



**XLIX**  
CONGRESSO  
NAZIONALE  
**AIEOP**

**STUDIO TRAMITE WES DI UNA CORTE DI  
NEUTROPENICI NON REMITTENTI AD  
ESORDIO PRECOCE o TARDIVO : DATI  
PRELIMINARI**

Francesca Fioredda

Unita di Ematologia

IRCCS –Istituto Giannina Gaslini-Genova



## BACKGROUND

### ***Likely Acquired Neutropenia Late Onset/Long Lasting Neutropenia***

**Fenotipo clinico poco espresso (infezioni gravi 13%)**

**Leucopenia e segni di immunodisregolazione**

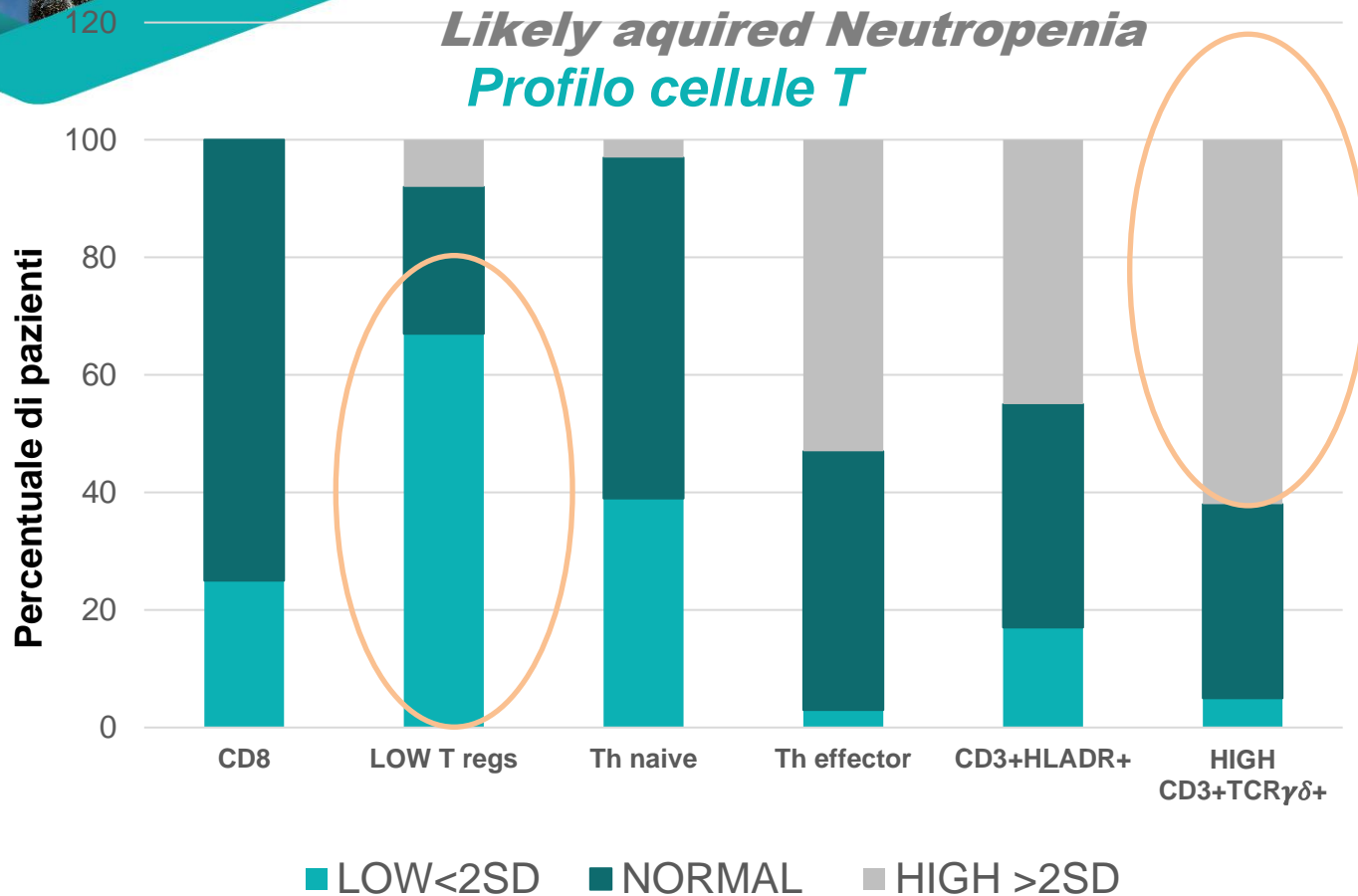
**Incidenza importante di autoimmunità' nel tempo**

**Ac anti N +/-**





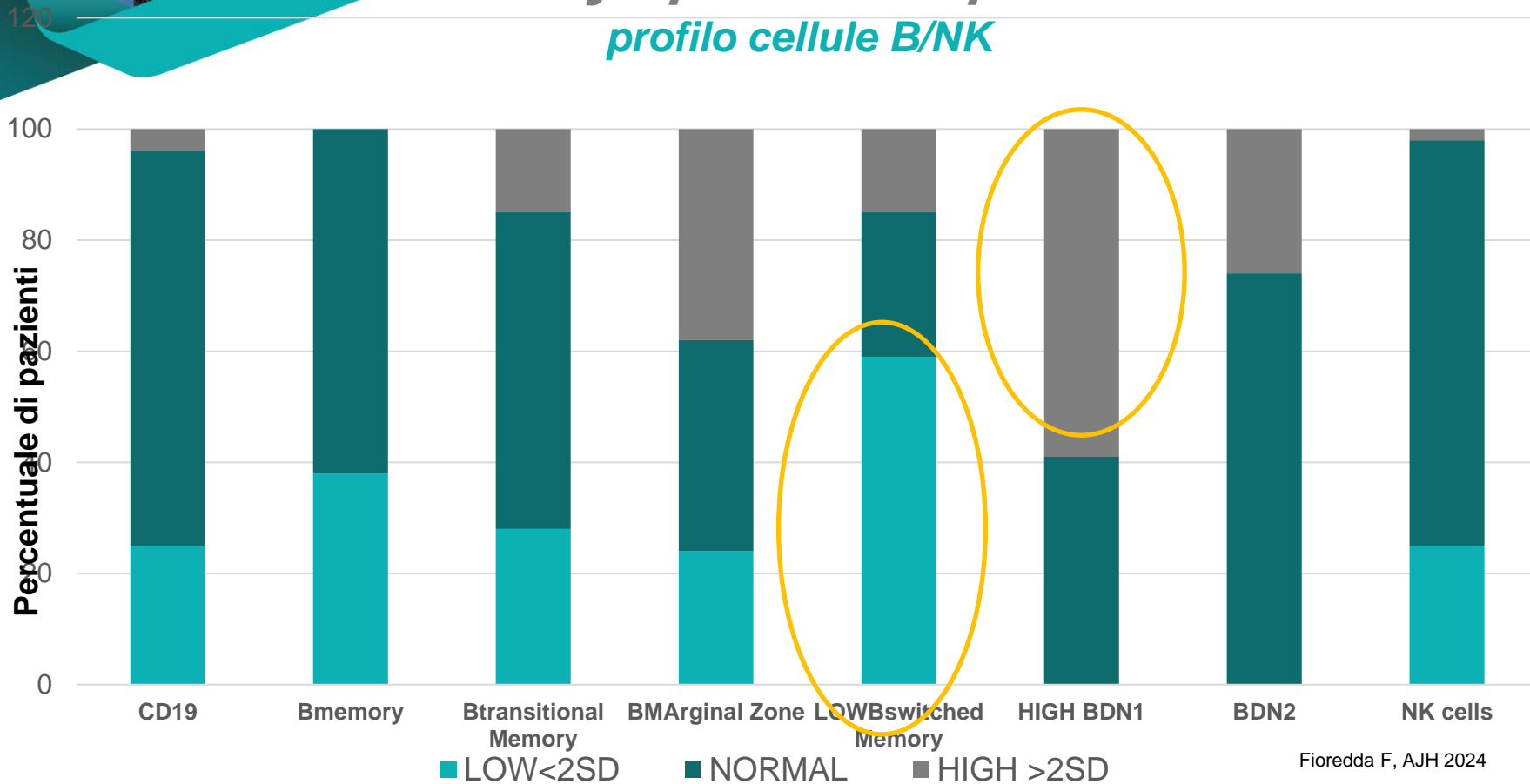
*Likely acquired Neutropenia*  
**Profilo cellule T**





*Likely aquired Neutropenia*

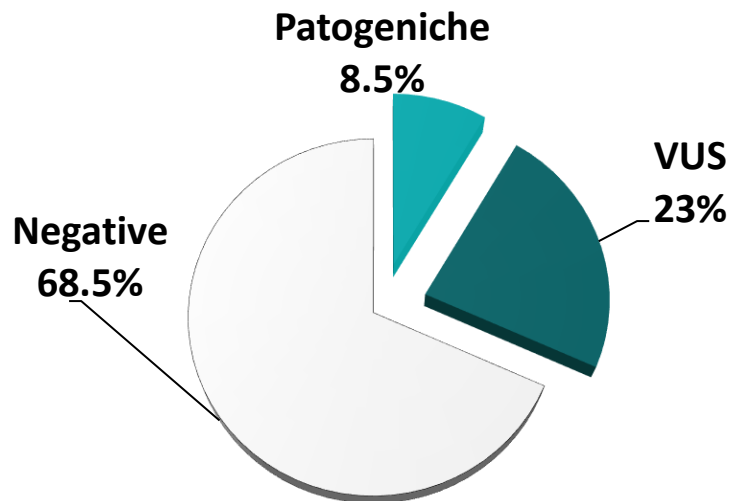
*profilo cellule B/NK*





## Genetic profile

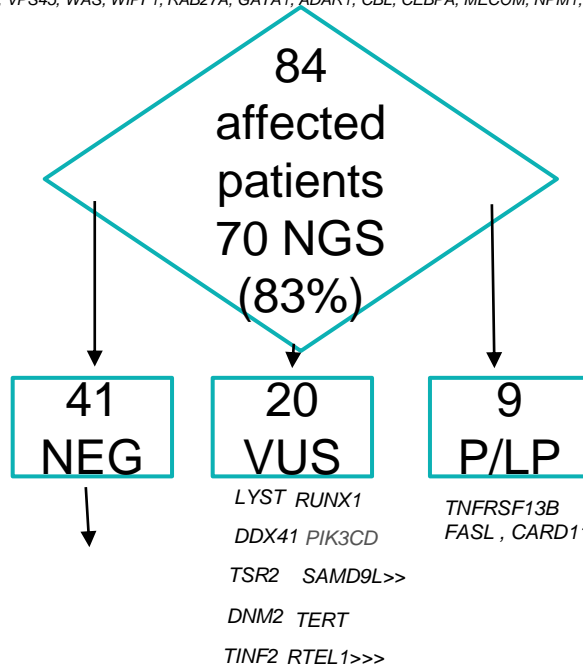
58 available samples





## LO/LL update del registro Italiano NGS 160 genes (BMF & PIRD)

AIRE, CARD11, CASP10, CASP8, CD19, CD20, CD40, CD40L, CD70, CTLA4, CTPS1, DGLRE1C, FADD, FAS, CECR1/ADA2, FASL, FOXP3, GATA2, GBA, GORASP1, IKZF1, IL10, IL10RB, IL2RA, ITK, KRAS, LRBA, NCKAP1L/HEM1, NEMO, NFKB1, NRAS, PIK3CB, PIK3CD, PIK3R1, PRKCD, RAG1, RAG2, RASGRP1, SOCS1, STAT1, STAT3, STAT5B, MPL, TLR8, TNFRSF13B, TNFRSF13C, MAGT1, ACD/TPP1, CTC1, DKC1, MYSM1, NAF1, NHP2, NOP10, PARN, POT1, RPL11, RPL15, RPL26, RPL27, RPL35A, RPL5, RPS10, RPS17, RPS19, RPS24, RPS26, RPS27, RPS28, RPS29, RPS7, RTEL1, STN1, TERC, TERT, TINF2, TSR2, WRAP53/TCAB1, RPS14, ERCC6L2, SRP72, TP53, C16orf57/USB1, DNAJC21, EFL1, SBDS, SRP54, ATM, BLM/RECQL3, LIG4, NBN, NHEJ1, AP3B1, BLOC1S6the, CD27, LYST, PRF1, SH2D1A, SLC7A7, STX11, STXBP2, UNC13-D, XIAP/BIRC4, ANKRD26, ASXL1, ATG2B, CD79B, DDX3X, DDX41, EOMES, ERAP1, GATA3, GSKIP, IL13, MKL1, MYD88, PVT1, RBBP6, REL, TCF3, ETV6, ACKR1/DARC, AK2, AK3, CLPB, CSF3R, CXCR2, CXCR4, DNM2, EIF2, ELA2, G6PC3, GFI1, HAX1, JAGN1, LAMTOR2, RAC2, RMRP, SEC61A1, SLC37A4, SMARCAL1, SMARCD2, STK4,s TAZ, TCIRG1, TCN2, VPS13B, VPS45, WAS, WIPF1, RAB27A, GATA1, ADAR1, CBL, CEBPA, MECOM, NPM1, RUNX1, SAMD9, SAMD9L



Pos NGS 8.5%



Pos NGS 13%





## SCOPO dello STUDIO

Allargare lo spettro genetico per  
ricerca varianti di  
immunodisregolazione  
responsabili di neutropenia



tecnica di  
Whole Exome Sequencing

**WES applicato, ad oggi, a 9 soggetti con pannello  
NGS negativo**

Risultato parziale di una analisi effettuata su una coorte  
di 25 pazienti di cui 16 adulti affetti da CIN



## CRITERI di INCLUSIONE

- i) Pazienti affetti da neutropenia cronica (Ac anti N pos e neg)
  - ii) Diagnosi Np  $\geq 3$  anni fino a 25 e durata superiore a 12 mesi (*Late Onset Neutropenia, LONp*)
- Oppure
- iii) Diagnosi Np  $< 3$  anni con durata superiore a 36 mesi (*Long Lasting Neutropenia, LLNp*)





## **WES multisamples**

- ❖ Varianti selezionate  $< 5\%$  (gnomAD) / regione esonica- sito di splicing
- ❖ CADD $>15$
- ❖ Controlli interni 7000 esomi (probandi & familiari)
- ❖ Interpretazione secondo modalita' di trasmissione & clinica & ACMG

## **WES Singleton**

- ❖ CADD $>20$

## **PANNELLO WES in silico** 538 geni di Inborn Error of Immunity (IEI)

- ❖ CADD $>15$  varianti non condivise



## RISULTATI 1. Clinica

Totale pazienti studiati	9
Sesso F	67%
LO/LL antiN +	89%
LO/LL antiN –	11%
Eta' mediana alla diagnosi	12 aa ( 0.3-1.3 aa)
Durata mediana del FUP	6.9 aa (3.5-16.2 aa)
Valore mediano di N assoluti	480/mmc (300-1280/mmc)
<b>Afte/Sindrome da fatica cronica</b>	44%
<b>Artromialgia/dattilite</b>	20%
<b>Autoimmunita'</b>	55%
<b>Assenza di sintomi</b>	44%



## **RESULTS 2. Emato/immunologia**

Leucopenia	89%
Linfocitopenia	20%
Nk <	89%
CD8 <	20%
CD19 <	20%



## RESULTS 3. Varianti genetiche

	MULTISAMPLES: at least 2 genes/variants shared among the whole exome between neutropenic patients CIN ADULTS	SINGLETON (genes/variants shared or not) among the whole exome	IEI panel (538 genes)
PT1	MST1R/CASP8	MPEG1	CARD10/ LAT
PT2	DNM2/MRE11/IRF7/CD36/PIEZO1/XRCC2/NBAS SIGLEC1/ZNFX1/DNM2/MPO		TGFBR2/RELA/TRNT1
PT3	BRCA1/MPO/ABCB6/CASP5/ EPX/RIF1/MPO		IFNAR1/SLC7A7
PT4	RANBP2/DOCK1/DOCK8/PLCH2/SPINK5		
PT5	EP300/VPS13B/ZNFX1/ ATP7B/PLCL2		AP3D1
PT6	BCLAF1/EPX/MYO9B/PDGFRB/PIK3C2G	CASP4	ADAM17/IL18BP/IPO8/LR RC32
PT7	FANCM/MRE11/SIGLEC1		SLCO2A1/NLRP1
PT8	PLCG2/ATP7B/CXCR1/CD36		POLD1
PT9	POLE/DOCK8/MAP3K21/SIGLEC1/DNM2		HS3ST6



## **Analisi WES multisamples**

Assenza di varianti patogeniche in geni AD

Assenza di varianti omozigoti in geni AR

Assenza di eterozigoti composte in geni AR

## **Analisi singleton WES**

Filtro per Ipotesi de novo neg

Filtri per eterozigosi composta neg

Filtri per omozigosi neg

## **WES Pannello in silico**

Evidenza varianti interessanti non sempre  
in linea con i modelli mendeliani



## Caratteristiche genetiche

**#PT**  
**(genere)**

**GENE**  
**(Etero)**

**Mod**  
**trasmissione**

**Class**  
**ACMG**

**PT1(F)**

MSTIR

AR

hotVUS

**PT2 (F)**

TGFBR2  
RELA

AD  
AD

hotVUS  
hotVUS

TRNT1

AR

hotVUS

**PT3(M)**

SLC7A7  
BRCA1  
MPO  
ABCB6

AR  
AD/AR  
AR  
AD

hotVUS  
LP  
P  
hotVUS

**PT4 (F)**

SPINK5

AR

P

**PT5 (M)**

NEG

-

NA

**PT6 (F)**

NEG

-

NA

**PT7 (F)**

NEG

-

NA

**PT8 (F)**

NEG

-

NA

**PT9 (M)**

NEG

-

NA



## Caratteristiche genetiche Cliniche Immunologiche

#PT (genere)	GENE (Etero)	Clinica	Autoimmunita'	IgG,A,M	Leuco/ linfopenia	Sottopop Linfocitarie
<b>PT1(F)</b>	MSTIR	Fatica cronica Afte Artromialgia	s (ANA+)	Nn	s/s	<NK <CD8
<b>PT2 (F)</b>	TGFBR2 RELA TRNT1	Fatica cronica Afte Artromialgia Dattilite	n	Nn	s/s	<NK <CD19
<b>PT3(M)</b>	SLC7A7 BRCA1 MPO ABCB6	Afte	s (ANA+)	nn	s/n	<NK
<b>PT4 (F)</b>	SPINK5	Fatica cronica Afte	s (ANA+)	>IgM	s/n	<NK <CD8
<b>PT5 (M)</b>	NEG	nn	n	Nn	s/n	<NK
<b>PT6 (F)</b>	NEG	nn	n	nn	n/n	<CD19
<b>PT7 (F)</b>	NEG	nn	s(AcTiroide+)	<IgA	s/n	<NK
<b>PT8 (F)</b>	NEG	nn	n	nn	s/n	<NK
<b>PT9 (M)</b>	NEG	Fatica cronica	s(AcTiroide+)	nn	s/n	<NK <CD4



## Analisi varianti & altre carttetricistiche

#PT (genere)	Eta' esord io (aa)	Segni clinici	Auto Immuni ta'	IgG Ig M Ig A	Leuco/ Linfo penia	Sottop Linfo	GENE (etero)	Mod trasmi ss	ACMG	Dati trio	
<b>PT1(F)</b>	15	Fatica cronica Afte Artromialgia	s(ANA+)	nn	s/s	<NK <CD8	<b>MST1R</b>	AD	hVUS	madre	← Predisposizione a K nasofaringeo
<b>PT2 (F)</b>	2	Fatica cronica Afte Artromialgia Dattilite	n	nn	s/s	<NK <CD19	<b>TGFBR2</b> <b>RELA</b>	AD AD	hVUS hVUS	padre madre	← Marfan like syndrome
<b>PT3(M)</b>	12	Afte	s(ANA+)	nn	s/n	<NK	<b>TRNT1</b> <b>SLC7A7</b> <b>BRCA1</b> <b>ABCB6</b> <b>MPO</b> <b>SPINK5</b>	AR AR AD/AR AD AR AR	hVUS LP/P LP hVUS P P	mother madre padre madre padre madre	← Coloboma Microftalmia
<b>PT4 (F)</b>	11,5	Fatica cronica Afte	s (ANA+)	>IgM	s/n	<NK <CD8					





## Analisi varianti & altre carttetricistiche

#PT (genere)	Eta' esord io (aa)	Segni clinici	Auto Immuni ta'	IgG Ig M Ig A	Leuco/ Linfo penia	Sottop Linfo	GENE (etero)	Mod trasmi ss	ACMG	Dati trio	
<b>PT1(F)</b>	15	Fatica cronica Afte Artromialgia	s(ANA+)	nn	s/s	<NK <CD8	<b>MST1R</b>	AD	hVUS	madre ←	Predis a K nasofarigeo
<b>PT2 (F)</b>	2	Fatica cronica Afte Artromialgia Dattilite	n	nn	s/s	<NK <CD19	<b>TGFBR2 RELA</b>	AD AD	hVUS hVUS	padre ← madre	Marfan like syndrome
<b>PT3(M)</b>	12	Afte	s(ANA+)	nn	s/n	<NK	<b>BRCA1 ABCB6</b>	AD/AR AD	LP hVUS	padre madre ←	Coloboma Microftalmia
<b>PT4 (F)</b>	11,5	Fatica cronica Afte	s (ANA+)	>IgM	s/n	<NK <CD8					



## Analisi varianti & altre carttetricistiche

#PT (genere)	Eta' esord io (aa)	Segni clinici	Auto Immuni ta'	IgG Ig M Ig A	Leuco/ Linfo penia	Sottop Linfo	GENE (etero)	Mod trasmis s	ACMG	Dati trio
<b>PT1(F)</b>	15	Fatica cronica Afte Artromialgia	s(ANA+)	nn	s/s	<NK <CD8				
<b>PT2 (F)</b>	2	Fatica cronica Afte Artromialgia Dattilite	n	nn	s/s	<NK <CD19	<b>RELA</b>	AD	hVUS	madre
<b>PT3(M)</b>	12	Afte	s(ANA+)	nn	s/n	<NK	<b>BRCA1</b>	AD/AR	LP	Padre
<b>PT4 (F)</b>	11,5	Fatica cronica Afte	s (ANA+)	>IgM	s/n	<NK <CD8				



**STORIA CLINICA della PZ con RELA** p.S536del  
prima valutazione IGG DIC 2018 (15 anni):

**Benessere generale, non episodi infettivi**

Leuco Neutropenia **GB 1570 (N 600 L 740 M 140)**

Screening immunologico: neg, eccetto **AB anti-neutrofilo: POSITIVI**

Ecografia addome: splenomegalia (D max 17.3 cm)

Aspirato midollare: no atipie, serie eritroide e mieloide nella norma,46XX

Biopsia osteomidollare: normale cellularita'

NGS immuno-ematologico: negativo



## Dicembre 2019 (16 anni)

- ❖ Benessere generale, non episodi infettivi
- ❖ Leuconeutropenia **GB 910**, **Nass 430/mmc**, **L 340/mmc**

## Luglio 2020 (17 anni)

- ❖ Comparsa di afte a livello della mucosa labiale.
- ❖ Leucopenia **GB 1860/mmc**, **N 710/mmc**, **L 880/mmc**, deficit del comparto B e degli NK alle sottopopolazioni linfocitarie, pannello ALPS neg
- ❖ PM e BOM: Cellularità midollare percentualmente **ai limiti inferiori** della norma per la età anagrafica.



## Negli ultimi anni...

**2021** Comparsa di dattilite, persistono afte, > indici di infiammazione

**2022** Comparsa **cervicalgia** e frequenti episodi di **gonalgia**

**2024** Manifesta artrite gomito, ginocchia, caviglia e dolore e limitazione funzionale al II e III dito delle mani , persistenza neutropenia e afte



## Aploinsufficienza RELA

RELA/C11ORF95 FUSION GENE, INCLUDED

HGNC Approved Gene Symbol: [RELA](#)

Cytogenetic location: [11q13.1](#) Genomic coordinates (GRCh38): [11:65,653,601-65,663,857](#) (from NCBI)

### Gene-Phenotype Relationships

Location	Phenotype	Phenotype MIM number	Inheritance	Phenotype mapping key
<a href="#">11q13.1</a>	Autoinflammatory disease, familial, Behcet-like-3	<a href="#">618287</a>	AD	3

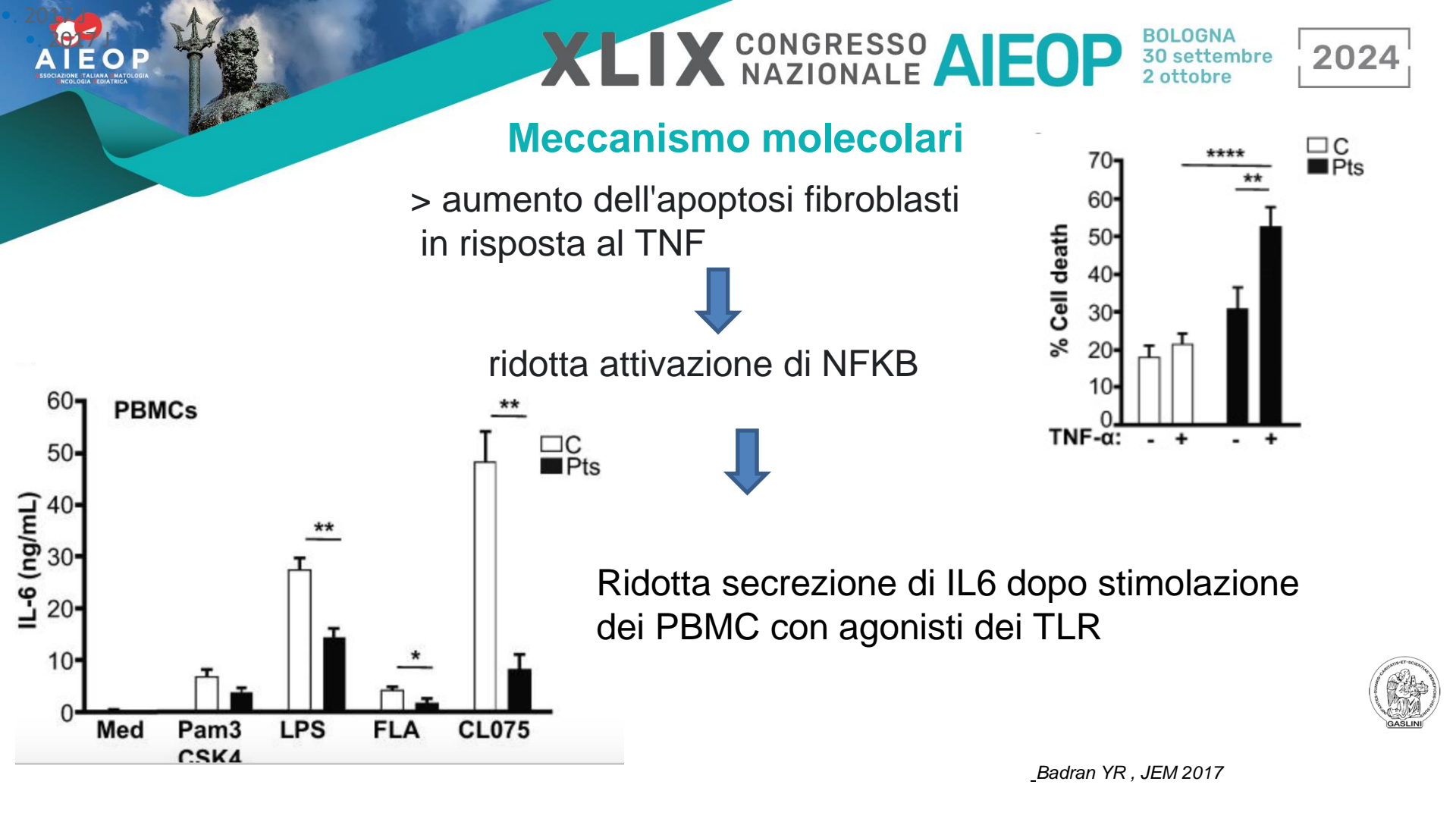
*RELA* e' componente chiave di NFκB

NF-κB addetto alla tolleranza verso il self ed alla regolazione della risposta immune

*Aploinsufficienza RELA* -> alterazione dell 'attivazione di NF-κB -> up-regolazione di geni antiapoptotici

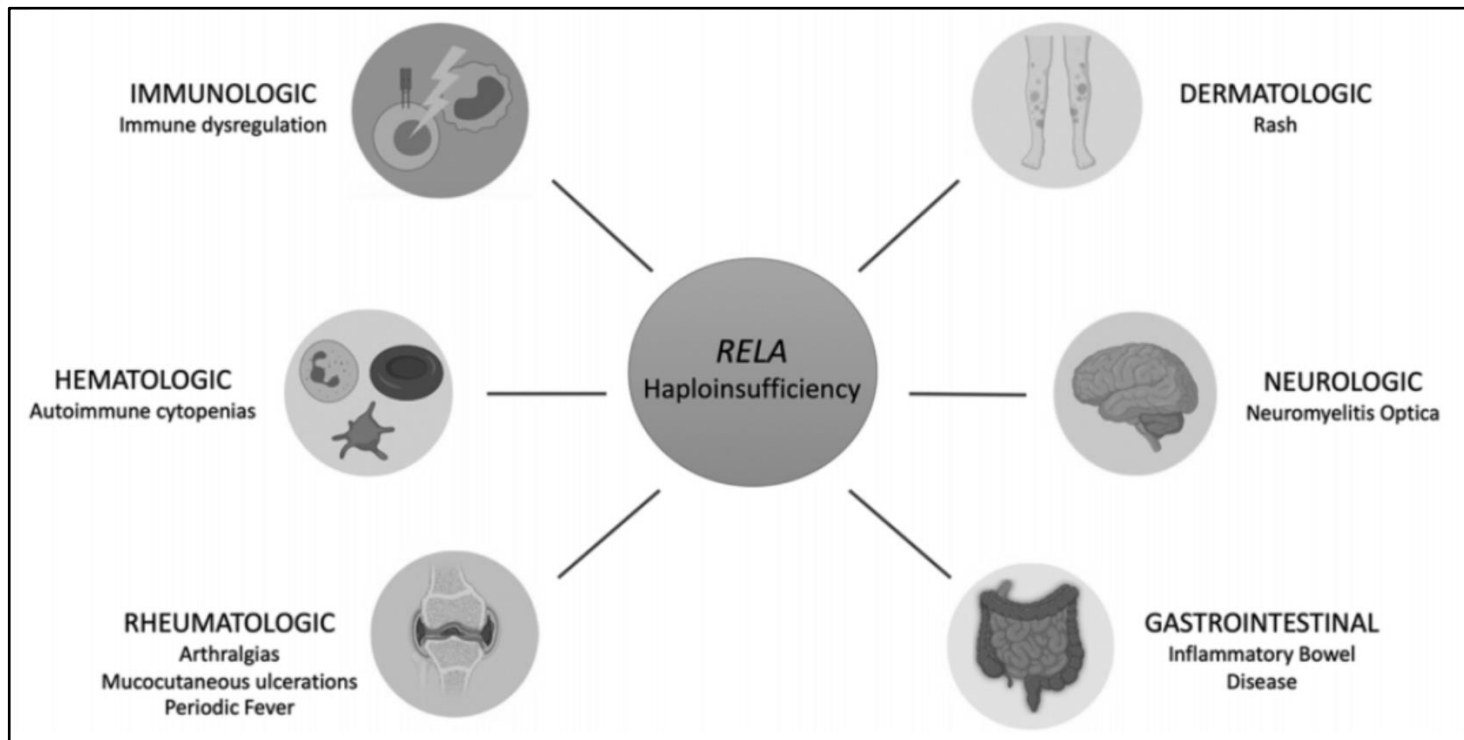


>> APOPTOSI CELLULARE





## Sintesi possibili manifestazioni cliniche







## Programma di validazione funzionale PT2

In progress

- colture midollari con anti TNFalfa
- Espressione/funzione della proteina p65 (Rel-A) (parte di NFkB)



## Osservazioni conclusive

WES → significativo nell' 11% della corte

Presenza di sintomi di auto/inflammation autoimmunita'  
nella corte dei neutropenici portatori di varianti

Ipotesi di meccanismi di trasmissione non strettamente  
mendeliani

ANALISI DI >>CAMPIONI CON METODI DI «BIG DATA»



GRAZIE!





## Caratteristiche genetiche Cliniche Immunologiche

#PT (genere)	Eta' Esordio	GENE (Etero)	Clinica	Autoimmunita	IgG, A,M	Leuco/ linfopeni a	Sottopop Linfocitari e
PT1(F)	15	MSTIR	Fatica cronica/Afte Artromialgia	s (ANA+)	nn	s/s	<NK <CD8
PT2 (F)	2	TGFBR2 RELA TRNT1	Fatica cronica/Afte Artromialgia Dattilite	n	nn	s/s	<NK <CD19
PT3(M)	12	SLC7A7 BRCA1 MPO ABCB6 SPINK5	Afte	s (ANA+)	nn	s/n	<NK
PT4 (F)	11,5		Fatica cronica Afte	s (ANA+)	>IgM	s/n	<NK <CD8
PT5 (M)	2,3	NEG	nn	n	Nn	s/n	<NK
PT6 (F)	0,3	NEG	nn	n	nn	n/n	<CD19
PT7 (F)	16,7	NEG	nn	s(AcTiroide+)	<IgA	s/n	<NK
PT8 (F)	17,3	NEG	nn	n	nn	s/n	<NK
PT9 (M)	14,6	NEG	Fatica cronica	s(AcTiroide+)	nn	s/n	<NK <CD4



***Il sottoscritto .....***

*ai sensi dell'art. 3.3 sul Conflitto di Interessi, pag. 17 del Reg. Applicativo dell'Accordo Stato-  
Regione del 5 novembre 2009,*

dichiara

- ☐ *che negli ultimi due anni NON ha avuto rapporti diretti di finanziamento con soggetti  
portatori di interessi commerciali in campo sanitario*
- ☐ *che negli ultimi due anni ha avuto rapporti diretti di finanziamento con i seguenti soggetti  
portatori di interessi commerciali in campo sanitario:*
  - .....
  - .....
  - .....

**Varianti monoalleliche** del gene **RELA** causano manifestazioni infiammatorie Behcet's-like → **RAID** (RELA- associated autoinflammatory disease), ereditate in modalità Autosomica-dominante  
**L'aploinsufficienza del gene RELA** ↓

↓  
**Down-regolazione del complesso NF-κB**

↓  
**Iperespressione del TNF-alfa**

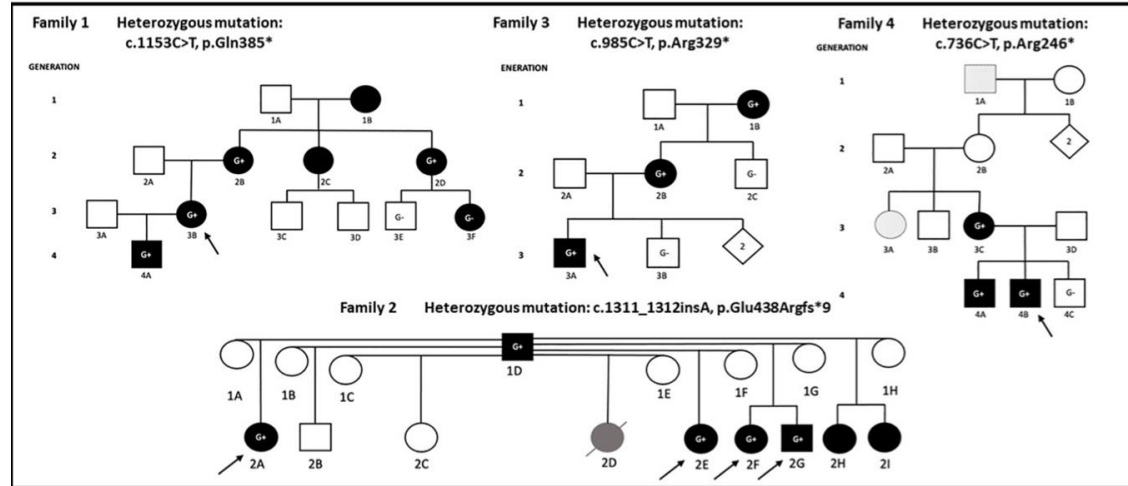
**RELA/C11ORF95 FUSION GENE, INCLUDED**

HGNC Approved Gene Symbol: **RELA**

Cytogenetic location: **11q13.1** Genomic coordinates (GRCh38): **11:65,653,601-65,663,857** (from NCBI)

Gene-Phenotype Relationships

Location	Phenotype	Phenotype MIM number	Inheritance	Phenotype mapping key
<b>11q13.1</b>	Autoinflammatory disease, familial, Behcet-like-3	<b>618287</b>	<b>AD</b>	<b>3</b>





## Test funzionali

- ✓ Espressione della proteina p65 (Rel-A) con WESTERN BLOT
- ✓ Studio dell'apoptosi dei fibroblasti dopo stimolazione con TNF alfa
- ✓ Studio dell'espressione nei fibroblasti dei geni dopo stimolo con TNF alfa
- ✓ Ridotta secrezione di IL6 dopo stimolazione delle PBMC con agonisti dei TLR