HIF-α su specifici residui prolilici e il fattore che inibisce HIF (FIH) idrossila costitutivamente HIF-α su uno specifico residuo di asparagina. L'idrossilazione dell'a asparagina impedisce l'interazione tra il dominio di attivazione trascrizionale di HIF-α e il dominio di attivazione trascrizionale di HIF-α e il coattivatore trascrizionale CREB-binding protein (CBP)/p300. La prolil-idrossilazione consente il riconoscimento da parte di della proteina soppressore del tumore von Hippel-Lindau (VHL), componente di un complesso di E3 ubiquitina ligasi che indirizza HIF-α alla degradazione da parte del proteasoma.

B. In condizioni di ipossia, l'inibizione della prolilidrossilazione promuove la stabilizzazione di HIF-α, che permette la dimerizzazione con HIF-β. L'inibizione dell'idrossilazione dell'asparaginile smaschera l'attività trascrizionale di HIF-α, che consente il legame di CBP/p300. Abbreviazioni: HRE, elemento di risposta all'ipossia.

B. Eritrocitosi congenita di tipo 2 (ECYT 2): mutazioni a carico del gene VHL

La prima forma descritta di eritrocitosi congenita secondaria a mutazioni a carico del gene VHL, fu la Policitemia di Chuvash, dalla Chuvashia, regione della Russia dove vennero identificati i primi casi. Tale forma è dovuta a mutazioni a carico del gene VHL (Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor) (24). Nello specifico, i pazienti affetti da tale forma di eritrocitosi presentano omozigosi per una mutazione puntiforme missenso C598T nel gene VHL, che porta alla sostituzione di Arg in Trp al residuo aminoacidico 200 (Arg200Trp, R200W) (24). Tale proteina mutata non è più in grado di combinarsi con HIF-α, che non viene quindi degradato dal proteasoma e può dimerizzare con HIF-β e attivare la trascrizione genica. La Policitemia di Chuvash è quindi una rara forma di eritrocitosi secondaria congenita, a trasmissione autosomica recessiva, caratterizzata dal punto di vista clinico da eritrocitosi, incremento dei livelli sierici di EPO, rubor, vene varicose, ipotensione arteriosa, emangiomi vertebrali, ipertensione polmonare. Inoltre studi retrospettivi hanno evidenziato una

maggiore associazione con trombosi arteriose e venose, eventi vascolari cerebrali e diminuita aspettativa di vita (33,34)

C. Eritrocitosi congenita di tipo 3: mutazioni a carico del gene EGLN1 (PHD2)

L'eritrocitosi congenita tipo 3 (ECYT3) è causata da mutazioni, a trasmissione autosomica dominante, a carico del gene *EGLN1 (*Egl-9 Family Hypoxia Inducible Factor 1**)** che determinano perdita di funzione oloss-of-function della proteina PHD2. Sono state descritte almeno 30 mutazioni (missenso, non senso, piccole delezioni, inserzioni), tutte nel dominio catalitico di PHD2, che interferiscono con la sua capacità di legare HIF-2α (25). Clinicamente il fenotipo è variabile, tra i sintomi sono state segnalate complicanze microvascolari come cefalea, tinnito, artromialgie, tra le complicanze trombosi superficiali o in sedi atipiche, cisti renalio angiomi (27,28). Inoltre, è stata riportata un'associazione tra mutazioni germinali a carico di *EGLN1* e tumori neuroendocrini (paraganglioma, feocromocitoma), suggerendo una funzione di tale proteina come soppressore tumorale (22,26).

D. Eritrocitosi congenita di tipo 4: mutazioni a carico del gene EPAS1 (HIF-2α)

Ad oggi 12 mutazioni (missenso) a carico del gene *EPAS1* determinanti gain-of function di HIF-2α sono responsabili dell'eritrocitosi congenita tipo 4, a trasmissione autosomica dominante (29). I pazienti affetti da tale forma di eritrocitosi sembrerebbero presentare una maggiore ricorrenza di eventi tromboembolici (23). Anche in questo caso, è stato riportato il ruolo di mutazioni di EPAS1, in genere somatiche ma in un caso anche germinale, in pazienti con associazione di eritrocitosi e tumori neuroendocrini (paraganglioma, feocromocitoma, somatostatinomi) (30).

E. Eritrocitosi congenita di tipo 5: mutazioni a carico del gene di EPO

Questa forma di eritrocitosi è dovuta a una mutazione del gene dell'EPO stessa. Si tratta di una delezione di un singolo nucleotide con conseguente frame shift, a trasmissione autosomica dominante, risultante in una gain-of-function da abolizione della traduzione del mRNA principale e conseguente spinta alla produzione di EPO da parte di un promotore alternativo. L'aumentata produzione di EPO è la causa dell'aumentata sintesi eritrocitaria (32,31).

1.4.2. ERITROCITOSI ACQUISITA

Numerose condizioni cliniche possono determinare eritrocitosi secondaria acquisita, associata ad un aumento fisiologico o patologico di EPO (16). Ogni condizione che determina ridotta disponibilità di O2, e quindi ipossia tissutale, può essere responsabile di incrementata produzione fisiologica di EPO e di conseguenza di eritrocitosi. Tra le condizioni che possono causare eritrocitosi secondaria riconosciamo:

• ipossia centrale: malattie polmonari croniche (come la BPCO), altitudine, cardiopatie congenite cianogene, forte tabagismo, intossicazione da monossido di carbonio (8,37)

• ipossia locale a livello renale: idronefrosi, stenosi dell'arteria renale, rene policistico, insufficienza renale terminale ed eritrocitosi post-trapianto di rene (38,39)

• produzione ectopica di EPO: tumori maligni o benigni EPO-secernenti, inclusi emangioblastoma cerebellare, meningioma, adenoma/carcinoma paratiroideo, carcinoma epatocellulare, carcinoma a cellule renali, feocromocitoma e leiomioma uterino (37)

• farmaci/doping: somministrazione di EPO esogena o farmaci che inducono la produzione di EPO; somministrazione di androgeni (meccanismo ipotizzato di soppressione dell'epcidina da parte del testosterone con conseguente incremento della secrezione renale di EPO) (38,39). Questi soggetti possono essere asintomatici, ed il riscontro di elevati livelli di GR essere casuale o in alcuni casi può manifestarsi sintomatologia da aumentata viscosità ematica come ad esempio mialgia, debolezza, fatigue, cefalea, visione offuscata, rallentamento psicomotorio (40). In questi casi è importante individuare la condizione sottostante all'eritrocitosi perché curando questa si avrà conseguente risoluzione anche del quadro ematologico.

1.4.3. ERITROCITOSI IDIOPATICA

La diagnosi di Eritrocitosi Idiopatica (EI) è di esclusione, è cioè una eritrocitosi assoluta per la quale non sono state identificate cause evidenti .Devono essere pertanto escluse le eritrocitosi Primarie, che possono essere congenite (mutazioni del recettore per eritropoietina) e acquisite (Policitemia Vera, associata a mutazione JAK2 e di esone 12) e le eritrocitosi Secondarie, a loro volta pure suddivise in forme congenite (mutazioni nella via che regola la sensibilità all'ossigeno; emoglobina ad alta affinità per ossigeno; deficit 2,3 difosfiglicerato) e in forme acquisite (da secrezione appropriata di EPO, esempio da ipo-ossigenazione, e da secrezione inappropriata, di origine neoplastica). Le EI possono avere valori ridotti di EPO, suggerendo una genesi primaria, o normali/aumentati con ipotesi di una causa secondaria, non identificata (7,23,36).

I pazienti affetti da EI presentano caratteristiche emocromocitometriche di eritrocitosi con conta piastrinica e leucocitaria nella norma, assenza di splenomegalia e di rischio evolutivo in mielofibrosi e leucemia acuta. La prevalenza stimata dell'eritrocitosi è di circa 1.1 casi ogni 1000 persone, 4 volte più frequente della Policitemia Vera . L'età media alla diagnosi è di 52 anni, con una preponderanza di pazienti maschi (7,11,35).

<u>Eritrocitosi Idiopatiche e metabolismo del ferro</u>

Recenti ricerche hanno messo in evidenza la presenza di una correlazione tra EI e il metabolismo del ferro (41) . Il ferro svolge un ruolo fondamentale nella eritropoiesi. L'organismo umano contiene circa 3-5 g di ferro, la maggior parte del quale contenuto nell'emoglobina dei globuli rossi circolanti. Il ferro è immagazzinato negli epatociti e nei macrofagi reticolo endoteliali, dove viene complessato alla proteina, ferritina. La quota restante di ferro si trova nella mioglobina, nei citocromi e negli enzimi contenenti ferro (ossidasi, catalasi, perossidasi, etc). Inoltre il ferro viene "riciclato" (circa 20 mg/die) dall'emoglobina degli eritrociti senescenti nei macrofagi reticolo endoteliali per far fronte alle continue esigenze eritropoietiche. La distribuzione del ferro nell'organismo è mostrata in (Figura 5) (da Ganz T. Hepcidin and iron regulation, 10 years later. Blood. 2011;117(17):4425-33)

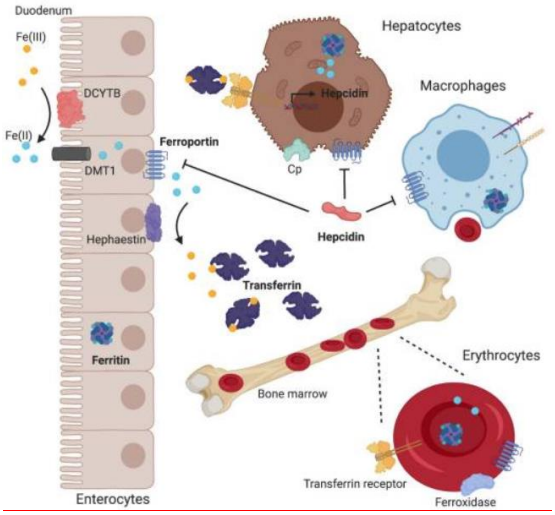

Figura 5: Il Metabolismo del Ferro.

Il ferro viene assorbito dagli enterociti nel duodeno, dove viene ridotto dal citocromo b duodenale (DCYTB) e trasportato nelle cellule dal trasportatore divalente, DMT1. Successivamente, viene rilasciato dagli enterociti attraverso la ferroportina e ossidato dall'efestina o ceruloplasmina, per poi essere caricato sulla transferrina e trasportato in tutto l'organismo. Gli eritrociti senescenti vengono fagocitati dai macrofagi, che riciclano il ferro. L'epcidina, prodotta dagli epatociti, regola questo processo legando la ferroportina e riducendo l'esportazione di ferro. L'emocromatosi è uno dei più comuni disordini ematologici benigni che deriva da un eccessivo deposito di ferro a livello tissutale, specialmente nel fegato, pancreas e cuore (41). Si distinguono innanzitutto due forme di emocromatosi: l'Emocromatosi primitiva o Ereditaria (HH), causata da mutazioni in diversi geni coinvolti nella regolazione del metabolismo del ferro che inducono aumento della ferritina sierica e abnorme accumulo di ferro nei tessuti dell'organismo (42) e l'Emocromatosi secondaria, dovuta a diverse cause tra cui, eccessiva supplementazione parenterale o orale di ferro (ad es. da ripetute emotrasfusioni), anemie caratterizzate da eritropoiesi inefficace congenite (ad es. talassemia, anemia falciforme, sferocitosi ereditaria) e acquisite (sindromi mielodisplastiche, mielofibrosi, anemia

aplastica refrattaria), epatopatie croniche (epatiti, alcool, NASH, porfiria cutanea tarda), sindromi metaboliche (obesità, insulino-resistenza). Alcuni studi hanno evidenziato una importante associazione tra EI e alterazioni del metabolismo del ferro in quanto l'aumentata disponibilità di ferro risultante da difetti delle molecole coinvolte nel suo metabolismo può condurre all'incremento di eritropoiesi e quindi a una condizione di eritrocitosi.

In conclusione, ad oggi la solo relativa conoscenza dell'eritrocitosi idiopatica e dell'impatto sulla clinica delle mutazioni ad oggi descritte, anche implicate nel metabolismo del ferro, in questo gruppo di pazienti non consente di dare indicazioni prognostiche a lungo termine né di fornire precise indicazioni terapeutiche e di prevenzione basate sull'evidenza. La disponibilità di tecnologie avanzate come il sequenziamento di nuova generazione (NGS) nel nostro laboratorio ci ha spinto a costruire un pannello di geni specifico per cercare nuove mutazioni in pazienti con eritrocitosi di eziologia incerta.

CAPITOLO 2

2. SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo di questo studio è stato di :

a) sviluppare e ottimizzare la tecnologia NGS (Next Generation Sequencing) per analizzare l'esoma in pazienti con eritrocitosi idiopatica.
b) creare un pannello di sequenziamento mirato per l'indagine genetica dell'eritrocitosi.

CAPITOLO 3

3. PAZIENTI, MATERIALI E METODI

3.1. Pazienti

Sono stati reclutati 22 pazienti affetti da eritrocitosi idiopatica, presso l'Unità di Ematologia del Dipartimento di Medicina dell'Azienda Ospedaliera-Università di Padova tra il 2023 e 2025. I criteri di inclusione sono stati stabiliti secondo le linee guida internazionali della WHO (World Health Organization): emoglobina > 165 g/L negli uomini e > 160 g/L nelle donne, e/o ematocrito > 49% negli uomini e > 48% nelle donne. I criteri di esclusione comprendono: diagnosi di Policitemia Vera, confermata dalla presenza della variante JAK2 V617F del gene JAK2, o diagnosi di eritrocitosi acquisita, associata a malattie polmonari croniche, malattie cardiache, intossicazione da CO o alta quota. Per ogni paziente sono stati raccolti i dati antropometrici, i parametri biochimici (esame emocromocitometrico, conta dei globuli rossi, bianchi e piastrine, i valori di ematocrito (Ht) e dell'emoglobina (Hb) , dosaggio di EPO sierica), analisi genetica della mutazione JAK2 V617F. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliera di Padova, e tutti i pazienti hanno firmato il consenso informato. Un prelievo di sangue in EDTA è stato raccolto per l'estrazione di DNA.

3.2.1. Estrazione del DNA da buffy-coat

3.3. Controlli di qualità e quantità del DNA estratto

Il campione di sangue è stato centrifugato per 10 min a 3000 rpm e il buffy coat è stato raccolto. L'estrazione di DNA è stata eseguita con "DNeasy® Blood & Tissue Kit" (Qiagen).

3.3.1 Controllo tramite spettrofotometro

La concentrazione del DNA estratto e la sua qualità è stata determinata mediante misurazione al NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Tale strumento, infatti, consente di conoscere la concentrazione dell'acido nucleico (espressa in ng/μL) alla lunghezza d'onda di 260 nm, e il grado di purezza del campione dato dal rapporto 260/280 che deve avere un valore compreso tra 1.8 e 2.0

3.3.4. Controllo tramite Qubit

Il metodo spettrofotometrico è utile per ottenere una prima indicazione sulla quantità e qualità del DNA estratto, ma le informazioni che fornisce non sono sufficienti per la preparazione delle librerie per il sequenziamento tramite NGS. Per ottenere dati più precisi sulla quantità di DNA

estratto, si utilizza il Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) e i reattivi dsDNA High Sensitivity (HS).

3.4. Sequenziamento dell'esoma

Il sequenziamento dell'esoma consiste in 4 fasi : preparazione delle librerie, arricchimento e cattura dei frammenti, sequenziamento mediante NGS e analisi bioinformatica.

Preparazione delle Librerie

Per la preparazione delle librerie di DNA è stato utilizzato il kit "xGEN™ DNA Library Prep EZ Kit" (IDT). Il principio di funzionamento prevede una fase iniziale di frammentazione del DNA, seguita dalla fase di ligazione e da una fase finale di pre-amplificazione. (Figura6)

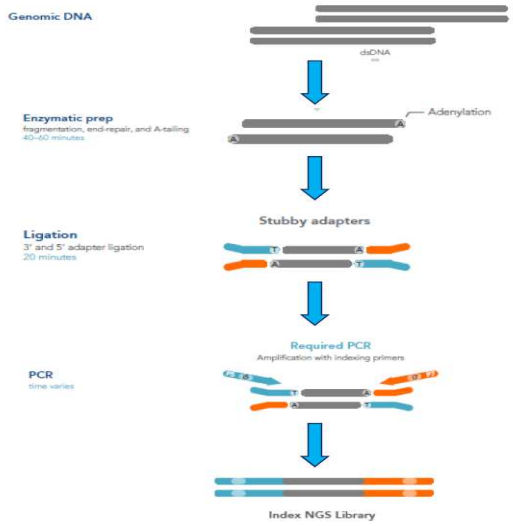

Figura 6 : Le Fasi di preparazione delle Librerie.

3.5.1. Frammentazione enzimatica del DNA

La frammentazione del DNA è stata effettuata incubando il campione di DNA (100 ng) con una miscela di enzimi di restrizione e di endonucleasi allo scopo di ottenere dei frammenti di lunghezza variabile tra 200-400 nucleotidi alla temperatura di: 32°C per 14 min, 65°C per 30 min e 4°C per 10 min.

3.5.2. Ligazione

La fase di reazione di ligazione ha lo scopo di legare degli "stubby adapters" adattatori che contengono le sequenze nucleotidiche complementari ai primers di sequenziamento e le sequenze UMIs (Unique Molecular Identifiers). Poi, verranno inserite le sequenze dette Index che servono da barcode per l'identificazione del campione. Successivamente alla fase di ligazione viene effettuato un *cleanup*, che ha lo scopo di trattenere i frammenti di DNA legati agli "stubby adapters" e di eliminare i reattivi in eccesso. La purificazione del prodotto di ligazione avviene utilizzando le biglie

magnetiche *Agencourt® AMPure® XP-PCR purification beads* (Beckman Coulter), progettate in modo tale da trattenere selettivamente il prodotto di ligazione e lasciare liberi in soluzione i reattivi in eccesso, così che possano essere rimossi.

3.5.4.Amplificazione mediante PCR

Questa fase consiste in una pre-amplificazione del prodotto di ligazione con primers specifici e con brevi sequenze nucleotidiche (10 basi) detti indici. Questa pre-amplificazione consentirà di unire gli indici al frammento di DNA, che servono come *barcode* del campione e permetteranno di identificarlo durante l'analisi bioinformatica dopo il sequenziamento.

3.5.5.Cleanup post-PCR

Al termine della reazione di pre-amplificazione, le librerie vengono ulteriormente purificate mediante le biglie magnetiche *Agencourt® AMPure® XP-PCR purification beads* (Beckman Coulter). La libreria sarà pertanto composta da diverse sequenze come rappresentato nella Figura 7.

Figura 7 : ***Rappresentazione di una tipica libreria per il sequenziamento NGS. P5/P7:Sequenze degli adattatori complementari a quelli presenti sulla flow cell; SP1/SP2 : Sequenze complementari dei primer di innesco del sequenziamento;i5 e i7: Sequenze nucleotidiche dette indici che servono come barcode per l'identificazione del campione; Insert : Frammento di DNA o RNA target di una data libreria del campione.***

3.7. Controllo della qualità e delle dimensioni delle librerie

Il controllo di qualità delle librerie è stato effettuato utilizzando lo strumento LabChip GX Touch Nucleic Acid Analyzer (PerkinElmer), che separa mediante elettroforesi capillare i frammenti contenuti nel campione in base alla loro dimensione. Come mostrato in Figura 8, la lunghezza media delle librerie è stata di 250-350 bp.

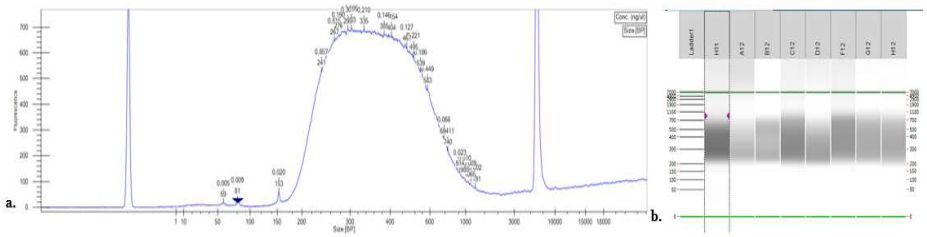

Figura 8 : ***Controllo di qualità delle dimensioni delle librerie. Nell'immagine (a) è riportata la lunghezza espressa in numero di basi e la concentrazione relativa dei frammenti di un campione rappresentativo e nell'immagine (b) la corsa elettroforetica su gel dei singoli campioni.***

3.8. Arricchimento e cattura dei frammenti dell'Esoma

Il termine *enrichment* può essere tradotto in italiano come "arricchimento", si tratta infatti di un processo che ha lo scopo di selezionare, per ciascun campione, le sole librerie che contengono i frammenti di DNA target o di interesse, i quali verranno successivamente sottoposti a sequenziamento. Il pannello xGen Exome Hyb v2 (Integrated DNA Technologies, IDT) è composto da 415.115 sonde oligonucleotidiche 5' biotinilate le quali sono sintetizzate singolarmente secondo gli standard ISO per dare una elevata copertura o coverage delle regione di interesse.

3.8.1. Protocollo enrichment

Per la cattura delle librerie di DNA è stato seguito il protocollo "xGen hybridization capture of DNA libraries for NGS target enrichment" (IDT) il cui *workflow* è suddiviso in diverse fasi, come mostrato nella Figura 9. Il primo step del *workflow* ha lo scopo di bloccare le librerie di DNA utilizzando degli oligonucleotidi complementari agli adattatori impiegati durante la costruzione delle librerie con una soluzione contenente gli "xGen Blocking Oligos". Successivamente, il *pool* di DNA essiccato viene fatto ibridare con le sonde oligonucleotidiche biotilinate specifiche per i geni target selezionati, la reazione avviene a 65°C per 4h. Al termine della reazione di ibridazione vengono effettuati una serie di lavaggi con opportuni buffers. L'ultima azione consiste nella cattura dei frammenti genici di interesse mediante l'utilizzo di biglie magnetiche legate alla streptavidina.

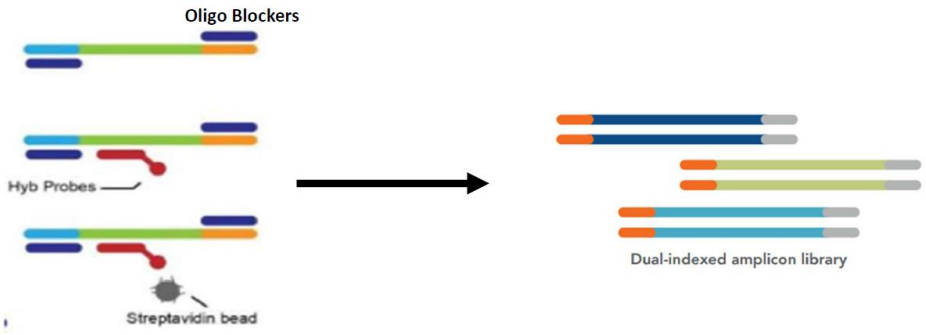

Figura 9: ***Processo di cattura con sonde di ibridazione e conversione in librerie pronte per PCR.***

3.9. Sequenziamento NGS

Il sequenziamento NGS delle librerie di DNA e' stato eseguito mediante tecnologia Illumina utilizzando lo strumento Next seq 550 e la flow cell HighOutput, 300 cicli da 400 milioni di reads. Il controllo di qualita' della corsa NGS e' stato analizzato utilizzando il software Sequencing Analysis Viewer (Illumina) che consente di calcolare il valore di Q-score (Q_{30}) e della cluster density. Q-score e' un valore che indica l'accuratezza di chiamata delle basi durante la corsa di sequenziamento. Come mostrato nella figura 10, il Q_{30} ottenuto dalle nostre corse NGS e' risultato essere superiore al 92%

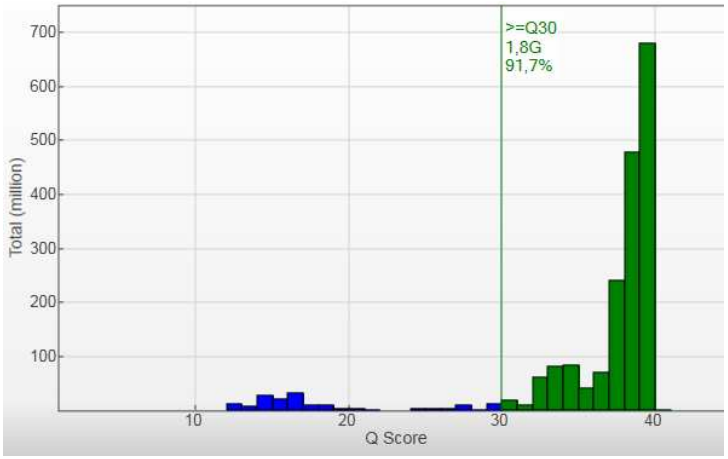

Figura 10: ***Rappresentazione grafica del numero di basi che hanno superato il filtro di qualità con un punteggio Q-score superiore a 30.***

La *cluster density* è dato dal rapporto tra il numero di kilobasi individuate e mm^2 di superficie della *flow cell* e viene misurato come K/mm^2. La cluster density utilizzando la flow cel HighOutput da 300 cicli deve avere un valore ottimale tra 170-220 k/mm^2.

3.9.2. Analisi bioinformatica

L'analisi bioinformatica dei dati ottenuti al termine del sequenziamento è stata effettuata utilizzando il tool bioinformatico CLC Genomics, sviluppato da Qiagen.

Il sequenziamento NGS restituisce come *output* un file Fast Q. Un file FastQ è un file di testo che si compone di 4 righe: la prima riga contiene una serie di codici che funzionano come identificatore della sequenza in esame, relative al modello di sequenziatore e alla tipologia di flow cell utilizzata, la seconda riga contiene la sequenza nucleotidica letta dallo strumento, la terza riga contiene un simbolo "+" e funziona da separatore, la quarta riga contiene informazioni codificate relative al quality score della chiamata delle basi (Figura 11).

```
@ML-P2-14:9:000H003HG:1:11102:17290:1073 1:N:0:TCCTGAGC+GCGATCTA
TTTGGTAACAGCATGAATTATTCTAGCCACTAAAACTCTATGAACATCTTGTGAAGGTTTCAGATAGAGCCTGAAGTACACAGAGAACAATTCTTAAAAAA
+
AAAAAEEE
```

Tabella 2 : ***Tabella riassuntiva relativa ai dati di coverage di una corsa NGS, contenuta nel report generato dal software CLC Genomics*.**

Metrico	Valore
Numero di regioni target (Kb)	197.769
Lunghezza totale delle regioni target (Mb)	34.156.490
Reads per campione	76.512.390
Coverage 50X	99.98%

Validazione mediante sequenziamento Sanger

Alcune mutazioni identificate mediante sequenziamento con tecnica NGS sono state validate utilizzando il sequenziamento Sanger. E' un metodo cosiddetto enzimatico si basa sull'utilizzo dei nucleotidi modificati dideossitrifosfato che si differenziano per l'assenza del gruppo idrossilico sul carbonio 2'e 3'della molecola e un primer per iniziare la reazione di polimerizzazione.

CAPITOLO 4

RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. Parametri clinici dei pazienti con Eritrocitosi

La Tabella 3 riporta i valori medi dei parametri antropometrici e ematochimici del gruppo di studio (n=22). I pazienti presentano un quadro clinico tipico di eritrocitosi, con livelli di ematocrito (Ht), emoglobina (HB) e numero di globuli rossi generalmente superiori ai valori di riferimento. Inoltre, 3 pazienti hanno evidenziato valori di eritropoietina plasmatica superiori ai limiti di riferimento. Tutti i pazienti sono risultati negativi per la variante JAK2 V617F, analizzata mediante Droplet Digital PCR (Medicina di Laboratorio – Azienda Ospedaliera di Padova), escludendo così la diagnosi di Policitemia Vera (PV)

Tabella 3 : ***Parametri antropometrici e biochimici del gruppo di studio*.**

Variabile	Valore	Intervallo di Riferimento
Età (anni)	35 (24-55)	-
Sesso (F/M)	9/13	-
Ematocrito (Ht)	51 (45.7–57.2)	41-50
Emoglobina (Hb)	178 (152–206)	140-175
Globuli Rossi (10^12/L)	5.98 (5.38-7.75)	4.5-5.9
Piastrine	232 (187-323)	150-450
Eritropoietina (IU/L)	8.55 (5-20.5)	2.6-18.5
Globuli Bianchi (10^9/L)	4.646 (4.40-11.00)	4.40-11.00

Ht = Ematocrito , Hb = Emoglobina , GR= Globuli Rossi , PLT= Piastrine , EPO = Eritropoietina. I valori sono espressi come mediana e intervallo di variazione (range).

Analisi delle Varianti Esoniche (WES)

L'analisi delle varianti geniche è stata eseguita utilizzando un algoritmo specifico fornito dal software bioinformatico CLC Genomics, che permette di rilevare e caratterizzare le varianti germinali in modo preciso ed efficiente. Le fasi principali dell'analisi comprendono: a) la chiamata delle varianti e b) il filtraggio delle varianti per rimuovere gli artefatti. La chiamata delle varianti consente l'identificazione delle variazioni genetiche rispetto al genoma di riferimento (Hg38). In questo modo, le varianti genetiche germinali vengono suddivise in due categorie principali: varianti a singolo nucleotide (SNV) e piccole inserzioni o delezioni (Indel), tipicamente definite come varianti di 2-10 bp). Il filtraggio delle varianti prevede l'eliminazione degli artefatti, ossia varianti "false" introdotte

durante il sequenziamento NGS. Gli artefatti possono derivare da rotture del DNA genomico causate dal trattamento con formalina e paraffina, da una frammentazione eccessiva del DNA o da errori nella reazione di PCR, che possono introdurre basi errate, generando così artefatti significativi.

Poiché i geni causativi dell'eritrocitosi non sono ancora completamente noti, in questo studio pilota si è scelto di esplorare l'esoma completo, al fine di considerare una vasta gamma di varianti geniche associate all'eritrocitosi idiopatica. Le varianti geniche germinali ottenute tramite l'analisi WES sono risultate, in media, tra le 35.000 e le 40.000 per paziente. Questo elevato numero di mutazioni deve essere ulteriormente analizzato e classificato nelle cinque principali categorie, secondo le linee guida dell'ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics): benigne, probabilmente benigne, VUS (varianti di significato incerto), probabilmente patologiche o patologiche. Inoltre, queste varianti devono essere correlate al fenotipo clinico, ossia all'eritrocitosi idiopatica. Per questo motivo, dopo attenta lettura bibliografica e con il supporto del tool bioinformatico eVAI, Exper Variant interpreter, (certificata CE IVD in vitro Diagnostic Medical Device) sono stati considerati questi pathway genici: *fattori inducibili dell'ipossia (hypoxia-sensing pathway)*, *fattori di regolazione dell' Eritropoietina*, *geni coinvolti nell'affinità dell'ossigeno per l'emoglobina*, *geni che codificano proteine della glicolisi e della membrana del globulo rosso* e *geni coinvolti nel metabolismo del ferro* . La lista dei geni indagati è mostrata nella tabella 4

TABELLA 4

Simbolo	Nome	Cromosoma	Pathway
EGLN1	Egl-9 Family Hypoxia-Inducible Factor 1	1	Hypoxia-sensing pathway
EGLN2	Egl-9 Family Hypoxia-Inducible Factor 2	19	Hypoxia-sensing pathway
EGLN3	Egl-9 Family Hypoxia-Inducible Factor 3	14	Hypoxia-sensing pathway
HIF-1α	Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha	14	Hypoxia pathway
HIF-2α (EPAS1)	Hypoxia Inducible Factor 2 Subunit Alpha	2	Hypoxia pathway
HIF-3α	Hypoxia Inducible Factor 3 Subunit Alpha	19	Hypoxia pathway
HIF1AN	Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha Subunit Inhibitor	10	Hypoxia pathway
VHL	Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor	3	Hypoxia pathway
BHLHE41	Basic Helix-Loop-Helix Family Member E41	12	Hypoxia pathway
EPO	Erythropoietin	7	Eritropoietina pathway

EPOR	Erythropoietin Receptor	19	Eritropoietina pathway
JAK2	Janus Kinase 2	9	Eritropoietina pathway
GH2	Growth Hormone 2	17	Eritropoietina pathway
GH1	Growth Hormone 1	17	Eritropoietina pathway
CSH2	Chorionic Somatomammotropin Hormone 2	17	Eritropoietina pathway
CSH1	Chorionic Somatomammotropin Hormone 1	17	Eritropoietina pathway
BPGM	Bisphosphoglycerate Mutase	7	Affinità dell'ossigeno per l'emoglobina
HBA1	Hemoglobin Subunit Alpha 1	16	Affinità dell'ossigeno per l'emoglobina
HBA2	Hemoglobin Subunit Alpha 2	16	Affinità dell'ossigeno per l'emoglobina
HBB	Hemoglobin Subunit Beta	11	Affinità dell'ossigeno per l'emoglobina
ANK1	Ankyrin 1	8	Citoscheletro globulo rosso
ANKRD26	Ankyrin Repeat Domain 26	10	Citoscheletro globulo rosso
PFKM	Phosphofructokinase, Muscle	12	Glicolisi
PKLR	Pyruvate Kinase, Liver and RBC	1	Glicolisi
HK1			Glicolisi
SPTA1	Spectrin Alpha, Erythrocytic 1	1	Citoscheletro globulo rosso
SPTB	Spectrin Beta, Erythrocytic	14	Citoscheletro globulo rosso
SLC4A1	Solute Carrier Family 4 Member 1 (Band 3)	17	Citoscheletro globulo rosso
PIEZO1	Piezo Type Mechanosensitive Ion Channel Component 1	16	Citoscheletro globulo rosso
EPB41	Erythrocyte Membrane Protein Band 4.1	1	Citoscheletro globulo rosso
EPB42	Erythrocyte Membrane Protein Band 4.2	15	Citoscheletro globulo rosso
KCNN4	Potassium Calcium-Activated Channel Subfamily N Member 4	19	Citoscheletro globulo rosso
RHAG	Rh Blood Group, Glycoprotein A	6	Citoscheletro globulo rosso
ACO1	Aconitase 1	9	Metabolismo del ferro
HFE	Homeostatic Iron Regulator	6	Metabolismo del ferro
CYB5A	Cytochrome B5 Type A	18	Metabolismo del ferro

CYB5R3	Cytochrome B5 Reductase 3	22	Metabolismo del ferro
BMP2	Bone Morphogenetic Protein 2	20	Metabolismo del ferro
FTH1	Ferritin Heavy Chain 1	11	Metabolismo del ferro
HAMP	Hepcidin Antimicrobial Peptide	19	Metabolismo del ferro
HJV	Hemojuvelin	1	Metabolismo del ferro
SLC40A1	Solute Carrier Family 40 Member 1 (Ferroportin)	2	Metabolismo del ferro
TFR2	Transferrin Receptor 2	7	Metabolismo del ferro
GFI1B	Growth Factor Independent 1B Transcriptional Repressor	9	Emopoiesi
SOCS2	Suppressor Of Cytokine Signaling 2	12	Emopoiesi
SOCS3	Suppressor Of Cytokine Signaling 3	17	Emopoiesi
SH2B3	SH2B Adaptor Protein 3	12	Emopoiesi

Dopo aver filtrato le varianti geniche per i geni di interesse e per il fenotipo clinico, abbiamo identificato per ciascun paziente in media tra 40-60 mutazioni sinonime, 30-50 mutazioni missense e tra 1-3 mutazioni indels (inserzione/delezione), come mostrato nella figura 13.

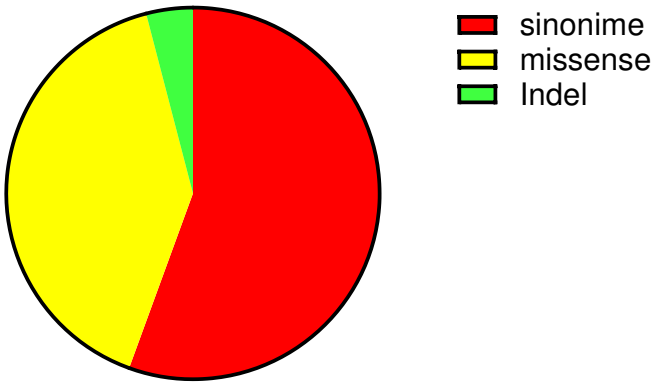

Figura 13 : ***Rappresentazioni del numero delle varianti sinonime, missense e indels identificate nei pazienti affetti da eritrocitosi idiopatica.***

Le varianti geniche sono state poi classificate in benigne, probabilmente benigne, di significato incerto o VUS, probabilmente patogeniche e patogeniche, in accordo alle linee guida internazionali (ACMG). Abbiamo pertanto utilizzato diversi tool bioinformatici come ClinVar e eVAI. Per le mutazioni identificate, entrambi i tool informatici hanno fornito risultati essenzialmente risultati

simili. Sono state identificate 2 mutazioni probabili patogeniche (VHL e HBB), 14 mutazioni VUS di significato incerto e due mutazione non riportata in ClinVar (VHL, p.Arg210Pro e ACO1 p.Pro574Leu) . Le mutazioni VUS possono prevedere un aumento del rischio di malattia, ma non vi sono ancora dati in laboratorio o epidemiologici di popolazioni che confermano il loro ruolo patologico. La maggior parte di queste mutazioni sono coinvolte nel metabolismo del ferro, della via dei fattori di ipossia (Hypoxia-sensing pathway) e nelle proprietà della membrana del globulo rosso (Fig14 e Tabella 5).

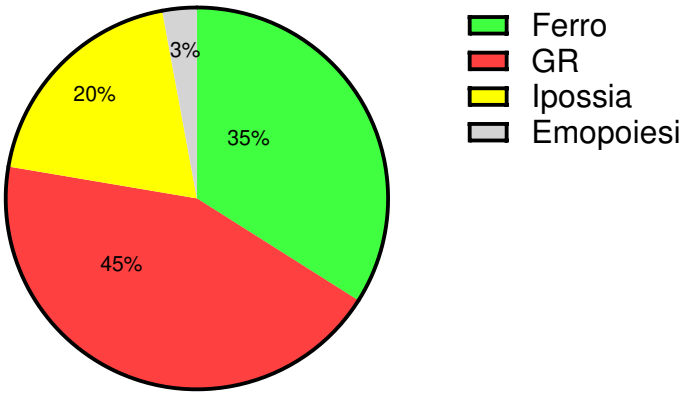

Figura 14: ***Pathways delle varianti identificate*.**

Tabella 5: Mutazioni VUS e likely pathogenic nei pazienti con EI

Gene	Pathway	Chr	Tipo	Mutazione	Variante genica	Variante amminoacido	Classif.	rs dbSNP
HFE	*Met.ferro*	6	SNV	Eterozig.	c.193A>T	p.Ser 65 Cys	VUS	rs1800730
HFE	*Met.ferro*	6	SNV	Eterozig.	c.187C>G	p.His 63Asp	VUS	rs1799945
CYB5R3	*Met.ferro*	22	SNV	Eterozig.	c.248C>T	p.Thr238Met	VUS	rs765710455
SLC40A1	*Met.ferro*	2	SNV	Eterozig.	c.1112G>A	p.Arg371Gln	VUS	rs387907378
ACO1	*Met.ferro*	9	SNV	Eterozig.	c.1721C>T	p.Pro574Leu	NA	Nuova
HIF3A	*Ipossia*	19	SNV	Eterozig.	c.1196C>T	p.Ala401Val	VUS	rs781513922
VHL	*Ipossia*	3	SNV	Eterozig.	c.241C>T	p.Pro81Ser	Likely Path.	rs104893829
VHL	*Ipossia*	3	SNV	Eterozig.	c.629G>C	p.Arg210Pro	NA	Nuova

BHLHE41	*Ipossia*	12	SNV	Eterozig.	c.1087G>A	p.Val363Met	VUS	rs770318138
HBB	*Affinità Ossigeno*	11	SNV	Eterozig.	c.298G>A	p.Asp100Asn	Likely Path.	rs33954595
SLC4A1	GR	17	SNV	Eterozig.	c.1160G>A	p.Arg387Gln	VUS	rs201228073
PIEZO1	GR	16	SNV	Eterozig.	c.1112G>A	p.Arg1356Pro	VUS	rs780831903
ANKRD26	GR	10	SNV	Eterozig.	c.3913G>A	p.Val1305Ile.	VUS	rs10829163
SPTA1	GR	1	SNV	Eterozig.	c.1243C>T	p.His415Tyr	VUS	rs769493017
SPTA1	GR	1	SNV	Eterozig.	c.410G>A	p.Arg137His	VUS	rs200716254
SPTA1	GR	1	SNV	Eterozig.	c.4240C>T	p.Arg1414Cys	VUS	rs201399968
HK1	GR	10	SNV	Eterozig.	c.54G>T	p.Glu18Asp.	VUS	rs776406861
SH2B3	Emopoiesi	12	SNV	Eterozig.	c.784 T>C	P.Trp262Arg	VUS	rs3184504

Vengono infine mostrate alcuni analisi ottenute dal sequenziamento NGS e validate mediante sequenziamento Sanger su DNA estratto da buffy coat dei pazienti affetti da eritrocitosi idiopatica. La figura 15 mostra l'output ottenuto da IVG (Integrative genome Viewer) mediante l'analisi boinformatica su tool CLC Genomics dove è stata identificata la variante in eterozigosi c.629G>C del gene VHL (Von Hippel-Lindau) con sostituzione amminoacidica di una arginina (polare) con prolina (neutra) p.Arg210Pro. Questa variante non è riportata nel database Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) e in Clin Var. La mutazione è stata confermata dall'analisi del sequenziamento mediante Sanger, come riportato nella figura 16.

Figura 15: ***IGV della mutazione c.629G>C***

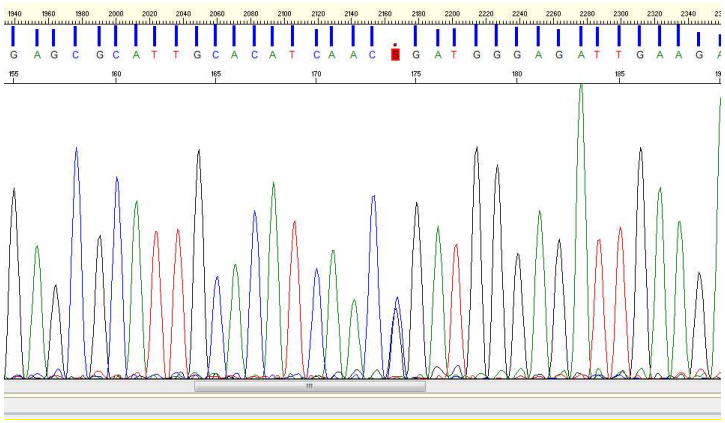

Figura16: ***Sequenziamento Sanger della mutazione c.629G>C***

Il gene VHL, localizzato sul cromosoma 3 (3p25.3), è composto da tre esoni principali: E1, E2 ed E3. Questi esoni codificano per una proteina nota come VHL, che svolge un ruolo importante nella regolazione del fattore inducibile da ipossia (HIF). In condizioni normali, la proteina VHL riconosce e lega HIF, favorendo la sua degradazione da parte del sistema ubiquitina-proteasoma. In presenza di una alterazione della sua funzionalità per mutazioni, si ha la sintesi di una proteina VHL non è più in grado di degradare il fattore ipossico causando un'eccessiva attivazione della via di segnalazione di HIF, contribuendo a condizioni patologiche come l'eritrocitosi e aumentando il rischio di sviluppare tumori associati alla sindrome di Von Hippel-Lindau.

Abbiamo inoltre identificato una variante probabilmente patologica nel gene della subunità Beta dell'emoglobina c.298G>A con sostituzione dell'acido aspartico, amminoacido polare, carico negativamente (gruppo carbossilico). con Asparagina, ammninoacido polare, neutro (gruppo

ammidico) (p.Asp100Asn) (Figura 17 e 18). Questa mutazione provoca la sostituzione dell'aminoacido aspartato con asparagina in posizione 100 della proteina beta globina. Il gene HBB è localizzato sul cromosoma 11p15.5 e codifica per la subunità beta della emoglobina, una proteina fondamentale per il trasporto dell'ossigeno nel sangue. Il gene è composto da 3 esoni e gioca un ruolo cruciale nella formazione dell'emoglobina adulta, che è composta da due catene alfa (codificate dal gene HBA) e due catene beta (codificate dal gene HBB). Le mutazioni nel gene HBB sono associate a diverse emoglobinopatie, tra cui la beta-talassemia e l'anemia falciforme. Queste condizioni possono portare a una produzione inefficace di globuli rossi o alla formazione di emoglobina anomala, con conseguenti sintomi di anemia e, in alcuni casi, eritrocitosi compensatoria. In risposta a bassi livelli di ossigeno o a una ridotta capacità di trasporto dell'ossigeno, il corpo può aumentare la produzione di eritropoietina (EPO), stimolando così la produzione di globuli rossi (Figura 19-20).

Figura 17: ***IGV della mutazione c.298G>A (l'output è in direzione reverse)***

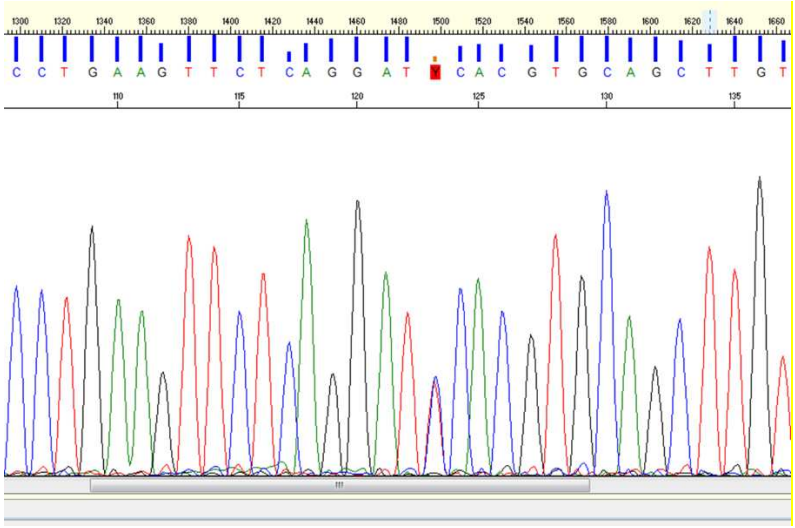

Figura 18 : ***Sequenziamento Sanger della mutazionec.298G>A***

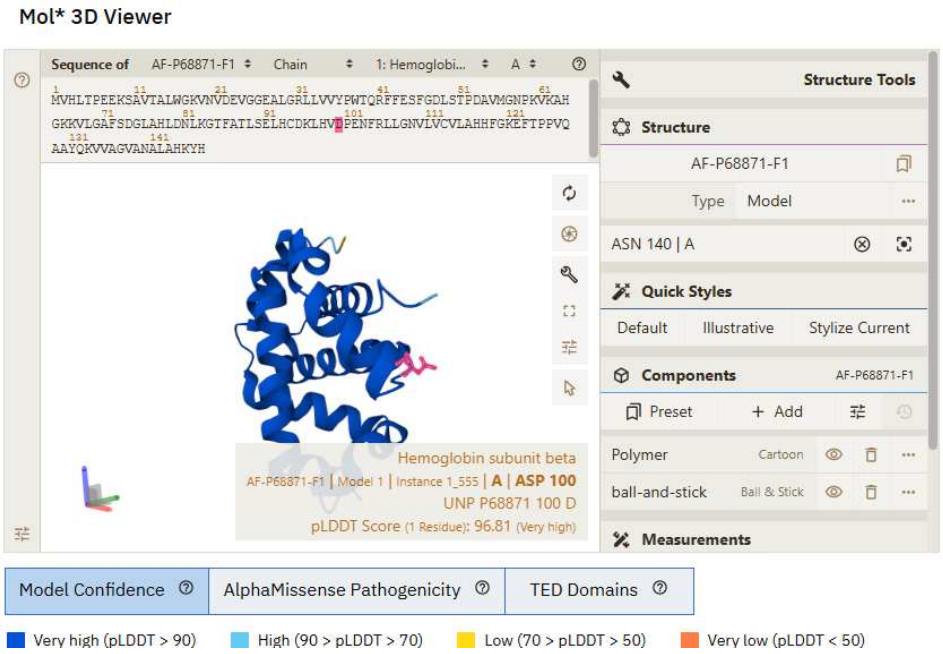

Figura 19: ***Visualizzazione della struttura tridimensionale della subunità beta dell'emoglobina tramite Mol 3D Viewer (fonte AlphaFold tool).***

Figura 20: ***Heat Map delle varianti missenso del gene HBB predetti dal tool AlphaMissense.***

Discussione e conclusioni

La tecnologia di sequenziamento di seconda generazione "Next Generation Sequencing" (NGS) sta rappresentando una rivoluzione nell'attuale panorama scientifico internazionale, grazie alle sue prestazioni e alle numerose applicazioni possibili. Le applicazioni NGS nell'ambito della ricerca e della clinica sono numerose, tra queste vi sono il sequenziamento di interi genomi (*Whole Genome Sequencing, WGS*) o esomi (*Whole Exome Sequencing, WES*) e il sequenziamento di specifiche regioni genomiche mediante pannelli genici. Questa presenta numerosi vantaggi rispetto al sequenziamento di "prima generazione" con metodo Sanger, uno di questi è la possibilità di sequenziare numerosi campioni in parallelo, riducendo di conseguenza il tempo necessario per ottenere un risultato (43). Un ulteriore vantaggio delle tecniche di NGS è rappresentato dalla loro sensibilità, infatti permettono di individuare la presenza di mutazioni aventi una frequenza fino al 1-2% (44,45), invece il limite di sensibilità del sequenziamento Sanger è vicino al 15-20%. Tale caratteristica risulta fondamentale per l'individuazione di mutazioni somatiche aventi una bassa frequenza allelica (VCF), che possono essere implicate in numerosi processi patologici e possono rappresentare un valido bersaglio terapeutico.

Sappiamo dai dati in letteratura che in circa il 70% dei pazienti affetti da eritrocitosi non è possibile determinare una specifica eziologia. Grazie alle moderne metodiche di biologia molecolare,

si è riusciti ad individuare in alcuni di questi pazienti alterazioni a livello dei geni coinvolti nella regolazione dei fattori di ipossia, nella sintesi dell'eritropoietina, nel metabolismo del ferro e nelle caratteristiche della membrana del globulo rosso (47).

Alcuni studi hanno inoltre dimostrato, che i pazienti con EI presentano una elevata frequenza di varianti del gene HFE coinvolto nel metabolismo del ferro (48,49). Sebbene non è ancora chiaro il significato fisiopatologico di questa associazione, si ritiene che una alterazione dei meccanismi di regolazione del ferro possa contribuire all'aumento del numero di eritrociti.

Varianti di geni coinvolti nella regolazione dei fattori di ipossia come HIF3A, VHL e BHLHE41 sono stati identificati nella nostra coorte di pazienti. La condizione di ipossia può infatti stimolare l'espressione dell'eritropoietina, una glicoproteina sintetizzata prevalentemente dal rene che attraverso il sangue raggiunge il midollo osseo, dove stimola il precursore dei globuli rossi (emopoiesi) che prolifera e si differenzia in eritrocita; in tal modo incrementa il numero di eritrociti (48). La sintesi di EPO è regolata dai fattori trascrizionali dell'ipossia. Mutazioni dei geni che regolano il pathway HIF-EPO, come VHL, HIF3A e BHLHE41 possono creare una condizione patologica dove il sistema HIF-EPO rimane a lungo attivato dando origine a una maggiore sintesi di eritropoietina e quindi auna eritrocitosi di tipo secondaria (49).

In conclusione, i risultati del nostro studio evidenziano che l'analisi approfondita dell' esoma nei pazienti affetti da eritrocitosi idiopatica rappresenta un passo fondamentale per migliorare la definizione dell'iter diagnostico. Questo approccio consente di ottenere indicazioni più precise e personalizzate, permettendo una gestione più mirata e ottimizzata dei pazienti con questa condizione rara. Inoltre, l' analisi dell'esoma offre la possibilità di identificare varianti genetiche specifiche che potrebbero influire sull'evoluzione della malattia, contribuendo così a una diagnosi precoce e a trattamenti sempre più adattati alle necessità individuali di ogni paziente

BIBLIOGRAFIA

1. **Bento C, Percy MJ, Gardie B, Maia TM, et al., on behalf of ECE-Consortium.** Genetic basis of congenital erythrocytosis: mutation update and online databases. Hum Mutat 2014;35: 15–26.

2. **Pearson TC, Guthrie DL, Simpson J, Chinn S, Barosi G, Ferrant A, Lewis SM, Najean Y.** Interpretation of measured red cell mass and plasma volume in adults: Expert Panel on Radionuclides of the International Council for Standardization in Haematology. Br J Haematol. 1995;89(4):748-56.

3. **Schapkaitz E, Baiden A, Raburabu S.** Performance evaluation the new automated Atellica Hema 580 hematology analyzer. Int J Lab Hematol. 2024;46(1):63-71.

4. **Mithoowani S, Laureano M, Crowther MA, Hillis CM.** Investigation and management of erythrocytosis. CMAJ. 2020;192(21):E913-E918.

5. **Blacklock HA, Royle GA.** Idiopathic erythrocytosis--a declining entity. Br J Haematol. 2001;115(3):774-81.

6. **McMullin MF.** The classification and diagnosis of erythrocytosis. Int J Lab Hematol. 2008;30(6):447-59.

7. **McMullin MF.** Genetic Background of Congenital Erythrocytosis. Genes (Basel). 2021;12(9):1151.

8. **McMullin MF.** Congenital erythrocytosis. Int J Lab Hematol. 2016;38 Suppl 1:59-65.

9. **McMullin MF.** The classification and diagnosis of erythrocytosis. Int J Lab Hematol. 2008;30(6):447-59.

10. **Keohane C, McMullin MF, Harrison C.** The diagnosis and management of erythrocytosis. BMJ. 2013;347:f6667.

11. **Waksal JA, Tremblay DA.** Contemporary and future strategies in polycythemia vera. Best Pract Res Clin Haematol. 2022;35:101370.

12. **Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW.** The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 2016;127(20):2391-405.

13. **Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, et al.** Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. Lancet. 2005;365(9464):1054-61.

14. **Pardanani A, Lasho TL, Finke C, Hanson CA, Tefferi A.** Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythemia vera. Leukemia. 2007;21(9):1960-3.

15. **Blacklock HA, Royle GA.** Idiopathic erythrocytosis--a declining entity. Br J Haematol. 2001;115(3):774-81.

16. **Kralovics R, Stockton DW, Prchal JT.** Clonal hematopoiesis in familial polycythemia vera suggests the involvement of multiple mutational events in the early pathogenesis of the disease. Blood. 2003;102(10):3793-6.

17. **Hirvonen EAM, Pitkänen E, Hemminki K, Aaltonen LA, Kilpivaara O.** Whole-exome sequencing identifies novel candidate predisposition genes for familial polycythemia vera. Hum Genomics. 2017;11(1):6.

18. **McMullin MF.** Congenital erythrocytosis. Int J Lab Hematol. 2016;38 Suppl 1:59-65.

19. **Mallik N, Das R, Malhotra P, Sharma P.** Congenital erythrocytosis. Eur J Haematol. 2021;106(1):29-37.

20. **Bento C.** Genetic basis of congenital erythrocytosis. Int J Lab Hematol. 2018;40(1):62-67.

21. **Patnaik MM, Tefferi A.** The complete evaluation of erythrocytosis: congenital and acquired. Leukemia. 2009;23(5):834-44.

22. **McMullin MF.** Idiopathic erythrocytosis: a disappearing entity. Hematol Am Soc Hematol Educ Program. 2009;629-35.

23. **Ang SO, Chen H, Gordeuk VR, Sergueeva AI, Polyakova LA, Miasnikova GY, et al.** Endemic polycythemia in Russia: mutation in the VHL gene. Blood Cells Mol Dis. 2002;28(1):57-62.

24. **Bento C, Percy MJ, Gardie B, Maia TM, van Wijk R, Perrotta S, et al.** Genetic basis of congenital erythrocytosis: mutation update and online databases. Hum Mutat. 2014;35(1):15-26.

25. **McMullin MF.** Investigation and Management of Erythrocytosis. Curr Hematol Malig Rep. 2016;11(5):342-7.

26. **Wilson R, Syed N, Shah P.** Erythrocytosis due to PHD2 Mutations: A Review of Clinical Presentation, Diagnosis, and Genetics. Case Rep Hematol. 2016;2016:6373706.

27. **Percy MJ, Furlow PW, Beer PA, Lappin TR, McMullin MF, Lee FS.** A novel erythrocytosis-associated PHD2 mutation suggests the location of a HIF binding groove. Blood. 2007;110(6):2193-6.

28. **Bento C.** Genetic basis of congenital erythrocytosis. Int J Lab Hematol. 2018;40(1):62-67.

29. **McMullin MF.** Investigation and Management of Erythrocytosis. Curr Hematol Malig Rep. 2016;11(5):342-7.

30. **Zmajkovic J, Lundberg P, Nienhold R, Torgersen ML, Sundan A, Waage A, Skoda RC.** A Gain-of-Function Mutation in EPO in Familial Erythrocytosis. N Engl J Med. 2018;378(10):924-930.

31. **McMullin MF.** Genetic Background of Congenital Erythrocytosis. Genes (Basel). 2021;12(9):1151.

32. **Gordeuk VR, Sergueeva AI, Miasnikova GY, Okhotin D, Voloshin Y, Choyke PL, et al.** Congenital disorder of oxygen sensing: association of the homozygous Chuvash polycythemia VHL mutation with thrombosis and vascular abnormalities but not tumors. Blood. 2004;103(10):3924-32.

33. **Gordeuk VR, Prchal JT.** Vascular complications in Chuvash polycythemia. Semin Thromb Hemost. 2006;32(3):289-94.

34. **Pearson TC, Messinezy M.** Idiopathic erythrocytosis, diagnosis and clinical management. Pathol Biol (Paris). 2001;49(3):170-7.

35. **Finazzi G, Gregg XT, Barbui T, Prchal JT.** Idiopathic erythrocytosis and other non-clonal polycythemias. Best Pract Res Clin Haematol. 2006;19(3):471-82.

36. **McMullin MF.** Investigation and Management of Erythrocytosis. Curr Hematol Malig Rep. 2016;11(5):342-7.

37. **Mørkeberg J.** Blood manipulation: current challenges from an anti-doping perspective. Hematol Am Soc Hematol Educ Program. 2013;2013:627-31.

38. **Siegel FP, Tauscher J, Petrides PE.** Aquagenic pruritus in polycythemia vera: characteristics and influence on quality of life in 441 patients. Am J Hematol. 2013;88(9):665-9.

39. **McMullin MF.** Secondary erythrocytosis. Hematology. 2014;19(3):183-4.

40. **Yun S, Vincelette ND.** Update on iron metabolism and molecular perspective of common genetic and acquired disorder, hemochromatosis. Crit Rev Oncol Hematol. 2015;96:12-25.

41. **Pietrangelo A.** Hemochromatosis: an endocrine liver disease. Hepatology. 2007;46(4):1291-301.

42. **Hu T, Chitnis N, Monos D, Dinh A.** Next-generation sequencing technologies: An overview. Hum Immunol. 2021;82(11):801-11.

43. **Singh RR.** Next-Generation Sequencing in High-Sensitive Detection of Mutations in Tumors. J Mol Diagn. 2020;22(9):994-1007.

44. **Dai P, Wu LR, Chen SX, Wang MX, Cheng LY, Zhang JX, et al.** Calibration-free NGS quantitation of mutations below 0.01% VAF. Nat Commun. 2021;12(1):6123.

45. **Logsdon GA, Vollger MR, Eichler EE.** Long-read human genome sequencing and its applications. Nat Rev Genet. 2020;21(10):597-614.

46. **Gangat N, Szuber N, Pardanani A, Tefferi A.** JAK2 unmutated erythrocytosis: current diagnostic approach and therapeutic views. Leukemia. 2021;35(6):2166-81.

47. **Biagetti G, Catherwood M, Robson N, Bertozzi I, Cosi E, McMullin MF, et al.** HFE mutations in idiopathic erythrocytosis. Br J Haematol. 2018;182(2):270-2.

48. **Burlet B, Bourgeois V, Buriller C, Aral B, Airaud F, Garrec C, et al.** High HFE mutation incidence in idiopathic erythrocytosis. Br J Haematol. 2019;186(5):794-5.

49. **Gurnari C, Lombardi AM, Cosi E, Biagetti G, Buccisano F, Franceschini L, et al.** Genetic analysis of erythrocytosis reveals possible causative and modifier gene mutations. Br J Haematol. 2019;187(2):e100-e103.