

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE

CORSO DI LAUREA IN MEDICINA E CHIRURGIA



Lunghezza del telomero e citopenie: esperienza monocentrica

Relatore:

Chiar.mo Prof. Angelo Ravelli

Correlatore:

Dott.ssa Francesca Fioredda

Candidata:

Benedetta Giordano

Sessione di laurea del 24 Luglio 2020

A Carlo Alberto, Maria Vittoria e Paolo Enrico,

i miei raggi di sole,

anche nelle giornate più nuvolose.

Sommario

INTRODUZIONE	4
BIOLOGIA DEL COMPLESSO TELOMERO/TELOMERASI	4
OMEOSTASI DEL TELOMERO LUNGO LA VITA	9
PATOGENESI DELLE TELOMEROPATIE.....	10
MUTAZIONI GENETICHE ED IMPATTO NELLA FISIOPATOLOGIA.....	14
DELLE MALATTIE DEL TELOMERO	14
DISCHERATOSI CUTANEA, MODELLO DI “TELOMEROPATIA”	17
LUNGHEZZA DEI TELOMERI NELLA DISCHERATOSI CONGENITA	21
TELOMERI NELLE INSUFFICIENZE MIDOLLARI SU BASE GENETICA.....	23
NON DISCHERATOSI CONGENITA.....	23
TELOMERI E ANEMIA APLASTICA ACQUISITA.....	25
TELOMERI E AUTOIMMUNITA’	26
TELOMERI E IMMUNODEFICIENZA.....	28
TELOMERI E NEOPLASIE	30
MISURA LUNGHEZZA TELOMERI.....	31
VALUTAZIONE DELLA LUNGHEZZA DEL TELOMERO NEI LEUCOCITI DI INDIVIDUI SANI.....	36
ALGORITMO DIAGNOSTICO TELOMEROPATIE	38
OBIETTIVI E RAZIONALE DELLO STUDIO	39
MATERIALI E METODI	40
RISULTATI.....	47
CARATTERISTICHE GENERALI	47
ANOMALIE FENOTIPICHE.....	49
QUADRO EMATOLOGICO	50
CONCORDANZA TRA I GRUPPI 2 e 3, SENSIBILITA’ E SPECIFICITA’	52
DELLA LUNGHEZZA DEI TELOMERI	52
ASSETTO IMMUNITARIO	53
VARIANTI GENETICHE	54
TERAPIA.....	58
DISCUSSIONE.....	59
BIBLIOGRAFIA.....	63
RINGRAZIAMENTI.....	68

INTRODUZIONE

BIOLOGIA DEL COMPLESSO TELOMERO/TELOMERASI

Durante il processo replicativo di interfase, la sintesi del DNA sul filamento lento avviene in modo discontinuo attraverso la produzione di corti frammenti. Questo meccanismo va incontro ad un problema all'estremità della forchetta replicativa. Il primer di RNA finale sintetizzato sul filamento lento non può essere sostituito da DNA perché, in assenza dell'estremità 3'—OH, non vi è un sito di legame per la polimerasi. Senza alcun meccanismo riparatorio si perderebbe una parte di DNA all'estremità del cromosoma ad ogni divisione cellulare. (1)

I telomeri rappresentano la soluzione: brevi sequenze di DNA (nell'uomo TTAGGG) specializzate poste all'estremità dei cromosomi garantiscono la completa replicazione delle estremità cromosomiche e le proteggono dalla fusione e dalla degradazione, preservando la stabilità del genoma. (2)

Con l'accorciamento dei telomeri, conseguente alla divisione cellulare, le estremità dei cromosomi cessano di essere protette con danno del DNA e arresto del ciclo cellulare. La lunghezza dei telomeri viene pertanto preservata con l'aggiunta di nucleotidi mediata dalla telomerasi. (3)

La sequenza di DNA telomerico viene riconosciuta da proteine leganti il DNA che richiamano la telomerasi, che ha il compito di ripristinare queste sequenze ad ogni divisione cellulare.

La maggior parte delle ripetizioni telomeriche sono a doppio filamento, ma l'estremità è costituita da una sporgenza a singolo filamento 3'. La sporgenza al 3' agisce come sito di priming per la telomerasi ed è cruciale per la protezione dell'estremità del cromosoma. Essa agisce formando una struttura particolare, il t-loop, che sembra evitare il segnale di danno del DNA, evitando quindi la perdita di telomeri.

Questa regione è costituita da un gruppo di proteine che formano un cappuccio protettivo del cromosoma, il complesso della "Shelterina", costituito da sei proteine specializzate come estesamente illustrato nella tabella seguente.

Tab. 1. *Caratterizzazione delle proteine che formano il complesso Shelterina (4; 5)*

PROTEINA	INTERAZIONI	FUNZIONE
TRF1 (o TERF1): telomere repeat binding factor 1	Interazione diretta con le ripetizioni TTAGGG doppio filamento	Regolazione della lunghezza del telomero
TRF2 (o TERF2): telomere repeat binding factor 2	Interazione diretta con le ripetizioni TTAGGG doppio filamento	Stabilizza la forma T-loop e regola la lunghezza del telomero
TINF2 (o TIN2): TRF1 interacting nuclear factor 2	Si associa direttamente a TRF1, TRF2 e TPP1 e indirettamente a POT1	Lega TPP1 e POT1 a TRF1 e TRF2 e lega TRF1 a TRF2, stabilizzando l'associazione di TRF2 col telomero. Regola la lunghezza del telomero
POT1: protection of Telomeres 1	Interazione diretta con l'estremità telomerica a singolo filamento	Inibisce la risposta di danno del DNA e regola la lunghezza del telomero
TPP1 (o ACD): telomerase recruitment factor	Interazione con TINF2 e POT1	Migliora POT1 legandolo al DNA telomerico a singolo filamento e regola la lunghezza del telomero in combinazione con POT1
RAP1 (o TRF2IP): TRF2 interacting protein	Si associa a TRF2	Regola la lunghezza del telomero

L'interazione fra le proteine del complesso Shelterina e la sequenza di DNA del telomero stabilizza la struttura stessa del telomero e regola l'accesso delle proteine coinvolte nella riparazione e nell'allungamento del DNA. (4)

La struttura nucleoproteica che si forma crea un cappuccio protettivo all'estremità del cromosoma, con due funzioni principali: I) nasconde l'estremità del cromosoma da inappropriati meccanismi di riparazione del DNA, che altrimenti potrebbero riconoscere il filamento libero di DNA come una rottura e determinare eventi di fusione; II) previene la degradazione dei geni vicini al telomero, che altrimenti si perderebbero per incompleta replicazione del DNA. (5)

Il complesso "shelterina" ha una precisa specificità per le ripetizioni telomeriche TTAGGG grazie alla presenza di diversi siti di riconoscimento nel complesso. (4)

Alcune componenti del complesso, TRF1 e TRF2, hanno un dominio simile ed entrambe legano i tandem telomerici formando omo-dimeri o -tetrameri. Inoltre, hanno un dominio (TRFH) al quale legano le altre componenti del complesso ed altre proteine associate.

TRF1 e TRF2 infatti sono connesse a TIN2, che stabilizza il legame di TRF1 e TRF2 col DNA e, inoltre, è fondamentale per il reclutamento di altre due componenti del complesso: TPP1 e POT1.

POT1 lega il DNA telomerico a singolo filamento, legando di preferenza l'estremità 3', ma può associarsi alla sequenza TTAGGG in altre zone.

Ultima proteina del complesso è Rap1, che interagisce esclusivamente con TRF2. (6)

TRF2 e POT1 agiscono principalmente sopprimendo il segnale di danno del DNA: TRF2 previene l'attivazione dell'ATM chinasi all'estremità del cromosoma, e POT1 previene l'attivazione dell'ATR chinasi.

Quando le proteine del complesso sono rimosse dai telomeri, si ha un accorciamento molto più rapido, a prova del fatto che le diverse subunità del complesso agiscono evitando l'attacco nucleolitico dell'estremità cromosomica. (6)

Il complesso Shelterina è fondamentale poi per il reclutamento della telomerasi e per il controllo dell'omeostasi della lunghezza del telomero. (7)

La telomerasi è una trascrittasi inversa a RNA che aggiunge le ripetizioni telomeriche di DNA all'estremità del cromosoma, usa la sporgenza a singolo filamento 3' del telomero come primer ed un RNA interno come stampo per aggiungere delle ripetizioni telomeriche, evitando la perdita di nucleotidi che si avrebbe altrimenti.

La ribonucleoproteina telomerasi umana è costituita da diverse componenti: RNA telomerasico (TERC), il dominio catalitico trascrittasi inversa (TERT) e delle proteine accessorie importanti per la stabilità del complesso e per il legame al telomero, discherina, NOP10, NHP2 e GAR1. (8)

La telomerasi viene reclutata dai telomeri grazie a TPP1, del complesso Shelterin. Inoltre, TPP1 associata a POT1 stimola la telomerasi RAP in vitro. (9) Sembra che TPP1 interagisca col DNA o potenzialmente con TR per facilitare la traslocazione del sito catalitico della telomerasi. (10)

Inoltre, TPP1 lega la telomerasi attiva, in particolare attraverso la parte superficiale denominata TEL e si è studiato che cellule prive di questa interazione mostrano un accorciamento progressivo dei telomeri fino alla completa assenza degli stessi. (11)

Le vie di regolazione della telomerasi e di Shelterina giocano un ruolo fondamentale nella regolazione della lunghezza del telomero. (6)

Essa è mantenuta costante attraverso un feedback negativo che blocca l'attività della telomerasi. Se un telomero è troppo lungo si ha un meccanismo di blocco, se troppo corto lo stesso blocco viene inibito.

L'inibizione della telomerasi è influenzata dalla quantità totale di shelterina sul telomero. Essendo questa proporzionale alla lunghezza delle ripetizioni TTAGGG, più lunghi sono i telomeri, maggiore è la quantità di shelterina che può inibire la telomerasi. Per il controllo inoltre è fondamentale l'attività di POT1, che lega il DNA a singolo filamento. Una forma

mutata di POT1 che non lega ssDNA comporta una completa perdita del controllo della lunghezza del telomero. (12)

Inoltre, il complesso CST, composto da tre proteine (CTC1, STN1 e TEN1), ha un ruolo inibitorio sulla telomerasi, determina il limite massimo dell'allungamento del telomero, attraverso il legame col DNA a singolo filamento e sposta la telomerasi, inattivandola, una volta che la sporgenza 3' del telomero ha raggiunto una determinata lunghezza. (13)

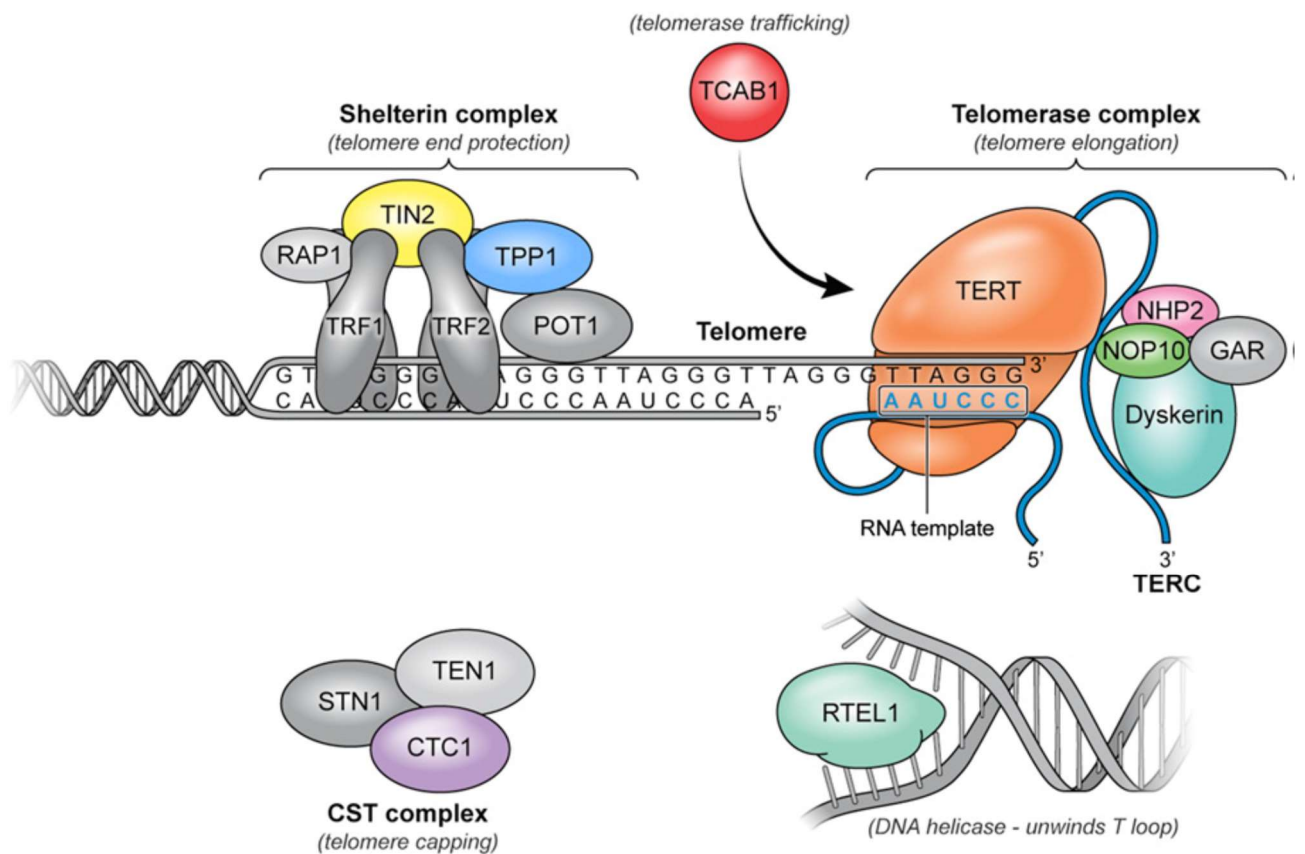


Figura 1 (da Townsley, Blood 2014): Strutture coinvolte nel mantenimento del telomero (in grigio le proteine non coinvolte in patologie note)

Un altro regolatore negativo della lunghezza del telomero nelle cellule umane è l'RNA TERRA, la cui trascrizione comincia in regioni subtelomeriche, e che contiene delle ripetizioni UUAGGG che legano TERC e TERT; sembra che TERRA inibisca l'attività della telomerasi legandosi ad essa. (14)

Quando i telomeri sono eccessivamente corti, le proteine del complesso Shelterina non possono più associarsi alla sequenza telomerica e formare il cappuccio all'estremità del cromosoma. L'azione inibitoria del complesso Shelterina sulla segnalazione del danno di DNA viene persa e la cellula quindi esce da G1 ed entra in G0. (15) A questo punto, si attiva la

fosforilazione di p53, si rende manifesta l'espressione di p21 e sono inibite le chinasi ciclina dipendenti, che altrimenti determinerebbero una progressione del ciclo cellulare. (16)

A questo punto la cellula entra in senescenza o va in apoptosi. L'accumulo delle cellule senescenti, in seguito all'accorciamento dei telomeri, porta all'invecchiamento tissutale e dell'organismo. (5)

Con la differenziazione i meccanismi di allungamento del telomero si riducono, diventando poi insufficienti a recuperare la perdita di telomeri.

Nella maggior parte di cellule somatiche differenziate (esclusi i linfociti) la telomerasi non è espressa, determinando la perdita di 50-100 paia di basi ad ogni divisione. (5) L'accorciamento dei telomeri è quindi la normale conseguenza dell'invecchiamento. Ad esempio, la lunghezza media dei telomeri dei linfociti si riduce all'incirca da 11 kb alla nascita a 4 kb nei centenari. Per questo i telomeri sono stati definiti "l'orologio biologico" interno alla cellula, che determina il numero possibile di divisioni cellulari.

La telomerasi è attiva nella cellula staminale emopoietica (CSE), ma è stato dimostrato che non è in grado di mantenere una lunghezza del telomero costante col progredire dell'età o in seguito a numerosissimi processi replicativi (14). Nella CSE normale, l'accorciamento dei telomeri avviene lentamente, fino ai 50-60 anni, ed è poi più rapido, segno questo che l'attività della telomerasi declina con l'età (17). Molto probabilmente, la telomerasi è in primo luogo richiesta per agire direttamente sulle estremità cromosomiche delle CSE e, in secondo luogo, può intervenire indirettamente supportando la proliferazione cellulare o la trascrizione di proteine (18). Il suo è quindi un ruolo fondamentale nella stabilizzazione genomica e, in caso di mutazioni di geni codificanti per proteine coinvolte in tale processo, si attiva un meccanismo deleterio di danno al DNA e morte cellulare.

OMEOSTASI DEL TELOMERO LUNGO LA VITA

Il telomero dell'embrione ha una lunghezza variabile ed è più corto di quello dell'ocita e della morula rispettivamente (19), per una riduzione dell'attività della telomerasi (18).

Nelle fasi successive, la blastocisti mostra un vivace aumento dell'attività della telomerasi con allungamento dei telomeri. (18; 19) Dalla sesta/settima settimana di gestazione si osserva un rapido accorciamento della lunghezza del telomero, che va poi rallentando fra l'ottava e l'undicesima settimana e a seguire rimane costante. Dopo la decima settimana la lunghezza dei telomeri non differisce da quella dei neonati. (20)

Alla nascita la lunghezza del telomero è altamente variabile (21), ciò è congruente con l'estrema variabilità osservata negli embrioni umani (18) e sembra essere associata alla lunghezza dei telomeri dei genitori. Essa resta simile nei diversi tessuti e non ci sono differenze sostanziali fra maschi e femmine (21), a differenza di ciò che accade negli adulti, in cui nei vari tessuti si hanno lunghezze differenti (22) e la lunghezza dei telomeri è maggiore nelle donne (23).

Dopo la nascita la lunghezza dei telomeri comincia a decrescere dopo le prime settimane, anche nei nati pretermine, ad indicare come il mantenimento della lunghezza dei telomeri sia una caratteristica specifica della vita intrauterina. (21)

L'accorciamento dei telomeri è più pronunciato nei primi anni di vita e successivamente rallenta nei giovani adulti e ancor di più nei più anziani. (24)

Sembra che il tasso di accorciamento negli adulti sia più importante in coloro che avevano una maggior lunghezza dei telomeri alla nascita. (25) La lunghezza dei telomeri comunque varia fra individui della stessa età, e sembra essere legata ad una serie di fattori genetici ed ambientali (es.: sesso, etnia, stress, attività fisica, obesità, fumo, consumo di alcol).

Questi fattori si associano alla produzione di radicali liberi dell'ossigeno (26), sembra che le ripetizioni ricche in G del telomero siano particolarmente suscettibile al danno ossidativo. (27)

È descritta la associazione tra stress e lunghezza dei telomeri, già visibile nelle fasi più precoci della vita. Di fatto, neonati da madre con elevato stress durante la gravidanza mostrano telomeri tendenzialmente più corti. Eventi di violenza subiti ed esposizione allo stress condizionano la "cortezza" dei telomeri. (28)

PATOGENESI DELLE TELOMEROPATIE

I telomeri si accorciano fisiologicamente di circa 50-100 basi ad ogni divisione cellulare, a causa della replicazione incompleta del filamento lento; di conseguenza la maggior parte delle cellule somatiche hanno una capacità replicativa limitata. (29)

L'accorciamento dei telomeri viene in qualche modo ri-equilibrato dall'attività della telomerasi, espressa nei tessuti ad alta replicazione, come le cellule staminali, le cellule germinali e i linfociti attivati. (30)

Varianti genetiche che colpiscono la funzione dei geni coinvolti nel mantenimento dei telomeri determinano delle patologie conosciute come telomeropatie, caratterizzate da un accorciamento prematuro dei telomeri e insufficienza proliferativa dei tessuti coinvolti. (29)

I danni delle Cellule Staminali Ematopoietiche (CSE) e dei linfociti sembrerebbero derivare da un segnale persistente di danno del DNA, che causerebbe una mancata formazione del cappuccio a livello dei telomeri e, oltre una certa soglia, all'apoptosi.

Il mancato "cappuccio" dei telomeri nelle cellule con ridotta attività della telomerasi potrebbe influenzare la lunghezza del telomero in modo diretto e indiretto. In modo diretto attraverso la normale replicazione del DNA telomerico (31, 32) con danno da parte delle specie reattive dell'ossigeno (33). In modo indiretto, deriverebbe dall'aumento di divisioni cellulari richieste per compensare l'aumento delle perdite. Divisioni cellulari compensatorie in cellule con deficit della telomerasi, sarebbero particolarmente dannose perché ad ogni divisione cellulare aggiuntiva si accorcerebbero ulteriormente i telomeri.

L'esaurimento di cellule staminali nei neonati e bambini spiegherebbe l'insufficienza midollare tipica dei pazienti pediatrici con deficit nella telomerasi. Quando un numero sufficiente di cellule staminali viene conservato fino all'età adulta, lo stesso meccanismo potrebbe portare un esaurimento delle cellule del sistema immunitario. Questa ipotesi si allinea all'osservazione che dopo la pubertà l'accorciamento dei telomeri nei sottotipi più maturi di T e nelle NK è molto più marcato che nei granulociti, come marcatore affine alle cellule staminali.

La lunghezza dei telomeri nei leucociti diminuisce in maniera molto importante alla nascita. Questo è spiegato dall'importante proliferazione delle cellule staminali ed immunitarie dopo la nascita. (32)

Analoghi meccanismi sarebbero alla base della compromissione di altri organi bersaglio quali polmone e fegato, alla cui patogenesi, oltre ai difetti di riparazione/rigenerazione del danno

tissutale conseguente alla compromissione del mantenimento del telomero, contribuirebbero anche fattori ambientali (figura 2, 34).

Altra conseguenza delle anomalie del mantenimento del telomero è l'instabilità genomica, che può predisporre allo sviluppo di leucemie/mielodisplasie (35).

Nella figura 2, vengono riassunti i meccanismi patogenetici alla base del fenotipo clinico che si osserva nei pazienti con telomeropatie (da Calado, Blood 2008).

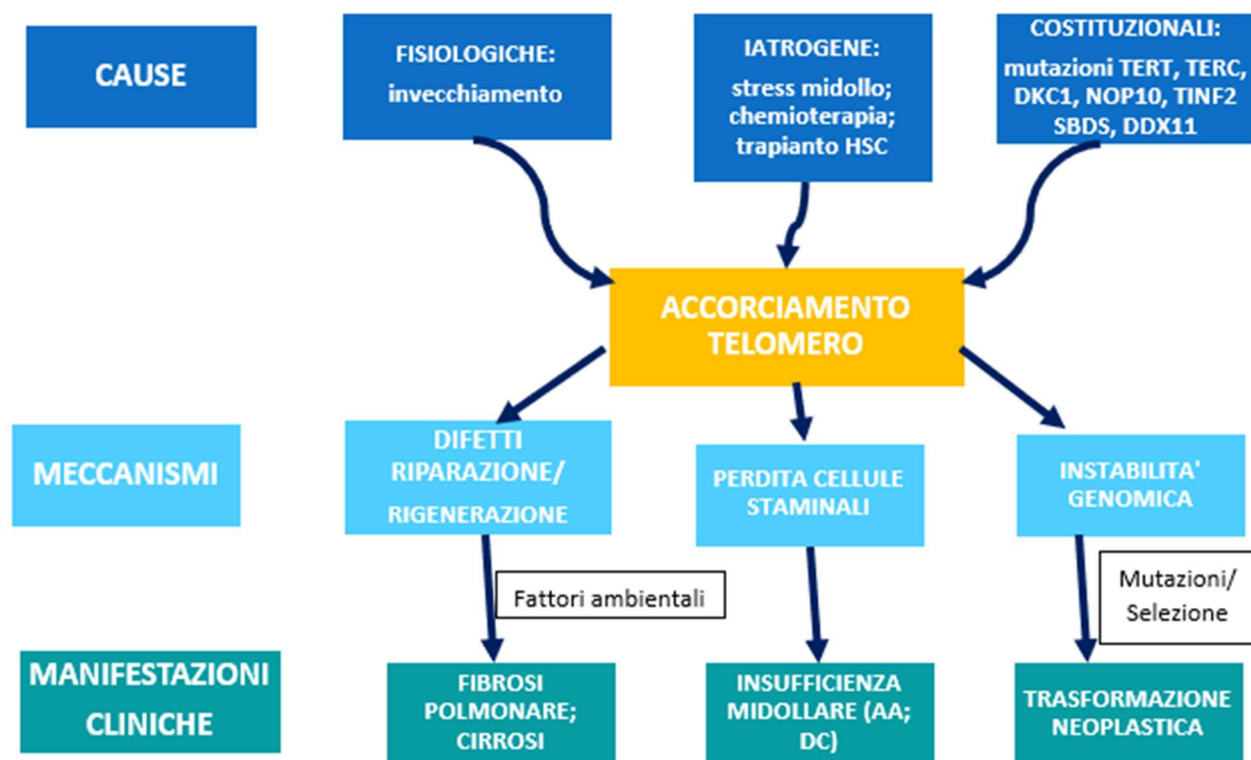


Figura 2 da Calado, 2008: *Meccanismi patogenetici nelle telomeropatie*

Le mutazioni di geni che regolano la lunghezza del telomero causano numerose patologie con caratteristiche cliniche diverse, da molto lievi a piuttosto gravi anche nell'ambito della stessa variante. (36) Rispetto alla normale velocità di accorciamento dei telomeri di circa 60 basi/anno negli individui sani, nei soggetti con patologia del telomero la perdita di DNA è di circa 120 paia di basi/anno. (37)

Spesso le famiglie con telomeropatie presentano il fenomeno dell'anticipazione genetica, con riduzione dell'età d'esordio e aggravamento della severità dei sintomi nelle generazioni successive. (38) Alterazioni nel mantenimento della lunghezza dei telomeri nelle linee germinali determina un progressivo accorciamento nelle generazioni successive, nei modelli murini, e sembra sia questa la base del fenomeno dell'anticipazione genetica. (39)

È importante l'analisi della lunghezza del telomero quando si studiano nuove varianti genetiche, perché i telomeri corti sono il risultato evidente della patogenicità della variante in questione. (30)

Le malattie del telomero sono patologie con fenotipi molto variabili, differenze di penetranza e età d'esordio. (40)

Spesso la diagnosi di telomeropatia è subdola ed inaspettata come nel caso del riscontro di mutazioni di TERT per esempio in soggetti affetti da linfocitosi granulosa, aplasia pura dei globuli rossi e neutropenia idiopatica. Mutazioni di TERT possono essere associate a piccoli cloni di cellule di emoglobinuria parossistica notturna. (35)

Le telomeropatie possono rendersi manifeste anche come "patologie d'organo" isolate a carico soprattutto del sistema gastrointestinale, del fegato (cirrosi) e del polmone (fibrosi polmonare). Si possono manifestare inoltre correlate alla presenza di neoplasie: elevata incidenza di telomeropatie sono presenti nei soggetti affetti da carcinoma squamoso della lingua. (41)

Alle volte la patologia d'organo può essere il segno isolato di telomeropatia come per la fibrosi polmonare ad esordio nell'età adulta. (42)

La fibrosi polmonare idiopatica si associa nel 65% dei casi ad accorciamento del telomero (42) ed un sesto delle polmoniti familiari è causata dalle mutazioni di TERT e TERC con diversa penetranza ed espressività.

Tale patologia viene diagnosticata di solito in età adulta (43) ed alla fibrosi polmonare inoltre si possono associare altri disturbi come la bronchiolite obliterante, l'ipersensibilità e l'enfisema isolato. (35)

Da un punto di vista patogenetico il telomero corto è la causa e quanto più il telomero è accorciato maggiore è la gravità e più precoce è l'esordio (dai neonati all'età adulta). (44)

Infatti, mentre la lunghezza dei telomeri dei linfociti è molto inferiore al primo percentile negli individui con esordio di malattia alla nascita (24), la lunghezza dei telomeri non è così ridotta, anzi, spesso si trova fra primo e decimo percentile rispetto all'età, nelle fibrosi familiari o sporadiche con una mutazione genetica conosciuta. (44)

Dati recenti da modelli murini mostrano che, sebbene il polmone sia un tessuto con un turnover cellulare piuttosto lento, la fibrosi polmonare causata dalla disfunzione dei telomeri sia portata dall'insufficienza delle cellule staminali, in particolare da quelle epiteliali di tipo II alveolari. (45)

Anche il fegato può essere coinvolto mostrando fibrosi fino alla cirrosi; i quadri possono essere paucisintomatici rivelandosi solo negli stadi più avanzati come la cirrosi e l'ipertensione portale. Per fare diagnosi è sempre necessaria biopsia, anche la steatosi all'imaging può essere un segno premonitore. (46)

Sono state descritti poi casi di stenosi esofagea, enteropatie, enterocoliti, osteoporosi, necrosi avascolare ed immunodeficienza associati a accorciamento del telomero. (47)

MUTAZIONI GENETICHE ED IMPATTO NELLA FISIOPATOLOGIA DELLE MALATTIE DEL TELOMERO

Le varianti riscontrate nei geni che preservano la lunghezza del telomero nella maggior parte dei casi portano ad un insufficiente mantenimento della sua lunghezza, anche se in alcuni casi c'è unicamente disfunzione del telomero senza eccessivo accorciamento (37).

L'insufficienza midollare ha aperto gli studi alla biologia del telomero: vennero riscontrati telomeri corti nei leucociti di pazienti con anemia aplastica acquisita (42), il che portò alla scoperta di geni mutati che causavano un'anemia aplastica ereditaria, la discheratosi congenita. (43)

Vennero poi riscontrate diverse mutazioni con vari meccanismi di trasmissione, autosomico dominante e recessivo e X-linked. Per alcuni geni, in particolare DKC1 e TINF2, sono comuni le mutazioni de novo. (33)

Queste mutazioni possono influire in vario modo sul mantenimento del complesso telomero-telomerasi.

La riduzione dell'attività della telomerasi più comunemente è data dalle mutazioni di TERT e TERC, legati all'attività catalitica della telomerasi, e di geni coinvolti nella biogenesi della telomerasi e nella stabilità di hTR, come DKC1, NHP2 e NOP10. (37)

Le mutazioni di TERC e TERT determinano telomeropatie sia nei bambini che negli adulti. (43)

La perdita di funzione di 1 dei due geni sugli autosomi è sufficiente a ridurre l'attività della telomerasi, accelerando l'accorciamento del telomero. (35)

Le manifestazioni patologiche sono più severe nelle mutazioni di TERC rispetto a quelle di TERT, forse per un maggiore effetto sulla telomerasi, per lo meno misurato in vitro. (48)

Altre mutazioni riguardano i fattori che determinano il reclutamento della telomerasi al telomero, come TCAB1, componente essenziale della dinamica di strutture subnucleari, conosciute come i corpi di Cajal. TCAB1 lega 4 nucleotidi presenti sia su hTR che su corpi di Cajal. La carenza di TCAB1 porta una relocalizzazione della telomerasi dai corpi di Cajal al nucleolo, una riduzione del reclutamento della telomerasi ed un accorciamento del telomero. (49)

Il ripiegamento di TCAB1 è svolto da un complesso, TRiC, che quindi influenza anch'esso il reclutamento e il posizionamento della telomerasi e compromette l'aggiunta delle ripetizioni telomeriche. (50)

A differenza di quanto accade in assenza della discherina, che lega anch'essa direttamente hTR, alterazioni di TCAB1 e TRIC non determinano instabilità di hTR, ma alterazioni nel reclutamento della telomerasi.

Mutazioni composte nel gene WRAP53, che codifica per TCAB1, sono state identificate in pazienti con la discheratosi congenita.

Il reclutamento della telomerasi richiede inoltre l'interazione fra TERT e l'estremità TEL su TPP1, anche queste strutture possono risultare alterate e causare telomeropatie. (43)

Altre mutazioni sono legate ai processi di sintesi del filamento ricco in C, che seguono l'allungamento mediato dalla telomerasi del filamento ricco in G.

Il primo di questi geni è CTC1, che promuove il riavvio della sintesi del filamento lento nelle forcelle di replicazione e la sintesi della porzione ricca in C, funzioni in comune con STN1 e TEN1, assieme a cui costituisce il complesso CST. (51)

Mutazioni di questo gene sono state identificate inizialmente nella maggioranza dei pazienti con sindrome di "Coats plus".

Rispetto alle altre mutazioni con esordio alla nascita, quelle di CTC1 non determinano sempre un accorciamento dei telomeri. (52)

Vi sono poi le mutazioni che conducono ad un'instabilità del telomero, come quelle di RTEL1, fattore che agisce sulle strutture D-loops, agendo sia sul telomero che in altri siti. (43)

Mutazioni sono state riscontrate nei pazienti con Hoyeraal Hreidarsson, con telomeri molto corti, e fibrosi polmonare familiare. (53)

Esistono poi mutazioni i cui meccanismi non sono ancora stati compresi, come le mutazioni di TIN2, che codifica per TIN2, che determinano un accorciamento severo dei telomeri con patologia ad esordio precoce, spesso sindrome di Hoyeraal Hreidarsson e di Revesz. (54)

Un altro gene, di recente scoperta, implicato nelle telomeropatie è PARN. Mutazioni eterozigoti sono state riportate inizialmente associate a bambini con fibrosi polmonare familiare. (55) Nella maggior parte dei casi la lunghezza dei telomeri dei leucociti era inferiore al primo percentile.

PARN è legato alla funzione di mRNA. Inoltre, è coinvolto nella maturazione di alcuni RNA non codificanti. Quindi le cellule dei bambini con mutazioni bialleliche di PARN presentano una riduzione dei trascritti RNA hTR, DKC1, RTEL1 e TRF1; anche se resta da chiarire se queste riduzioni siano sufficienti a determinare difetti telomerici. (43)

Infine, nuovi dati supportano la presenza di nuove telomeropatie che si manifestano con un aumentata predisposizione ad alcuni specifici tumori, come melanomi e gliomi, per mutazione di POT1, e che esitano in un allungamento e disfunzione dei telomeri. (56)

DISCHERATOSI CUTANEA, MODELLO DI “TELOMEROPATIA”

La prima telomeropatia descritta è stata la discheratosi congenita (DC), caratterizzata dalla triade mucocutanea: leucoplachia, lesione premaligna che coinvolge la mucosa orale, anomalie della pigmentazione cutanea e distrofia ungueale, segno di senescenza prematura delle cellule staminali del derma e dell'ectoderma rispettivamente.

Le manifestazioni quindi di tale patologia derivano dalla perdita delle cellule staminali, in particolare nei tessuti ad alta proliferazione.

È una patologia pediatrica multi-sistemica, che esordisce precocemente, con alta penetranza e differente severità delle manifestazioni cliniche.

Il fenotipo può essere più o meno espresso; si va dalle forme paucisintomatiche fino alle più gravi o con peculiarità come la sindrome Hoyeraal-Hreidarsson e quella di Revesz. (57)

Dal punto di vista patogenetico la DC come già detto, presenta un accorciamento eccessivo dei telomeri che porta ad apoptosi, con conseguente riduzione dell'emopoiesi e della vita delle cellule somatiche. Inoltre, si ha instabilità cromosomica che predispone allo sviluppo di neoplasie. (41)

Il primo gene riscontrato mutato nella discheratosi congenita è DKC1, che codifica per la discherina, e determina patologia X-linked. Tipicamente i maschi affetti presentano la triade: distrofia delle unghie, leucoplachia e iperpigmentazione cutanea. A questi sintomi tipici possono associarsi insufficienza midollare e coinvolgimento di altri organi come polmoni, fegato, sistema genito urinario e scheletro e maggior predisposizione allo sviluppo di neoplasie, come si vede nella tabella 2. (58)

La riduzione delle cellule staminale e dei progenitori midollari può essere la causa di insufficienza midollare e possibile sviluppo di sindrome mielodisplastica. (59)

Il midollo osseo nei soggetti con discheratosi congenita e negli adulti con mutazioni dei telomeri può essere di tipo ipo/acellulare, comunemente segni anticipatori sono macrocitosi ed anemia.

Soggetti affetti da discheratosi congenita possono presentare una compromissione d'organo con una diversa frequenza. Le percentuali sono riferite al registro più grande di discheratosi congenita curato dai colleghi inglesi:

Tab. 2 *Interessamento multisistemico nella Discheratosi Congenita. (da Dokal 2011)*

Interessamento clinico/anomalie	% di pazienti*
Caratteristiche maggiori/comuni	
-Anomalie pigmentazione cutanea	89
-Distrofia ungueale	88
-Insufficienza midollare	85.5
-Leucoplachia	78
Altre caratteristiche riconosciute	
-Epifora	30.5
-Difficoltà apprendimento/ ritardo dello sviluppo/ ritardo mentale	25.4
-Patologie polmonari	20.3
-Bassa statura	19.5
-Carie/perdita dentale	16.9
-Prematura perdita/ingrimento di capelli/ ciglia rade	16.1
-Iperidrosi	15.3
-Neoplasie	9.8
-Ritardo di crescita intrauterino	7.6
-Patologie epatiche/ ulcera peptica/ enteropatia	7.3
-Atassia/ Ipoplasi cerebellare	6.8
-Ipogonadismo / criptorchidismo	5.9
-Microcefalia	5.9
-Stenosi uretra/Fimosi	5.1
-Osteoporosi /Necrosi asettica/Scoliosi	5.1
-Sordità	0.8

Oltre al gene DKC1 sopradescritto, altri geni causativi di discheratosi congenita con modalità di trasmissione differenti sono elencati in ordine di frequenza nella seguente tabella.

Tab, 3 Varianti geniche causative di Discheratosi Congenita (modificata da Dokal 2015):

Gene	Modalita' di trasmissione
DKC1	Xlinked
TINF2	AD
TERC	AD
TERT	AD/AR
RTEL1	AD/AR
CTC1	AR
NOP10	AR
NHP2	AR
WRAP53 (TCAB1)	AR
ACD (TPP1)	AD/AR
PARN	AD/AR
NAF1	AD
POT1	AR
STN 1	AR

Tra questi geni, la perdita di un singolo allele funzionante di TERT o TERC, che codifica per TR, è sufficiente per determinare telomeri eccessivamente corti, rivelando come

l'aploinsufficienza della telomerasi sia un meccanismo sottostante la discheratosi congenita. (39)

Alcune caratteristiche cliniche sono più facilmente legate alla mutazione di specifici geni.

L'ipoplasia cerebellare per esempio (che può essere presente alla nascita e manifestarsi come ritardo di crescita intrauterina e microcefalia) è una caratteristica principale della sindrome di Hoyeraal-Hreidarsson e l'immunodeficienza può essere severa. Essa si associa a mutazioni di DKCI o di RTEL1.

La sindrome Revesz è caratterizzata dalla presenza di retinopatia essudativa bilaterale o malattia di Coats. Spesso sono presenti calcificazioni intracraniche. Si associa a mutazioni dominanti di TINF2. (43)

Una terza forma, detta "Coats plus", sovrappone la sindrome di Revesz con la presenza di retinopatia essudativa o teleangiectasie. (60)

Inoltre sono presenti calcificazioni intracraniche asimmetriche, diverse rispetto a quelle osservate nella sindrome di Revesz, associate a leucoencefalopatia e cisti cerebrali; osteopenia; emorragie gastrointestinali ricorrenti. Le manifestazioni cerebellari ed ematologiche della sindrome di Revesz sono però ridotte o assenti. La Coats plus si associa a mutazioni eterozigoti di CTC1.

In tutte queste varianti possono associarsi le caratteristiche cliniche della discheratosi congenita, come la triade mucocutanea e il coinvolgimento midollare, normalmente quest'ultimo è meno severo nella forma Coats plus. (43)

La discheratosi congenita e la sindrome di Hoyeraal Hreidarsson, si associano a mutazioni su più geni, mentre la sindrome di Revesz e Coats plus hanno un'unica mutazione, sui geni TINF2 e CTC1 rispettivamente.

Nonostante i progressi della ricerca, il 30-40% dei casi di discheratosi congenita, o di malattie presunte tali perché caratterizzate da telomeri inferiori al primo percentile, rimane orfana di gene.

LUNGHEZZA DEI TELOMERI NELLA DISCHERATOSI CONGENITA

I telomeri di lunghezza inferiore al primo percentile sono considerati patognomonici di malattia del telomero di cui la discheratosi, come ampiamento discusso sopra, rappresenta il modello. (61,62, Fig 3)

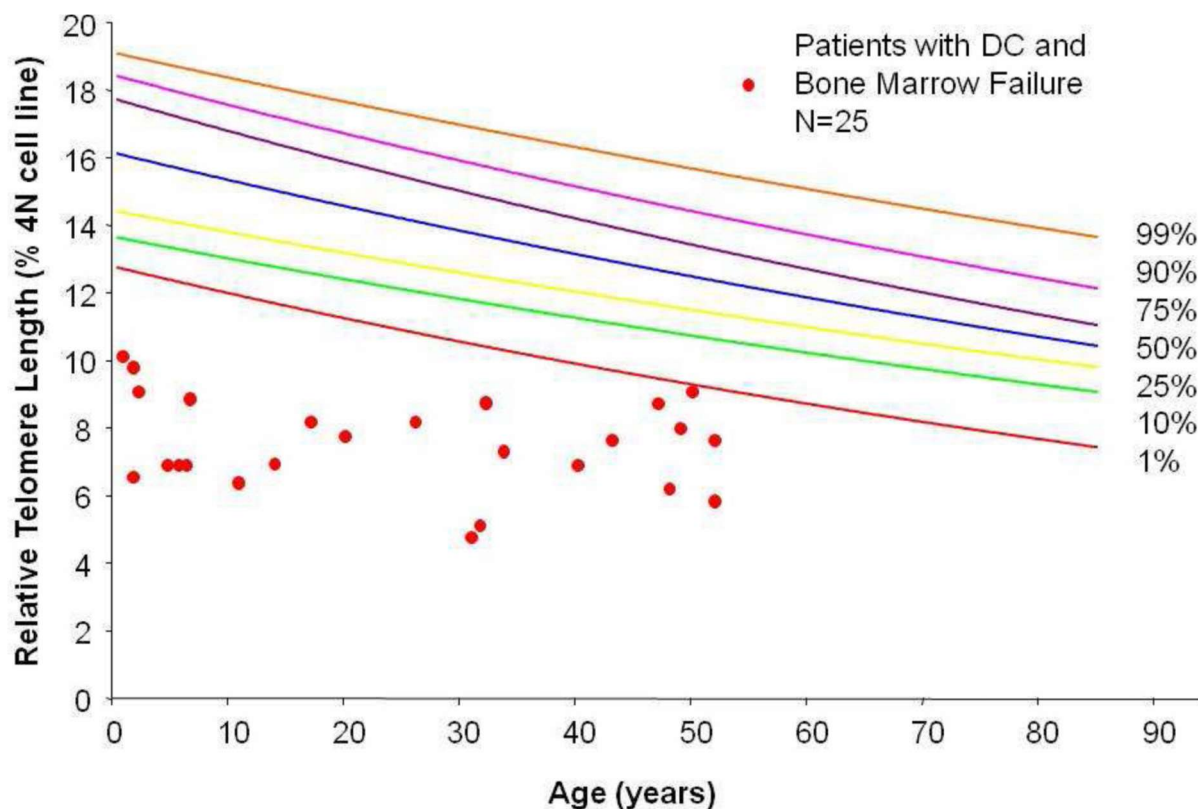


Figura 3 (da Mason 2011) Lunghezza del telomero in 25 pazienti con discheratosi congenita misurata in flow FISH nelle cellule periferiche mononucleate. Sono inoltre rappresentati i percentili di 243 controlli sani di età compresa fra 0 e 94 anni.

In uno studio del 2007 Alter e collaboratori (61) hanno analizzato la lunghezza dei telomeri in diverse sottopopolazioni cellulari utilizzando la tecnica flow-FISH in pazienti con diagnosi già nota di DC, comparandole a quelle di altri individui sani e altri pazienti con insufficienze midollari congenite. Da questo lavoro è emerso che la lunghezza del telomero inferiore al primo percentile per linfociti totali, T naive, linfociti B aveva una sensibilità e specificità superiori al 90% per fare diagnosi di discheratosi congenita, mentre tale parametro sui granulociti e sui leucociti totali risultava meno specifico e sui T memory e sugli NK meno sensibile.

Lo stesso gruppo in un lavoro del 2012 (44) ha confermato che la lunghezza del telomero inferiore al primo percentile nei linfociti totali ha il 97% di sensibilità e il 91% di specificità

nella comparazione con parenti sani di soggetti con DC o con altre forme ereditarie di aplasia midollare che non siano DC (valore predittivo positivo 85%). Tali livelli di sensibilità e specificità non venivano raggiunti per nessun'altra sottopopolazione cellulare studiata singolarmente. La migliore performance diagnostica in termini di sensibilità e specificità (rispettivamente 94 e 98%) veniva in questo studio raggiunta in caso di lunghezza del telomero inferiore al primo percentile su almeno 3-4 sottopopolazioni valutate fra linfociti totali, T memory, T naive, e B.

Gli autori suggerivano dunque che l'analisi della lunghezza del telomero nei linfociti in flow-FISH è quindi da considerarsi il test di screening più sensibile e specifico per la diagnosi di DC, mentre l'analisi delle diverse sottopopolazioni è da riservarsi a casi dubbi, ad esempio qualora si voglia escludere con certezza che un familiare potenziale donatore di cellule staminali emopoietiche sia un portatore silente (in tal caso maggiore specificità e sensibilità vengono raggiunte dalla presenza di lunghezza del telomero inferiore al primo percentile su almeno 3-4 sottopopolazioni valutate fra linfociti T totali, T memory, T naive e B). Sempre nello stesso lavoro Alter e collaboratori hanno dimostrato che i pazienti affetti avevano un maggior declino della lunghezza del telomero con l'età e che la lunghezza del telomero era in correlazione con la severità delle manifestazioni cliniche.

TELOMERI NELLE INSUFFICIENZE MIDOLLARI SU BASE GENETICA NON DISCHERATOSI CONGENITA

In diversi studi è stata valutata la lunghezza del telomero in pazienti affetti da insufficienze midollari su base genetica quali anemia di Fanconi (FA), anemia di Diamond Blackfan (DBA) e sindrome di Schwachman Diamond (SDS) (63). Spesso è stata riportata una lunghezza media del telomero inferiore rispetto ai controlli sani della stessa età. Tale dato è stato interpretato dai diversi autori come legato ad un anomalo turnover dei progenitori midollari, per un incremento dell'apoptosi a sua volta in relazione ai diversi meccanismi patogenetici alla base delle diverse condizioni (35). Più nel dettaglio, è stato visto che nell'anemia di Fanconi l'attività della telomerasi è conservata (64), per cui l'accorciamento dei telomeri è da considerarsi secondario alla perdita di nucleotidi telomerici dovuta all'aumentata proliferazione cellulare midollare in risposta alla pancitopenia o in alternativa al danno telomerico diretto/mediato da specie reattive dell'ossigeno che la cellula FA non è in grado di riparare (34, 65, 66). Studi recenti (66) attribuirebbero inoltre un ruolo diretto ad alcune proteine FA nel mantenimento dell'omeostasi del telomero.

Anche nella SDS il meccanismo sembra essere simile alla FA; diversi autori attribuiscono la lunghezza del telomero inferiore a quella dei controlli sani della stessa età (valutata in tal caso nella maggior parte dei lavori sui granulociti), al fatto che i progenitori midollari sono sottoposti ad un maggiore stress replicativo legato ad una maggiore spinta proliferativa compensatoria (67), mentre anche in tal caso come nella FA l'attività della telomerasi è normale (68).

Lo stesso meccanismo di incrementato turnover cellulare è stato inoltre ipotizzato per i pazienti con DBA (68).

Il gruppo della Alter ha pubblicato un lavoro nel 2015 in cui ha descritto lo studio della lunghezza del telomero nelle stesse sottopopolazioni cellulari precedentemente analizzate nei pazienti con discheratosi congenita in questi pazienti (63), allo scopo di valutare se in alcuni di essi vi fosse una lunghezza del telomero inferiore al primo percentile, parametro che, come già descritto, è da considerarsi, soprattutto in determinate sottopopolazioni leucocitarie, altamente sensibile e specifico per la diagnosi di discheratosi congenita. Nella maggior parte dei pazienti non DC studiati, la lunghezza del telomero era nei range di normalità in tutte le sottopopolazioni cellulari studiate, ma inferiore ai controlli sani della stessa età, confermando quindi un dato già noto in letteratura. Nei pochi pazienti con lunghezza del telomero inferiore

al primo percentile, tale dato veniva evidenziato nei granulociti, dato in linea con quanto descritto in precedenza riguardo tale linea cellulare, considerata quella a più bassa specificità per la diagnosi di discheratosi congenita (44,61) e che si spiega con l'aumentato turnover cellulare della CSE responsabile dell'accorciamento dei telomeri nei pazienti con insufficienze midollari non DC. Solo un paziente DBA (3%), 2 FA (9%) e un SDS (7%) avevano invece lunghezza del telomero inferiore al primo percentile in 3-4 sottopopolazioni fra linfociti totali, T naive, T memory e B, considerato parametro più sensibile e specifico per la diagnosi di DC. Non sono state evidenziate inoltre differenze significative di lunghezza del telomero nei 3 gruppi di pazienti studiati (FA, DBA, SDS), mentre la differenza era significativa fra il gruppo DC e gli altri 3. La lunghezza del telomero nei gruppi studiati non correlava con la severità del fenotipo e in particolare con la gravità dell'insufficienza midollare, a differenza di quanto osservato nei pazienti DC (44).

TELOMERI E ANEMIA APLASTICA ACQUISITA

Dal punto di vista patogenetico l'Anemia Aplastica Acquisita (AA) è una malattia multifattoriale dovuta ad un attacco autoimmune verso le cellule staminali emopoietiche (CSE) in cui possono avere un ruolo le stesse cellule, la risposta immunitaria e lo stroma (69).

Il 30-50% dei leucociti dei pazienti AA ha un accorciamento dei telomeri come dimostrato nel lavoro di Brümmendorf del 2001 (70), in cui è stata valutata la lunghezza del telomero nei linfociti e nei granulociti di 56 pazienti AA in flow FISH, confrontandola con controlli sani di pari età. In questo lavoro infatti è emerso che la lunghezza dei telomeri nei granulociti dei pazienti AA era significativamente inferiore a quella dei controlli sani. Altro dato emerso da questo studio è che i pazienti responsivi alla terapia immunosoppressiva avevano una lunghezza del telomero sovrapponibile ai controlli.

La letteratura più recente suggerisce che i pazienti AA con telomeri di lunghezza inferiore alla diagnosi hanno un maggior rischio di evoluzione clonale maligna, segno che nella CSE i telomeri corti e come tali disfunzionali mediano quindi instabilità cromosomica e predispongono ad aberrazioni citogenetiche deleterie causa di mielodisplasia/leucemia (71,72)

L'aumentato accorciamento dei telomeri nell'AA sarebbe imputabile secondo alcuni studi a un meccanismo di aumentato turnover cellulare e stress replicativo (73), che predisporrebbe a una maggiore fragilità della CSE. L'accorciamento del telomero può essere però anche dovuto a mutazioni nei geni di riparazione o protezione dei telomeri (soprattutto TERC e TERT), ritrovate nel 10% circa delle AA (74). I pazienti AA con queste mutazioni non hanno le anomalie somatiche tipiche della DC, ma hanno una lunghezza inferiore del telomero nei leucociti rispetto agli altri pazienti AA (in alcuni casi inferiore al primo percentile), una ridotta attività della telomerasi e tipicamente non rispondono alla terapia immunosoppressiva (34,71). Si tratta di forme importanti da identificare sia per i risvolti terapeutici, che per la scelta del donatore di CSE familiare.

TELOMERI E AUTOIMMUNITA'

Le malattie autoimmuni sono caratterizzate da una spontanea iperreattività del sistema immunitario, che spesso porta alla produzione di autoanticorpi. Nella loro patogenesi hanno senz'altro un ruolo l'infiammazione e lo stress ossidativo. Questi ultimi, insieme all'incrementato turnover leucocitario spesso presente in queste condizioni, sono fattori che contribuiscono notoriamente all'accorciamento dei telomeri fino alla soglia critica che, come già esposto, porta al danno al DNA, alla senescenza o all'apoptosi.

Negli ultimi anni sono stati eseguiti diversi studi volti a valutare il sistema telomero/telomerasi nelle malattie autoimmuni, che hanno rivelato il loro coinvolgimento anche nella patogenesi di queste condizioni (75).

Gli studi hanno analizzato il complesso telomero/telomerasi in patologie quali lupus eritematoso sistemico, artrite reumatoide, malattie granulomatose (granulomatosi di Wegener e sarcoidosi), sclerosi sistemica, fibrosi polmonare idiopatica, cirrosi biliare primitiva e diabete di tipo 1, ritrovando in tutti i casi un accorciamento del telomero nelle cellule mononucleate del sangue periferico di questi pazienti rispetto ai controlli sani. Oltre alla già citata triade infiammazione-stress ossidativo-aumentato turnover leucocitario, in questi casi potrebbe contribuire all'accorciamento del telomero anche una ridotta attività della telomerasi, anche se sulla sua effettiva presenza i dati ancora sono controversi e in alcune condizioni come LES o artrite reumatoide è stata addirittura osservata un'attività aumentata (75).

È stato ipotizzato che l'accorciamento dei telomeri possa accelerare la senescenza a livello del sistema immunitario, in particolare delle diverse sottopopolazioni linfocitarie (76). Se tale senescenza prematura riguarda selettivamente alcune sottopopolazioni come i T regolatori e ne salvaguarda altre come i T autoreattivi, come osservato in alcuni studi riguardanti patologie autoimmuni come l'artrite reumatoide, si crea un danno tissutale immunomediato (Figura 4).

Nonostante gli avanzamenti della ricerca sull'argomento, non è ancora precisamente noto se siano i telomeri corti a scatenare uno stato infiammatorio o piuttosto la deregolazione del sistema immunitario a causare un difetto del complesso telomero/telomerasi. La risposta è probabilmente che nelle malattie infiammatorie croniche coesistono e si autoalimentano entrambi i meccanismi (77).

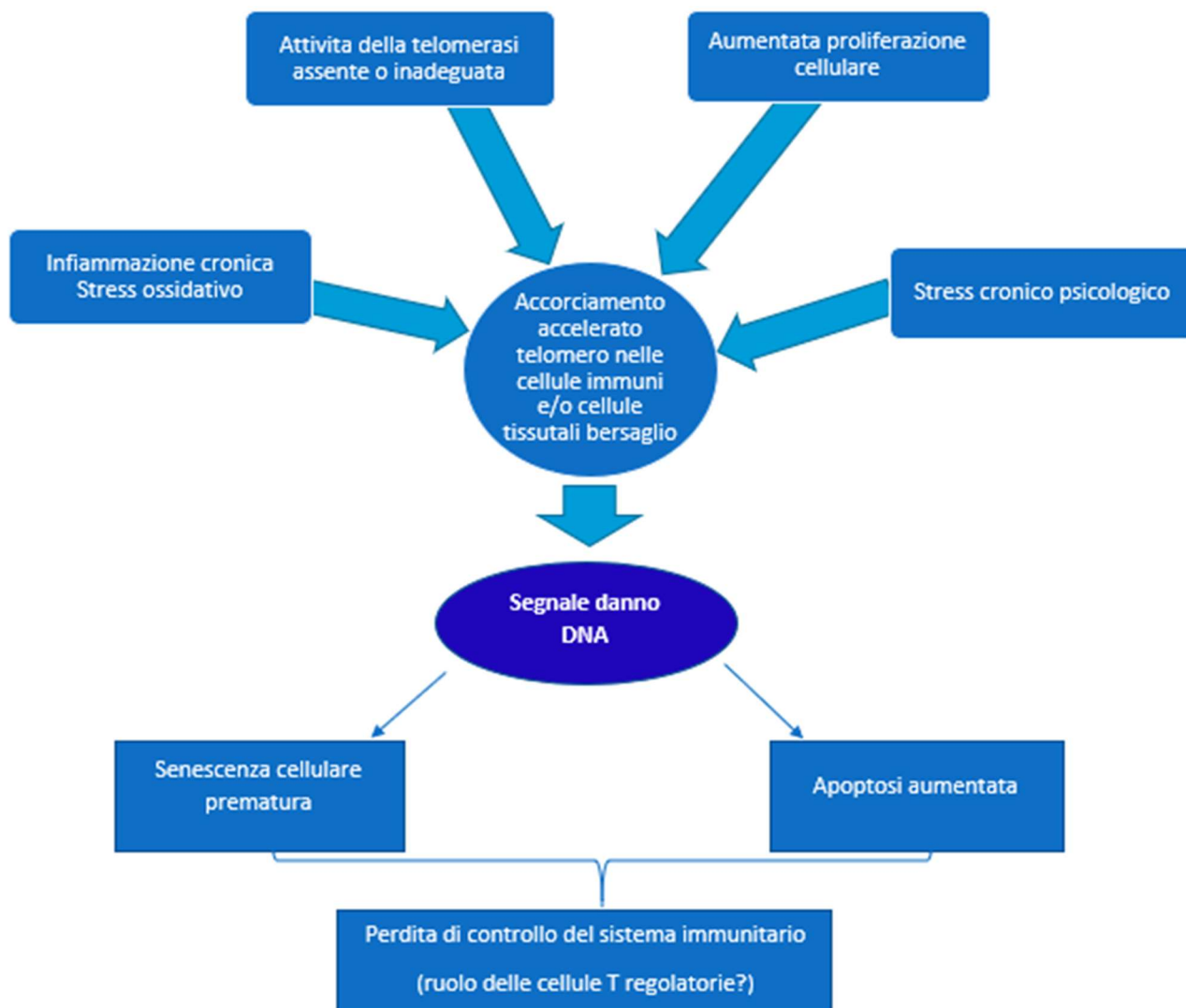


Figura 4 (da Georgin-Lavialle, 2010): modello proposto per spiegare il coinvolgimento del complesso telomero/telomerasi nelle malattie autoimmuni

TELOMERI E IMMUNODEFICIENZA

Sempre legato all'associazione fra alterazioni della lunghezza del telomero e funzione dei linfociti T, è stato riscontrato come l'accorciamento dei telomeri, possa mediare l'invecchiamento dei linfociti T, determinando una grave immunodeficienza nei linfociti T, qualitativa e quantitativa, in pazienti giovani, che può portare complicazioni fatali. (78)

Si ipotizza che il potenziale replicativo dei linfociti T sia mantenuto dall'attività della telomerasi, siccome le cellule T memoria devono essere mantenute nell'adulto. L'attivazione del recettore dei linfociti T (TCR) aumenta l'attività della telomerasi. (79)

L'immunodeficienza, può presentarsi anche come primo segno di telomeropatia in assenza di altre manifestazioni. Mutazioni legate a malattie del telomero e alla telomerasi vengono quindi annoverate tra le cause di immunodeficienza primaria. È importante quindi diagnosticare questi pazienti valutando la lunghezza del telomero, perché in questi pazienti, a differenza delle altre immunodeficienze primarie, c'è una maggior suscettibilità alla tossicità delle terapie convenzionali, come ai protocolli mieloablativi per il trapianto di cellule staminali ematopoietiche. Regimi di condizionamento ad intensità ridotta proteggono di fatto i pazienti affetti dai danni sul DNA.

Questa immunodeficienza probabilmente si sviluppa per una deplezione persistente di precursori nel midollo osseo, nel timo e in periferia nei soggetti nati con telomero corto.

Nonostante l'accorciamento dei telomeri sia fisiologico con l'invecchiamento, quando è precoce sembra esserci una soglia oltre la quale l'accorciamento diventa biologicamente e clinicamente rilevante e sufficiente a segnalare la disfunzione del telomero.

I portatori di mutazioni dei geni del telomero mostrano invecchiamento cellulare prematuro, con fenotipo dei linfociti T pari a quelli di adulti 5 decenni più vecchi e riduzione di cellule T naive, aumentata apoptosi, e ridotto repertorio di cellule T. (78)

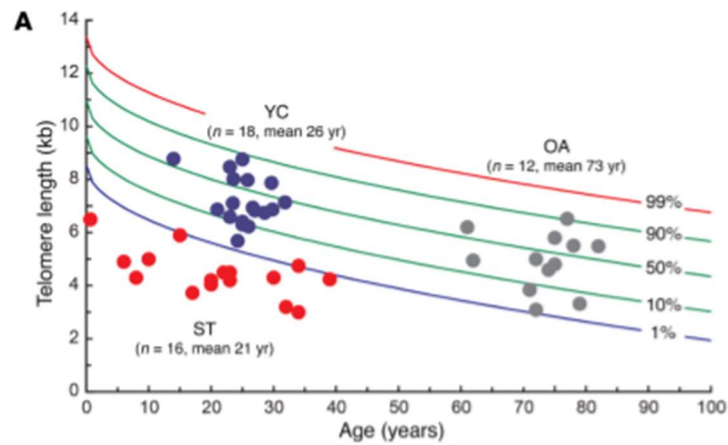


Figura 5: Lunghezza del telomero nei linfociti, aggiustata per età, in individui appartenenti ai gruppi: YC: gruppo controllo giovani; OA: adulti più anziani; ST: giovani con mutazione geni telomero (*The Journal of Clinical Investigation*)

I linfociti T con telomero corto aumentano i meccanismi di danno del DNA attivando le vie apoptotiche intrinseche, a differenza di ciò che accade con l'invecchiamento, dove si attivano le vie estrinseche e viene espresso PD-1 (programmed cell death). (80)

TELOMERI E NEOPLASIE

Come già ampiamente illustrato nei paragrafi precedenti, il progressivo accorciamento dei telomeri determina la senescenza replicativa e, in presenza di altre alterazioni, i telomeri corti formano strutture di fusione che portano a instabilità del cromosoma e sviluppo di tumori.

(81) La maggior parte delle cellule cancerogene (85-90%) mostrano una riattivazione della telomerasi per potersi replicare all'infinito e la maggior parte di queste mantiene dei telomeri corti stabili. (82)

Diversi studi hanno dimostrato come i telomeri corti contribuiscano ad aumentare il rischio di tumori come tumori di testa e collo (83), linfoma non Hodgkin e nella leucemia linfatica cronica (84).

In una meta-analisi si analizza come telomeri più corti siano significativamente associati al rischio di cancro rispetto a telomeri più lunghi. Associazioni più importanti sono state osservate per i tumori di vescica, polmone, apparato digerente e sistema urogenitale. (85)

Telomeri corti sono stati anche riscontrati più frequentemente nei pazienti con mieloma multiplo. (86)

Le disfunzioni del telomero sono state considerate come fattore prognostico negativo nella leucemia linfatica cronica, il telomero corto infatti si associa ad alterazioni genomiche ad alto rischio e peggior prognosi (87).

Uno studio di 215 pazienti, di cui 97 bambini con diagnosi di ALL e 117 bambini come controllo, ha valutato un significativo accorciamento della lunghezza del telomero nei pazienti con LAL rispetto al gruppo di controllo. Non si associano però polimorfismi di hTERT al rischio di LAL e non ci sono associazioni fra i polimorfismi di hTERT e la lunghezza del telomero o le caratteristiche cliniche di LAL.

L'accorciamento dei telomeri fino ad una lunghezza critica determina la perdita della protezione del telomero, portando instabilità cromosomica, che potrebbe risultare in una tendenza alla leucemogenesi. (88)

MISURA LUNGHEZZA TELOMERI

La misura della lunghezza dei telomeri è importante per identificare malattie correlate al suo anomalo accorciamento o a predire l'esordio di alcune patologie età correlate come per esempio patologie cardiovascolari e neurodegenerative. (89, 90)

L'accorciamento dei telomeri è di fatto età dipendente come mostrato in un campione di 100 pazienti di famiglie con mutazioni conosciute. (91)

Per i portatori non c'è una età soglia precisa, ma mentre sotto i 20 anni la lunghezza dei telomeri è significativamente ridotta rispetto al controllo, sopra i 60 anni si sovrappone al decile inferiore del controllo di sani. La misura della lunghezza del telomero ha un elevato valore predittivo negativo.

Il grado di deviazione della lunghezza del telomero dalla mediana è inoltre predittivo e dà informazioni prognostiche circa l'età approssimativa di esordio e il fenotipo probabile. Per questo la misura della lunghezza del telomero è critica per consulenza genetica e valutazione dei sintomi, in pazienti con mutazioni patogenetiche. (91)

Sono stati studiati diversi metodi per valutare la biologia dei telomeri, ognuno con dei pro e dei contro.

-Tecniche basate sulla Polymerase Chain Reaction (PCR)

La tecnica più usata, fra quelle basate sulla PCR, è la quantitative PCR (Q-PCR) o real time PCR, è relativamente semplice e non richiede una grande quantità di DNA.

Misura il segnale del telomero (T) rispetto al segnale di un gene in singola copia (S), permettendo di calcolare un rapporto T/S. (92)

Questo rapporto è proporzionale alla media lunghezza del telomero, quindi utilizzabile per determinare la lunghezza relativa.

Dando una valutazione relativa, i dati ottenuti non possono essere presentati in valori assoluti in paia di kilobasi, a meno che siano a confronto con la lunghezza del telomero di una linea cellulare studiate con un altro metodo.

Inoltre, c'è una certa variabilità fra campioni, quindi possono esserci grandi differenze fra laboratori diversi, perché il gene controllo usato potrebbe non essere unico nel genoma e questo influenzerebbe il rapporto T/S. (93)

Non fornisce informazioni sui telomeri più corti.

Non è utile quindi nello studio di cellule tumorali, dove il gene controllo potrebbe esser duplicato o perso; ma si limita a campioni di cellule normali diploidi e cariotipicamente stabili. (94)

-Frammenti di restrizione terminali (TRF)

I primi studi dei telomeri venivano fatti con sequenziamento del DNA. (95) Sapendo che la sequenza TTAGGG è altamente conservata, l'analisi TRF è stata sviluppata usando dei campioni TTAGGG-marcati ed ora è largamente diffusa per la misura dei telomeri. (96)

Non può visualizzare i telomeri più corti. Il DNA viene diviso in piccoli frammenti attraverso una combinazione di enzimi di restrizioni, le sequenze telomeriche restano però intatte perché non contengono i siti di legame per questi enzimi. Dopo le ripetizioni telomeriche, sul cromosoma, c'è una regione sub-telomerica, formata da ripetizioni telomeriche non canoniche, degenerate. In base a dove gli enzimi restrittivi processano la regione subtelomerica in ogni analisi TRF ci sarà una certa quantità di sequenze non telomeriche. (89) Dopo la frammentazione del DNA si performa l'elettroforesi su gel e i telomeri sono individuati attraverso Southern blot. (97)

Si valuta la lunghezza media dei telomeri attraverso la quantificazione del DNA marcato a confronto con un DNA di cui è conosciuta la lunghezza dei frammenti.

Limite principale di questa tecnica sono la necessità di una grande quantità di DNA di partenza e il tempo di studio abbastanza lungo.

Inoltre, i telomeri molto corti sono piuttosto difficili da individuare e quantificare.

L'analisi può poi variare molto a seconda del pannello di enzimi di restrizione usati, anche se questo è stato migliorato dall'introduzione di kit in commercio. (89)

-Telomere dysfunctional Induced Foci analysis (TIF).

È utile per gli studi sui danni del DNA. Solitamente si attua su cellule in interfase in vitro o in sezioni di tessuti e solitamente si usano 2 anticorpi, uno diretto verso le proteine Shelterin, come TRF2 e l'altro verso le rotture sul DNA a doppio filamento.

È utile come biomarker per seguire i trials che studiano l'inibizione della telomerasi.

Non da informazioni sulla lunghezza dei telomeri, solo che alcuni telomeri possono apparire come DNA danneggiato perché troppo corti o privi di cappuccio protettivo.

In combinazione con TRF e Q-FISH potrebbe dare informazioni circa la media lunghezza dei telomeri quando sono sufficientemente corti da determinare l'inizio di una patologia. (89)

-Single Telomere Length Analysis (STELA)

Sviluppato per misurare i telomeri su singoli cromosomi, (98) utilizza una combinazione di metodi basati sulla PCR e Southern blot, per misurare l'abbondanza dei telomeri più corti. (89) Ha rivelato l'abbondanza di eterogeneità allelica e i telomeri molto corti nelle cellule senescenti. (12) Inoltre, ha dimostrato la disfunzione e fusione dei telomeri nella progressione della leucemia linfocitica cronica. (99)

Misura accuratamente la lunghezza del telomero in uno specifico cromosoma, con una quantità limitata di materiale iniziale.

Come limiti di questa tecnica non tutte le estremità dei cromosomi hanno sequenze uniche per il primer e quindi lo studio si limita alle estremità che possono essere seguite.

Può essere usato per contare il numero assoluto di telomeri più corti, ma richiede una quantificazione manuale delle centinaia di misure di telomeri rilevate. (89)

-Telomere Shortest Length Assay (TeSLA)

Richiede una piccola quantità di DNA iniziale e utilizza una tecnica di legatura e frammentazione migliorata. Usa una sonda marcata con digossigenina e un software che misura automaticamente la distribuzione dei telomeri di diverse lunghezze. (78)

Permette il monitoraggio dei più sottili cambiamenti della lunghezza del telomero in un breve periodo di tempo e dona informazione circa le dinamiche del telomero durante le varie fasi cellulari. Come STELA è però a basso rendimento e non misura i telomeri più lunghi.

È comunque utile per determinare i cambiamenti nei telomeri più corti in diversi intervalli di tempo o durante esperimenti.

Misurare i telomeri più corti può avere utilità per lo studio dello sviluppo di malattie, valutando le soglie patologiche. (89)

-Quantitative Fluorescence In Situ Hybridization

Ci sono diversi metodi Q-FISH, basati su principi simili ma con modificazioni a seconda dell'uso, è prevista l'ibridizzazione dei cromosomi con sonde fluorescenti di sequenze CCCTAA ripetute 3 volte e la misurazione della quantità di fluorescenza emessa. (100)

Q-FISH metafase misura la lunghezza del telomero all'estremità di ogni cromosoma con una più alta precisione, permette di evidenziare singolarmente tutti i 92 telomeri ed evidenzia i telomeri eccessivamente corti attraverso il fenomeno della mancanza di fluorescenza. (89)

Il limite maggiore è che richiede cellule proliferanti, non analizza i telomeri di cellule senza mitosi attiva. (101)

Ci sono poi delle modifiche, come Q-FISH interfase, che riesce a evidenziare telomeri di vari tipi cellulari, essendo meno complessa è usata negli studi su larga scala.

La modificazione dell'interfase Q-FISH, chiamata high-throughput Q-FISH (HT Q-FISH), usa procedure automatiche per studi a larga scala su linfociti. (102)

Un altro adattamento è la flow-FISH, certificato per uso diagnostico, che valuta la fluorescenza dei telomeri nelle cellule in interfase attraverso la citometria a flusso. Viene usata una sonda pantelomerica e successivamente le cellule passano singolarmente nel citometro. Si calcola una media delle lunghezze telomeriche in base alla quantità di fluorescenza emessa.

Il vantaggio è che permette da un singolo campione di sangue di studiare le varie sottopopolazione cellulari, per questo è molto utile per lo studio della media delle lunghezze telomeriche nelle cellule del sangue.

Dati i limiti dell'ibridazione, i metodi Q-FISH non captano i segnali di fluorescenza dei telomeri che hanno un numero di sequenze telomeriche inferiore alla soglia per la sonda PNA. (93)

La sonda potrebbe poi legarsi a delle sequenze telomeriche interstiziali, ovvero localizzate al di fuori dell'estremità del cromosoma, generando dei falsi positivi.

Anche qui avremo come risultati una media della lunghezza piuttosto che informazioni sul singolo telomero.

In base ai dati disponibili in letteratura e per tutte le ragioni sopraelencate, la flow-FISH è la tecnica di scelta, per lo studio dei telomeri di pazienti con sospetta telomeropatia.

Ad esempio, la lunghezza del telomero inferiore al primo percentile per linfociti totali ha una sensibilità e specificità superiori al 90% per fare diagnosi di discheratosi congenita. (36)

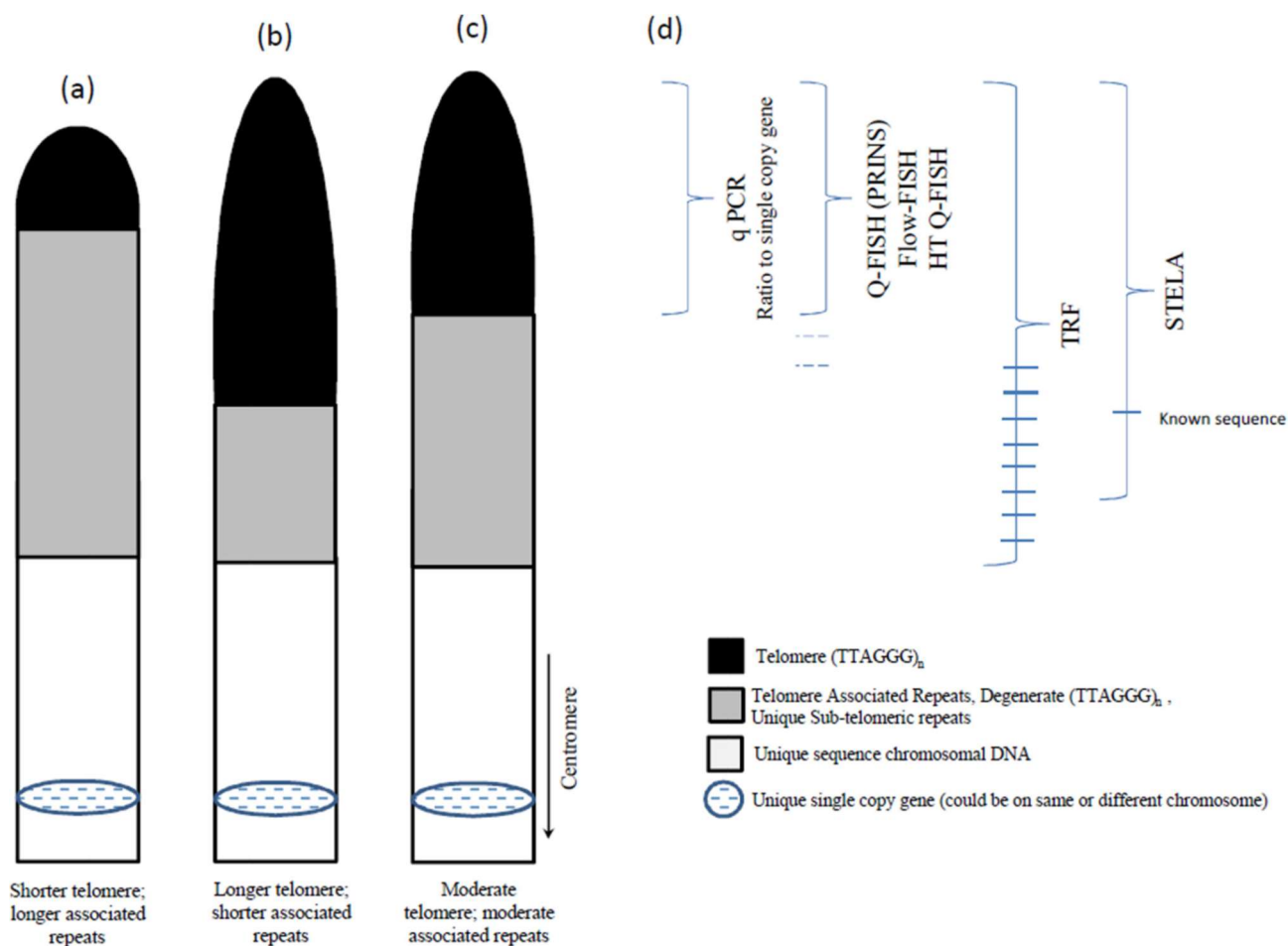


Figura 6 (da Montpetit, 2014): *Rappresentazione schematica delle regioni cromosomiche misurate nei diversi metodi di misurazione della lunghezza dei telomeri (d). I telomeri, in nero, nelle diverse cellule possono avere lunghezza variabile da molto corta (a), intermedia (b) o lunga (c). Le regioni adiacenti, in grigio, includono telomere associated repeats, degenerate (TTAGGG) repeats, e subtelomeric repeats e anch'esse possono avere una lunghezza variabile (a-c). L'uso dei frammenti di restrizione terminali (TRF) implica la misurazione delle regioni telomeriche e di quelle adiacenti, così come anche la STELA, con meno variabilità rispetto alla metodica precedente perché utilizza un primer con sequenza nota. Le metodiche basate sulla FISH misurano solo le regioni telomeriche, con una piccola variabilità (linea tratteggiata), la qPCR è invece più precisa nel misurare esclusivamente le regioni telomeriche, ma non i telomeri più lunghi.*

VALUTAZIONE DELLA LUNGHEZZA DEL TELOMERO NEI LEUCOCITI DI INDIVIDUI SANI

Nel sistema ematopoietico, le cellule più primitive, le cellule staminali emopoietiche (CSE), sono quelle con i telomeri più lunghi. (41, 103)

Gli studi sul ruolo dei telomeri e della telomerasi nella CSE normale di individui sani sono complicati per il fatto che queste cellule tipicamente risiedono nel midollo osseo. Al contrario di quanto accade per le varie cellule derivate dalle CSE che sono facilmente accessibili. (33) La lunghezza media dei telomeri nei granulociti può essere usata come surrogato di quella nelle CSE. (104)

Uno studio del 2012 ha valutato con flow FISH la lunghezza mediana del telomero di 5 diverse sottopopolazioni leucocitarie in 800 individui sani, dai 0 ai 100 anni, comparandola con 60 soggetti con mutazioni nei geni TERT e TERC. Si è visto come la lunghezza dei telomeri nei sani vari molto in base all'età e la rapidità dell'accorciamento dei telomeri varia in base all'età e al sottotipo cellulare.

Come atteso, la lunghezza dei telomeri dei soggetti con mutazioni in hTERC o hTERT era molto ridotta in tutti i tipi cellulari. La maggior differenza rispetto ai sani della stessa età è stata riscontrata nei T naive per i pazienti TERC mutati e nei NK/T differenziati per quelli TERT mutati. Per valutare il tasso di accorciamento nelle varie fasce di età è stata valutata la lunghezza dei telomeri nei granulociti e nelle sottopopolazioni linfocitarie. È risultato un declino della lunghezza maggiore per i linfociti rispetto ai granulociti. I linfociti T memoria e T maturi/NK mostrano una riduzione più importante con l'età, in particolare nell'infanzia.

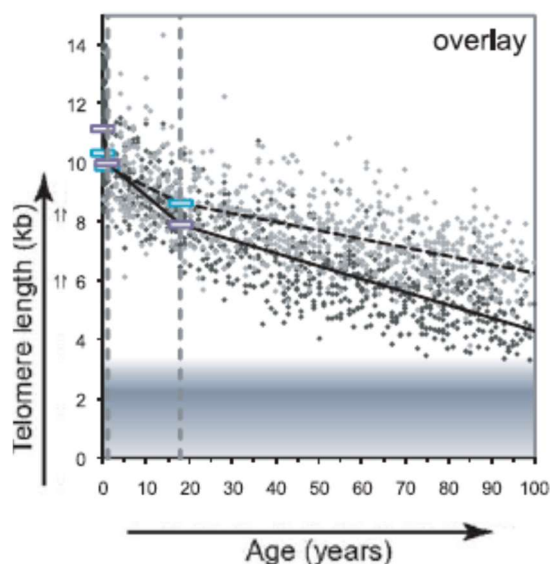


Figura 7 (da Aubert, 2012): Declino della lunghezza del telomero con l'età in 835 individui sani (linea tratteggiata granulociti, linea continua linfociti).

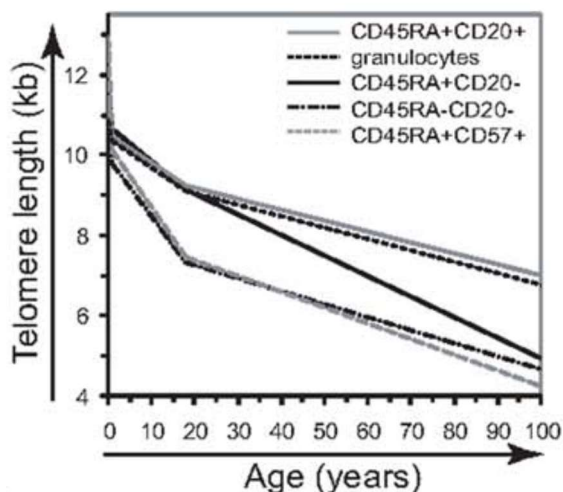


Figura 8 (da Aubert, 2012): Declino della lunghezza del telomero per età nelle diverse sottopopolazioni leucocitarie

I telomeri più corti sono stati misurati fra i linfociti T e NK, essendo le sottopopolazioni più colpite dai deficit della telomerasi. Inoltre, i familiari di pazienti con mutazioni TERT o TERC, pur non avendo alterazioni dei geni della telomerasi, mostrano una lunghezza mediana inferiore in tutti i leucociti rispetto alla popolazione di controllo.

I risultati hanno dimostrato come livelli normali di telomerasi siano essenziali per il mantenimento di una normale omeostasi del telomero delle CSE e dei linfociti. (33)

Lo studio sembra ipotizzare che una delle prime conseguenze dell'accorciamento dei telomeri sarebbe la perdita dell'immunità NK, proprio in questa popolazione si osserva il maggior accorciamento dei telomeri. (33)

ALGORITMO DIAGNOSTICO TELOMEROPATIE

Nei pazienti con citopenia in sospetta insufficienza midollare, presso il nostro centro viene seguito l'algoritmo proposto da Townsley e collaboratori nel 2014. È bene sospettare una telomeropatia in tutti i pazienti con anemia aplastica o sindrome mielodisplasica ipoplastica, ed è importante valutarne la presenza quando le decisioni terapeutiche potrebbero esserne influenzate. (35)

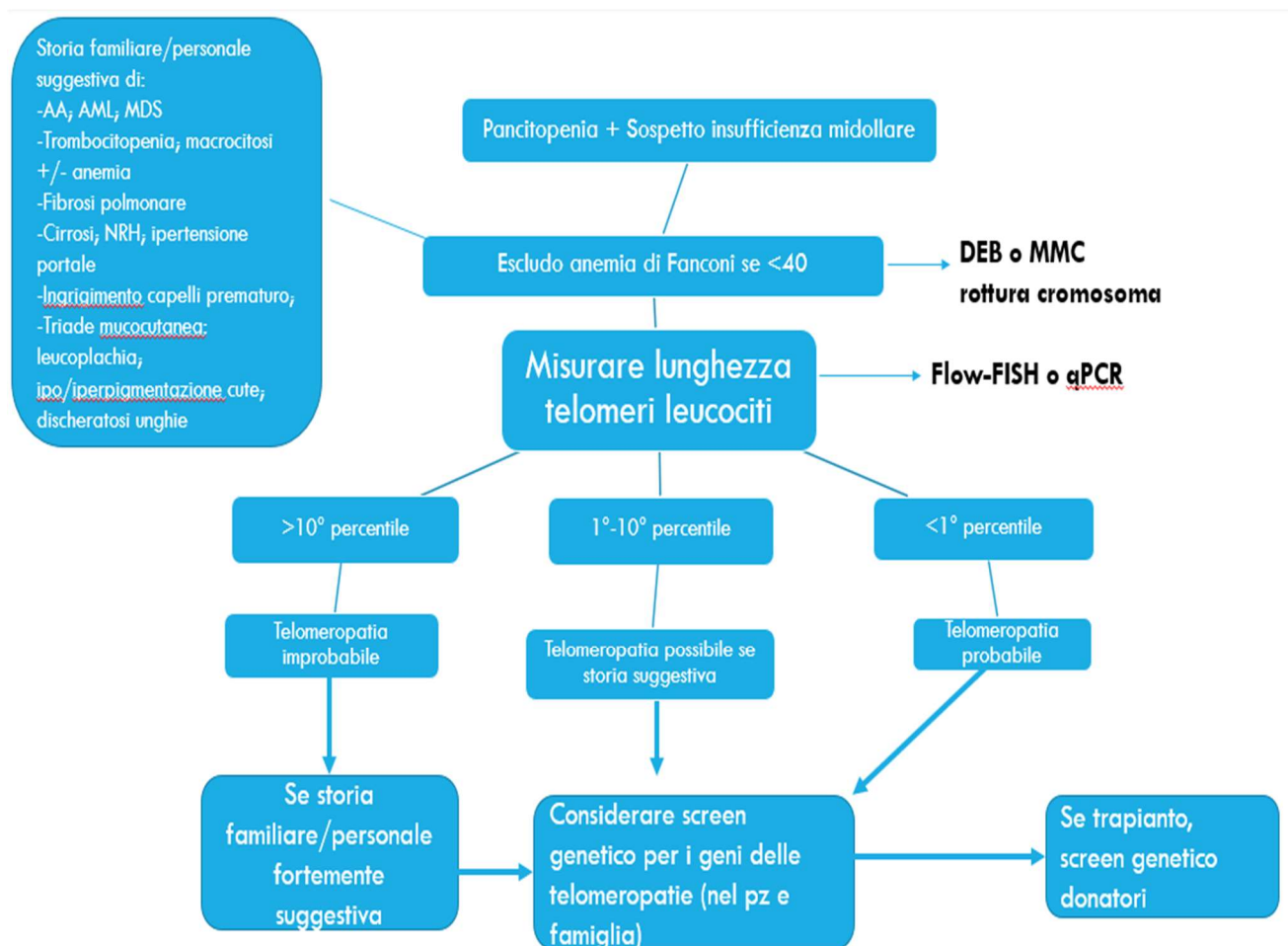


Figura 9 (da Townsley, 2014): algoritmo diagnostico nelle telomeropatie

Una volta esclusa l'anemia di Fanconi si procede a misurare la lunghezza del telomero e in base a questa si valutano i pazienti da sottoporre a screening delle mutazioni di geni coinvolti nel mantenimento del telomero (Figura 1).

OBIETTIVI E RAZIONALE DELLO STUDIO

L'obiettivo principale del nostro studio è stato quello di valutare, in collaborazione con il laboratorio di Ematologia dell'Università di Aquisgrana, la lunghezza del telomero nei linfociti e nei granulociti di una popolazione di pazienti affetti da segni clinici di discheratosi congenita (con relativi familiari) ed in pazienti con citopenia persistente in fase di inquadramento, afferenti presso il nostro Centro. Si è voluto inoltre valutare la sensibilità e la specificità del test e la correlazione fra lunghezza del telomero, il fenotipo clinico e le caratteristiche ematologiche ed infine si è analizzata la correlazione tra lunghezza del telomero e geni causativi di malattia del telomero.

MATERIALI E METODI

I pazienti seguiti presso l'Unità di Ematologia a partire da aprile 2015 fino a marzo 2020 sono stati inclusi nello studio se rispondenti ai seguenti criteri:

1. soggetti affetti da citopenia persistente di almeno una linea (emoglobina < 2 deviazioni standard per età, neutrofili $< 1500/\text{mmc}$ se età superiore ad un anno, $< 1000/\text{mmc}$ se età inferiore ad un anno, piastrine $< 150.000/\text{mmc}$, linfociti $< 1000/\mu\text{L}$ negli adulti o $< 2000/\mu\text{L}$ nei bambini < 2 anni). Tale esame veniva inserito nell'iter diagnostico di inquadramento iniziale della citopenia, indipendentemente dalla sua origine (centrale o periferica);

oppure

2. familiari di soggetti affetti da malattia del telomero e potenziali donatori di cellule staminali emopoietiche;

oppure

3. pazienti con anomalie fenotipiche suggestive di DC, anche in assenza di citopenia.

In tutti i casi è stato acquisito un consenso informato all'esecuzione dell'esame.

Per ciascun paziente abbiamo valutato le seguenti caratteristiche: età, sesso, presenza di anomalie fenotipiche, presenza e grado di citopenia, cellularità midollare, cariotipo midollare, assetto immunologico, diagnosi ed eventuale mutazione trovata, trattamento e outcome.

In particolare, per le anomalie fenotipiche è stato utilizzato uno score di severità mutuato dal lavoro di Svahn et al del 2016 (105). Ad una malformazione o un'anomalia somatica solo di natura estetica senza alcun impatto sulla funzione d'organo o non necessitante nessun intervento correttivo, veniva attribuito 1 punto e classificata come "lieve". Ad una malformazione/anomalia somatica con impatto sulla funzione d'organo, ma non necessitante terapia correttiva o chirurgia venivano attribuiti 3 punti e veniva classificata come "moderata". Infine, ad una malformazione/anomalia somatica con impatto sulla funzione d'organo, necessitante terapia medica o chirurgica, venivano assegnati 5 punti e veniva definita come "severa". Dalla somma dei punteggi attribuiti per ogni paziente a ciascuna malformazione/anomalia fenotipica si è ricavato uno score fenotipico individuale, che ci ha

permesso di dividere i pazienti studiati in 3 gruppi: fenotipo "lieve" (≤ 6 punti), "moderato" (7-15 punti), "severo" (≥ 16 punti).

Il grado di citopenia, modificato dal lavoro di Svahn et al (105) è stato definito in base ai seguenti criteri:

1. Citopenia lieve se presente almeno uno dei seguenti criteri: emoglobina >10 g/dl, ma al di sotto del limite inferiore per età, neutrofili compresi fra 1000 e 1500/mmc, piastrine comprese fra 150.000 e 50.000/mmc.
2. Citopenia moderata se presente almeno uno dei seguenti criteri: emoglobina compresa fra 8 e 10 g/dl, neutrofili compresi fra 500 e 1000/mmc, piastrine comprese fra 20.000 e 50.000/mmc
3. Citopenia grave se presente almeno uno dei seguenti criteri: emoglobina inferiore a 8 g/dl, neutrofili inferiori a 500/mmc, piastrine inferiori a 20.000/mmc,

Il più basso valore delle tre linee eventualmente coinvolte definiva il grado di citopenia (ad esempio in un paziente con emoglobina 9 g/dl, neutrofili 700/mmc e piastrine 10.000/mmc la citopenia veniva considerata severa).

La cellularità midollare è stata valutata sulla biopsia osteomidollare da un esperto anatomopatologo. Si è definita, in accordo con la letteratura, indicativa di insufficienza midollare una cellularità inferiore al 30%.

Il cariotipo midollare è stato valutato con tecniche di bandeggio e in casi selezionati è stata anche eseguita l'analisi mediante ibridazione in situ fluorescente (FISH), allo scopo di identificare i riarrangiamenti submicroscopici, non visibili con le normali tecniche di citogenetica (inferiori a circa 4 Mb).

Lo screening della FA è stato eseguito mediante DEB test.

La citopenia veniva definita immunologica se erano presenti segni o markers di autoimmunità (anticorpi anti-neutrofilo su periferico e/o midollo, anticorpi anti-piastrine, test di Coombs diretto/indiretto positivo, presenza di inibizione da parte del siero di colture omogruppo o presenza di auto anticorpi) con cellularità ematopoietica superiore al 30%.

Per quanto riguarda l'assetto immunologico nei soli pazienti citopenici abbiamo valutato le immunoglobuline IgA, IgG e IgM e le sottopopolazioni linfocitarie, valutando in particolare la deplezione di linfociti assoluti, CD3+; CD3+CD4+; CD3+CD8+; linfociti B e linfociti NK, rapportata per età.

La valutazione genetica è stata in primo luogo eseguita in Sanger tramite sequenziamento dei seguenti geni: ELA 2, HAX1, G6PC3, WAS, TERC, TERT, TNF2, DKC1, cMPL, WRAP53, NHP2, NOP10, C16orf57, FAS, TCAB1, JAGN1. Per i pazienti negativi al Sanger è stata utilizzata la metodica Next Generation Sequencing (NGS).

Nel pannello NGS sono stati analizzati geni correlati alle seguenti specifiche patologie:

- DC: 9 geni
- DBA: 10 geni
- CAMT: 1 gene
- SDS: 1 gene
- Neutropenia congenita: 19 geni
- ALPS: 9 geni
- ALPS like/immunodisregolazione/CVID: 44 geni
- Istiocitosi familiari: 13 geni
- Immunodeficienze/ Chromosome breakage disorders: 50 geni

Il dettaglio dei singoli geni studiati è riportato nella Tabella 4 sottostante:

Tab. 4: geni inclusi nel pannello NGS presso il nostro Centro

AID	CD40LG	FOXM1	KRAS	OX40	RPS10	TAP2
AIRE	CD81	FOXP3	LAMTOR2	PGM3	RPS17	TAPBP
AK2	CD8A	G6PC	LCK	PIK3CD	RPS19	TAZ
APB3B1	CECR1	GATA2	LIG4	PIK3R1	RPS24	TBX1
ATM	CORO1A	GFI1	LRBA	PLCG2	RPS26	TERT
BCL10	CSF3R	HAX1	LYST	PNP	RPS7	TINF2
BLM	CTC1	HOIP	MAGT1	PRF1	RTEL	TNFRSF13C
BLOC1S6	CTLA4	ICOS	MALT1	PRKCD	RUNX1	TPP2
BTK	CTPS1	IKBKB	MAP3K14	PTPRC	SBDS	TWEAK
C16ORF57	CXCR4	IL10	MPL	RAB27A	SH2D1A	TYK2
CARD11	CYBA	IL10RA	NBN	RAC2	SLC37A4	UNC119
CASP10	CYBB	IL10RB	NCF1	RAG1	SLC7A7	UNC13D
CASP8	DCLRE1C	IL21	NCF2	RAG2	SMARCAL1	UNG
CD19	DKC1	IL21R	NCF4	RBCK1	STAT1	VPS13B
CD20	DOCK2	IL2RA	NEMO	RFX5	STAT3	VPS45
CD21	DOCK8	IL2RG	NFKB2	RFXANK	STAT5B	WAS
CD27	ELA2	IL7R	NHEJ1	RFXAP	STIM1	WIPF1
CD3D	EXTL3	ITCH	NOLA2	RPL11	STK4	WRAP53
CD3E	FADD	ITK	NOLA3	RPL26	STX11	XIAP
CD3G	FAS	JAGN1	NRAS	RPL35A	TACI	ZAP70
CD40	FASLG	JAK3	ORAI1	RPL5	TAP1	

Next Generation Sequencing

Il test viene effettuato mediante un arricchimento degli esoni, fiancheggiati le regioni introniche e non tradotti (5' e 3') dei geni di cui sopra utilizzando la tecnologia PCR microdroplet seguita da sequenziamento NGS. La libreria personalizzata contenente tutti i primer è stata ottenuta da RainDance Technologies (Lexington, Massachusetts). Il DNA genomico è stato frammentato in segmenti di 2-5 kb, e poi sono stati generati i microdroplets, contenenti il DNA frammentato e i reagenti per la PCR, mediante il RDT1000 (Raindance Technologies). Dopo l'amplificazione mediante PCR, i prodotti sono stati purificati e sottoposti alla preparazione della libreria NGS. Poi, i campioni sono stati sequenziati su sequencer Illumina HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, California) seguendo i protocolli del produttore. La sequenza di lettura ad alta qualità è stata mappata in riferimento alla sequenza del genoma umano (NCBI build 37) così come verso sequenze dei geni inclusi nel pannello utilizzando NextGENe software v2.15 (Softgenetics, LLC, State College, Pennsylvania) per la sequenza delle varianti. Tutte le varianti patogenetiche e nuove, così come le varianti di significato sconosciuto, cosa determinata per via bioinformatica, sono state confermate da sequenziamento Sanger.

Misurazione della lunghezza del telomero

La valutazione della lunghezza media dei telomeri nei granulociti e nei linfociti è stata eseguita presso il laboratorio di Ematologia di Aquisgrana, in Germania, tramite la metodica flow FISH modificata descritta brevemente di seguito e riportata in letteratura dal gruppo tedesco (70, 80).

Partendo da campioni di sangue periferico, il primo passaggio è la lisi osmotica dei globuli rossi usando il cloruro di ammonio, in modo da ottenere solo leucociti. Le cellule sono quindi lavate con PBS contenente 0.1% BSA (Calbiochem Corp.). Dopo aver separato le cellule diploidi in base alla colorazione con propidio di iodio (PI) (R1 in figura 9A), i linfociti (R2 in figura 9B) e granulociti (R3 in figura 9B) sono stati separati in base alle dimensioni e alla presenza di granuli. L'analisi è stata eseguita con e senza marcatura dei telomeri con un probe specifico (PNA, Peptide Nucleic Acid) marcato con fluoresceina isotiocianato (FITC) (picchi grigio scuro e chiaro rispettivamente in figura 9C per i linfociti e 9D per i granulociti) per permettere la sottrazione dell'autofluorescenza delle cellule nella stessa finestra di dispersione della luce (Figura 9B) dalla fluorescenza dei telomeri (barre orizzontali nella figura 9C-D). La fluorescenza media del telomero è stata dunque calcolata sottraendo alla fluorescenza media del background quella ottenuta usando il probe specifico per il DNA telomerico ed espressa in MESF (molecules of equivalent soluble fluorochrome) units. La lunghezza dei telomeri in bp è stata poi ottenuta utilizzando la seguente equazione: $bp = \text{MESF units} \times 0.02604 \times 0.019 \times 10^3$.

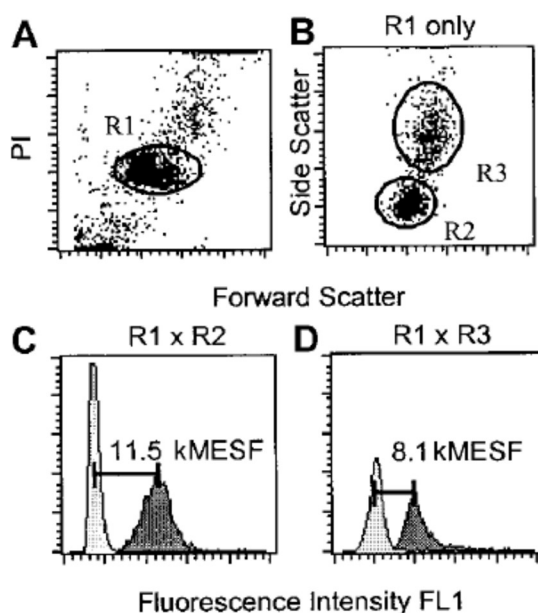


Figura 10 (da Brümmendorf TH, 2001): analisi in flow FISH della lunghezza del telomero nei granulociti e nei linfociti (vedi testo per i dettagli)

L'analisi è stata eseguita 3 volte per ogni campione e la lunghezza dei telomeri nelle due sottopopolazioni studiate (linfociti e granulociti) è stata espressa come lunghezza media e messa in relazione alla lunghezza normale per età ricavata da curve di normalità create nello stesso laboratorio analizzando campioni di individui sani.

I pazienti, per l'analisi, sono stati suddivisi in 3 gruppi in base alla lunghezza del telomero dove possibile le comparazioni veniva fatte sui tre gruppi, ma spesso il gruppo 2 essendo costituito da soli 3 pazienti veniva analizzato insieme al gruppo 3 in comparazione con il gruppo 1:

1. **Gruppo 1:** nessuna anomalia di lunghezza del telomero in nessuna delle due popolazioni cellulari
2. **Gruppo 2:** lunghezza del telomero fra il primo e il quinto percentile in almeno una delle popolazioni cellulari studiate.
3. **Gruppo 3:** lunghezza del telomero inferiore al primo percentile in almeno una delle popolazioni cellulari studiate

Per ciò che concerne l'analisi, ove possibile, le comparazioni veniva fatte sui tre gruppi, ma spesso il gruppo 2 essendo costituito da soli 3 pazienti è stato analizzato insieme al gruppo 3 rendendo possibile il confronto di fatto tra pazienti con il telomero inferiore al 5° percentile e telomero normale.

Rispetto alla letteratura, abbiamo abbassato il cut off del gruppo "intermedio" dal decimo al quinto percentile per testare l'ipotesi di una maggior di sensibilità e specificità per la diagnosi di DC rispetto a quanto riportato.

La statistica descrittiva è stata riportata come frequenze assolute o percentuali per i dati qualitativi, e in mediana e range per dati quantitativi. Poiché nel nostro caso almeno una delle frequenze attese era minore di 5, per la comparazione nella distribuzione delle frequenze abbiamo utilizzato il test esatto di Fisher. È stato considerato statisticamente significativo un p value <0.05. È stato utilizzato per l'analisi statistica dei dati il software STATA (release 7.0, StataCorp 2001, College Station, TX).

Allo scopo di verificare se la combinazione di 2 delle variabili esaminate potesse essere utile a dare un'indicazione chiara allo studio della lunghezza del telomero abbiamo utilizzato un test di concordanza (indice "Kappa" di Cohen), metodo statistico che fornisce indicazioni circa una reale associazione non dovuta al caso. Il grado di concordanza viene definito in base alla seguente tabella.

Tab. 5: *grado di concordanza fra due variabili*

KAPPA	CONCORDANZA
<0,01	Nulla
0,01-0,2	Scarsa
0,21-0,40	Modesta
0,41-0,60	Moderata
0.61-0,80	Buona
0,81-1,00	Eccellente

RISULTATI

CARATTERISTICHE GENERALI

Nel periodo di tempo compreso fra Aprile 2015 e febbraio 2020 abbiamo valutato presso l'Unità di Ematologia dell'Istituto Giannina Gaslini, in collaborazione con il laboratorio di Ematologia dell'Università di Acquisgrana, la lunghezza dei telomeri nei granulociti e nei linfociti in 55 pazienti che rispettavano i criteri di inclusione sopra illustrati.

47/55 (85%) soggetti presentavano citopenia in base ai criteri definiti nella sezione metodi, 7 pazienti erano familiari tra cui alcuni potenziali donatori di cellule staminali emopoietiche (di cui 2 citopenici), mentre in 3 casi l'analisi è stata eseguita per escludere una discheratosi congenita/anemia di Fanconi in pazienti con stimmate malformative in assenza di citopenia.

Dei 55 pazienti analizzati, 25 (24%) erano femmine. L'età mediana al momento della nostra valutazione è risultata essere di 11 anni (range 1-51 anni).

In base alla valutazione della lunghezza del telomero l'intera coorte è stata divisa in 3 gruppi:

1. Gruppo 1: soggetti con nessuna anomalia di lunghezza del telomero (sia su linfociti che su granulociti) che era costituito da 37/55 (67%) pazienti

2. Gruppo 2: soggetti la cui lunghezza del telomero era fra il primo e il quinto percentile in almeno una delle popolazioni cellulari studiate: 3/55 (6%) pazienti: (due sui linfociti ed uno solo sui granulociti).

3. Gruppo 3: soggetti in cui la lunghezza del telomero era inferiore al primo percentile in almeno una delle popolazioni cellulari studiate: 15/55 (27%) pazienti. In 9/15 soggetti i telomeri erano contemporaneamente corti su entrambe le popolazioni, 2/15 mostravano accorciamento del telomero solo nei linfociti ed in 3/15 l'accorciamento era evidente solo nei granulociti (1 con N fra 1° e 5°).

La distribuzione dei maschi/femmine era comparabile tra le tre popolazioni (p=ns)

Per ogni paziente abbiamo valutato la presenza e il grado delle anomalie fenotipiche e della citopenia. Per i pazienti per i quali è stata eseguita una valutazione midollare, abbiamo inoltre riportato la cellularità e il cariotipo midollare.

La tabella 6 riassume le caratteristiche fenotipiche ed ematologiche dei pazienti studiati.

Tab. 6: *Caratteristiche fenotipiche ed ematologiche dei pazienti studiati. (DC=fenotipo suggestivo di discheratosi congenita).*

Fenotipo	N° pazienti totali	Gruppo 1	Gruppo 2	Gruppo 3
	Fenotipo Normale	25	0	10
	Fenotipo Lieve	6	3 (3DC)	4 (3DC)
	Fenotipo Moderato	3	0	1 (1DC)
	Fenotipo Grave	3 (1DC)	0	0
	Totale	37	3	15
Citopenia				
	Assenza di citopenia	5	0	3
	Citopenia lieve	7	1	1
	Citopenia moderata	3	1	3
	Citopenia grave	22	1	8
	Totale	37	3	15
Insufficienza midollare				
	Cellularita Bio ossea >30%	18	3	6
	Cellularita bio ossea <30%	10	0	5
	Totale	28	3	11
	Anomalie cariotipo midollare (totale 4)	2	0	2

ANOMALIE FENOTIPICHE

I pazienti con anomalie fenotipiche in generale erano 20/55 (36%) nell'intero gruppo studiato. Tali anomalie erano manifeste in 12/37(32%) pazienti con normale lunghezza del telomero, (gruppo 1), in 3/3 (100%) pazienti del gruppo 2 ed in 5/15 (33%) pazienti del gruppo 3. ($p=ns$). Il confronto non risultava significativo né confrontando i tre gruppi separatamente, né se il gruppo 2 veniva associato al gr 3 ed insieme confrontati al gruppo 1

Da sottolineare che i pazienti con una o più anomalia fenotipica suggestiva di discheratosi congenita erano in totale 8, di cui 4 pts/15 (27%) appartenenti al gruppo 3, 3pts/3(100%) al gruppo 2, mentre riguardavano un solo pz/37 (3%) nel gruppo 1 ($p= 0.01$). La significatività era confermata sia che il confronto fosse sui tre gruppi separatamente, che se il confronto fosse effettuato sul gruppo 2 + 3 rispetto al gruppo 1 ($p=0.04$).

Per ciò che concerne la tipologia del fenotipo, risultava grave (>15) in 3/20 (15%) pazienti tutti appartenenti a gruppo 1, con telomeri normali. I restanti soggetti del gruppo 1 avevano alterazioni lievi (6/37; 16 %) e moderate (3/37; 5%).

Nel gruppo 2 fenotipo nessun paziente aveva fenotipo grave ed era lieve in tutti i restanti soggetti (3/3 ;100%).

Nei pazienti del gruppo 3, ovvero coloro con telomeri inferiori al 1° percentile, nessuno presentava fenotipo grave, mentre era lieve in 4/15 (27%) casi e moderato solo in 1/15 (7%).

La gravità del fenotipo di fatto non correlava con la "cortezza" del telomero sia comparando singolarmente i tre gruppi sia associando i gruppi 2+3 comparati al gruppo 1. ($P=ns$)

Considerando le mediane degli scores fenotipici fra i vari gruppi (gruppo 1: 7,5 (2-25), gruppo 2: 5 (3-6) e gruppo 3: 6 (1-6)), veniva nuovamente sottolineata la mancanza di correlazione statistica ($p=ns$)

Calcolando anche la percentuale di soggetti senza anomalie fenotipiche (score 0) non emergeva alcuna differenza tra i 25/37 (67%) del gruppo 1 ed i 10/18(55%) del gruppo 2+3 ($p=ns$)

QUADRO EMATOLOGICO

Riguardo le caratteristiche ematologiche dei pazienti studiati, abbiamo rilevato che nel gruppo per intero, 47/55 (85%) pazienti studiati presentavano citopenia, di cui 32/37 (86%), nel gruppo 1, 3/3 (100%) e 12/15 (80%) rispettivamente nei gruppi 2 e 3. La distribuzione non era significativa se comparata nei tre gruppi. ($p=ns$)

Tra gli 8 pazienti non citopenici, 5 avevano telomeri normali, 3 presentavano telomero inferiore al primo percentile. Di questi ultimi 3 pazienti, 2 (fratello e sorella di paziente del gruppo 3 deceduto con DC) presentavano mutazione TERT, mentre la terza, sorella di un paziente portatore di una mutazione di TERC (quest'ultimo appartenente al gruppo 3), studiata in quanto potenziale donatrice di cellule staminali emopoietiche del fratello affetto- e non portatrice della mutazione del familiare- presentava una lunghezza del telomero valutata sui linfociti inferiore al primo percentile

Nel gruppo in toto, la citopenia era definibile come grave 31/47 (66%), moderata 7/47 (15%) e lieve in 9/47 (19%).

I pazienti con citopenia grave erano così distribuiti nei vari gruppi: 22/32 (69%) nel gruppo 1, 1/3 nel gruppo 2 (33%) e 8/15 nel gruppo 3 (53%). ($p=ns$). Il confronto non era significativo né per confronto tra i tre gruppi, né analizzando i gruppi 2+ 3 e confrontandoli al gruppo 1.

Non significativo risultava altresì il confronto sulla citopenia lieve e sulla lieve moderata nei tre gruppi ($p=ns$)

Citopenia "Centrale"

Approfondendo il tipo della citopenia, emergeva che in circa un terzo della popolazione studiata il difetto era centrale ovvero causato da difetto di maturazione e crescita dei progenitori ematopoietici (definito come cellularità ematopoietica < al 30%) alla biopsia ossea, peraltro effettuata in 42/47 pazienti (82%) della nostra coorte.

L'esame del midollo è stato eseguito in 45/55 pazienti (82%), anche in due pazienti non citopenici (donatore e paziente seguito per sospetta anemia di Fanconi), mentre la biopsia ossea era disponibile in 42/47 (89%) pazienti

I pazienti con cellularità emopoietica <30% (definiti affetti da insufficienza midollare=IM) alla biopsia ossea, erano 15/42 (36%), così distribuiti: 10/15 (67%) pazienti appartenenti al gruppo

1, 5/15 (33%) nel gruppo 3, mentre nel gruppo 2 non vi erano pazienti con insufficienza midollare ($p=ns$) Tab 6.

Viceversa i pazienti con una cellularità ematopoietica > 30% alla biopsia ossea erano 27/42 (64%) così distribuiti: 18/27 (67%) pazienti nel gruppo 1, 3/27 (11%) soggetti nel gruppo 2 e 6/27 (22%) nel gruppo 3 ($p=ns$).

La trasformazione a mielodisplasia è occorsa in 4/47 pazienti, 2/32 (6%) appartenenti al gruppo 1 e 2/12 (17%) al gruppo 3 ($p=ns$).

Tra le anomalie cariotipiche (cariotipo disponibile per 38/47 valutazioni midollari) in 3 soggetti è stata evidenziata monosomia del cromosoma 7 (1 nel gruppo 1 e 2 nel gruppo 3) tutti trasformati in mielodisplasia (MDS) e in un soggetto identificato con Anemia di Fanconi con un'anomalia complessa (46 XX, der(15)t(1;15)(q21;p12)[4]/46XX, [16]) ed apparteneva al gruppo 1.

Citopenia "Periferica"

Da segnalare che tra i 47 soggetti con citopenia, 17 (36%) avevano una citopenia periferica ovvero associata ad una cellularità ematopoietica superiore al 30%, ma con stimate immunologiche. Il fenomeno era così distribuito: 11/37 (30%) nel gruppo 1, 3/3 (100%) nel gruppo 2 e 3/15 (20%) nel gruppo 3 ($p=ns$).

Rispetto alla correlazione con la genetica, parte che verrà approfondita nei successivi paragrafi ed in dettaglio nella tabella 7 è emersa una maggiore percentuale, seppur non statisticamente significativa, di soggetti affetti da citopenia immunologica e varianti patogeniche in geni di immunodeficienza ed immunodisregolazione (5/11; 45%) nel gruppo 1 mentre nei gruppi 2 e 3 nessuno dei pazienti affetti da citopenia immunologica era correlato a mutazioni di geni delle immunodeficienza/immunodisregolazione ($p=ns$).

CONCORDANZA TRA I GRUPPI 2 e 3, SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DELLA LUNGHEZZA DEI TELOMERI

Per riassumere brevemente quanto emerso fino a questo punto, i pazienti con lunghezza del telomero inferiore al quinto percentile avevano maggiore frequenza di fenotipo anomalo, fenotipo DC e citopenia rispetto ai pazienti con lunghezza del telomero normale. Tali differenze, però, non risultavano essere significative fra i due gruppi eccetto che per il fenotipo discheratosi.

Se le succitate variabili (anomalie fenotipiche, fenotipo DC, citopenia e presenza di insufficienza midollare) venivano appaiate e confrontate tra i gruppi 2 e 3 per valutare se i soggetti del gruppo 2 potessero di fatto essere assimilati al gruppo 3 emergeva che l'associazione di anomalie fenotipiche + insufficienza midollare era presente in soli 2/15 pz (di cui 0/3 del gruppo 2 e 2 del gruppo 3), ed aveva una concordanza moderata. (kappa di Cohen=0.491)

Viceversa l'associazione di citopenia più anomalie fenotipiche era presente in 7 pazienti (3/3 nel gr 2 e 4/12 nel gruppo 3) con un valore di kappa di Cohen pari a 0.675 e quindi una concordanza definita buona.

Anche per ciò che concerneva la combinazione citopenia con fenotipo DC era presente in 6 pazienti (3 nel gruppo 2 e 3 nel gruppo 3) ed il valore della kappa di Cohen 0.658 mostrava buona concordanza.

Queste ultime due combinazioni se confermate su più larga scala potrebbero rappresentare una indicazione chiara allo studio della lunghezza del telomero.

In accordo con i dati della letteratura, tutti i pazienti con mutazioni DC hanno lunghezza dei telomeri inferiore al primo percentile sia nei granulociti che nei linfociti. Nella nostra casistica, pur se con un numero di pazienti limitato, la lunghezza del telomero nei linfociti, sotto il primo percentile ha dimostrato sensibilità del 100% e specificità del 82% e si conferma un test affidabile per la diagnosi di telomeropatia. Il valore predittivo positivo era del 43% ed il valore predittivo negativo del 100%.

ASSETTO IMMUNITARIO

Approfondendo l'analisi immunologica, nei pazienti citopenici abbiamo valutato i valori di immunoglobuline sieriche e delle sottopopolazioni linfocitarie nelle tre coorti.

Sottopopolazioni linfocitarie

In totale i dati erano disponibili in 46/47 pazienti. 37/46 pazienti avevano alterazioni dei globuli bianchi e tra questi 15/37 (40%) erano francamente linfocitopenici ed i restanti 22/37 (60%) avevano valori di linfociti sopra alla soglia per età.

La distribuzione dei soggetti linfocitopenici non era diversa nei tre gruppi ($p=ns$)

In ordine di frequenza, nell'intera coorte, la deplezione dei linfociti B, CD19+ era la più frequente (27/47; 57%) indipendentemente dalla conta linfocitaria, a seguire risultavano sotto la soglia per età le cellule NK, CD3+CD26+CD56+ (20/47; 42%), le cellule CD3+CD8+ (13/47; 28%) ed infine le cellule CD3+CD4+ (11/47; 23%)

La deplezione di almeno una delle sottopopolazioni era più frequente nel gruppo con telomero inferiore al 5° (13/15; 87%), rispetto al gruppo con telomero normale (22/31; 71%) ma non statisticamente significativa. ($p=ns$)

Assetto immunoglobulinico

Il dosaggio immunoglobuline era disponibile in 38/47 (81%) dei soggetti citopenici. In una piccola porzione 4/38 (10%) vi era una riduzione in tutte le classi di immunoglobuline ed in tutti associato a deplezione dei valori di linfociti B.

La deplezione di almeno una delle classi di immunoglobuline era presente in 10/23 (43%) nel gruppo 1, 1/3 (33%) nel gruppo 2 e tendenzialmente più elevata nel gruppo 3 ovvero in 8/12 (66%) ma non statisticamente significativa ($p=ns$).

VARIANTI GENETICHE

L'analisi genetica dei pazienti attraverso PCR con tecnica Sanger o NGS allargato è stata effettuata su 49/55 pazienti (89%) ed ha dato i seguenti risultati: nel gruppo 1 sono stati studiati 32 soggetti, di cui 17 (53%) sono risultati negativi, mentre i restanti 15 soggetti hanno mostrato le seguenti varianti TACI(2), TERT (3), LIG4 (2), BLNK +TCF3 (1), sindrome di Ohdo (1), RAG 2(1), SAMD9 (1), GATA2 (1), CASP10 (1), CASP10+PI3KCD(1) e CARD11(1).

Nel gruppo 2, nessuno dei tre pazienti era portatore di varianti patogeniche.

Nel gruppo 3, lo studio genetico è stato eseguito in 14 soggetti: 4/14 (28%) soggetti sono risultati negativi per varianti patogeniche, dei restanti 10 (72%) pazienti, 8 avevano mutazioni su geni DC (4TERT, 2 TINF2, 1TERC e 1DKC mutato), mentre i restanti due soggetti erano portatori di mutazioni di LIG 4 e CTLA 4. La probabilità di avere mutazioni di geni DC era più alta naturalmente nei gruppi (2+3) con telomero inferiore al 5° percentile, rispetto al gruppo di pazienti con telomero normale (gruppo 1). ($p= 0.0009$)

Tab. 7: Varianti genetiche identificate nei pazienti e/o familiari

GRUPPO 1	DIAGNOSI CLINICA	GENE/MUTAZIONE	VARIANTI
1	Sospetta A. di Fanconi	ND	—
2	Citopenia*	NEG	—
3	Sospetta A. di Fanconi	ND	—
4	Aplasia Midollare/Malattia mitocondriale	NEG	—
5	Citopenia*	NEG	—
6	Citopenia*	CASP10 p.Val410Ile PIK3CD p.His273Tyr	Polimorfismo predisponente Probabile Benigna
7	Aplasia Midollare	NEG	—
8	Familiare (pz43)	LIG4 p.Arg278His	Probabile Patogenica
9	Aplasia Midollare	Sindrome di Ohdo	—
10	Aplasia Midollare	ND	—
11	Citopenia*	ND	—
12	Citopenia*	TAC1 p.Arg202His	Probabile benigna
13	Sospetta A. di Fanconi	LIG 4 (non disponibile)	Patogenica
14	Aplasia Midollare	ND	—
15	Aplasia Midollare	NEG	—
16	Citopenia*	RAG2 p.Gly509Val	Variante di significato incerto
17	Aplasia Midollare	NEG	—
18	Citopenia*	TAC1 p.Glu117fs	Probabile Patogenica
19	Aplasia Midollare	NEG	—
20	Aplasia Midollare	GATA2 p.Ala164Thr p.Ser277Gly	Benigna predisponente Variante di significato incerto

21	Aplasia midollare	BLNK p.Gly30Arg TCF3 p.Arg158Gln	Varianti di significato incerto
22	Citopenia/MDS	SAMD9 p.Ile983Thr	Variante di significato incerto
23	Citopenia /MDS	NEG	—
24	Sospetta A. di Fanconi	NEG	—
25	Citopenia*	NEG	—
26	Citopenia	NEG	—
27	Citopenia	NEG	—
28	Citopenia*	NEG	—
29	Citopenia e storia familiare MDS/ leucemia	NEG	—
30	Citopenia	NEG	—
31	Citopenia*	CASP10 p.Val410Ile p.Tyr446Cys	Polimorfismo predisponente Variante di significato incerto
32	Sospetta A. di Fanconi	TERT p.Pro431Ser	Variante di significato incerto
33	Aplasia Midollare	CARD11 c.3145-3C>T	Variante di significato incerto
34	Familiare (pz 50)	NEG	—
35	Citopenia*	NEG	—
36	Familiare (pz 53)	TERT p.Asp 807Asn	Variante di significato incerto
37	Familiare (pz 53)	TERT p.Glu429Ter	Probabile Patogenica
Gruppo 2			
38	Citopenia*	NEG	—
39	Citopenia*	NEG	—
40	Citopenia*	NEG	—

Gruppo 3			
41	Discheratosi	DKC1 p.Ala353Val	Patogenica
42	Citopenia*	TERC c.300G>C	ND
43	Citopenia	LIG4 p.Gly833Ala p.Arg278His	Patogenica Propabile Patogenica
44	Citopenia*	NEG	—
45	Aplasia serie rossa	NEG	—
46	Discheratosi	TERT p.558 Arg>Trp p.1018 Gln>X	Variante di significato incerto Patogenica
47	Familiare (pz 42)	NEG	—
48	Citopenia/MDS	ND	—
49	Ipoplasia midollare/ MDS	CTLA4 p.Met90Val	Variante di significato incerto
50	Aplasia midollare	TINF2 p. Pro283His	Patogenica
51	Citopenia	NEG	—
52	Familiare (pz 53)	TERT p.Glu429Ter p.Asp807Asn	Probabile patogenica Variante di significato incerto
53	Discheratosi	TERT p.Glu429Ter p.Asp807Asn	Probabile patogenica Variante di significato incerto
54	Citopenia*	TINF2 p.Ser245Tyr	Probabile Benigna
55	Familiare (pz.53)	TERT p.Glu429Ter	Probabile Patogenica

* citopenia di verosimile natura autoimmune

TERAPIA

Riguardo al trattamento, è stata posta indicazione al trapianto di cellule staminali emopoietiche per 20/55 pazienti, di cui 13 nel gruppo 1 e 7 nel gruppo 3 con le seguenti diagnosi: 1 Anemia di Fanconi, 3 discheratosi congenita, 1 paziente con sospetta mutazione geni DNA nucleare che regolano espressione DNA mitocondriale (genetica in corso), immunodeficienze/disimmunità (mutazioni PI3K/CASP10, LIG4, TACI, CARD11, BLNK+TCF3, SAMD9, GATA2, CTLA4) e 7 affetti da anemia aplastica.

Il resto dei pazienti ha eseguito terapia con immunosoppressori o terapie target o in un caso per un paziente probabilmente affetto da discheratosi congenita, ma senza mutazioni patogenetiche identificate, con androgeni, con scarsa efficacia. In alcuni pazienti è stato sufficiente il controllo longitudinale.

All' ultimo controllo, nel gennaio 2020, 51 pazienti sono vivi e 4 (2 affetti da anemia aplastica, 1 affetto da DC ed 1 con telomero inferiori al 1° percentile, ma senza diagnosi genetica) sono deceduti tutti in seguito a complicanze legate al trapianto di cellule staminali emopoietiche.

DISCUSSIONE

L'obiettivo principale del nostro studio è stato quello di valutare, la lunghezza del telomero nei linfociti e nei granulociti di una popolazione di pazienti affetti da segni clinici di discheratosi congenita e relativi familiari o in pazienti con citopenia persistente in fase di inquadramento, afferenti presso il nostro Centro.

Ciò che è emerso è che i gruppi divisi per lunghezza del telomero non erano differenziati sulla base del fenotipo, anzi lo score fenotipo era tendenzialmente più frequentemente alterato e grave nel gruppo 1 (telomero normale) anche se il dato non trovava conferma statistica. Di fatto si annoveravano sindromi genetiche e sospetti di anemie di Fanconi in maggior numero nel primo gruppo rispetto al gruppo 2 e 3. Ciò che invece differenziava i gruppi e caratterizza il gruppo con il telomero inferiore al primo percentile era la tipologia del fenotipo, ovvero le stimate di discheratosi congenita erano significativamente più frequenti nel gruppo 3 rispetto al gr 2 ed 1. ($p=0.04$)

La presenza quindi di un fenotipo DC è un parametro che correla con un grave accorciamento del telomero e può pertanto essere considerato un indicatore per l'esecuzione dell'esame.

La citopenia era più frequentemente grave (66%) ed "ugualmente grave" nei tre gruppi con percentuali comparabili nel gruppo 1 e 3, d'altronde essendo criterio di inclusione difficile che potesse creare un elemento differenziativo. Anche l'incidenza di insufficienza midollare rispettivamente in 10/28 (36%) nel gruppo 1 ed in 5/14 (36%) nel gruppo 2+3 non differenziava di fatto i due gruppi.

Nella nostra analisi abbiamo raggruppato frequentemente i pazienti del gruppo 2 e 3 (lunghezza telomero fra 1°e 5°percentile e inferiore al 1°percentile rispettivamente) primariamente per la scarsa numerosità del gruppo 2, ma ritenendo che la lunghezza del telomero inferiore al 5° percentile potesse essere comunque "sospetta" per telomeropatie e comunque meritevole di ulteriori indagini. È stata studiata in questa ottica la concordanza degli elementi riguardanti i vari aspetti sopra illustrati

Dall'analisi della combinazione dei diversi parametri per i 18 pazienti dei gruppi 2 e 3 eseguita nell'ottica di considerare è emerso che le combinazioni anomalie fenotipiche + citopenia, e citopenia + fenotipo DC hanno rispettivamente una concordanza buona con l'accorciamento del telomero e possono essere quindi, insieme al fenotipo DC possono essere considerati come parametri per indirizzare l'esecuzione dell'esame. Anche se con minor forza, concordanza

modesta la combinazione anomalie fenotipiche-insufficienza midollare può essere presa in considerazione.

Si è voluto inoltre valutare la sensibilità e la specificità del test, ed è stata anche analizzata la correlazione tra lunghezza del telomero e geni causativi di malattia del telomero o altri geni di insufficienza midollare/immunodeficienza.

Riguardo la sensibilità e la specificità diagnostica per DC, in linea con la letteratura i nostri dati confermano che la lunghezza del telomero inferiore al primo percentile nei linfociti è un parametro altamente sensibile e abbastanza specifico per la diagnosi di DC con una sensibilità rispettivamente del 100% e specificità del 82%.

In linea di nuovo con quanto descritto in letteratura, 1 familiare di un paziente DC presenta lunghezza del telomero nei linfociti inferiore al primo percentile in assenza di mutazione, citopenia e con una valutazione midollare risultata nella norma.

Nella nostra casistica, i due fratelli del paziente DC deceduto con la mutazione TERT presentano a loro volta la mutazione e lunghezza dei telomeri < al 1°percentile, senza presentare citopenia o alterazioni fenotipiche.

In letteratura viene sostenuto che in familiari senza insufficienza midollare la lunghezza del telomero non può essere considerata predittiva della presenza della mutazione. Vengono infatti descritti familiari di pazienti DC che presentano telomero inferiore al primo percentile pur non avendo la mutazione, cosa che suggerisce che questi avrebbero ereditato i telomeri corti, ma non la mutazione patogenetica (106). Al contrario, sono descritti pazienti con una normale lunghezza del telomero e normale fenotipo, ma portatori della mutazione, segno questo che la mutazione da sola in una determinata generazione può non essere sufficiente a generare telomeri corti e/o la patologia manifesta, o che vi siano geni modificatori che compensino l'accorciamento del telomero in questi pazienti.

Un'indagine preliminare sull'assetto immunologico nei tre gruppi ha fatto emergere che il 40% dei soggetti, ugualmente distribuiti nei tre gruppi, erano linfocitopenici e la classe di sottopopolazioni più facilmente depleta era costituita dai linfociti B con consensuale riduzione delle immunoglobuline, seguita da deplezione delle cellule NK. Non si delineavano differenze nei tre gruppi. Riguardo alla citopenia immunologica, così definita dalla presenza concomitante di marcatori autoimmuni, era ugualmente rappresentata nel gruppo 1 rispetto al gruppo 2 e 3 (30%) La differenza era invece rilevante per ciò che concerne la associazione della citopenia immunologica con geni di immunodeficienza ed

immunoregolazione ovvero nel gruppo 1, 5/11 (45%) soggetti erano portatori di mutazioni su geni di immunodeficienza/immunodisregolazione; (CASP10+PI3K, CASP 10 isolata RAG2, TACI 2) mentre nessuno nei gruppi 2 e 3 mostrava la suddetta associazione (0/6 ; 0%). La citopenia immunologica nel gruppo 3 era viceversa associata (in due pazienti) a varianti di geni discheratosi (TINF2 e TERC). Tale dato è in linea con la letteratura che associa l'immunodeficit primariamente dei linfociti B e delle cellule NK alla discheratosi congenita (61).

Sempre riguardo alla analisi del NGS con telomero inferiore al primo percentile, 9 soggetti su 13 studiati erano portatori di varianti di geni di malattie del telomero così distribuiti: 7 soggetti con diagnosi di DC, 2 familiari precedentemente descritti ed 1 paziente con mutazione di LIG4 (condizione correlata ad un difetto del DNA repair, e già descritta come associata ad una lunghezza del telomero patologica, spesso inferiore al 1°percentile). La frequenza di mutazione di geni DC era significativamente più rappresentata in questo gruppo rispetto al gruppo 1 dove solamente 5/31 presentavano varianti di DC (3 TERT e 2LIG4 di cui un familiare) ($p=0.0009$).

Nel gruppo 2 invece l'analisi NGS ha evidenziato un'immunodeficienza e un'anemia di Fanconi. In quest'ultimo caso, in linea con la letteratura, vi era una lunghezza del telomero patologica nei granulociti. Il terzo paziente, per cui non sono state identificate mutazioni patogenetiche, presenta caratteristiche fenotipiche suggestive di DC (fibrosi polmonare, anomalie di cute e annessi).

Probabilmente, nei casi border line come quello descritto, potrebbe essere utile valutare l'attività della telomerasi nei fibroblasti per evidenziarne anomalie funzionali a supporto della diagnosi di telomeropatia. Lo studio dell'esoma (WES) e del genoma (WGS) possono contribuire a identificare lesioni in nuovi geni.

In sintesi mentre le stimate ed i geni DC erano chiaramente più frequenti nel gruppo 2 e 3, nel gruppo 1 si rileva una prevalenza di citopenia da geni di immunodisregolazione ad indicare che nelle citopenie immunologiche potrebbe non essere necessariamente utile sul piano diagnostico valutare la lunghezza del telomero.

I nostri 11 pazienti affetti da anemia aplastica appartengono tutti al gruppo 1, dato questo che non conferma quanto descritto in letteratura almeno per un subset di pazienti AA, che

hanno lunghezza del telomero inferiore a quella dei controlli sani di pari età. C'è comunque da aggiungere che in nessuno dei nostri pazienti AA è stata identificata una mutazione dei geni DC, per cui questa, oltre alla limitata dimensione del campione in studio, potrebbe essere la spiegazione del nostro dato.

Il limite principale del nostro studio è il numero di pazienti relativamente limitato, ma nonostante questo i nostri dati sono in linea con quanto precedentemente descritto in letteratura.

Punto di forza del nostro lavoro è quello di aver studiato la lunghezza del telomero in una popolazione eterogenea di pazienti, sia per quanto riguarda le età sia per il quadro clinico e la patogenesi della citopenia, cosa che raramente è stata fatta in letteratura e che ci ha permesso ad esempio di valutare la lunghezza del telomero in pazienti con citopenie autoimmuni e/o immunodeficienze, aspetto a nostra conoscenza fino ad oggi non esplorato.

In conclusione, la lunghezza del telomero inferiore al primo percentile si conferma parametro sensibile e specifico per la diagnosi di DC.

L'esecuzione della valutazione della lunghezza del telomero andrebbe riservata a casi selezionati, soprattutto in coloro che presentano stimate anche lievi di DC in cui ci può essere variamente associazione di citopenia ed insufficienza midollare.

Studi più estensivi saranno utili per confermare i dati ottenuti e per ampliare la conoscenza sul tema a tutt'oggi ancora caratterizzato da molti "grigi".

BIBLIOGRAFIA

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan DO, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of The Cell*, 6th edition; New York, NY: Garland Science; 2015; 262.
2. Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere. *Cell* 2001; 106:661.
3. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. *Robbins e Cotran - Le basi patologiche delle malattie: Patologia generale*, 8th edition; London: Elsevier Health Sciences Italy, 2011; 40.
4. De Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* 15 settembre 2005; 19,18: 2100–10.
5. Turner KJ, Vasu V, Griffin DK. Telomere Biology and Human Phenotype. *Cells.* 19 gennaio 2019; 8,1.
6. Doksani Y, De Lange T. The Role of Double-Strand Break Repair Pathways at Functional and Dysfunctional Telomeres. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* 1 dicembre 2014; 6,12: a016576–a016576.
7. Smogorzewska A, De Lange T. Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Ann Rev Biochem* 2004; 73: 177– 208.
8. Egan ED, Collins K. Specificity and stoichiometry of subunit interactions in the human telomerase holoenzyme assembled in vivo. *Mol Cell Biol.* 2010; 30:2775–86.
9. Wang F, Podell ER, Zaug AJ, Yang Y, Baciu P, Cech TR, Lei M. The POT1–TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature* 2007; 445: 506–510.
10. Schmidt JC, Cech TR. Human telomerase: biogenesis, trafficking, recruitment, and activation. *Genes Dev.* 1 giugno 2015; 29,11: 1095–105.
11. Sexton AN, Regalado SG, Lai CS, Cost GJ, O’Neil CM, Urnov FD, Grogory PD, Jaenisch R, Collins K, Hockemeyer D. Genetic and molecular identification of three human TPP1 functions in telomerase action: recruitment, activation, and homeostasis set point regulation. *Genes Dev.* 2014; 2817: 1885–99.
12. Loayza D, De Lange T. POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature*, 2003; 424: 1013– 1018.
13. Chen L-Y, Redon S, Lingner J. The human CST complex is a terminator of telomerase activity. *Nature* 2012; 488: 540–544.
14. Schoeftner S, Blasco MA. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nat Cell Biol*, 2008; 10: 228–236.
15. Longhese MP. DNA damage response at functional and dysfunctional telomeres. *Genes Dev.* 2008; 22, 125–140.
16. Muñoz-Espín D, Serrano M. Cellular senescence: From physiology to pathology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014; 15, 482–496.
17. Martens UM, Chavez EA, Poon SS, Schmoor C, Lansdorp PM. Accumulation of short telomeres in human fibroblasts prior to replicative senescence. *Exp Cell Res.* 2000; 256,1: 291–299.
18. Wright DL, Jones EL, Mayer JF, Oehninger S, Gibbons WE, Lanzendorf SE. Characterization of telomerase activity in the human oocyte and preimplantation embryo. *Mol. Hum. Reprod.* 2001; 7, 947–955.
19. Turner S, Wong HP, Rai J, Hartshorne GM. Telomere lengths in human oocytes, cleavage stage embryos and blastocysts. *Mol. Hum. Reprod.* 2010.
20. Cheng G, Kong F, Luan Y, Sun C, Wang J, Zhang L, Jiang B, Qi T, Zhao J, Zheng C. Differential shortening rate of telomere length in the development of human fetus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013; 442, 112–115.
21. Friedrich U, Schwab M, Griese EU, Fritz P, Klotz U. Telomeres in neonates: New insights in fetal hematopoiesis. *Pediatr. Res.* 2001; 49, 2–256.
22. Daniali L, Benetos A, Susser E, Kark JD, Labat C, Kimura M, Desai KK, Granick M, Aviv A. Telomeres shorten at equivalent rates in somatic tissues of adults. *Nat. Commun.* 2013; 4, 1597.
23. Sanders JL, Newman AB. Telomere Length in Epidemiology: A Biomarker of Aging, Age-Related Disease, Both, or Neither? *Epidemiol. Rev.* 2013; 35, 112–131.
24. Zeichner SL, Palumbo P, Feng Y, Xiao X, Gee D, Sleasman J, Goodenow M, Biggar R, Dimitrov D. Rapid telomere shortening in children. *Blood* 1999; 93, 2824–2830.
25. Benetos A, Kark JD, Susser E, Kimura M, Sinnreich R, Chen W, Steenstrup T, Christensen K, Herbig U, von Bornemann Hjelmberg J. Tracking and fixed ranking of leukocyte telomere length across the adult life course. *Aging Cell* 2013; 12, 615–621.

26. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; 408, 239.
27. Oikawa, S.; Kawanishi, S. Site-specific DNA damage at GGG sequence by oxidative stress may accelerate telomere shortening. *FEBS Lett.* 1999; 453, 365–368.
28. Price LH, Kao HT, Burgers DE, Carpenter LL, Tyrka AR. Telomeres and early-life stress: an overview. *Biol Psychiatry.* 2013; 73,1: 15 –23.
29. Blackburn EH, Epel ES, Lin J. Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science.* 4 dicembre 2015; 350,6265: 1193–8.
30. Norberg A, Rosén A, Raaschou-Jensen K, Kjeldsen L, Moilanen JS, Paulsson-Karlsson Y, Baliakas P, Lohi O, Ahmed A, Kittang AO, Larsson Pär, Roos G, Degerman S, Hulthdin M. Novel variants in Nordic patients referred for genetic testing of telomere-related disorders. *Eur J Hum Genet.* giugno 2018; 26,6:858–67.
31. Aubert G, Lansdorp PM. Telomeres and aging. *Physiol Rev* 2008; 88: 557–579.
32. Aubert G, Baerlocher GM, Vulto I, Poon SS, Lansdorp PM. Collapse of Telomere Homeostasis in Hematopoietic Cells Caused by Heterozygous Mutations in Telomerase Genes. *PLoS Genet.* 2012;8,5: e1002696.
33. Rhee DB, Ghosh A, Lu J, Bohr VA, Liu Y. Factors that influence telomeric oxidative base damage and repair by DNA glycosylase OGG1. *DNA Repair (Amst)* 2011; 10: 34–44.
34. Calado RT, Young NS. Telomere maintenance and human bone marrow failure. *Blood.* 2008; 111,9: 4446-55.
35. Townsley DM, Dumitriu B, Young NS. Bone marrow failure and the telomeropathies. *Blood.* 2014; 124,18: 2775.2783.
36. Walne AJ, Vulliamy T, Beswick R, Kirwan M, Dokal I. TINF2 mutations result in very short telomeres: analysis of a large cohort of patients with dyskeratosis congenita and related bone marrow failure syndromes. *Blood.* 2008; 112: 3594–3600
37. Townsley DM, Dumitriu B, Liu D, Biancotto A, Weinstein B, Chen C, Hardy N, Mihalek AD, Lingala S, Kim YJ, Yao J, Jones E, Gochuico BR, Heller T, Wu CO, Calado RT, Scheinberg P, Young NS. Danazol Treatment for Telomere Diseases. *N Engl J Med* 2016; 374:1922.
38. Vulliamy T, Marrone A, Szydlo R, Walne A, Mason PJ, Dokal I. Disease anticipation is associated with progressive telomere shortening in families with dyskeratosis congenita due to mutations in TERC. *Nat Genet.* 2004; 36: 447–9.
39. Armanios M, Chen JL, Chang YP, Brodsky RA, Hawkins A, Griffin CA, Eshleman JR, Cohen AR, Chakravarti A, Hamosh A, Greider CW. Haploinsufficiency of telomerase reverse transcriptase leads to anticipation in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:15960-4;
40. Armanios M. Syndromes of telomere shortening. *Annu Rev Genom Hum Genet.* 2009; 10:45–61.
41. Alter BP, Giri N, Savage SA, Rosenberg PS. Cancer in dyskeratosis congenita. *Blood* 2009; 113:6549-57;
42. Armanios M. Telomerase and idiopathic pulmonary fibrosis. *Mutat Res.* 2012; 730,1-2: 52-58.
43. Bertuch AA. The molecular genetics of the telomere biology disorders. *RNA Biology.* 2 agosto 2016; 13,8: 696–706.
44. Alter BP, Rosenberg PS, Giri N, Baerlocher GM, Lansdorp PM, Savage SA. Telomere length is associated with disease severity and declines with age in dyskeratosis congenita. *Haematologica* 2012; 97:353-9;
45. Alder JK, Barkauskas CE, Limjunyawong N, Stanley SE, Kembou F, Tudor RM, Hogan BL, Mitzner W, Armanios M. Telomere dysfunction causes alveolar stem cell failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112:5099-104;
46. Calado RT, Regal JA, Kleiner DE, Schrupp DS, Peterson NR, Pons V, Chanock SJ, Lansdorp PM, Young NS. A spectrum of severe familial liver disorders associate with telomerase mutations. *PLoS ONE.* 2009; 4,11: e7926
47. de la Fuente J, Dokal I. Dyskeratosis congenita: advances in the understanding of the telomerase defect and the role of stem cell transplantation. *Pediatr Transplant.* 2007; 11,6: 584-594
48. Vulliamy TJ, Kirwan MJ, Beswick R, Hossain U, Bagai C, Ratcliffe A, Marsh J, Walne A, Dokal I. Differences in disease severity but similar telomere lengths in genetic subgroups of patients with telomerase and shelterin mutations. *PLoS ONE.* 2011; 6,9: e24383.
49. Henriksson S, Farnebo M. On the road with WRAP53beta: guardian of Cajal bodies and genome integrity. *Front Genet* 2015; 6:91.
50. Freund A, Zhong FL, Venteicher AS, Meng Z, Veenstra TD, Frydman J, Artandi SE. Proteostatic control of telomerase function through TRiC-mediated folding of TCAB1. *Cell* 2014; 159:1389-403.

51. Stewart JA, Wang F, Chaiken MF, Kasbek C, Chastain PD, Wright WE, Price CM. Human CST promotes telomere duplex replication and general replication restart after fork stalling. *Embo J* 2012; 31:3537-49.
52. Anderson BH, Kasher PR, Mayer J, Szykiewicz M, Jenkinson EM, Bhaskar SS, Urquhart JE, Daly SB, Dickerson JE, O'Sullivan J, Leibundgut EO, Muter J, Abdel-Salem GMH, Babul-Hirji R, Baxter P, Berger A, Bonafé L, Brunstom-Hernandez JE, Buckard JA, Chitayat D, Chong WK, Cordelli DM, Ferreira P, Fluss J, Forrest EH, Franzoni E, Garone C, Hammans SR, Houge G, Hughes I, Jacquemont S, Jeannet PY, Jefferson RJ, Kumar R, Kutschke G, Lundberg S, Lourenço CM, Mehta R, Naidu S, Nischal KK, Nunes L, Ounap K, Philippart M, Prabhakar P, Risen SR, Schiffmann R, Soh C, Stephenson JBP, Stewart H, Stone J, Tolmie JL, van der Knaap MS, Vieira JP, Vilain CN, Wakeling EL, Wermenbol V, Whitney A, Lovell SC, Meyer S, Livingston JH, Baerlocher GM, Black GCM, Rice GI, Crow YJ. Mutations in CTC1, encoding conserved telomere maintenance component 1, cause Coats plus. *Nat Genet* 2012; 44:338-42.
53. Ballew BJ, Yeager M, Jacobs K, Giri N, Boland J, Burdett L, Alter BP, Savage SA. Germline mutations of regulator of telomere elongation helicase 1, RTEL1, in Dyskeratosis congenita. *Hum Genet* 2013; 32:473-80.
54. Sasa GS, Ribes-Zamora A, Nelson ND, Bertuch AA. Three novel truncating TINF2 mutations causing severe dyskeratosis congenita in early childhood. *Clin Genet* 2012; 81:470-8.
55. Stuart BD, Choi J, Zaidi S, Xing C, Holohan B, Chen R, Choi M, Dharwadkar P, Torres F, Girod CE, Weissler J, Fitzgerald J, Kershaw C, Kelsney-Tait J, Mageto Y, Shay JW, Ji W, Bilguvar K, Mane S, Lifton RP, Garcia CK. Exome sequencing links mutations in PARN and RTEL1 with familial pulmonary fibrosis and telomere shortening. *Nat Genet* 2015; 47:512-7.
56. Bainbridge MN, Armstrong GN, Gramatges MM, Bertuch AA, Jhangiani SN, Doddapaneni H, Lewis L, Tombrello J, Tsavachidis S, Liu Y, Jalali A, Plon SE, Lau CC, Parsons DW, Claus EB, Barnholtz-Sloan J, Il'yasova D, Schildkraut J, Ali-Osman F, Sadetzki S, Johansen C, Houlston RS, Jenkins RB, Lachance D, Olson SH, Bernstein JL, Merrl RT, Wrench MR, Walsh KM, Davis FG, Lai R, Shete S, Aldape K, Amos CI, Thompson PA, Muzny DM, Gibbs RA, Melin BS, Bondy ML, Consortium G. Germline mutations in shelterin complex genes are associated with familial glioma. *J Natl Cancer Inst* 2015; 107:384.
57. Revesz T, Fletcher S, al-Gazali LI, DeBuse P. Bilateral retinopathy, aplastic anaemia, and central nervous system abnormalities: a new syndrome? *J Med Genet* 1992; 29:673-5.
58. Dietz AC, Orchard PJ, Baker KS, Giller RH, Savage SA, Alter BP, Tolar J. Disease-specific hematopoietic cell transplantation: Nonmyeloablative conditioning regimen for dyskeratosis congenita. *Bone Marrow Transplant*, 2010; 46:98-104.
59. Balakumaran A, Mishra PJ, Pawelczyk E, Yoshizawa S, Sworder BJ, Cherman N, Kuznetsov SA, Bianco P, Giri N, Savage SA, Merlino G, Dumitriu B, Dunbar CE, Young NS, Alter BP, Robey PG. Bone marrow skeletal stem/progenitor cell defects in dyskeratosis congenita and telomere biology disorders. *Blood* 2015; 125:793-802.
60. Crow YJ, McMenamin J, Haenggeli CA, Hadley DM, Tirupathi S, Treacy EP, Zuberi SM, Browne BH, Tolmie JL, Stephenson JB. Coats' plus: a progressive familial syndrome of bilateral Coats' disease, characteristic cerebral calcification, leukoencephalopathy, slow pre- and post-natal linear growth and defects of bone marrow and integument. *Neuropediatrics* 2004; 35:10-9.
61. Alter BP, Baerlocher GM, Savage SA, Chanock SJ, Weksler BB, Willner JP, Peters JA, Giri N, Lansdorp PM. Very short telomere length by flow fluorescence in situ hybridization identifies patients with dyskeratosis congenita. *Blood* 2007; 110:1439-47.
62. Mason PJ, Bessler M. The genetics of dyskeratosis congenita. *Cancer Genet*. 2011; 204,12: 635-645.
63. Alter BP, Giri N, Savage SA, Rosenberg PS. Telomere length in inherited bone marrow failure syndromes. *Haematologica*. 2015; 100:49-54.
64. Li X, Leteurtre F, Rocha V, Guardiola P, Berger R, Daniel MT, Noguera MH, Maarek O, Roux GL, de la Salmonière P, Richard P, Gluckman E. Abnormal telomere metabolism in Fanconi's anaemia correlates with genomic instability and the probability of developing severe aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 2003; 120,5: 836-45.
65. Callen E, Samper E, Ramirez MJ, Creus A, Marcos R, Ortega JJ, Olivé T, Badell I, Blasco MA, Sorrallés J. Breaks at telomeres and TRF2-independent end fusions in Fanconi anemia. *Hum Mol Genet*. 2002; 11: 439-444.
66. Sarkar J, Liu Y. Fanconi anemia proteins in telomere maintenance. *DNA Repair (Amst)*. 2016; 43:107-12.

67. Thornley I, Dror Y, Sung L, Wynn RF, Freedman MH. Abnormal telomere shortening in leucocytes of children with Shwachman-Diamond syndrome. *Br J Haematol.* 2002; 117:189-92.
68. Calado RT, Graf SA, Wilkerson KL, Kajigaya S, Ancliff PJ, Dror Y, Chanock SJ, Lansdorp PM, Young NS. Mutations in the SBDS gene in acquired aplastic anemia. *Blood.* 2007; 110,4: 1141-6.
69. Zeng Y, Katsanis E. The complex pathophysiology of acquired aplastic anaemia. *Clin Exp Immunol* 2015; 180:361-70.
70. Brümmendorf TH, Maciejewski JP, Mak J, Young NS, Lansdorp PM. Telomere length in leukocyte subpopulations of patients with aplastic anemia. *Blood.* 2001; 97,4: 895-900.
71. Park HS, Park SN, Im K, Kim SM, Kim JA, Hwang SM, Lee DS. Telomere length and somatic mutations in correlation with response to immunosuppressive treatment in aplastic anaemia. *Br J Haematol.* 2017; 178,4: 603-615.
72. Calado RT, Cooper JN, Padilla-Nash HM, Sloand EM, Wu CO, Scheinberg P, Ried T, Young NS. Short telomeres result in chromosomal instability in hematopoietic cells and precede malignant evolution in human aplastic anemia. *Leukemia.* 2012; 26,4: 700-7.
73. Bär C, Povedano JM, Serrano R, Benitez-Buelga C, Popkes M, Formentini I, Bobadilla M, Bosch F, Blasco MA. Telomerase gene therapy rescues telomere length, bone marrow aplasia, and survival in mice with aplastic anemia. *Blood* 2016; 7, 127:1770-9.
74. Yamaguchi H, Calado RT, Ly H, Kajigaya S, Baerlocher GM, Chanock SJ, Lansdorp PM, Young NS. Mutations in TERT, the gene for telomerase reversetranscriptase, in aplastic anemia. *N Engl J Med* 2005; 352:1413-24.
75. Georgin-Lavialle S, Aouba A, Mouthon L, Londono-Vallejo JA, Lepelletier Y, Gabet AS, Hermine O. The telomere/telomerase system in autoimmune and systemic immune-mediated diseases. *Autoimmun Rev.* 2010; 9,10: 646-51.
76. Goronzy JJ, Fujii H, Weyand CM. Telomeres, immune aging and autoimmunity. *Exp Gerontol* 2006; 41,3: 246–51.
77. Kordinas V, Ioannidis A, Chatzipanagiotou S. The Telomere/Telomerase System in Chronic Inflammatory Diseases. Cause or Effect? *Genes (Basel).* 2016; 7,9.
78. Wagner CL, Hanumanthu VS, Talbot CC Jr, Abraham RS, Hamm D, Gable DL, Kanakry CG, Apllegate CD, Siliciano J, Jackson JB, Desiderio S, Alder JK, Luznik L, Armanios M. Short telomere syndromes cause a primary T cell immunodeficiency. *J Clin Invest.* 2018; 128,12: 5222-5234.
79. Buchkovich KJ, Greider CW. Telomerase regulation during entry into the cell cycle in normal human T cells. *Mol Biol Cell.* 1996; 7(9):1443–1454.
80. Rufer N, Brümmendorf TH, Kolvraa S, Bischoff C, Christensen K, Wadsworth L, Schulzer M, Lansdorpa PM. Telomere fluorescence measurements in granulocytes and T lymphocyte subsets point to a high turnover of hematopoietic stem cells and memory T cells in early childhood. *J Exp Med.* 1999;190,2: 157–167.
81. Fumagalli M, Rossiello F, Clerici M, Barozzi S, Cittaro D, Kaplunov JM, Bucci G, Dobrev M, Matti V, Bausejour CM, Herbig U, Longhese MP, di Fagagna FD. Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nat. Cell Biol.* 2012; 14, 355–365.
82. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW . Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266, 2011–2015.
83. Zhu X, Han W, Xue W, Zou Y, Xie C, Du J, Jin G. The association between telomere length and cancer risk in population studies. *Sci Rep,* 2016; 6, 22243.
84. Lan Q, Cawthon R, Shen M, Weinstein SJ, Virtamo J, Lim U, Hosgood HD, Albanes D, Rothman N. A prospective study of telomere length measured by monochrome multiplex quantitative PCR and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Clin Cancer Res,* 2009; 15, 7429-33.
85. Liu X, Cheng R, Verbitsky M, Kisselev S, Browne A, Mejia-Sanatana H, Louis ED, Cote LJ, Andrews H, Waters C, Ford B, Frucht S, Fahn S, Marder K, Clark LN, Lee JH. Genome-wide association study identifies candidate genes for Parkinson’s disease in an Ashkenazi Jewish population. *BMC Med Genet,* 2011; 12, 104.
86. Wu KD, Orme LM, Shaughnessy J Jr, Jacobson J, Barlogie B, Moore MAS. Telomerase and telomere length in multiple myeloma: correlations with disease heterogeneity, cytogenetic status, and overall survival. *Blood,* 2003; 101, 4982-9.

87. Dos Santos P, Panero J, Palau Nagore V, Stanganelli C, Bezares RF, Slavutsky I. Telomere shortening associated with increased genomic complexity in chronic lymphocytic leukemia. *Tumour Biol*, 2015; 36, 8317-24.
88. Eskandari E, Hashemi M, Naderi M, Bahari G, Safdari V, Taheri M. Leukocyte Telomere Length Shortening, hTERT Genetic Polymorphisms and Risk of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018; 19,6: 1515-1521.
89. Lai T-P, Wright WE, Shay JW. Comparison of telomere length measurement methods. *Phil Trans R Soc B*. 5 marzo 2018; 373,1741: 20160451.
90. Opresko PL, Shay JW. Telomere-associated aging disorders. *Ageing Res. Rev.* 2017; 33, 52–66.
91. Alder JK, Hanumanthu VS, Strong MA, DeZern AE, Stanley SE, Takemoto CM, Danilova L, Applegate CD, Bolton SG, Moht DW, Brodsky RA, Casella JF, Greider CW, Jackson JB, Armanios M. Diagnostic utility of telomere length testing in a hospital-based setting. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018; 115, 10: E2358–65.
92. Cawthon RM. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37, e21
93. Aubert G, Hills M, Lansdorp PM. Telomere length measurement—caveats and a critical assessment of the available technologies and tools. *Mutat. Res*. 2012; 730, 59–67.
94. Holland AJ, Cleveland DW. Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nat. Rev*. 2009; 10, 478–487.
95. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1988; 85, 6622–6626.
96. Mender I, Shay JW. Telomere restriction fragment (TRF) analysis. *Bio. Protoc.* 5, 2015; 1658.
97. Kimura M, Stone RC, Hunt SC, Skurnick J, Lu X, Cao X, Harley CB, Aviv A. Measurement of telomere length by the Southern blot analysis of terminal restriction fragment lengths. *Nat. Protoc.* 5, 2010; 1596–1607.
98. Baird DM, Rowson J, Wynford-Thomas D, Kipling D. Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells. *Nat. Genetic*. 2003; 33, 203–207.
99. Lin TT, Letsolo BT, Jones RE, Rowson J, Pratt G, Hewamana S, Fegan C, Pepper C, Baird DM. Telomere dysfunction and fusion during the progression of chronic lymphocytic leukemia: evidence for a telomere crisis. *Blood* 2010; 116, 1899–1907.
100. Canela A, Vera E, Klatt P, Blasco MA. High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2007; 104, 5300–5305.
101. Lansdorp PM, Verwoerd NP, van de Rijke FM, Dragowska V, Little MT, Dirks RW, Raap AK, Tanke HJ. Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum. Mol. Genet.* 5, 1996; 685–691.
102. Baerlocher GM, Vulto I, de Jong G, Lansdorp PM. Flow cytometry and FISH to measure the average length of telomeres (flow FISH). *Nat. Protoc.* 1, 2006; 2365–2376.
103. Vulliamy T, Marrone A, Goldman F, Dearlove A, Bessler M, Mason PJ, Dokal I. The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Nature*. 2001; 413,6854: 432-435.
104. Shepherd BE, Gutter P, Lansdorp PM, Abkowitz JL. Estimating human hematopoietic stem cell kinetics using granulocyte telomere lengths. *Exp Hematol*. 2004; 32: 1040–1050.
105. Svahn J, Bagnasco F, Cappelli E, et al Somatic, hematologic phenotype, long-term outcome, and effect of hematopoietic stem cell transplantation. An analysis of 97 Fanconi anemia patients from the Italian national database on behalf of the Marrow Failure Study Group of the AIEOP (Italian Association of Pediatric Hematology-Oncology). *Am J Hematol*. 2016; 91,7:666-71.
106. Du HY, Pumbo E, Ivanovich J, An P, Maziarz RT, Reiss UM, Chirnomas D, Shimamura A, Vlachos A, Lipton JM, Goyal RK, Goldman F, Wilson DB, Mason PJ, Bessler M. TERC and TERT gene mutations in patients with bone marrow failure and the significance of telomere length measurements. *Blood*. 2009 Jan 8;113,2:309-16.

RINGRAZIAMENTI

Vorrei concludere passando ai ringraziamenti di chi mi ha aiutata e sostenuta fino a qui.

Voglio iniziare ringraziando il professor Ravelli, per avermi dato la possibilità di svolgere la mia tesi nell'ospedale Gaslini e di compiere i primi passi nel mondo della pediatria.

Vorrei ringraziare i dottori del reparto di ematologia, in particolare il dottor Dufour per la possibilità di frequentare il reparto, per l'attenzione e i preziosi suggerimenti.

Ringrazio chi mi ha aiutata nella realizzazione della tesi, in particolare la dottoressa Fioredda, per avermi seguita con grande disponibilità e pazienza, per la passione trasmessami, per le sempre pronte risposte e i consigli; la dottoressa Pierri, per il supporto scientifico fornito e la dottoressa Zanardi, per le consulenze statistiche.

Un ringraziamento speciale ad Eleonora, la specializzanda che mi ha accompagnata e aiutata nella stesura e nella raccolta dei dati per questa tesi, per l'aiuto, la compagnia, i suggerimenti e la presenza costante.

Ringrazio i dottori che ho incontrato nel mio percorso che sono stati per me fonte di ispirazione, quelli incontrati nei tirocini e a lezione ed inoltre i dottori che mi hanno accolta in Erasmus, la dottoressa Maia, del CHU di Coimbra, che per prima mi ha introdotta e mi ha fatto appassionare al mondo dell'ematologia, ed i dottori Bodet, Deparis e Gaudichon e la mia specializzanda Camille del CHU di Caen per l'accoglienza che mi han riservato, per tutto quello che mi hanno insegnato, per la pazienza e la fiducia dimostrata e l'autonomia che mi han dato.

Il ringraziamento più grande va alla mia famiglia, porto sicuro su cui posso sempre contare. Grazie per essere i miei più grandi sostenitori, per avermi permesso di arrivare fino a qui, senza mai farmi mancare nulla.

Un grazie poi a tutti gli amici, quelli che ci sono da sempre e quelli che ho incontrato lungo il mio percorso, senza di voi sarebbe stato tutto più lungo e noioso.

E grazie a me, per la mia determinazione e per essermi circondata di persone meravigliose che han sempre creduto in me.