



UNIVERSITÀ DI PARMA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Mediche e Chirurgiche Traslazionali

CICLO XXXVIII

**Analisi integrata delle neoplasie mieloidi ereditarie: sviluppo di un
algoritmo diagnostico e di un pannello genico personalizzato per
analisi di Next Generation Sequencing**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Gabriele Missale

Tutore:

Chiar.mo Prof. Giovanni Roti

Dottorando: Dott.ssa Elena Ronda

Anni Accademici 2022/2023 – 2024/2025

Sommario

ABSTRACT	3
1. Introduzione: il significato della predisposizione genetica nelle neoplasie mieloidi	5
1.1 Eterogeneità genetica delle Neoplasie Mielodisplastiche e Leucemia Mieloidi Acute	7
1.2 Predisposizione nelle MDS e LAM	8
1.3 Condizioni su base ereditaria	9
1.4 Emopoiesi Clonale	13
1.5 Normative e linee guida per la gestione clinica e genetica delle neoplasie mieloidi ereditarie	14
2. Scopo della tesi: limiti diagnostici attuali e necessità di strumenti innovativi	19
3. Presentazione del progetto di ricerca	20
3.1 Descrizione generale del progetto e finalità	20
4.2 Preparazione e presentazione del progetto al Comitato Etico	22
4.2.1 Documenti e iter di approvazione	22
4. Stato dell'arte: dati molecolari pre-progetto	24
4.1 Approcci diagnostici-molecolari: metodica NGS	24
4.2 Dati molecolari derivanti dal work-up diagnostico	28
4.2.1 Coorte selezionata	28
4.2.2 Analisi pannello target di geni correlati a disordini di tipo mieloide	28
4.2.3 Risultati molecolari	29
4.3 Criticità della routine diagnostica	34
5. Definizione dei criteri diagnostici	35
5.1 Logica decisionale: requisiti clinici e combinazioni mutazionali	35
5.2 Criteri per la definizione di "sospetto di condizione ereditaria"	35
6. Definizione e sviluppo di un pannello NGS custom	38
6.1 Identificazione dei geni target rilevanti per le forme ereditarie di MDS/LAM/MPN	38
6.2 Progettazione tecnica del pannello	43
6.2 Strategie di ottimizzazione e parametri di qualità	44
6.4 Analisi bioinformatica e pipeline di elaborazione dati	45
6.5 Risultati preliminari	46
6.5.1 Valori di coverage	47
6.5.2 Risultati molecolari	48

7. Valutazione di materiali biologici alternativi	50
7.1 <i>Razionale: conferma delle varianti di origine germinale</i>	50
7.2 <i>Analisi comparativa tra DNA estratto da saliva e DNA estratto da linfociti T</i>	52
7.3 <i>Risultati ed implicazioni per la diagnostica clinica futura.</i>	52
8. Risultati complessivi	53
8.1 <i>Sintesi dei risultati ottenuti</i>	53
8.2 <i>Impatto dello studio nella pratica diagnostica di laboratorio</i>	54
9. Discussione e conclusioni: rilevanza del progetto per la medicina personalizzata in ematologia	56
10. Riferimenti Bibliografici	58

ABSTRACT

Le neoplasie mieloidi ereditarie (Hereditary Myeloid Neoplasm HMN) rappresentano una categoria emergente di disordini ematologici riconosciuta come entità distinta nella classificazione della World Health Organization dal 2016.

L'idea fondante di questo studio nasce dalla crescente evidenza che una quota non trascurabile di pazienti adulti affetti da neoplasie mieloidi presenta una base genetica germinale, spesso misconosciuta nei percorsi diagnostici convenzionali. L'identificazione precoce di tali forme è di cruciale importanza per migliorare la diagnosi precoce e la stratificazione del rischio, orientare le decisioni terapeutiche e per la selezione del donatore familiare per il trapianto. Nonostante l'importanza clinica di queste condizioni, i test germinali sembrano essere sottoutilizzati nella pratica diagnostica, probabilmente a causa delle difficoltà associate all'ottenimento del DNA germinale e della mancanza di criteri clinici standardizzati per l'accesso al test.

Alla luce di queste considerazioni, è emersa la necessità di esplorare in modo sistematico l'eventuale presenza di alterazioni germinali nei pazienti affetti da neoplasie mieloidi, partendo dall'osservazione delle varianti identificate nelle analisi somatiche routinarie. In quest'ottica, è stata avviata una valutazione retrospettiva presso il nostro Centro volta ad indagare la reale frequenza e le caratteristiche di tali alterazioni nei pazienti adulti con diagnosi di neoplasia mieloide, sottoposti a profilazione genetica mediante analisi di Next Generation Sequencing (NGS) per la definizione di varianti somatiche. Questa valutazione preliminare ha consentito di rilevare una suggestiva incidenza (circa 30% dei casi) di varianti con frequenze alleliche (VAF) compatibili con un'origine germinale. I geni coinvolti includevano quelli raccomandati da linee guida internazionali (World Health Organization-WHO, International Consensus Classification-ICC), geni associati a disordini di riparazione del DNA ed a condizioni sindromiche. Questi dati rappresentano un'iniziale evidenza del frequente riscontro di varianti potenzialmente germinali nei pazienti con neoplasie mieloidi, suggerendo che il sospetto di HMN dovrebbe essere preso in considerazione per tutti i pazienti, indipendentemente dall'età e che la profilazione genetica somatica può rappresentare un punto di partenza fondamentale per l'identificazione di condizioni ereditarie.

L'integrazione di questo studio ha successivamente portato alla definizione di criteri di selezione specifici per l'identificazione di pazienti candidati a test genetici mirati per condizioni ereditarie. Tali criteri sono stati elaborati sulla base dell'anamnesi clinica e familiare e comprendono: (i) valutazioni di sintomi clinici ematologici ed extra-ematologici; (ii)

storia personale di neoplasie ematologiche e/o solide multiple; (iii) storia familiare indicativa di una possibile predisposizione tumorale ereditaria.

È stato inoltre progettato e validato un pannello NGS customizzato, dedicato all'analisi di 98 geni di riconosciuta rilevanza clinica.

Questo studio pilota dimostra la fattibilità tecnica e clinica dell'integrazione di un pannello NGS esteso, guidato da criteri clinici strutturati, nella diagnostica ematologica di routine al fine di migliorare l'identificazione di pazienti con predisposizione germinale.

Sono attualmente in corso l'espansione della coorte, la validazione dei criteri di selezione e la conferma delle varianti germinali su campioni alternativi (es. linfociti T da sangue periferico), con l'obiettivo di promuovere una gestione combinata e personalizzata dei pazienti e dei familiari a rischio.

L'identificazione di tali pazienti e dei portatori asintomatici di varianti germinali rappresenta un approccio precoce alla medicina preventiva, che può influire sulle scelte dei donatori familiari di cellule staminali emopoietiche (CSE) e contribuire a una migliore comprensione della penetranza incompleta e della latenza di questi disturbi.

1. Introduzione: il significato della predisposizione genetica nelle neoplasie mieloidi

Le neoplasie mieloidi comprendono un ampio spettro di disordini clonali ematopoietici, caratterizzati da alterazioni genetiche somatiche che compromettono la normale emopoiesi e conducono, nel tempo, a displasia midollare, proliferazione incontrollata e rischio di trasformazione leucemica. Tra queste, le sindromi mielodisplastiche (MDS), le neoplasie mieloproliferative (MPN) e le leucemie acute mieloidi (LAM) rappresentano entità distinte ma biologicamente interconnesse, spesso accomunate da una progressione evolutiva e da alterazioni genetiche condivise [1].

Tradizionalmente considerate patologie acquisite, si presentano principalmente come condizioni sporadiche per lo più coinvolgenti individui anziani, con un'età media di insorgenza superiore ai 65 anni [2]. Tuttavia, negli ultimi due decenni la crescente disponibilità genomica ha dimostrato l'esistenza di forme ereditarie o familiari di MDS/MPN/LAM, dovute a varianti germinali in geni coinvolti nella regolazione della proliferazione e differenziazione ematopoietica [3]. Nel 2016 la classificazione WHO ha introdotto le neoplasie mieloidi ereditarie con tre categorie distinte: forme isolate in assenza di condizioni preesistenti; neoplasie con anamnesi di trombocitopenia e neoplasie con altre disfunzioni d'organo. L'entità nosologica delle condizioni mieloidi ereditarie (Hereditary Myeloid neoplasm, HMN) è stata progressivamente consolidata con la successiva edizione del 2022 (Tabella 1) [4;5]. Queste condizioni presentano un'eziologia e manifestazioni cliniche altamente eterogenee. Oltre alle sindromi predisponenti al cancro solido (sindrome di Li-Fraumeni, Nierofibromatosi di tipo 1, deficit nei geni del mismatch repair MMR, etc.), esistono specifiche sindromi ereditarie da insufficienza del midollo osseo che sono associate a un aumentato rischio di neoplasie ematologiche, più frequenti nell'infanzia e nell'adolescenza. La tendenza a sviluppare neoplasie mieloidi varia tra le diverse sindromi, con ad esempio l'anemia di Fanconi (FA) che comporta il rischio più elevato ed altre come la neutropenia congenita grave (SCN), la discheratosi congenita (DC), la sindrome di Shwachman-Diamond (SDS) e l'anemia di Diamond-Blackfan (DBA) che hanno generalmente rischi inferiori o intermedi [6-9]. E' stato inoltre riconosciuto un numero crescente di condizioni MDS/LAM ereditarie, manifestate in modo isolato e che si verificano in diverse fasce di età. L'incidenza stimata dagli studi pediatrici e sugli adulti è di circa il 4-10%, sovrapponibile tra le due fasce di età [10-11].

Sottotipi di neoplasie mieloidi associati alla predisposizione germinale elencati nella classificazione WHO 2022
Neoplasie mieloidi con predisposizione germinale senza un disturbo piastrinico preesistente o disfunzione d'organo
Varianti germinali patogenetiche o probabilmente patogenetiche nel gene <i>CEBPA</i>
Varianti germinali patogenetiche o probabilmente patogenetiche nel gene <i>DDX41</i>
Varianti germinali patogenetiche o probabilmente patogenetiche nel gene <i>TP53</i>
Neoplasie mieloidi con predisposizione germinale e disturbo piastrinico preesistente
Varianti germinali patogenetiche o probabilmente patogenetiche nel gene <i>RUNX1</i> (disturbo piastrinico familiare con neoplasia mieloide associata)
Varianti germinali patogenetiche o probabilmente patogenetiche nel gene <i>ANKRD26</i> (trombocitopenia 2)
Varianti germinali patogenetiche o probabilmente patogenetiche nel gene <i>ETV6</i> (trombocitopenia 5)
Neoplasie mieloidi con predisposizione germinale e potenziale disfunzione d'organo
Varianti germinali patogenetiche o probabilmente patogenetiche nel gene <i>GATA2</i> (deficienza di GATA2)
Sindromi da insufficienza del midollo osseo
◦ Neutropenia congenita grave (SCN)
◦ Sindrome di Shwachman-Diamond (SDS)
◦ Anemia di Fanconi (FA)
Condizioni sindromiche
Telomeropatie, RASopatie (neurofibromatosi di tipo 1, sindrome CBL, sindrome di Noonan o disturbi simili alla sindrome di Noonan)
Sindrome di Down
Varianti germinali patogenetiche o probabilmente patogenetiche nel gene <i>SAMD9</i> (sindrome MIRAGE)
Varianti germinali patogenetiche o probabilmente patogenetiche nel gene <i>SAMD9L</i> (sindrome da atassia e pancitopenia correlata a SAMD9L)
Varianti germinali patogenetiche o probabilmente patogenetiche/bi alleliche nel gene <i>BLM</i> (sindrome di Bloom)

Tabella 1. Neoplasie mieloidi ereditarie secondo classificazione WHO

La diagnosi differenziale tra forme acquisite ed ereditarie rappresenta una sfida clinica e laboratoristica. Le manifestazioni fenotipiche sono spesso sovrapponibili e in molti casi l'identificazione della variante germinale avviene solo retrospettivamente, dopo l'analisi delle varianti genetiche acquisite, dopo un trapianto da donatore familiare affetto o dopo la comparsa di casi multipli nella stessa famiglia [12]. In questo contesto, l'integrazione di dati clinici, anamnestici, genealogici e genomici risulta essenziale per riconoscere precocemente i soggetti a rischio. Tuttavia, la complessità delle informazioni disponibili e la rapida

evoluzione delle conoscenze genetiche rendono necessario lo sviluppo di strumenti diagnostici standardizzati e automatizzati, in grado di supportare la decisione clinica nella valutazione del sospetto di ereditarietà.

1.1 Eterogeneità genetica delle Neoplasie Mielodisplastiche e Leucemia Mieloidi Acute

L'estesa disponibilità genomica ha portato alla luce molti geni, pathways e processi mutazionali implicati nello sviluppo delle neoplasie mieloidi, consentendo di comprendere come le interazioni genetiche influenzino l'evoluzione della malattia e come determinino il fenotipo clinico. Per questo la definizione del profilo genetico è entrata nella pratica clinica come parte integrante del processo decisionale e numerosi geni, responsabili dell'insorgenza ed evoluzione di queste condizioni, sono comunemente indagati nel work-up diagnostico di routine.

Numerosi studi di profilazione genetica hanno consentito una più ampia integrazione delle alterazioni genetiche, rispetto alle già note categorie quali la delezione 5q, MDS con varianti in *SF3B1* o varianti bialleliche in *TP53* [13]. Il panorama genomico indica che le principali mutazioni driver responsabili dell'insorgenza ed andamento della patologia riguardano geni coinvolti nello splicing dell'RNA (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2*, etc.), nella regolazione epigenetica (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1*, *IDH2*, *WT1*, etc.), nella modificazione della cromatina (*EZH2*, *ASXL1*, *PHF6*, etc.) nella segnalazione intracellulare (*PTPN11*, *NF1*, *NRAS*, *KRAS*, *KIT*, *FLT3*, *CBL*, etc.), nella trascrizione e nella riparazione del DNA (*RUNX1*, *ETV6*, *GATA2*, *CEBPA*, *BCOR*, *TP53*, etc.), mostrando sostanziali sovrapposizioni con le alterazioni molecolari osservate nella leucemia mieloide acuta o nelle condizioni mieloproliferative croniche [1]. Il ruolo dei marker genetici responsabili dell'esordio o evoluzione di queste neoplasie è stato considerato nelle recenti classificazioni ICC e WHO: è stata introdotta infatti una nuova categoria MDS/MPN, definita da caratteristiche patologiche e molecolari sovrapposte che si manifestano clinicamente con varie combinazioni di citopenie e citosi ed è stato riconosciuto un continuum biologico tra MDS e LAM con la categoria MDS/LAM (Figura 1). Le varianti nucleotidiche coinvolgenti i pathways sopracitati risultano condivise nell'intero spettro delle neoplasie mieloidi e probabilmente determinano i fenotipi morfologici e clinici caratteristici [5, 14-18]. L'indagine molecolare di questi ha consentito la più precisa predizione di diversi subset di rischio, l'introduzione di nuovi target farmacologici e la definizione delle forme eredo-familiari.

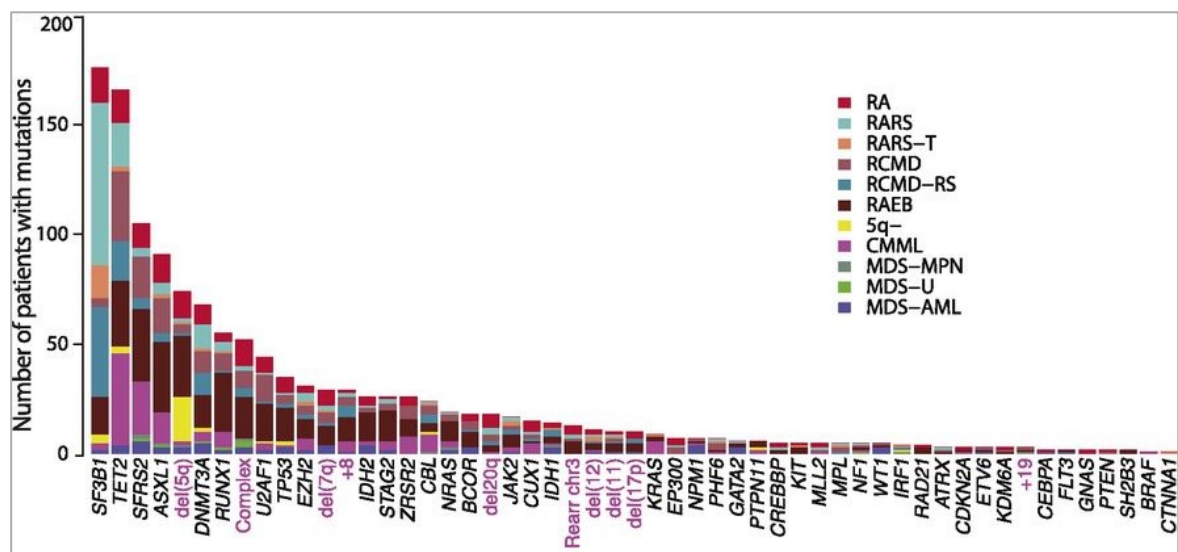


Figura 1. Distribuzione delle lesioni geniche nelle neoplasie mieloidi [17].

1.2 Predisposizione nelle MDS e LAM

Le predisposizioni germinali alle neoplasie mieloidi costituiscono un gruppo eterogeneo di condizioni clinico-molecolari caratterizzate da aumentato rischio di sviluppare sindromi mielodisplastiche, neoplasie mieloproliferative e leucemie acute mieloidi, talvolta associate a fenotipi extra-ematologici (ad es. immunodeficienze, anomalie vascolari, sordità e deficit neurologici). Le forme ereditarie possono manifestarsi con penetranza variabile e con età d'esordio estremamente eterogenea (da epoca pediatrica fino all'età adulta avanzata) e comprendono entità ben caratterizzate clinicamente e geneticamente (p. es. sindromi legate a *RUNX1*, *GATA2*, *CEBPA*, *DDX41*, *ETV6*, *ANKRD26*) nonché fenotipi meno definiti che emergono con nuove evidenze genomiche. L'integrazione delle predisposizioni germinali nelle recenti classificazioni internazionali riflette la crescente consapevolezza clinica dell'importanza di riconoscere le forme ereditarie sia per implicazioni prognostiche che per decisioni terapeutiche quali la selezione del donatore familiare per il trapianto di cellule staminali emopoietiche. Nel profilo clinico-epidemiologico, le caratteristiche più frequenti che suggeriscono una possibile predisposizione germinale sono: storie familiari positive per neoplasie mieloidi o trombocitopenie ereditarie, esordio in età giovanili, citopenie inspiegate o multilineari, disfunzioni immunitarie associate e segni fenotipici non ematologici correlati a specifiche sindromi genetiche. Tali elementi devono orientare il clinico verso indagini genetiche dedicate e counselling genetico familiare. Si considera, infine, che le sindromi ereditarie mieloidi mostrano modalità di trasmissione variabili, in genere autosomico dominante, con penetranza incompleta in molti casi (es. *RUNX1*, *GATA2*, *DDX41*), che può

manifestarsi in modo età-dipendente. Alcuni portatori germinali presentano un fenotipo clinico in età adulta avanzata, rendendo il pedigree familiare non sempre diagnostico in assenza di approfondimenti genetici (Figura 2).

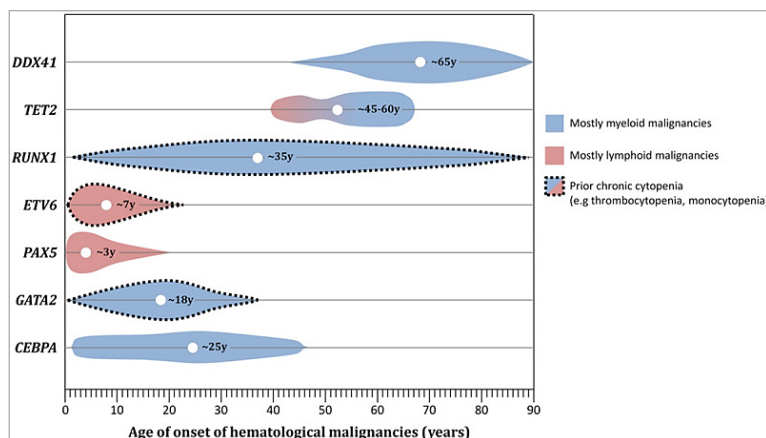


Figura 2. Età di insorgenza delle neoplasie ematologiche nei portatori di varianti germinali [19].

Tutte queste condizioni richiedono una pratica clinica specifica in termini di gestione e sorveglianza, in grado di garantire migliori risultati nella diagnosi e nella prognosi. In questo scenario risulta crescente la necessità di una valutazione multidisciplinare utile per riconoscere le caratteristiche cliniche extra-ematologiche e per raccogliere un'accurata anamnesi familiare. La gestione dei pazienti con sindromi familiari idealmente dovrebbe coinvolgere diversi specialisti con l'attenzione rivolta ad evitare i rischi di aumentata tossicità osservati in molte sindromi ereditarie da insufficienza midollare oppure a fornire una sorveglianza preventiva nei familiari sani [20].

È importante notare che i test genetici nelle neoplasie ematologiche presentano delle sfide tecniche laboratoristiche che i Centri, solitamente abilitati alle indagini somatiche, devono affrontare a partire dalla selezione dei geni, alla corretta interpretazione delle varianti e alla scelta del campione da analizzare.

1.3 Condizioni su base ereditaria

Recenti progressi hanno evidenziato un numero crescente di sindromi di predisposizione familiare allo sviluppo delle neoplasie mieloidi non sindromiche, causate da varianti in diversi geni che sembrano aumentare la suscettibilità germinale anche in assenza di altre manifestazioni cliniche. Sebbene fosse opinione comune che la predisposizione genetica germinale riguardasse solo i bambini e i giovani adulti, oggi è stato dimostrato che essa è coinvolta anche nella leucemogenesi degli adulti più anziani [21]. Ad oggi sono stati classificati diversi loci monogenici che, se mutati, predispongono ad un aumento del rischio

di MDS primaria e/o LAM. Ad eccezione delle mutazioni germinali *CEBPA*, che sembrano conferire un aumento del rischio solo per la LAM, le altre si sovrappongono nei rischi associati di MDS, LAM e trombocitopenia [22].

Nelle Tabelle di seguito si riassumono le diverse condizioni [23]:

Condizioni ematologiche	Gene	Altre manifestazioni ematologiche	Manifestazioni non ematologiche	Eredità	Età di insorgenza
LAM	<i>CEBPA</i>	–	–	AD	24,5
MDS, CMML	<i>DDX1</i>	–	–	AD	44-88
Disturbo piastrinico familiare, MDS, T-ALL	<i>RUNX1</i>	Trombocitopenia, propensione al sanguinamento	Eczema	AD	10-60
Trombocitopenia 2, MDS	<i>ANKRD26</i>	Trombocitopenia, propensione al sanguinamento	–	AD	20-70
Trombocitopenia 5, MDS, CMML, B-ALL, PCM	<i>ETV6</i>	Trombocitopenia	Possibile rischio di tumori solidi es. colon-retto	AD	Pediatrico e adulto
MDS, CMML	<i>GATA2</i>	Sindrome MonoMAC	Linfedema, perdita dell'udito, verruche extra-genitali	AD	20
Aplasia familiare, MDS	<i>SRP72</i>	Anemia aplastica	Sordità	AD	11-76
Sindrome MIRAGE, MDS	<i>SAMD9</i>	Pancitopenia	Infezioni, restrizioni della crescita intrauterina, ipoplasia surrenale, enteropatia	AD	Prima infanzia
Sindrome atassia-pancitopenia, MDS	<i>SAMD9L</i>	Pancitopenia	Deficit neurologici	AD	11-76

Tabella 2. Predisposizione genetica alle LAM/MDS

Sindrome	Gene(i)	Caratteristiche	Eredità	Eta' di insorgenza	Rischio di MDS/LMA
Sindrome di Bloom	<i>BLM</i>	Bassa statura, immunodeficienza, microcefalia, voce acuta, ipogonadismo	AR	Pediatrico	15–25%
Sindrome di Li-Fraumeni	<i>TP53</i> , <i>CHEK2</i>	Predisposizione al cancro	AD	<70 primo tumore 20-30 anni	8%
Neurofibromatosi di tipo I	<i>NF1</i> , <i>SPRED1</i>	Macchie color caffè-latte, lentiggini ascellari/inguinali, neurofibromi, noduli di Lisch, gliomi ottici, displasia ossea	AD	Pediatrico	<1%
Sindrome di Noonan	<i>PTPN11</i> , <i>KRAS</i> , <i>RAF1</i> , <i>SOS1</i> , <i>CBL</i>	Bassa statura, dismorfologia facciale, difetto cardiaco congenito	AD	Pediatrico	Sconosciuto
Sindrome di Lynch	<i>EPCAM</i> , <i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> , <i>MSH6</i> , <i>PMS2</i>	Predisposizione al cancro	AD	Giovanile e adulto	3-16%

Tabella 3. Sindromi predisponenti al cancro

Sindrome	Gene(i)	Caratteristiche	Eredità	Età di insorgenza	Rischio di MDS/LMA
Anemia di Diamond-Blackfan	<i>RPS19, RPS17, RPS24, RPL35A, RPL5, RPL11, RPS7, RPS26, RPS10, GATA1</i>	Bassa statura, anomalie congenite (testa e collo, cardiache, pollice), penetranza incompleta	AR, XLR	Pre-natale e prima infanzia	1–20%
Discheratosi congenita	<i>DKC1, TERT, TERC, TINF2, RTEL1, NOP10, NHP2, WRAP53, CTC1, PARN</i>	Distrofia ungueale, pigmentazione cutanea a merletto, leucoplachia orale, fibrosi polmonare, fibrosi epatica, predisposizione al cancro	XLR, AD, AR	35 anni	30%
Anemia di Fanconi	<i>FANCA, FANCC, FANCD1/B, RCA2, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG/XR, CC9, FANCI, FANCI/BA, CH1/BRIP1, FANCL, FANCM, FANCN/PA, LB2, FANCO/RA, D51C, FANCP/SL, X4, FANQ/ER, CC4, FANCB</i>	Anomalie radiali, macchie caffelatte, bassa statura, microcefalia, anomalie genitourinarie, displasia dell'anca, predisposizione al cancro	AR, XLR	7 anni	40%
Neutropenia congenita grave	<i>ELA2, HAX1, GFI1</i>	Neutropenia, infezioni frequenti	AR	Pediatrica	10%
Sindrome di Shwachman-Diamond	<i>SBDS</i>	Bassa statura, insufficienza pancreatica, anomalie scheletriche	AR	Pediatrica con insorgenza media di LAM a 18 anni	20–30%

Tabella 4. Sindromi ereditarie da insufficienza del midollo osseo

1.4 Emopoiesi Clonale

Il ruolo cruciale dell'emopoiesi clonale e delle sindromi germinali, come la sindrome di Shwachman-Diamond e l'anemia di Diamond-Blackfan, è ormai ben consolidato nell'aumento del rischio di MDS/AML nei soggetti giovani. Negli adulti, un meccanismo analogo è osservabile attraverso l'evoluzione clonale legata all'età, in cui l'accumulo di mutazioni somatiche progressivo contribuisce all'incremento della prevalenza delle neoplasie mieloidi negli individui più anziani. Tuttavia, le linee di evidenza in ambito adulto sono ancora recenti e i meccanismi mediante i quali la co-occorrenza di eventi somatici predisponga alle neoplasie ematologiche richiedono ulteriori approfondimenti.

L'emopoiesi clonale (CH) si definisce come un'espansione delle cellule del sangue o del midollo osseo derivante da varianti somatiche acquisite in geni associati alla proliferazione neoplastica, rilevate anche in individui clinicamente sani. Tali alterazioni si sviluppano comunemente durante l'invecchiamento del sistema ematopoietico e, nella maggior parte dei casi, non compromettono la funzione delle cellule staminali, configurandosi come emopoiesi clonale benigna correlata all'età (ARCH) [24]. In alcuni casi, tuttavia, queste alterazioni conferiscono un vantaggio competitivo alle cellule staminali ematopoietiche mature (HSC), diventando un indicatore di aumentato rischio di evoluzione in MDS/AML. Questo stato può precedere l'insorgenza della malattia di molti anni e il rischio associato aumenta con la complessità clonale, precedendo la malattia di molti anni e conferendo un rischio associato crescente con la complessità clonale [25, 26]. L'emopoiesi clonale, quindi, rappresenta uno stato pre-maligno che può essere influenzato dal contesto genetico germinale, ma può anche essere scatenata da eventi esogeni, anche in assenza di varianti germinali [27].

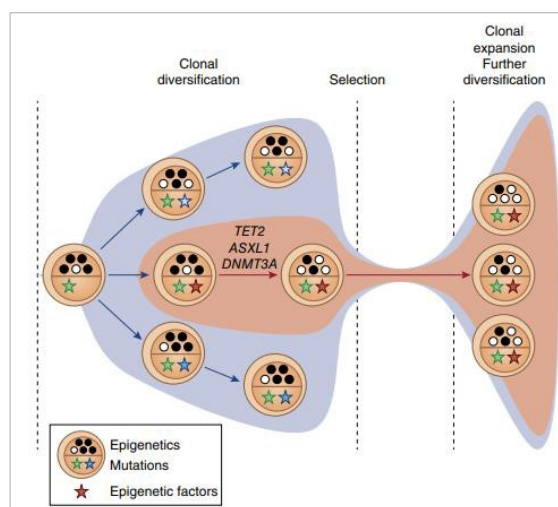


Figura 3. Ruolo dell'accumulo di alterazioni somatiche progressive nell'evoluzione clonale [31].

Diversi studi hanno dimostrato che condizioni di emopoiesi clonale comportano un aumento di circa 10 volte del rischio di sviluppare una neoplasiaematologica, con proporzioni uguali di neoplasie linfoidi e mieloidi, nonostante un rischio di progressione annuo lento, pari al 0,5-1%, in un periodo di follow-up di 5-10 anni [25, 26]. Diversi aspetti possono avere un ruolo nell'aumento del rischio di trasformazione maligna, della latenza e del tipo di neoplasia sviluppata, come varianti genetiche specifiche, modelli di co-mutazione e dimensioni dei cloni. Ad esempio, la presenza di due o più varianti è associata a un rischio più elevato; gli individui con una maggiore complessità mutazionale sono più inclini a sviluppare neoplasieematologiche rispetto ai controlli della stessa età [27-29]. Inoltre, la transizione dalla CH alle neoplasieematologiche comporta una complessa interazione tra alterazioni epigenetiche, del microambiente midollare e l'acquisizione graduale di ulteriori mutazioni driver. A seconda dei geni mutati specifici, la presenza di CH è associata ad un aumento del rischio sia di LAM de novo che correlata alla terapia [31]. I pazienti più anziani sono spesso affetti da mutazioni somatiche CH nei geni che codificano i modificatori epigenetici (*TET2*, *DNMT3A*), riparazione del DNA (*TP53*), coesine, geni coinvolti nello slicing del RNA (in particolare *SF3B1* e *SRSF2*) [32]. La comprensione di queste dinamiche è essenziale per la valutazione del rischio individuale e per lo sviluppo di strategie di monitoraggio e prevenzione personalizzate.

1.5 Normative e linee guida per la gestione clinica e genetica delle neoplasie mieloidi ereditarie

L'inclusione delle neoplasie mieloidi ereditarie nelle recenti revisioni delle classificazioni sopradescritte ha reso necessaria l'implementazione di raccomandazioni volte alla gestione clinica e laboratoristica, a partire dalla raccolta di dati anamnestici familiari e dalla segnalazione di una suggestiva condizione ereditaria nei referti patologici e genetici. Linee guida come quelle dell'European LeukemiaNet (ELN) e delle società internazionali sul trattamento di AML/MDS hanno aggiornato le proprie indicazioni per considerare la presenza di predisposizione germinale nella stratificazione del rischio, nella scelta terapeutica e nella selezione dei donatori per trapianto, sottolineando l'importanza di un approccio multidisciplinare che includa ematologi, genetisti clinici e consulenti genetici. Considerando come paradigma di esempio le raccomandazioni per la diagnosi delle condizioni neoplastiche su base ereditaria, si riporta che nel 2020 il gruppo di lavoro sulla medicina di precisione della Società Europea di Oncologia Medica (ESMO) ha cercato di elaborare delle linee guida sull'analisi incentrata sulla linea germinale dei dati di sequenziamento dei tumori,

sulle indicazioni per i test sulla linea germinale e sulle informazioni/il consenso dei pazienti [33]. In sintesi, queste linee guida consigliano di offrire un'analisi incentrata sulla linea germinale quando si prevede che una variante sia probabilmente patogena/patogena nella linea somatica, altamente penetrante e presente con una frequenza allelica variante (VAF) >30% per le varianti a singolo nucleotide o >20% per piccole inserzioni o delezioni. Suggestiscono inoltre cautela nei confronti delle varianti di significato sconosciuto (Variant of Uncertain Significance-VUS) o in geni associati a disturbi non correlati alla neoplasia per la quale è stato effettuato il test. Con l'adozione di queste raccomandazioni si riconosce formalmente il ruolo del consenso informato e l'importanza della conservazione dei campioni per un'eventuale conferma germinale, che possono essere inclusi prima del pannello somatico NGS oppure in un approccio più graduale che avviene dopo la revisione e la classificazione delle varianti.

Nonostante l'esempio dell'ambito oncologico, persistono numerose barriere che rendono difficile la diffusione di test clinici di predisposizione alle neoplasie mieloidi su base germinale. Tradizionalmente, infatti, queste condizioni sono state considerate rare e ad insorgenza giovanile e ad oggi non sono disponibili chiari programmi di sorveglianza preventiva per i familiari sani. Il riconoscimento di queste condizioni richiede la raccolta dettagliata della storia personale e familiare, con le conseguenti necessità di competenze specifiche e tempistiche dedicate che appaiono ancora scarsamente introdotte nella pratica ambulatoriale ematologica. In molti centri non risultano ancora sviluppate le pipeline cliniche per reperire materiale biologico alternativo, tra cui e biopsie cutanee come procedura standard al momento della biopsia del midollo osseo. Inoltre, molti dei test multigenici disponibili non sono in grado di rilevare tutti i tipi di alterazioni molecolari che conferiscono suscettibilità costituzionale (come ad esempio Copy Number Variations, delezioni o inserzioni esoniche, difetti di metilazione, ecc.) e/o mancano di geni chiave [34;35].

Emerge pertanto la necessità di armonizzare i protocolli esistenti, in un panorama ancora disomogeneo nell'accesso ai test genetici e per la carenza di percorsi strutturati di counseling genetico nei diversi sistemi sanitari. Le Nordic Guidelines [36] costituiscono uno dei primi tentativi di fornire raccomandazioni pratiche per la diagnosi genetica, la gestione e il follow-up dei pazienti adulti con predisposizione germinale a neoplasie mieloidi. Queste raccomandazioni sono state rivisitate da gruppi internazionali come l'UK Cancer Genetics Group (UKCGG), dal gruppo di lavoro sulle neoplasie oncologiche ematologiche dell'NHS England Genomic Laboratory Hub, dalle raccomandazioni spagnole e quelle dell'American Association for Cancer Research (AACR) [37, 42].

Complessivamente gli spetti da considerare sono i seguenti:

1. Criteri clinici per sottoporre il paziente a valutazione genetica

Le linee guida propongono di identificare i pazienti da valutare in base alla storia familiare, alla clinica come la presenza di più tumori maligni, difetti congeniti extra-ematologici o tossicità elevata alla terapia chemioterapica. Un ulteriore requisito il riscontro, nel contesto di un pannello somatico, di varianti con una frequenza allelica VAF suggerente un'origine costituzionale (40-60 % o >90 %).

2. Necessità di pannelli multigenici mirati

La raccomandazione basilare è quella di adottare test germinali sistematici a partire dai test somatici indipendentemente dalla presenza di segni clinici suggestivi di sindrome ereditaria. Tuttavia, l'approccio clinico tradizionale, basato sull'analisi di geni responsabili delle stratificazioni prognostiche secondo categorie ELN, ICC, WHO etc. rischia di non identificare una quota significativa di portatori di mutazioni patogenetiche in geni ad alta penetranza quali *ANKRD26*, *SRP72*, *SAMD9*, *DDX41* ed altri, con implicazioni rilevanti sia sul piano terapeutico che sul piano familiare [38]. Data l'elevata eziologia alla base delle HMN rimangono numerose difficoltà nel definire pannelli target univoci e profilazioni con approcci *whole genome* o *whole exome* risultano meno diffuse in pratica clinica [38-40].

3. Scelta del tessuto per conferma della variante germinale

Le prestazioni diagnostiche molecolari ematologiche differiscono da quelli nei tumori solidi, dove il sangue periferico è la fonte abituale di DNA. Nelle neoplasie ematologiche, il sangue periferico è solitamente contaminato da cellule tumorali, pertanto numerose linee guida descrivono materiali alternativi per l'analisi del DNA germinale. Le opzioni di campionamento alternative in questo contesto sono la biopsia cutanea, cellule T purificate da sangue periferico, cellule derivanti da raschiamento buccale o un campione di midollo osseo in remissione. Altri campioni come l'urina, le unghie e i tamponi cutanei hanno dimostrato di produrre una quantità insufficiente di DNA per i test [41].

4. Estensione del consenso informato e l'invio a consulenza genetica come pratica di routine diagnostica

I modelli di cura suggeriti nel contesto ematologico riflettono le necessità di informare il paziente e ottenere il suo consenso informato in varie fasi, con l'obbligo di una consulenza genetica prima e dopo il test in caso di conferma di una variante di significato patogenetico o probabilmente patogenetico sulla linea germinale. Il consenso informato deve esplicitare la natura del test (ricerca di varianti germinali), le possibili implicazioni familiari, la gestione dei risultati incidentali e le opzioni di tracciamento familiare [41].

5. Modalità di erogazione del test germinale

Le raccomandazioni fanno riferimento al modello di "*mainstreaming*" genetico in ambito oncologico in cui è prevista l'avvio al percorso diagnostico genetico direttamente all'interno del work-up oncologico, senza la necessità di ricorrere a specialisti esterni. L'esperienza nella gestione di tumori solidi come ovaio, mammella e prostata ha mostrato un'elevata accettabilità e un miglioramento nell'accesso al test nelle condizioni oncologiche, suggerendo una possibile applicazione anche nel contesto delle neoplasie mieloidi [43].

6. Definizione di percorsi di sorveglianza attiva e ottimizzazione del regime di condizionamento

E' noto che in presenza di sindromi correlate a sensibilità alla chemioterapia (es. sindromi da disfunzione di DNA), si raccomandano regimi ridotti. Il riconoscimento di una predisposizione germinale impone anche una ridefinizione delle strategie di monitoraggio clinico; le diverse raccomandazioni propongono dei modelli di gestione basati sul profilo genetico individuale, che includono protocolli di sorveglianza ematologica, annuali o semestrali, e screening oncologici personalizzati per i soggetti portatori di mutazioni germinali ad esempio nei geni *RUNX1*, *GATA2* o *FANC*, con l'obiettivo di anticipare l'insorgenza della malattia o intercettarla in fase precoce [44]. Tali strategie risultano particolarmente rilevanti per i familiari dei pazienti, i quali possono essere sottoposti a testing predittivo e inclusi in programmi di follow-up preventivo.

7. Necessità di una consolidata esperienza dei Centri che offrono i test genetici

Tutte le raccomandazioni sottolineano che i laboratori che offrono test in ambito clinico devono adottare standard di qualità (validazione analitica, controllo di qualità, partecipazione a programmi di qualità di inter-laboratori) e applicare le idonee linee guida per la precisa interpretazione delle varianti. L'interpretazione delle varianti su base germinale non è volta al solo quesito diagnostico di stratificazione prognostica o risposta alla terapia ma definisce precise classi di patogenicità (5 Classi secondo le raccomandazioni dell'American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology [45]) responsabili dell'insorgenza di una condizione congenita. Per questo, nella segnalazione delle varianti germinali il laboratorista per classificare e determinarne l'effetto causativo, deve considerare aspetti aggiuntivi come il meccanismo biologico di patogenicità del gene, la penetranza, il sistema di ereditarietà (dominante o recessivo), studi funzionali e la co-segregazione all'interno della famiglia [46].

8. Utilizzo del dato genetico come supporto nella scelta del donatore

Le recenti evidenze suggeriscono che nel caso della scelta di un donatore consanguineo asintomatico, è opportuno proporre un test predittivo per la variante nota [47]. Sono stati infatti segnalati casi di leucemia derivata dal donatore dopo trapianto da un parente portatore di una variante patogenetica germinale familiare nei geni *CEBPA*, *DDX41* e *GATA2* [48-50]. In ambito trapiantologico, i donatori familiari dovrebbero pertanto essere testati per evitare l'uso di un donatore portatore della stessa mutazione, che porterebbe al rischio di insuccesso o leucemia da donatore [51-52]. Inoltre, dopo il trapianto, è raccomandata una sorveglianza intensificata per rischio di tumori secondari, specialmente nei soggetti con predisposizioni genetiche che compromettono la stabilità genomica. Le linee guida sottolineano pertanto l'importanza della collaborazione stretta tra ematologi e genetisti clinici.

L'inquadramento teorico riassunto in questo capitolo sottolinea che le sindromi ematologiche ereditarie rappresentano un campo clinico e di ricerca in rapida evoluzione, dove la sinergia tra conoscenze genetiche, molecolari, tecnologie di sequenziamento e standard clinico-normativi è imprescindibile.

2. Scopo della tesi: limiti diagnostici attuali e necessità di strumenti innovativi

Questo lavoro intende contribuire alla costruzione di un modello diagnostico integrato e riproducibile, utile per la pratica diagnostica ematologica e per la futura medicina preventiva.

Complessivamente la tesi è articolata in quattro linee principali di attività:

1. Preparazione del progetto, sottomissione e approvazione del protocollo di ricerca al Comitato Etico.
2. Definizione dei requisiti diagnostici basati su dati clinici, familiari e genetici utili per valutare il rischio di ereditarietà e guidare la selezione dei test genetici più appropriati.
3. Sviluppo di un pannello NGS custom di geni implicati nelle condizioni ereditarie, con successiva validazione tecnica e analitica su campioni biologici da routine diagnostica.
4. Valutazione della fattibilità di materiali biologici alternativi come fonti di DNA germinale, al fine di rendere più agevole la raccolta di campioni e implementare strategie di screening familiare non invasive.

L'approccio multidisciplinare adottato integra competenze di ematologia, genetica medica e bioinformatica con l'obiettivo ultimo di traslare gli aspetti genomici nella pratica clinica. Lo studio si inserisce nel contesto della ricerca traslazionale, con l'intento di generare ricadute cliniche dirette, fornendo strumenti pratici per l'identificazione dei portatori di predisposizioni germinali e per la standardizzazione dei percorsi diagnostici in ambito ematologico.

3. Presentazione del progetto di ricerca

3.1 Descrizione generale del progetto e finalità

La presente tesi si inserisce in un progetto di ricerca osservazionale promosso dall'Azienda Unità Sanitaria Locale di Piacenza volto alla raccolta di dati genetico-molecolari derivanti dalle analisi diagnostiche delle condizioni mielodisplastiche, mieloproliferative croniche e acute.

Lo studio comprende due fasi distinte: retrospettiva e prospettica.

La fase retrospettiva prevede la raccolta dei dati relativi alle indagini NGS inserite nel work-up diagnostico di pazienti diagnosticati presso i Centri Partecipanti (A.U.S.L. Piacenza e A.O.U Parma) in base alle linee guida WHO, valutazioni citogenetiche e molecolari. A questo scopo sono comprese le analisi dei risultati delle analisi eseguite tra gennaio 2021 e giugno 2023. Tutti i campioni raccolti presso le Unità Operative partecipanti sono sottoposti all'analisi NGS mediante pannelli multigenici commerciali comprendenti le regioni codificanti e/o hot-spot dei geni correlati a disordini mieloidi (Ampliseq Myeloid ILLUMINA e/o Myeloid Solution SOPHiA GENETICS), come da pratica clinica delle due Aziende Sanitarie coinvolte.

Per i casi di nuovo reclutamento (da settembre 2023, data di ottenimento del nullaosta aziendale, a dicembre 2025, data prevista di fine arruolamento), oltre al prelievo di sangue periferico e midollare in ambito di indagini di routine diagnostica (i cui dati saranno utilizzati come descritto nella precedente fase retrospettiva), è previsto un campionamento di un tessuto aggiuntivo (linfociti T da sangue periferico, cellule di sfaldamento della mucosa buccale, fibroblasti da cute, follicoli piliferi o porzione sporgente delle unghie). Questo secondo campione è utile per confermare o escludere l'origine germinale, nel caso di riscontro di una variante in geni correlati a forme eredo-famigliari presenti nei pannelli sopracitati, mediante la ricerca della medesima variante con sequenziamento diretto bidirezionale (metodica Sanger). Di tutti i pazienti eleggibili per lo studio, oltre ad essere valutati per la definizione di diagnosi di MDS, LAM e MPN, verranno raccolti i dati anamnestici e familiari e valutati secondo un algoritmo di reclutamento per analisi genetico/ereditarie. Ai probandi selezionati secondo questi criteri si prevede l'analisi di un pannello NGS custom di geni correlati a disordini ematologici ereditari, sindromi da insufficienza midollare ereditaria, RASopatie, di predisposizione genetica ad insufficienza midollare isolata o sindromica e ad altre forme neoplastiche ereditarie (Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome, sindrome di Lynch, sindrome di Li-Fraumeni etc.). Nel caso di un riscontro di una variante su sangue periferico di significato patogenetico, probabilmente

patogenetico o sconosciuto (rispettivamente Classi 5, 4, 3 secondo Raccomandazioni internazionali American College of Medical Genetics and Genomics e Association for Molecular Pathology), verrà confermata la variante con metodo alternativo.

Si riassumono gli obiettivi nella tabella riportata di seguito (Tabella 5)

Obiettivi fase retrospettiva	
Definire il significato prognostico delle varianti	Stabilire tipo e frequenza delle varianti in correlazione ai dati clinici Valutare N° di casi in evoluzione in forme acute o ricaduti rispetto ad uno specifico profilo genetico
Individuare varianti utili in follow-up	Definire cut-off di frequenza allelica (VAF) per discriminare un possibile rischio di ricaduta Stabilire un timing univoco per la rivalutazione mediante NGS
Obiettivi fase prospettica	
Analisi di tipo costituzionale	Individuare varianti di origine germinale da confermare su tessuto alternativo Valutare l'efficienza dell'algoritmo diagnostico in base al N° di pazienti positivi candidati all'analisi NGS di un pannello custom esteso Valutare la validità clinica del pannello NGS in base al N° di casi che risultano positivi al test NGS con pannello custom eredo-famigliare Riportare il N° di donatori familiari candidati al trapianto di midollo selezionati anche secondo profilazione genetica

Tabella 5. Sintesi degli obiettivi del progetto di ricerca

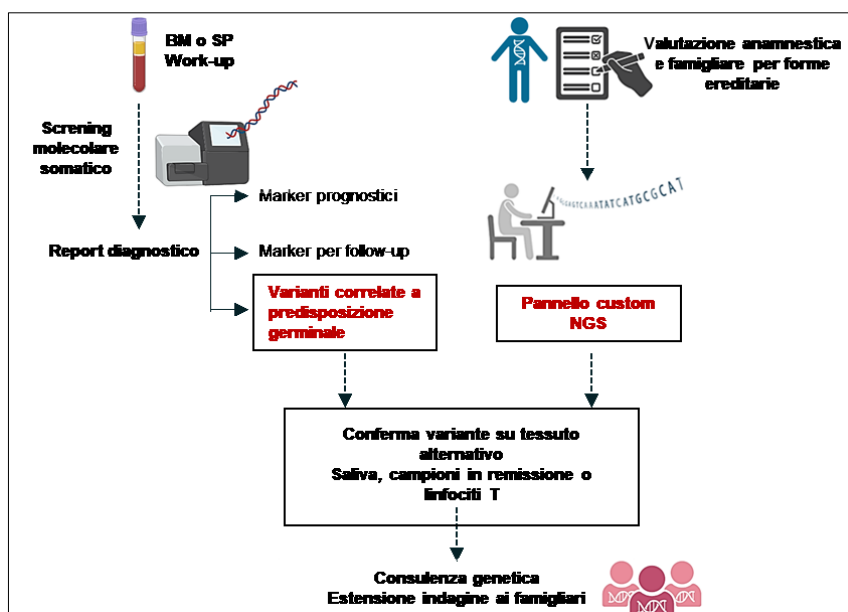


Figura 4. Rappresentazione schematica del progetto

4.2 Preparazione e presentazione del progetto al Comitato Etico

La presentazione al Comitato Etico (CE) ha costituito una fase preliminare essenziale, finalizzata a garantire la conformità del progetto ai principi etici e normativi

4.2.1 Documenti e iter di approvazione

Il dossier sottoposto al CE comprende:

- Protocollo di studio completo contenente razionale scientifico, obiettivi, metodologia, gestione dei rischi e benefici attesi;
- Informativa e modulo di consenso informato per pazienti e familiari comprensivi di sezioni dedicate all'uso futuro dei dati genetici, alla condivisione dei risultati con i familiari e alle modalità di recesso dal consenso;
- Piano di gestione dei dati genetici;
- Modalità di raccolta e conservazione dei campioni biologici, specificando la tipologia (sangue, linfociti T, saliva);
- Modulo per la raccolta del consenso alla condivisione dei risultati;
- Documento di valutazione dell'impatto sulla privacy (DPIA);
- Curriculum vitae del responsabile scientifico e del personale coinvolto;
- Lettera di intenti dei centri collaboratori.

La natura genetica del progetto ha richiesto un'attenzione particolare agli aspetti etici e di protezione dei dati personali. In particolare, tutti i partecipanti sono tenuti a firmare un consenso informato specifico e dettagliato, redatto in linguaggio comprensibile, in cui sono stati chiariti i potenziali rischi, benefici, limiti del test genetico e la possibilità di scoprire risultati incidentali. E' stata garantita la pseudonimizzazione dei campioni e dati genetici, con separazione delle informazioni anagrafiche dai risultati molecolari e l'accesso ai dati è stato ristretto al personale autorizzato.

Il progetto non ha previsto manipolazioni genetiche né interventi terapeutici, configurandosi come studio osservazionale e diagnostico.

Il Comitato Etico competente (Area Vasta Emilia Nord) ha approvato il progetto dopo un'analisi formale della documentazione scientifica ed etico-legale.

L'iter è stato articolato come segue:

1. Valutazione preliminare del protocollo e richiesta di integrazioni documentali;
2. Parere favorevole alla conduzione dello studio (Prot. 2023/0074537 del 20-07-2023);

3. Notifica dell'azienda A.U.S.L. di Piacenza all'avvio del progetto (delibera 406 del 06-09-2023);
4. Avvio operativo delle attività di raccolta dei campioni e implementazione del protocollo diagnostico (reclutamento primo paziente 23-10-2023).

L'approvazione ha conferito al progetto validità scientifica e legittimazione istituzionale, permettendo di proseguire con le fasi successive di sviluppo dell'algoritmo, implementazione del pannello genetico e analisi dei materiali biologici.

4. Stato dell'arte: dati molecolari pre-progetto

4.1 Approcci diagnostici-molecolari: metodica NGS

Le tecniche di sequenziamento di nuova generazione hanno rivoluzionato la ricerca e la diagnostica a partire dagli anni 2000, grazie all'elevata processività di analisi, ossia alla capacità di sequenziare simultaneamente un numero molto elevato di target genetici garantendo un'acquisizione parallela di dati genomici ad alta definizione.

Il presente studio si inserisce in una pregressa attività diagnostica, svolta presso l'Unità Operativa Complessa Biologia dei Trapianti, Diagnostica Molecolare e Manipolazione CSE-A.U.S.L. di Piacenza. Secondo le raccomandazioni ELN, ICC e WHO vengono offerte indagini di tipo genetico molecolare mediante un pannello NGS commerciale, volto a definire criteri diagnostici e di stratificazione prognostiche delle condizioni mieloidi. La piattaforma di sequenziamento adottata è lo strumento MiSeq di Illumina, con cui vengono analizzate library sintetizzate secondo la chimica *amplicon-based*, un metodo di sequenziamento mirato a specifiche sequenze di DNA chiamate ampliconi, generate da copie di primers progettate in modo target.

Il flusso di lavoro è suddivisibile in tre fasi:

Fase 1: Costruzione delle librerie

Prevede la frammentazione del DNA genomico, la selezione dei frammenti alla lunghezza desiderata e successiva aggiunta di brevi sequenze nucleotidiche, definiti *adapters*, che legano degli indici molecolari univoci necessari per raggruppare e sequenziare più campioni diversi, migliorando notevolmente la produttività.

Fase 2: Generazione dei Cluster

Grazie alla precedente incorporazione degli *adapters*, le librerie denaturate si legano alla flow cell. Le librerie vengono amplificate clonalmente mediante una PCR in fase solida definita amplificazione a ponte (*bridge amplification*). Durante questa amplificazione, i DNA a singolo filamento, contenenti sequenze di terminazione complementari agli oligonucleotidi presenti sulla flow cell, si replicano in un'area circoscritta e poi si piegano per aderire ai siti vicini, producendo un cluster locale di molecole identiche, necessario per garantire elevate profondità di lettura (Figura 6).

Fase 3: Sequenziamento

Per iniziare il primo ciclo di sequenziamento, sono simultaneamente presenti i quattro diversi nucleotidi marcati con uno specifico fluoroforo. Durante ogni ciclo, la polimerasi seleziona la

base corretta da incorporare, sfruttando la naturale competizione tra tutte e quattro le alternative presenti nella miscela di reazione. Dopo la scansione della flow cell, in seguito all'eccitazione da parte di un laser, viene acquisita un'immagine della fluorescenza emessa da ogni cluster presente sulla flow cell e si determina quale dei quattro colori è stato incorporato. Successivamente il blocco al 3' e il fluoroforo vengono rimossi per procedere con il ciclo successivo.

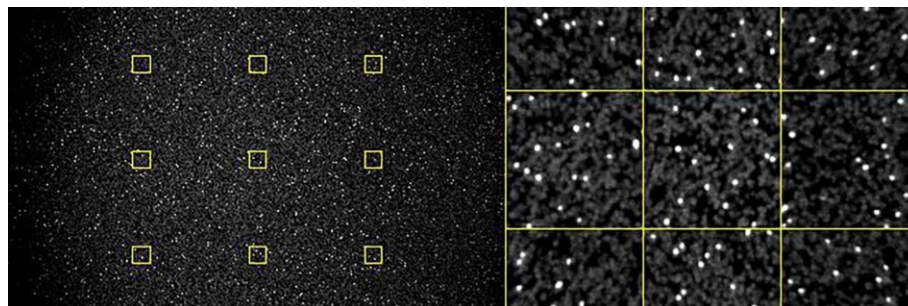


Figura 5. Rappresentazione dei cluster in un'immagine acquisita alla fine di un ciclo di sequenziamento.

Nelle immagini acquisite, i cluster appaiono come punti luminosi e ognuno di questi punti rappresenta mille copie dello stesso filamento di DNA in un'area di 1 micron. Ogni immagine rappresenta quindi la fluorescenza in uno dei quattro canali che rappresentano i quattro possibili nucleotidi. L'algoritmo di rilevamento dei cluster cerca l'area di massima intensità del cluster e misura, inoltre, il livello di rumore di fondo sulla flow cell.

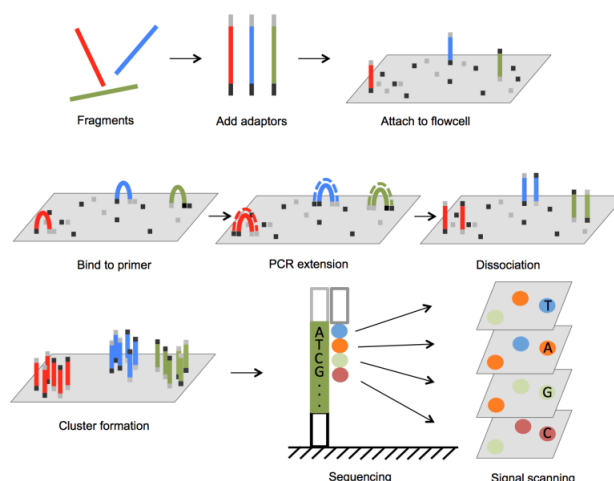


Figura 6. Fasi del sequenziamento per sintesi utilizzato dalla tecnologia NGS Illumina.

I software di analisi differiscono in base alle tecnologie utilizzate, ma prevedono tutti i medesimi processi; nel nostro caso i file per l'analisi sono generati dal software Local Run Manager di Illumina.

Le fasi di analisi dei dati e file generati sono le seguenti:

Demultiplexing: confronta ogni lettura degli indici con le sequenze degli indici effettivamente utilizzati nella seduta. I cluster vengono assegnati ad un campione quando si ha una perfetta corrispondenza tra la sequenza dell'indice assegnato e la sequenza letta dallo strumento per quella determinata corsa. In questa fase non vengono considerati i valori di qualità.

Generazione del file FASTQ: tali file contengono le letture per ciascun campione e i rispettivi score di qualità e costituiscono il principale input per l'allineamento

Allineamento: i cluster di ciascun campione vengono allineati alle sequenze di ampliconi presenti nel file manifest del campione stesso. Il plugin di analisi del software per il sequenziamento del pannello multigenico è l'algoritmo di allineamento BWA. Le letture vengono allineate al genoma di riferimento ed eseguita una prima selezione/esclusione degli allineamenti low quality. Ad esempio, gli allineamenti con un numero elevato di mismatch vengono filtrati dai risultati, riportati nei file di allineamento come non allineati e non sono utilizzati per la chiamata delle varianti.

Identificazione delle varianti: la chiamata di varianti registra polimorfismi a singolo nucleotide, inserzioni/delezioni e altre varianti strutturali in un formato standardizzato (VCF). Per ogni SNV o indel chiamato, la probabilità di errore è fornita come punteggio di qualità della variante.

File di Output

I seguenti file di output dell'analisi vengono generati per il modulo di analisi degli ampliconi di DNA e forniscono i risultati dell'analisi per l'allineamento e la chiamata di varianti. I file di output dell'analisi si trovano nella cartella Alignment.

- File FASTQ (.fastq): è un formato di file che contiene le chiamate di base e valori di qualità per ogni lettura.
- File BAM (.bam): è la versione binaria compressa di un file SAM, utilizzata per rappresentare le sequenze allineate. I file BAM contengono una sezione di intestazione e una sezione di allineamento:
 - o Intestazione: contiene informazioni sull'intero file, come il nome del campione, la lunghezza del campione e il metodo di allineamento.
 - o Allineamenti: contiene il nome della lettura, la sequenza della lettura, la qualità della lettura, le informazioni sull'allineamento e i tag personalizzati. Il nome della lettura include il cromosoma, la coordinata iniziale e la qualità dell'allineamento.

- I file indice BAM (*.bam.bai) forniscono un indice del file BAM corrispondente; rappresentano file indispensabili per la visualizzazione delle sequenze ed allineamento.
- File VCF (.vcf): è un formato di file comune che contiene informazioni sulle varianti trovate in posizioni specifiche rispetto ad un genoma di riferimento. L'intestazione del file VCF include la versione del formato, del *variant caller* ed elenca le annotazioni utilizzate nel resto del file. L'intestazione del VCF include anche il file del genoma di riferimento e il file BAM. Ogni riga del file VCF contiene informazioni su una variante. Una volta disponibile il file .vcf è possibile annotare le varianti ed applicare a queste una serie di filtri che permettono di ottenere un risultato idoneo nel contesto del quesito diagnostico.

L'interpretazione del significato delle varianti avviene tramite l'utilizzo di supporti bioinformatici gratuitamente accessibili, quali:

- database internazionali di varianti (es. Civic, DoCM, Ckb Core, BIC, LOVD, LOVD-IARC, ClinVar, Franklin Genoox o altri database specifici);
- letteratura scientifica (PubMed) e database di patologie (OMIM);
- dati sulle frequenze alleliche (es. 1000 Genomes Project, EXAC, ESP);
- strumenti in-silico di predizione funzionale (es. SIFT, Poliphen-2, MutationTaster, HSF).

Si valutano in aggiunta informazioni riguardanti la conservazione dell'amminoacido, la presenza di domini funzionali, eventuali influenze sullo splicing, dati presenti in database e soprattutto in letteratura. Le varianti così interpretate vengono classificate in base alle raccomandazioni ACMG/AMP, i cui criteri sono rappresentati nella figura sottostante (Figura 7).

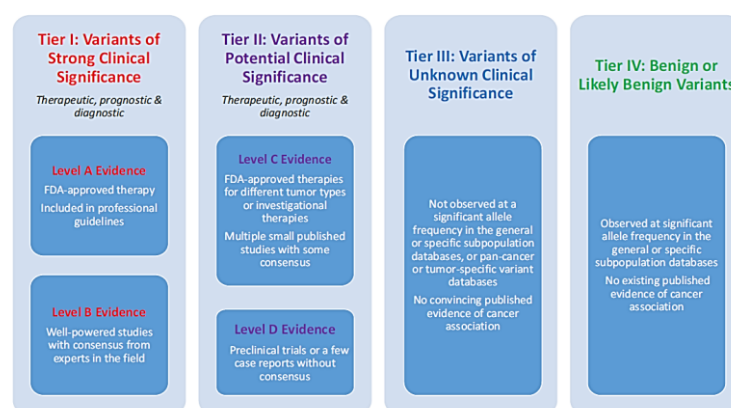


Figura 7. Categorizzazione delle varianti basata sull'evidenza. Le varianti somatiche sono classificate in quattro Tier in base al loro livello di importanza clinica nella diagnosi del cancro, nella prognosi e/o nella terapia. Le varianti di Tier I sono quelle di maggiore rilevanza clinica, mentre quelle di Tier IV sono varianti benigne o probabilmente benigne [53].

4.2 Dati molecolari derivanti dal work-up diagnostico

Come fase preliminare per l'avvio del presente studio, è stata condotta un'analisi retrospettiva sullo stato attuale della diagnostica molecolare dei disordini mieloidi nella pratica clinica quotidiana. L'obiettivo è comprendere la frequenza e la distribuzione delle varianti sospette germinali, valutare l'adeguatezza dei pannelli commerciali utilizzati ed identificare le criticità che giustificano lo sviluppo di un approccio diagnostico integrato e mirato alle condizioni ereditarie.

4.2.1 Coorte selezionata

La coorte selezionata consiste in 162 pazienti con indicazione all'analisi di neoplasie mieloidi in forma acuta e cronica, non clinicamente caratterizzate, provenienti dalla U.O.C. Ematologia e CTMO-A.U.S.L. Piacenza e analizzati tra gennaio 2021 e giugno 2023.

La popolazione presenta le seguenti caratteristiche:

Pazienti (n) (162)	
Genere (n)	Femmine (58) Maschi (104)
Diagnosi (n)	MDS (85) MDS/LAM (37) MDS/MPN (40)
Età (media 70)	≤40 (9) 41-64 (46) ≥65 (107)
Campione (%)	BM (78%) PB (22%)

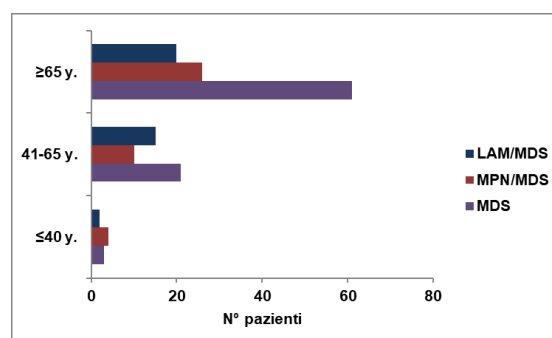


Tabella 6. Caratteristiche demografiche della coorte

Figura 8. Distribuzione delle condizioni cliniche per fasce di età.

4.2.2 Analisi pannello target di geni correlati a disordini di tipo mieloidi

Tutti i pazienti sono stati analizzati sequenziando un pannello commerciale "Ampliseq Myeloid di Illumina" comprendente le regioni codificanti e/o hot-spot dei geni *ABL1*, *ASXL1*, *BCOR*, *BRAF*, *CALR*, *CBL*, *CEBPA*, *CSF3R*, *DNMT3A*, *ETV6*, *EZH2*, *FLT3*, *GATA2*, *HRAS*, *IDH1*, *IDH2*, *IKZF1*, *JAK2*, *KIT*, *KRAS*, *MPL*, *MYD88*, *NF1*, *NPM1*, *NRAS*, *PHF6*, *PRPF8*, *PTPN11*, *RB1*, *RUNX1*, *SETBP1*, *SF3B1*, *SH2B3*, *SRSF2*, *STAG2*, *TET2*, *TP53*, *U2AF1*, *WT1*, *ZRSR2*. La chimica amplicon-based presenta delle limitazioni tecniche, quali la

difficoltà di individuare le varianti low coverage o low VAF (<1%) o varianti di tipo indel maggiori di 50 nucleotidi ed espansioni di triplette. Considerando queste limitazioni e l'obiettivo di introdurre l'analisi con finalità diagnostica, il pannello è stato sottoposto a validazione e riconvalida annuale, analizzando campioni noti testati con metodiche alternative (sequenziamento Sanger), partecipando ai controlli di qualità EQA/EPT(External Quality Assessment/External Proficiency Testing) distribuiti dal consorzio UK NEQAS (United Kingdom National External Quality Assessment Scheme), inserendo nelle sedute analitiche controlli positivi e negativi ed ottimizzando le condizioni di sequenziamento allo scopo di ottenere coperture elevate con alte confidenze nella chiamata delle varianti. Inoltre, nella fase di validazione sono stati riconosciuti risultati falsi positivi ricorrenti, valutate varianti complesse come variante di tipo ITD nel gene *FLT3* e valutate le sequenze mediante software Integrative Genomics Viewer (IGV). I dati tecnici del sequenziamento sono riportati in Tabella 7. Dei 162 casi considerati sono due presentavano una profondità media inferiore a 1000X e sono stati quindi ripetuti.

Parametri tecnici	
N° ampliconi	526
% di letture on-target	96%
Valori di coverage	Range 1560X-12500x Media 7700 X
Coverage minimo	>500X
% di ampliconi con coverage >500X	>96%
Fallimenti	2 casi (cov. <1000X)

Tabella 7. Parametri run NGS pannello Ampliseq Myeloid-Illumina

4.2.3 Risultati molecolari

L'interpretazione delle varianti è stata effettuata in conformità con le linee guida dell'American College of Medical Genetics and Genomics/Association for Molecular Pathology. Per la prioritizzazione delle varianti sono stati effettuati due principali passaggi consecutivi: iniziale selezione delle varianti con una Minor Allele Frequency nella popolazione generale < 0.01 e successiva esclusione delle varianti introniche. Tra le varianti esoniche e di splicing sono escluse varianti sinonime, classificate come benigne o probabilmente benigne e varianti selezionate come artefatti in base ai valori di qualità (sostituzioni in sequenze ripetute, basse profondità di lettura, bassi valori di qualità, etc.). Le

varianti predette deleterie da un punto di vista biologico sono classificate secondo linee guida ACMG/AMP/ASCO in risposta al quadro clinico e al quesito diagnostico. Tra i pazienti analizzati, 123 di essi (61%) presentano almeno una variante, 106 (66%) più di tre. L'incidenza delle varianti è risultata pressoché sovrapponibile con i tre gruppi diagnostici.

I geni *TET2*, *DNMT3A*, *SRSF2*, *JAK2*, *TP53*, *ASXL1*, *NPM1*, *STAG2*, *SF3B1*, *RUNX1*, *IDH2* e *FLT3* si presentano maggiormente arricchiti di varianti rispetto ad altri geni. Dalla valutazione molecolare si confermano alte incidenze di varianti nei geni *TET2*, *ASXL1* e *DNMT3A*, conducibili a cellule pre-maligne e correlate ad emopoiesi clonale o a meccanismi epigenetici che possono guidare la progressione della malattia, vista l'elevata incidenza anche nelle forme acute (Figura 9).

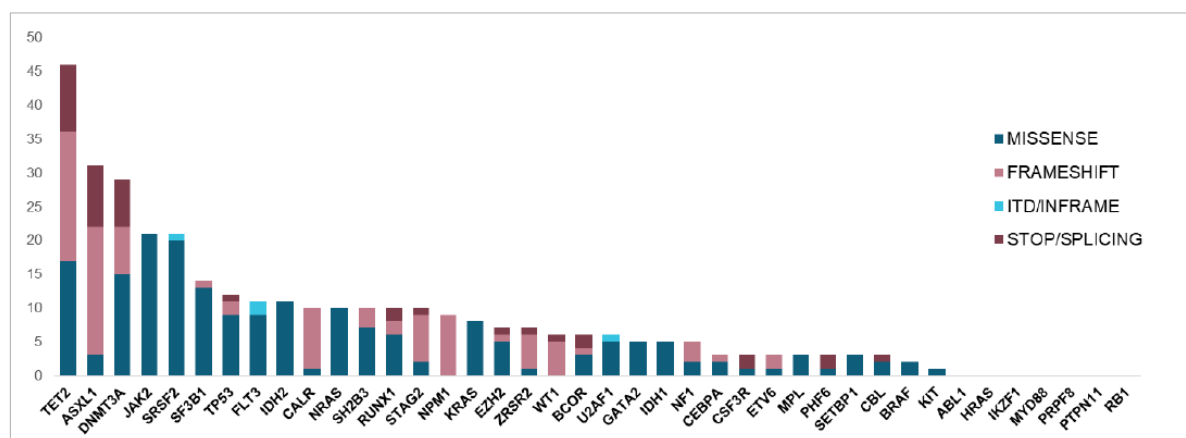


Figura 9. Incidenza e tipologia di varianti individuate rispetto ai geni del pannello

L'osservazione dei dati molecolari risultanti conferma le differenze significative note tra i sessi nelle aberrazioni genomiche alla base della patologia della malattia. La distribuzione delle varianti evidenziate conferma una maggiore prevalenza di mutazioni nei geni *SF3B1*, *SRSF2* e *ASXL1* nei maschi e mutazioni *DNMT3A* nelle femmine con potenziale indeterminato di emopoiesi clonale e sindromi mielodisplastiche (MDS) (Figura 10). Queste differenze persistono dopo la progressione verso la LAM, dove le pazienti di sesso femminile presentano più frequentemente mutazioni in *DNMT3A*, *FLT3*, *NPM1* e *TP53*, mentre varianti in *ASXL1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *RUNX1* e *KIT* sono più comuni nei maschi. Queste differenze mutazionali sesso-specifiche possono essere in parte attribuite a diverse esposizioni ambientali, come il fumo, che è stato storicamente più comune nei maschi ed è associato a mutazioni *ASXL1* [54;54].

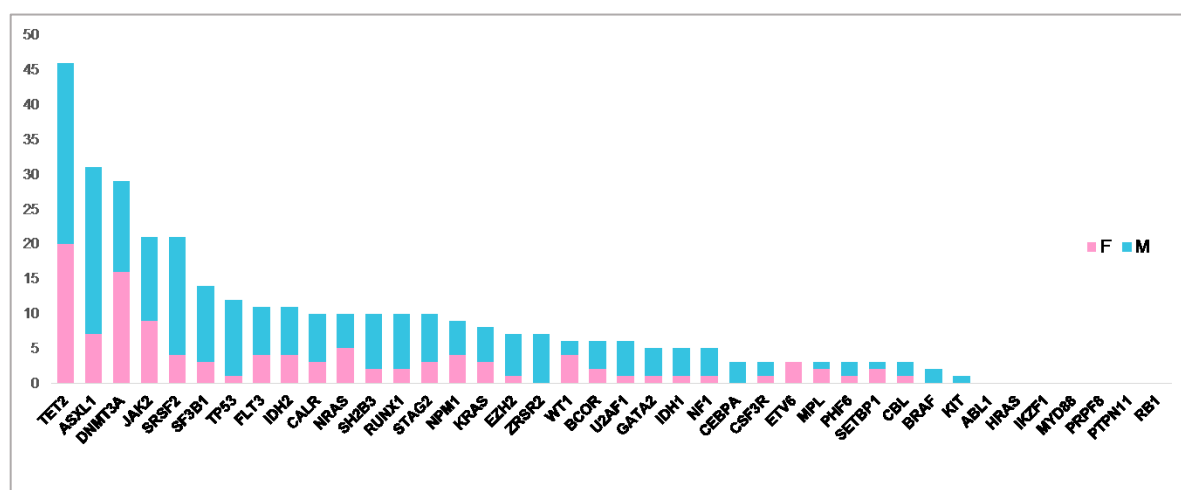


Figura 10. Distribuzione delle varianti per genere

Considerando infine la distribuzione delle varianti rispetto al raggruppamento nelle tre condizioni cliniche, emerge che tra campioni MDS, MDS/LAM e MDS/MPN il numero di varianti non differiva, dimostrandone l'elevata eterogeneità clonale; anche se le varianti individuate nelle condizioni LAM o MDS-EB sembrano presentare VAF più elevate. Si confermano inoltre, rispetto ai dati riportati in letteratura, che varianti nei geni *SF3B1*, *SRSF2* sono predominanti nelle MDS mentre *FLT3*, *NPM1*, *TP53*, *NRAS*, *PHF6* e *WT1* nelle LAM. Geni secondari come *NRAS* e *PHF6* potrebbero presentare un maggiore potenziale di guidare l'espansione leucemica, riconducendoli a cloni di mutazioni di segnalazione emergenti, che persistono o si espandono durante la trasformazione in LAM. I campioni in progressione in leucemia mieloide acuta sono arricchiti per mutazioni in geni con ruolo di modificanti epigenetici come *DNMT3A*, *TET2* e *IDH1/2*, indicando che, piuttosto che l'espansione clonale, in alcuni casi i meccanismi epigenetici possono guidare la progressione della malattia [56] (Figura 11).

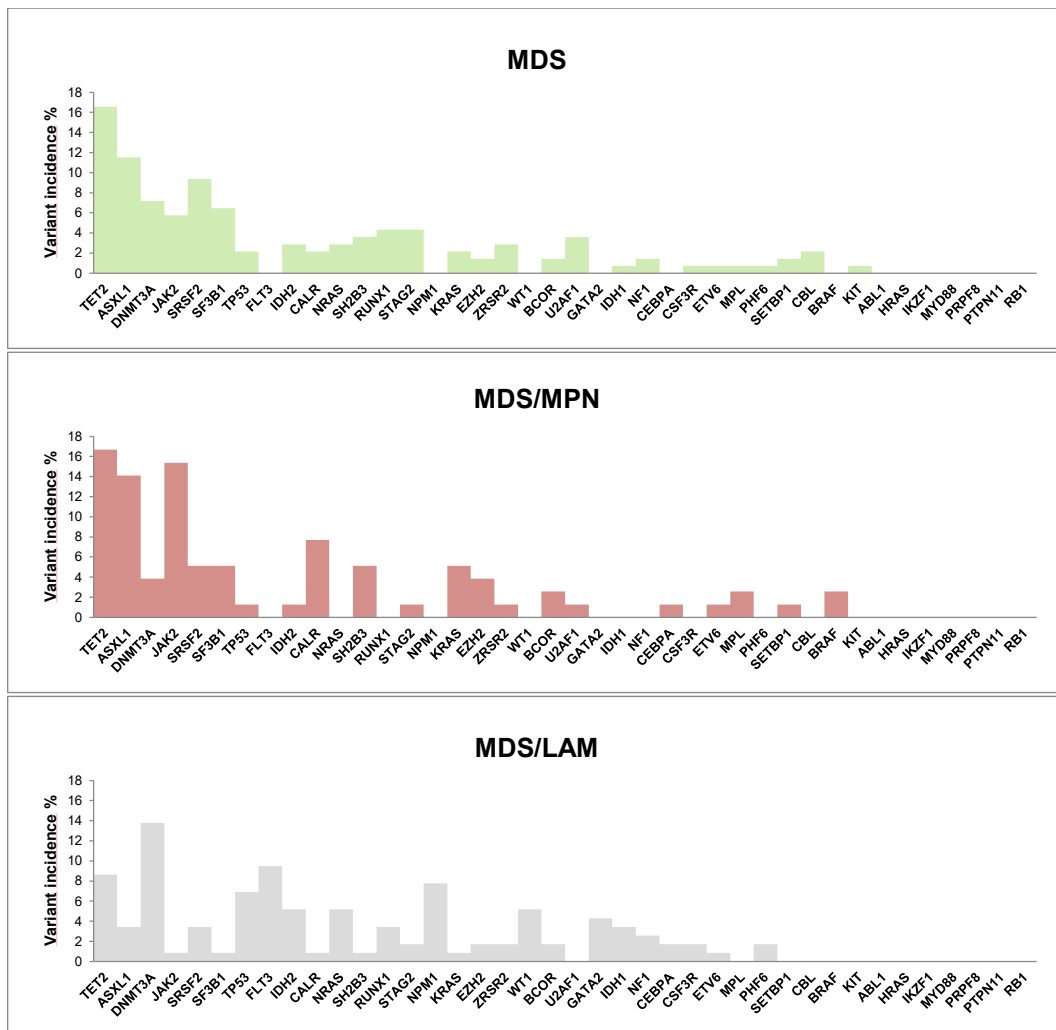


Figura 11. Confronto dell'incidenza delle varianti nelle tre condizioni cliniche

L'analisi dei dati disponibili ha consentito di focalizzare l'attenzione sui geni associati a disordini ereditari. In 50 pazienti (pari al 30% della coorte selezionata), di età compresa tra 38 e 88 anni, sono state identificate varianti con frequenze alleliche compatibili con un'origine germinale (comprese tra il 40–60% o intorno al 90%). I geni maggiormente coinvolti, in ordine di prevalenza, risultano essere: *TET2*, *JAK2*, *RUNX1*, *TP53*, *CALR*, *NRAS*, *CEBPA*, *NF1*, *WT1*, *ETV6*, *KRAS*, *GATA2*, *RB1*, *CBL1*, *CSF3R*, *MPL1* e *MYD88*.

In particolare, le varianti individuate nei geni *TP53*, *RUNX1* e *GATA2* sono state per lo più classificate come probabilmente patogenetiche (Classe 4) o patogenetiche (Classe 5). È di particolare rilievo la presenza di una variante di Classe 5 nel gene *TP53* e di due varianti di Classe 4 nei geni *ETV6* e *NF1*, le quali sono state confermate nelle analisi eseguite in fase di remissione, mostrando una frequenza allelica compatibile con l'eterozigosi. Tale evidenza suggerisce una probabile origine germinale delle stesse.

Anche il quadro clinico pregresso dei pazienti supporta l'ipotesi di una possibile origine germinale delle alterazioni rilevate. In particolare, una variante *RUNX1* (Gly135Asp) è stata osservata in un paziente di 70 anni con MDS, con anamnesi positiva per poliglobulia, anemia, mieloma multiplo e precedente adenocarcinoma gastrico (ADK). Due varianti nel gene *NF1* (Leu1780Stop e Val1146Ile) sono state riscontrate rispettivamente in un paziente di 66 anni con MDS-EB1 e in un paziente di 68 anni con AML, entrambi con pregresso carcinoma mammario diagnosticato all'età di 57 anni e confermate in successive analisi molecolari.

In assenza di dettagli fenotipici approfonditi dei pazienti portatori di varianti di significato patogenetico incerto, non è possibile fornire ulteriori elementi utili alla loro caratterizzazione funzionale. Non è pertanto possibile escludere che tali varianti, sebbene apparentemente di origine germinale, possano in realtà rappresentare alterazioni somatiche. Inoltre, la presenza di varianti riportate come *hot-spot* somatici nei geni *RAS*, *JAK2* e *MPL* appare solo debolmente suggestiva di un'origine ereditaria, considerando che le neoplasie associate a mutazioni sporadiche e germinali in questi geni presentano differenze sostanziali sia per istologia che per spettro mutazionale.



Figura 12. Rappresentazione riassuntiva delle caratteristiche molecolari e demografiche dei casi portatori di varianti con VAF comprese tra 40-60% e >50%.

4.3 Criticità della routine diagnostica

Nel complesso, i nostri dati indicano che il rischio di predisposizione germinale dovrebbe essere preso in considerazione per tutti i pazienti con diagnosi di neoplasiaematologica maligna, indipendentemente dall'età. L'analisi della coorte retrospettiva rappresenta lo studio di validazione del concetto che la gestione dei pazienti a rischio di neoplasie mieloidi ereditarie parta dalla segnalazione e dall'interpretazione accurata delle varianti genetiche riscontrate con lo screening multigenico somatico.

Va certamente notato che i risultati ottenuti dall'analisi dei dati presentano una serie di importanti limitazioni:

- difficoltà nel discriminare tra variante germinale e somatica nei pazienti con emopoiesi clonale (CHIP) o mosaicismi germinali post-zigotici;
- ridotta disponibilità di dati clinico-familiari, riducendo la capacità di identificare soggetti a rischio di predisposizione ereditaria;
- limitata utilità del pannello commerciale nell'identificare le condizioni HMN;
- assenza di conferme su tessuti alternativi.

Inoltre, la discriminazione delle varianti in base alla frequenza allelica è di per sé un parametro limitato nella ricerca delle condizioni ereditarie. Molteplici variabili nel sequenziamento possono portare ad una stima inaccurata della frequenza allelica come la perdita di eterozigosi, un legame variabile dei primers di amplificazione, altre problematiche legate alla pipeline bioinformatica di allineamento delle sequenze.

Pertanto, l'esperienza sullo *status quo* ha evidenziato chiaramente l'esigenza di sviluppare un algoritmo clinico integrato per la selezione dei pazienti a rischio di forme ereditarie, progettare un pannello NGS custom più esteso rispetto alla sola valutazione somatica, introdurre materiali alternativi per conferme germinali e standardizzare percorsi diagnostici e reportistica in linea con le linee guida internazionali.

5. Definizione dei criteri diagnostici

5.1 Logica decisionale: requisiti clinici e combinazioni mutazionali

La diagnosi delle forme ereditarie di neoplasie mieloidi rappresenta una sfida clinica complessa, a causa della sovrapposizione fenotipica con le forme acquisite e della variabilità genetica associata. Il principale obiettivo di questa fase del progetto è stato lo sviluppo di un algoritmo diagnostico integrato che permetta di identificare, tra i pazienti affetti da MDS, MPN o LAM, quelli con alta probabilità di predisposizione germinale, indirizzandoli verso test genetici mirati. L'algoritmo è stato concepito per integrare dati clinici, familiari, laboratoristici e molecolari; guidare il clinico nella decisione se procedere al test genetico germinale e contribuire alla standardizzazione dei percorsi diagnostici in ambito ematologico [54-56]. Per supportare il clinico nel riconoscimento di queste condizioni è importante implementare una raccolta di dati clinici-familiari e genetici in base a diversi parametri.

L'algoritmo sviluppato utilizza diversi parametri clinici e genetici come input: dati clinici come citopenie presenti, episodi di infezioni ricorrenti, splenomegalia, anomalie morfologiche midollari; dati familiari, come la positività per l'insorgenza di neoplasie in parenti di primo e secondo grado, valutazioni in base al pattern di ereditarietà autosomica dominante o recessiva e dati genetici preliminari, risultanti da sequenziamento eseguito come screening somatico di stratificazione prognostica.

5.2 Criteri per la definizione di “sospetto di condizione ereditaria”

Il modello proposto si basa su una logica a livelli progressivi, in cui i criteri clinici e genetici vengono combinati per definire la probabilità di ereditarietà.

I parametri possono essere raggruppati in tre moduli:

Modulo clinico-anamnestico – valuta le caratteristiche del paziente (età, diagnosi, storia personale di citopenie, comorbidità ematologiche).

- MDS/AML (esclusi core binding/APL), o insufficienza midollare progressiva diagnosticato a ≤ 50 anni di età
- Storia personale di MDS o AML o insufficienza midollare a qualsiasi età e due o più ulteriori neoplasie
- Storia personale di MDS o AML o insufficienza midollare progressiva diagnosticato a qualsiasi età con segni/sintomi di una condizione ereditaria predisponente:
 - o aberrazioni citogenetiche nel cromosoma 7 [monosomy7/del(7q)/der(7)];

- preesistente difetto piastrinico familiare (definito o sospetto) con particolare riferimento a piastrinopatie riconducibili a mutazioni nei geni *RUNX1*, *ETV6*, *ANKRD26*;
- preesistente mastocitosi idiopatica.
- Fenotipo clinico riferibile ad alcune forme congenite (infezioni gravi e insolite o immunodeficienza, anemia aplastica DEB negativa, alterazioni cutanee o muco-cutanee)
- Storia personale di MDS o AML o insufficienza midollare indipendente dall'età che soddisfa i criteri di test per altre sindromi tumorali ereditarie (es., sindrome di Li-Fraumeni, sindrome di Lynch, sindrome ereditaria del carcinoma mammario e ovarico, etc.).
- Scarsa mobilitazione di Cellule Staminali Ematopoietiche da sangue periferico da parte di un donatore familiare.

Modulo familiare – considera la presenza di casi di neoplasieematologiche o citopenie nella famiglia, età di insorgenza e pattern di trasmissione [57].

- Storia familiare (in un paziente con MDS/AML indipendente dall'età) con:
 - un parente di primo grado con quadro clinico/diagnosi ematologica condiviso a ≤ 50 anni di età;
 - due o più parenti di primo o secondo grado con MDS o AML o insufficienza midollare uno dei quali diagnosticato a ≤ 50 anni di età;
 - due o più parenti di primo o secondo grado con MDS o AML o insufficienza midollare indipendentemente dall'età, uno dei quali con diagnosi di tumore solido diagnosticato a ≤ 50 anni di età;
 - tre o più parenti di primo o secondo grado con MDS o AML o insufficienza midollare indipendentemente dall'età.
- Storia personale di MDS o AML o insufficienza midollare indipendente dall'età che ha un membro della famiglia con una variante patogena/probabilmente patogena germinale in qualsiasi gene tumorale ereditario.

Modulo laboratoristico e citogenetico – include parametri ematologici, cariotipo, evidenze di instabilità genomica o mutazioni a VAF elevata

- Storia personale di MDS, AML o insufficienza midollare progressiva diagnosticato a qualsiasi età positivo a varianti P/LP con VAF 40-60% o $>90\%$ in geni quali *CEBPA*, *ETV6*, *GATA2*, *RUNX1*, *NF1*, *TP53*, etc. identificati con analisi somatica (su midollo o sangue periferico) durante il work up diagnostico.

I criteri proposti rappresentano una valutazione sintetica e facilmente applicabile durante il colloquio ambulatoriale con il paziente. La rassegna di questa check-list consente al medico specialista di raccogliere i dati clinico-anamnestici e la definizione del pedigree familiare su tre generazioni. Sono inoltre valutate le analisi ematologiche e citogenetiche per escludere cause secondarie o forme terapia-relate e vengono utilizzati i risultati dello screening molecolare di I livello su geni somatici ricorrenti. Questa logica consente di ottimizzare le risorse diagnostiche, evitando test genetici non necessari e concentrando gli sforzi su pazienti con reale sospetto di ereditarietà.

La definizione di criteri diagnostici mirati ha rappresentato un passaggio centrale del progetto di ricerca, consentendo di trasformare un problema complesso in uno strumento operativo concreto. La combinazione di parametri clinici, familiari e genetico-molecolari ha permesso di definire una check-list che presentasse un'utilità predittiva affidabile, scientificamente validata e facilmente applicabile nella pratica clinica. L'algoritmo sviluppato fornisce un modello operativo standardizzato per il sospetto di predisposizione ereditaria nelle neoplasie mieloidi con ricadute positive come la riduzione dei tempi diagnostici e ottimizzazione delle risorse, consentendo una migliore accuratezza nella selezione dei pazienti per il test genetico ed una facilitazione dello screening familiare preventivo.

6. Definizione e sviluppo di un pannello NGS custom

Le recenti linee guida National Comprehensive Cancer Network (NCCN) per le sindromi mielodisplastiche, linee guida dell'European Society of Medical Oncology (ESMO), della British Society of Hematology e del Cancer Genetics Group del Regno Unito (UKCGG) per la predisposizione germinale alle neoplasie ematologiche rivelano una marcata eterogeneità e talvolta incoerenza nelle raccomandazioni relative alla diagnosi e ai test per la diagnosi delle HMN. Questa eterogeneità rappresenta un elemento limitante all'introduzione di queste valutazioni in pratica clinica, con la conseguente sotto-diagnosi e riduzione della corretta gestione di questi pazienti [58-61].

Gli obiettivi di questa fase del progetto sono:

1. Progettare un pannello di sequenziamento mirato (custom panel) ottimizzato per i geni noti e sospetti associati a predisposizione ereditaria alle MDS/MPN/LAM;
2. Validarne le *performance* tecniche analitiche in termini di copertura genomica e pipeline di chiamata delle varianti;
3. Validarne l'affidabilità analitica e diagnostica, in termini di sensibilità, specificità e copertura genomica;
4. Testare materiali biologici alternativi (saliva e linfociti T) per la valutazione del DNA germinale.

La diagnosi delle forme ereditarie di MDS, MPN e LAM richiede l'identificazione precisa di varianti germinali in geni chiave. Sebbene il sequenziamento dell'intero esoma o genoma (WES/WGS) offra una visione completa, nella pratica clinica risulta ancora scarsamente diffuso a causa dei costi elevati e alle complessità di interpretazione. Per questo motivo, la progettazione di un pannello NGS customizzato rappresenta una strategia efficiente, mirata e riproducibile.

6.1 Identificazione dei geni target rilevanti per le forme ereditarie di MDS/LAM/MPN

La scelta dei geni inclusi nel pannello è stata basata su una revisione sistematica della letteratura (pubblicazioni fino al 2024) ed a quanto riportato nelle linee guida internazionali (ELN, ICC, NCCN, WHO). Complessivamente, i criteri di selezione hanno incluso: l'evidenza documentata di associazione con una predisposizione germinale a MDS, MPN e LAM; la presenza di un meccanismo biologico noto o fortemente sospettato (coinvolgimento in processi di ematopoiesi, regolazione trascrizionale, splicing o mantenimento dell'integrità genomica); la frequenza significativa di varianti germinali riportate in registri internazionali

(ClinVar, LOVD, HGMD); e il potenziale ruolo dei geni nella stratificazione prognostica o nella scelta terapeutica. Il pannello custom include numerosi geni citati anche nelle raccomandazioni ESMO come di rilevanza germinale, comprendendo geni ad alta penetranza (es. *TP53*, *RB1*, *NF1*) e a bassa penetranza (es. *APC*, *CHEK2*) [62]. Sono state inoltre considerate condizioni genetiche che determinano una predisposizione al cancro, includendo anche geni non classicamente associati alle forme conclamate di malattia ematologica, oltre a geni più rari e meno caratterizzati.

Il pannello finale comprende 98 geni suddivisi per pathways funzionali:

- geni codificanti per fattori di trascrizione e differenziamento ematopoietico (*RUNX1*, *CEBPA*, *GATA2*, *ETV6*);
- controllo della proliferazione ed integrità genomica (*TP53*, *DDX41*, *SRP72*, *ANKRD26*, *SAMD9*, *SAMD9L*, *TERT*, *RTEL1*);
- meccanismo di splicing e regolazione dell'espressione genica (*SF3B1*, *SRSF2*, *ZRSR2*, *PRPF8*, *RBM10*);
- segnalazione intracellulare e risposta immunitaria (*STAT3*, *SH2B3*, *JAK2*, *MPL*);
- meccanismi di riparazione dei danni al DNA e dei telomeri (*BRCA2*, *FANCA*, *FANCG*, *ATM*, *ATRX*, *POT1*, *TINF2*).

Si riassumono in Tabella 8 i fenotipi clinici associati ai geni compresi nel pannello.

Gene	Fenotipi associati (OMIM)	Eredità	ClinVar	HGMD
ACD	Discheratosi congenita, autosomica dominante 6, Discheratosi congenita, autosomica recessiva 7	AD/AR	2	8
ANKRD26	Trombocitopenia	AD	6	21
APC	Sindrome di Gardner, malattia desmoide, ereditaria, poliposi adenomatosa familiare	AD	773	1926
ATG2B	Neoplasie mieloidi, familiari	AD	1	1
ATM	Ataxia-telangiectasia, Cancro al seno	AD	2882	2879
BARD1	Cancro al seno	AD	159	114
BRAF	Sindrome di LEOPARD, sindrome di Noonan, sindrome cardiofaciocutanea	AD	134	65
BRCA1	Tumore del pancreas, Tumore della mammella-ovaio, familiare, anemia di Fanconi	AD	2997	2631
BRCA2	Anemia di Fanconi, Medulloblastoma, Suscettibilità al glioma, Tumore del pancreas, Tumore di Wilms, Tumore della mammella, Cancro della mammella,	AD/AR	3369	2659
BRIP1	Anemia di Fanconi, Tumore della mammella	AD/AR	238	189
CALR	Neoplasie mieloidi, familiari	AD	3	5
CBL	Malattia simile alla sindrome di Noonan con o senza leucemia mielomonocitica giovanile	AD	24	43
CEBPA	Leucemia mieloide acuta, familiare	AD	15	13
CHEK1	Controllo del ciclo cellulare nella fase di sviluppo embrionale	AD	5	-
CHEK2	Cancro al seno, suscettibilità a	AD/AR	275	197
CSF3R	Neutrofilia ereditaria	AD/AR	13	13
CTC1	Microangiopatia cerebrotinica con calcificazioni e cisti	AR	21	33
DDX41	Neoplasie mieloproliferative/linfoproliferative familiari, tipi multipli, suscettibilità a	AD	9	21
DKC1	Sindrome di Hoyeraal-Hreidarsson, discheratosi congenita	XL-R	48	74
ELANE	Neutropenia	AD	43	217
EPCAM	Diarrea 5, con enteropatia a ciuffi, congenita, cancro del colon-retto, non poliposi ereditaria	AD/AR	38	80
ERCC4 (FANQ)	Anemia di Fanconi, Xeroderma pigmentoso, sindrome progeroide XFE	AR	13	70
ERCC6L2	Sindrome da insufficienza midollare 2	AR	4	9
ERFWD3 (FANCW)	Anemia di Fanconi	AR	2	-
ETV6	Trombocitopenia 5	AD	10	38
FANCA	Anemia di Fanconi	AR	191	677
FANCB	Anemia di Fanconi	XL-R	34	28
FANCC	Anemia di Fanconi	AR	94	64
FANCD2	Anemia di Fanconi	AR	339	75
FANCE	Anemia di Fanconi	AR	35	19
FANCF	Anemia di Fanconi	AR	21	2
FANCG	Anemia di Fanconi	AR	50	96
FANCI	Anemia di Fanconi	AR	13	45
FANCL	Anemia di Fanconi	AR	13	24
FANCM	Anemia di Fanconi	AD/AR	6	50
G6PC3	Neutropenia, grave congenita, sindrome di Dursun	AR	11	37
GATA1	Anemia, senza trombocitopenia, Trombocitopenia con beta-talassiemia, Anemia diseritropoietica con trombocitopenia	XL	21	15
GATA2	Sindrome mielodisplastica, Neutropenia cronica associata a monocitopenia, evolvendo verso mielodisplasia e leucemia mieloide acuta, Leucemia mieloide acuta, Sindrome di Emberger, Immunodeficienza	AD	30	142
HAX1	Neutropenia, grave congenita	AR	11	21
HRAS	Sindrome di Costello, miopatia congenita con eccesso di fusi muscolari	AD	43	31

JAK2	Trombocitemia 3	AD	12	22
KRAS	Sindrome di Noonan, Sindrome cardio-facio-cutanea	AD	63	35
MAD2L2 (FANCV)	Anemia di Fanconi	AR	1	2
MAP2K1	Sindrome cardio-facio-cutanea	AD	45	23
MBD4	Sindrome da predisposizione tumorale	AR	44	2
MDM4	Sindrome da insufficienza midollare	AD	0	1
MLH1	Sindrome di Muir-Torre, cancro dell'endometrio, sindrome del cancro con riparazione del mismatch, cancro del colon-retto, non poliposi ereditaria	AD/AR	873	1191
MPL	Trombocitemia, trombocitopenia amegacariocitaria	AD/AR	23	55
MPO	Cancro al polmone, suscettibilità	AD	11	11
MSH2	Sindrome di Muir-Torre, Cancro dell'endometrio, Cancro del colon-retto, non poliposi ereditaria, Sindrome del cancro con riparazione del mismatch	AD/AR	933	1249
MSH6	Cancro dell'endometrio, sindrome tumorale da riparazione del mismatch, cancro del colon-retto, non poliposi ereditaria	AD/AR	672	586
MUTYH	Poliposi adenomatosa familiare, Poliposi adenomatosa coloretale, con pilomatricomi	AR	134	168
NF1	Sindrome di Watson, Neurofibromatosi, Neurofibromatosi-Sindrome di Noonan	AD	1157	2901
NHP2	Discheratosi congenita	AR	5	3
NOP10	Discheratosi congenita	AR	3	1
NRAS	Sindrome di Noonan	AD	21	15
PALB2	Anemia di Fanconi, Tumore del pancreas, Tumore della mammella	AD/AR	495	406
PARN	Fibrosi polmonare e/o insufficienza midollare, Discheratosi congenita	AD/AR	46	29
PIK3CA	Condizioni neoplastiche	-	154	126
PMS2	Sindrome tumorale da riparazione del mismatch, cancro del colon-retto, non poliposi ereditaria	AD/AR	319	342
POT1	Glioma suscettibilità 9, melanoma, cutaneo maligno, suscettibilità a 10	AD	2	34
PTEN	Sindrome di Bannayan-Riley-Ruvalcaba, sindrome di Lhermitte-Duclos, sindrome di Cowden	AD	435	638
PTPN11	Sindrome di Noonan, metacondromatosi	AD	135	140
RAD51	Anemia di Fanconi, cancro al seno, suscettibilità	AD	14	9
RAD51B	Anemia di Fanconi, Tumore della mammella-ovaio	-	1	0
RAD51C	Anemia di Fanconi, Tumore della mammella-ovaio	AD/AR	107	125
RAD51D	Carcinoma mammario-ovarico, familiare	AD	77	78
RAF1	Sindrome di LEOPARD, sindrome di Noonan, cardiomiopatia dilatativa (DCM)	AD	45	53
RBBP6	Neoplasie mieloidi, familiari	-	0	0
RECQL4	Sindrome di Baller-Gerold, sindrome di RAPADILINO, sindrome di Rothmund-Thomson	AR	82	114
RPA1	Sindrome da fibrosi polmonare e/o insufficienza del midollo osseo, correlata ai telomeri	AD	2	0
RPL11	Anemia di Diamond-Blackfan	AD	12	45
RPL35A	Anemia di Diamond-Blackfan	AD	7	14
RPL5	Anemia di Diamond-Blackfan	AD	19	77
RPS10	Anemia di Diamond-Blackfan	AD	3	5
RPS19	Anemia di Diamond-Blackfan	AD	23	172
RPS26	Anemia di Diamond-Blackfan	AD	10	33
RTEL1	Fibrosi polmonare e/o insufficienza midollare, Discheratosi congenita	AD/AR	58	51
RUNX1	Malattia piastrinica, familiare, con neoplasie mieloidi associate	AD	47	101
SAMD9	Sindrome di Mirage, calcinosi tumorale, normofosfatemico	AD/AR	10	27
SAMD9L	Sindrome atassia-pancitopenia	AD	4	16

SBDS	Anemia aplastica, sindrome di Shwachman-Diamond, grave displasia spondilometafisaria	AR	19	90
SLX4	Anemia di Fanconi	AR	18	72
SOS1	Sindrome di Noonan	AD	44	71
SRP72	Sindrome da insufficienza midollare 1	AD	2	5
STK11	Sindrome di Peutz-Jeghers	AD	173	460
TERC	Anemia aplastica, fibrosi polmonare e/o insufficienza midollare, telomero-correlata, discheratosi congenita	AD	42	73
TERF2	Telomeropatie	-	0	0
TERT	Anemia aplastica, fibrosi polmonare e/o insufficienza midollare, telomero-correlata, discheratosi congenita	AD/AR	48	156
TET2	Immunodeficiency 75	AR	149	120
THPO	Trombocitemia 1	AD/AR	5	10
TINF2	Sindrome di Revesz, Discheratosi congenita	AD	25	42
TP53	Cancro del colon-retto, sindrome di Li-Fraumeni, ependimoma, intracranico, papilloma del plesso coroideo, cancro della mammella, familiare, carcinoma cortico-surrenalico, sarcoma osteogenico, epatoblastoma, linfoma non-Hodgkin	AD	393	505
UBE2T (FANCT)	Anemia di Fanconi, gruppo di complementazione T	AR	2	7
VHL	Eritrocitosi familiare, Feocromocitoma, malattia di Von Hippel-Lindau	AD/AR	206	614
WAS	Sindrome di Wiskott-Aldrich	XL-R	203	147
WRAP53	Discheratosi congenita	AR	4	7
XRCC2	Cancro al seno ereditario	AD/AR	10	21

Tabella 8 Elenco dei geni compresi nel pannello NGS custom. Come ereditarietà si riferisce a modelli di ereditarietà come autosomica dominante (AD), autosomica recessiva (AR), X-linked (XL) e X-linked recessiva (XLR); Colonne ClinVar e HGMD si riferiscono al numero di varianti del gene classificate come Classi 5 o 4 riportate nei database.

6.2 Progettazione tecnica del pannello

Il disegno del pannello è stato realizzato utilizzando la piattaforma Illumina DesignStudio®, con chimica amplicon-based.

Le scelte progettuali hanno tenuto conto della necessità di ottenere una copertura completa degli esoni codificanti e delle giunzioni esone/introne, lunghezza media degli ampliconi: 175–225 bp, ottimizzata per DNA di qualità variabile. L'algoritmo di progettazione garantisce un pooling bilanciato per uniformare la profondità di copertura tra geni di grandi dimensioni (es. *TP53*, *ATM*) e geni compatti (es. *ETV6*, *ANKRD26*).

Il pannello presenta le caratteristiche elencate nella tabella sottostante (Tabella 11).

Chimica	Amplicon Based
Templato	DNA
Genoma di Riferimento	Hg19
Numero Geni	98
Regioni Target	Tutti gli esoni
Regione Fiancheggiante gli Esoni	25 bp
Numero Ampliconi	3487
Numero Pool di Primer	2
Mediana Lunghezza Ampliconi	273
Media Lunghezza Ampliconi	261
Intervallo Lunghezza Ampliconi	125-273
Coverage Predetto	98.5%

Tabella 9. Caratteristiche tecniche del pannello multigenico custom progettato in silico.

Una volta completato il progetto, il software restituisce tre file in formato .bed relativi al disegno del pannello:

- *File submitted.bed*: contenente le coordinate genomiche delle regioni input (porzioni codificanti e giunzioni introne-esone).
- *File designer.bed*: contiene le coordinate degli ampliconi risultati dal disegno dei primers volti a coprire tutte le regioni presenti nel file submitted. Per ciascun ID relativo all'amplicone nel pannello, è possibile visualizzare la posizione cromosomica, l'inizio e la fine dell'amplicone ed il simbolo del gene.
- *File missed.bed*: contiene le coordinate delle regioni non coperte dal disegno degli ampliconi.

Il software fornisce inoltre dati di coverage in silico relativi al numero di ampliconi allineati al target e informazioni sulla distribuzione delle coperture per ogni esone. Nonostante la

predizione di un coverage pari a 98%, nella validazione tecnica si è osservata la presenza di una copertura inferiore per alcune regioni.

6.2 Strategie di ottimizzazione e parametri di qualità

L'analisi di un pannello di ampliconi esteso (più di 1500 copie di primers per pool) ha richiesto l'ottimizzazione delle temperature di *anealing* e cicli per la prima fase di PCR di sintesi della libreria.

L'analisi dei dati, al pari del pannello descritto nel capitolo 4, avviene mediante algoritmo Illumina DNA Amplicon di Local Run Manager in cui sono allineate le letture degli ampliconi con il riferimento specificato nel file manifest contenenti le coordinate delle regioni da sequenziare. Nel software è integrato un file di annotazione, che permette la chiamata delle varianti, con un setting impostato a copertura minima 10X e minima VAF 10%. Per ottenere dati di coverage aggregabili per gene, utili per fornire una reportistica diagnostica, abbiamo ottimizzato il file *manifest* correlando ogni amplicone ad uno specifico gene.

La qualità di una corsa si misura sulla base di diversi parametri quali numero di letture adeguato, lunghezza delle letture attesa e relativa qualità. Il numero delle letture (Total Reads) dipende da vari fattori, inclusi il caricamento della flow cell, l'input di librerie e qualità delle librerie. Questi fattori sono in parte valutabili nel report PDF della corsa ottenuto con software Local Runa Manager-Illumina.

IAA37411_188_manifest_definitivo - Blocco note

File Modifica Formato Visualizza ?

[[Probes]]

Target ID	ULSO Sequence	DLSO Sequence	Gene ID
AMPL5221299_MAD2L2	GGCCAACACTGTCTGTCTCAAATAC	TGCTTCTCCACCAAAATGCCAGGGA	MAD2L2
AMPL5218960_MAD2L2	CCCCACTGATGCCCAAACGTGTCAGA	GAGTTGTTTCAATAAAGGGGCCCA	MAD2L2
AMPL4528600_MAD2L2	TGGCTGTTTGCTTGTGTCGTCAGA	CAAGTGCTCTTATCGCCTCTGTGTG	MAD2L2
AMPL4528487_MAD2L2	TGCTGAGGCCCTTACTAGAGGGCTTG	GAAGAGCGCGCTCATAAAGGCAGCT	MAD2L2
AMPL4528651_MAD2L2	CCTAGTGATTCTGAGGCTCAGGTTG	ATTAGGGGCTGCTTAACGAAGTGA	MAD2L2
AMPL4528625_MAD2L2	CTTTTCTTAGCACTTGCTTTGCCAT	AACGTGATGTCGAGTTCAGGCGG	MAD2L2
AMPL4528650_MAD2L2	GGTCCTAGGCATGCAGCACTCTCAC	CATTTCCATGGTTATCTCGGGTTGG	MAD2L2
AMPL4528493_MAD2L2	GGGGTTCCTCTCTTTGCAGAATGAT	AATACCTTGGTAAAGGCCTGGGAGG	MAD2L2
AMPL4528483_MAD2L2	GGTGCCGGCTTCTCAAACCTCGCTAT	AAATTCGTCTTTGAGATCACCCAGC	MAD2L2
AMPL4528455_MAD2L2	GCCGCATGGTATTGTGTGCAGATGT	CACTCTGGAGACCATCCCAACCCAG	MAD2L2
AMPL4528676_MAD2L2	GTTCTTAGCCTCTTGAGGGAAAGTG	GAATCAGTATATCCAGGACACGCTG	MAD2L2
AMPL4528512_MAD2L2	ACCTCAACTTTGGCCAAGGTAGGGA	TGGGTACAGGGTGGACTTTTAAAAA	MAD2L2
AMPL5222132_MAD2L2	GCCCAACACTCAGGTAGCGGGAAG	GAAACGCAAGAAGTACAACGTGCCG	MAD2L2

Figura 14. Esempio delle coordinate contenute nel BED file-manifest

6.4 Analisi bioinformatica e pipeline di elaborazione dati

Il plug-in Variant Caller che viene avviato automaticamente con la corsa ed è accessibile dal Local Run Manager-Illumina. Esso fornisce le coordinate genomiche, il tipo di variante individuata, il numero di letture della posizione allelica con la percentuale di allele mutante.

Le sequenze sono state elaborate con il seguente workflow:

- Demultiplexing e controllo qualità (FastQC);
- Allineamento su genoma umano GRCh37 con BWA;
- Rimozione dei duplicati e realignment;
- Chiamata delle varianti (SNV e indel);
- Annotazione funzionale con wANNOVAR, ClinVar, gnomAD, Varsome;
- Classificazione ACMG;
- Validazione manuale con IGV (Integrative Genomics Viewer).

Il limite di rilevazione (LOD) è stato fissato a $VAF \geq 10\%$, con una copertura media del pannello maggiore di 100X per il 98% delle regioni target.

L'interpretazione delle varianti germinali, al pari delle varianti somatiche, segue un filtraggio gerarchico, vengono inizialmente escluse le varianti in base alla

- frequenza allelica rispetto alla frequenza nella popolazione generale (database ExAC, gnomAD, 1000 Genomes Project);
- localizzazione (esonica o splice-site vs intronica o UTR);
- effetto della variante (nonsense o missenso o INDEL vs sinonime).

Le varianti filtrate vengono successivamente valutate per:

- possibili artefatti (falsi positivi) mediante valutazione con software IGV e confronto con altri campioni;
- per le varianti missenso, vengono utilizzati strumenti di previsione delle varianti in silico come SIFT, PolyPhen, Mutation Taster e CADD score;
- correlazione con il fenotipo e compatibilità con meccanismo di trasmissione;
- confronto con la letteratura scientifica.

È importante sottolineare che il disegno del pannello, basato su tecnologia *amplicon-based*, presenta alcune limitazioni intrinseche. In particolare, tale approccio non consente l'identificazione di varianti di numero di copie (CNV, Copy Number Variation), traslocazioni bilanciate, inversioni complesse, espansioni di triplette ripetute, né di varianti non codificanti localizzate oltre ± 20 coppie di basi dal confine esone-introne.

Inoltre, non è ancora stato implementato un plugin di analisi in grado di rilevare in modo affidabile bassi livelli di mosaicismo, ripetizioni mono-nucleotidiche, inserzioni/delezioni di dimensioni superiori a 50 paia di basi, delezioni o duplicazioni di singoli esoni, né varianti presenti in regioni pseudogeniche o in segmenti duplicati.

Alla luce di queste limitazioni, l'interpretazione dei dati ottenuti tiene conto della possibilità di varianti non individuabili tramite approccio *amplicon-based*.

6.5 Risultati preliminari

La validazione del pannello NGS è stata condotta sulla base di un piano di convalida strutturato, finalizzato ad assicurare l'affidabilità e la robustezza del metodo. Il processo ha previsto diverse fasi, tra cui:

- Selezione dei campioni: sono stati selezionati 10 campioni rappresentativi, comprendenti campioni caratterizzati da varianti note o negativi, analizzati con il pannello commerciale Illumina descritto nel capitolo 4.
- Analisi del rischio: è stata condotta una valutazione mirata ad individuare potenziali punti critici lungo il flusso di lavoro, dagli aspetti tecnici-analitici fino all'interpretazione bioinformatica, con particolare attenzione ai limiti della chimica *amplicon-based* sopracitati, al rischio di coperture non idonee ed alla ricorrenza di varianti false positive.
- Qualificazione del materiale e delle strumentazioni: il sequenziamento di questo pannello avviene utilizzando strumenti e reagenti in dotazione presso il nostro Laboratorio per i quali sono già state valutate le qualificazioni dei materiali, dei reagenti e delle strumentazioni impiegate per la validazione di altri pannelli diagnostici.

L'insieme di queste attività ha consentito di definire un percorso di validazione conforme all'idoneità del pannello anche per future applicazioni diagnostiche. Si riportano i parametri valutati nelle sedute di validazione (Tabella 10).

Parametri di validazione		
Fase pre-NGS	Concentrazione e qualità DNA	>25 ng/μl
	Concentrazione library	>4 nM
	Concentrazione pool pre-carica	16 pM
Fase post-NGS	Metriche della corsa	Cluster Density: 800-1400 k/mm ² Cluster Passing Filter: >85% Output bases >=Q30: >80%
	Metriche del campione	Numero totale delle reads: >5000000 Percentuale di reads on target: > 96% Percentuale di Q30 delle basi: >85% Copertura minima degli ampliconi: >10x Uniformità di coverage: >90% % basi con Q30:>80%

Tabella 10. Parametri tecnici monitorati nel processo di convalida

6.5.1 Valori di coverage

Il modulo “ampliseqDNA” del local Run Manager crea anche i bam file relative alle profondità di lettura per amplicone e per gene. L’analisi dei 10 campioni, in condizioni di alta profondità di lettura (coperture tra 900X e 3744X) ha dimostrato un’uniformità di coverage ad almeno 100X sovrapponibile a quella predetta in silico, con una riduzione media del 3%.

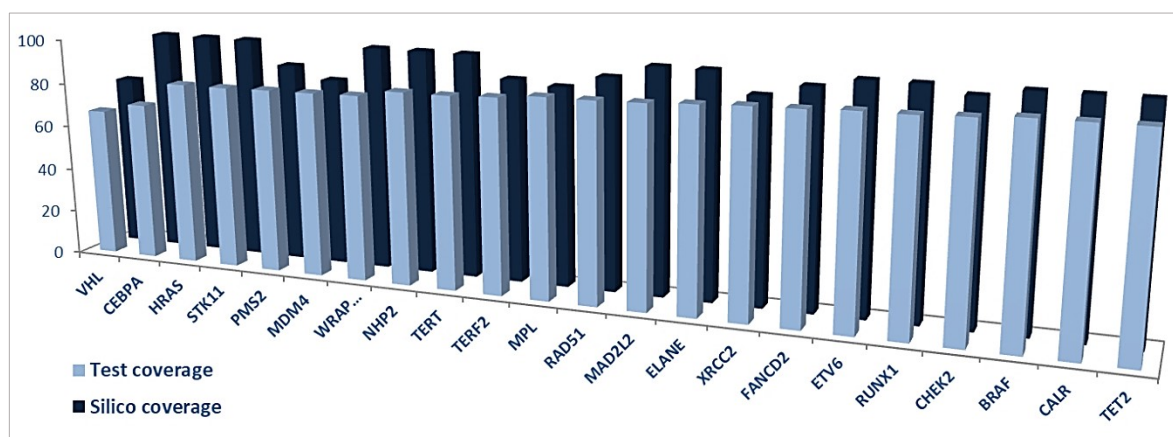


Figura 15. Confronto tra le % di coperture predette in silico e ottenute nelle fasi sperimentali. Si riportano alcuni dei geni del pannello in ordine crescente di coverage.

La valutazione delle sequenze mediante il software di visualizzazione IGV ha permesso di identificare falsi positivi ricorrenti, quali chiamate associate a bassi punteggi Phred,

disallineamenti locali in prossimità di InDel, strand bias e allineamenti errati in regioni omopolimeriche, con basse coperture o in regioni paraloghe scarsamente rappresentate nel genoma di riferimento. Tali eventi sono stati annotati all'interno del programma di convalida in un file dedicato e classificati come varianti non correttamente identificabili, fornendo così una documentazione sistematica dei limiti analitici del pannello.

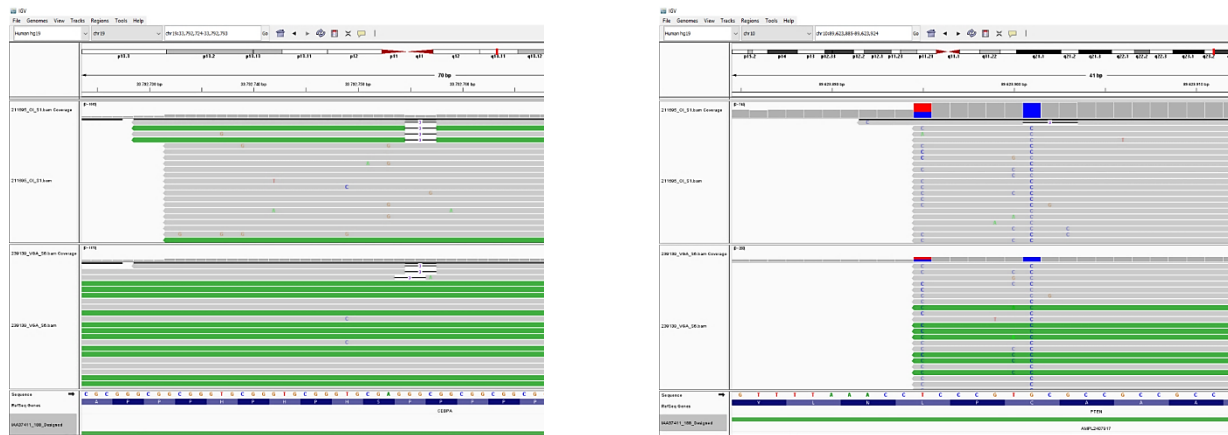


Figura 16. Esempi di varianti false positive ricorrenti visualizzate in IGV

6.5.2 Risultati molecolari

I risultati ottenuti confermano i valori attesi, evidenziando la presenza di varianti precedentemente individuate o coerenti con il quadro clinico e anamnestico dei pazienti, incluso il caso di una paziente affetta da MDS terapia-correlata (therapy-related MDS) insorta dopo neoplasia mammaria su base eredo-familiare.

L'analisi mediante NGS ha permesso di identificare varianti germinali classificate come patogenetiche o probabilmente patogenetiche in sette pazienti, coinvolgenti i geni *BRCA1*, *ETV6*, *NF1*, *RUNX1*, *TET2* e *TP53*. Inoltre, sono state rilevate varianti di significato sconosciuto (VUS) nei geni *ACD*, *CHEK2*, *FANCM*, *FANCD2*, *MPL*, *NF1*, *PALB2*, *PARN*, *PMS2* e *SLX4*.

Il ruolo biologico e clinico delle varianti di significato incerto rimane tuttavia indeterminato in assenza di annotazioni fenotipiche dettagliate e di dati sperimentali funzionali.

Tra le analisi di validazione, si segnala il caso di un paziente maschio di 50 anni affetto da leucemia mieloide acuta, portatore di varianti nei geni *NPM1*, *FLT3*, *KRAS*, *TET2* e *GATA2*. Il paziente è stato sottoposto a trapianto aploidentico da donatrice consanguinea (sorella), con mantenimento di chimerismo completo per quattro anni, seguito dallo sviluppo di LAM secondaria. L'analisi somatica, eseguita mediante pannello diagnostico NGS su un campione midollare al momento della recidiva, ha evidenziato la presenza di due varianti nei

geni *RUNX1* e *PHF6*, oltre a una variante nel gene *TET2* (Gln138Leu) coerente con il profilo mutazionale di esordio. L'applicazione del pannello NGS custom ha confermato la variante *TET2* e ha inoltre rilevato una variante di significato incerto (Classe 3) nel gene *PALB2* (Ser1165Leu), successivamente confermata sia nei linfociti T periferici del paziente (purezza >97%) sia nel campione della sorella donatrice.

La concomitante identificazione di varianti germinali nei geni *TET2* e *PALB2* nel paziente e nella sorella suggerisce la presenza di una eziologia multifattoriale e a penetranza incompleta per lo sviluppo di patologieematologiche. Il gene *TET2* codifica per una diossigenasi coinvolta nei processi di demetilazione del DNA e nella regolazione dell'autorinnovamento delle cellule staminali ematopoietiche. Alterazioni molecolari in questo gene sono frequentemente associate ad emopoiesi clonale e possono rappresentare un evento precoce nel processo leucemico [63]. Il gene *PALB2* svolge un ruolo cruciale nella riparazione del DNA per ricombinazione omologa, agendo in cooperazione con *BRCA2*. Sebbene le varianti germinali di *PALB2* siano principalmente note per la loro associazione con sindromi di predisposizione a tumori solidi, evidenze recenti suggeriscono un loro possibile contributo anche alla predisposizione mieloide o al tasso di recidiva dopo il trapianto, attraverso un incremento della instabilità genomica e del carico mutazionale [64;65]. Si ipotizza che la coesistenza di varianti in due meccanismi di regolazione cellulare diversi potrebbe quindi creare un contesto biologico favorevole all'espansione clonale, coerente con un modello di rischio poligenico, tipico della predisposizione all'insorgenza di condizioni neoplastiche [66]. In tale scenario, ciascuna variante da sola potrebbe non essere sufficiente a determinare la malattia, ma la loro combinazione può alterare l'equilibrio dell'omeostasi ematopoietica, facilitando l'emergere di cloni anomali in condizioni di stress selettivo. Dopo il trapianto di cellule staminali, il microambiente midollare è soggetto a profondi processi di rimodellamento infiammatorio e rigenerativo, che possono promuovere la selezione di cloni preesistenti dotati di vantaggi proliferativi o di sopravvivenza [67;69]. L'interazione tra predisposizione germinale e segnali microambientali rappresenta pertanto un possibile meccanismo alla base della trasformazione leucemica osservata in questo caso.

Nel complesso, questo caso dimostra la natura complessa e multifattoriale delle neoplasie mieloidi ereditarie, in cui predisposizione genetica, dinamiche clonali e influenze microambientali concorrono nel determinare l'insorgenza e l'evoluzione della malattia. Permane la necessità di ulteriori studi funzionali per chiarire l'impatto biologico delle varianti identificate e il loro contributo ai processi di ematopoiesi clonale e progressione leucemica.

Il pannello NGS sviluppato costituisce la base tecnologica per l'applicazione dell'algoritmo diagnostico descritto nel capitolo precedente e per l'implementazione di percorsi di genetica predittiva personalizzata nelle neoplasie mieloidi ereditarie. Questo strumento diagnostico è

di elevata adattabilità e presenta dei tempi di analisi e di risposta compatibili con la pratica clinica.

7. Valutazione di materiali biologici alternativi

7.1 Razionale: conferma delle varianti di origine germinale

La distinzione tra mutazioni somatiche e varianti germinali rappresenta uno dei principali ostacoli nella diagnosi delle neoplasie mieloidi ereditarie. Tradizionalmente, il DNA germinale viene ottenuto dal sangue periferico; tuttavia, nei pazienti con malattia attiva, questo materiale può contenere cloni leucemici. In presenza di CHIP (Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential) o mosaicismi somatici, il DNA da sangue periferico può includere cellule portatrici di mutazioni acquisite, generando falsi positivi nella valutazione dell'ereditarietà.

Per superare questa limitazione, il progetto ha previsto la sperimentazione di due fonti alternative di DNA germinale:

1. Saliva, come materiale non invasivo, facilmente accessibile e con buona resa di DNA, adatta a soggetti in remissione o a familiari sani.
2. Linfociti T selezionati da sangue periferico, che possono costituire un tessuto libero da alterazioni somatiche, poiché raramente coinvolti nelle espansioni clonali mieloidi.

Si riportano in tabella le principali caratteristiche dei tessuti suggeriti come alternativi al campione di midollo osseo o sangue periferico.

Tipo di campione	Vantaggi	Svantaggi
Biopsia cutanea	• Fonte di DNA ad alta quantità- in coltura cellulare resa maggiore	• Procedura invasiva • Non tutti i laboratori sono predisposti per l'estrazione da questi campioni • E' necessaria la coltura per evitare contaminazione di DNA derivato da leucociti • Richiede tempi di processazione più ampi
Sorting delle cellule T (CD3+)	• Campione (sangue) facilmente accessibile	• Non tutti i laboratori sono predisposti per l'estrazione da questi campioni • Possibilità di mutazioni ematopoietiche somatiche precoci erroneamente diagnosticate come germinali • Necessità di purezza superiore al 95% per evitare contaminazioni di possibili cellule
Raschiamento buccale	• Campione di facile accesso	• Contaminazione da DNA derivato da leucociti
Radice dei capelli	• Campione di facile accesso	• Non tutti i laboratori sono predisposti per l'estrazione da questi campioni • Possibilità di contaminazione del DNA da altre fonti • DNA di ridotta quantità
Taglio delle unghie	• Campione di facile accesso	• Non tutti i laboratori sono predisposti per l'estrazione da questi campioni • Possibilità di contaminazione del DNA da altre fonti • DNA di ridotta quantità
Campione di remissione (aspirato di midollo osseo o sangue in remissione)	• Riduce il numero di campioni che necessitano di conferma germinale ed evita la necessità di un campionamento separato più invasivo	• Può ritardare la conferma della linea germinale • Il campionamento in remissione potrebbe non fornire un risultato chiaro • Non tutti i pazienti hanno un prelievo di midollo osseo in remissione • Possibilità di mutazioni ematopoietiche somatiche clonali residue erroneamente diagnosticate come germinali

Tabella 11. Elenco schematico dei campioni alternativi utili per la ricerca di varianti di origine germinale

L'obiettivo di questa fase del progetto è stato quello di valutare la qualità, la stabilità e l'affidabilità del DNA estratto da campioni di saliva e linfociti T di 8 pazienti arruolati nel progetto.

7.2 Analisi comparativa tra DNA estratto da saliva e DNA estratto da linfociti T

L'estrazione del DNA dalla saliva è stata condotta utilizzando il kit Oragene® DNA OG-500, che consente la conservazione stabile del campione a temperatura ambiente fino a 3 mesi e la successiva procedura automatica di estrazione con strumentazione Promega.

I risultati medi ottenuti sono:

- Concentrazione di DNA: range 4-31 ng/μg;
- Purezza (A260/A280): 1,85;
- Tempo di preparazione: 45 minuti per campione.

L'isolamento dei linfociti T è stato eseguito mediante separazione magnetica positiva (MACS®) con anticorpi anti-CD3, partendo da 5 mL di sangue periferico ed ottenendo una purezza media del 97,8% (valutata tramite citometria a flusso). Il DNA è stato estratto con metodica manuale QIAGEN.

Risultati medi:

- Concentrazione di DNA: media 20ng/μg;
- Purezza (A260/A280): 1,85;
- Tempo di preparazione: circa 2 ore per campione.

7.3 Risultati ed implicazioni per la diagnostica clinica futura.

Un campione di saliva e un campione di DNA da linfociti T sono stati analizzati utilizzando sia il pannello commerciale Illumina a 40 geni, sia il pannello custom sviluppato nel progetto. Le metriche di sequenziamento ottenute sono state confrontate con quelle derivanti dal DNA da sangue periferico o midollare, dimostrando che tutti i campioni hanno confermato i parametri di qualità predefiniti e di conseguenza la compatibilità dell'utilizzo di DNA estratto da materiali alternativi con le analisi NGS.

È importante sottolineare che, a causa del numero limitato di prove eseguite, i presenti risultati devono essere considerati con cautela. Non sono state effettuate conferme tramite sequenziamento Sanger, né sono stati inclusi campioni aggiuntivi per la verifica delle varianti

identificate nell'iter somatico, limitando la possibilità di validazione dell'utilizzo del DNA estratto da linfociti T come materiale alternativo.

8. Risultati complessivi

8.1 Sintesi dei risultati ottenuti

In questo capitolo vengono discussi i risultati principali, le implicazioni cliniche e i limiti dello studio.

Prima dell'avvio del presente progetto, è stata condotta un'analisi retrospettiva sui risultati di diagnostica molecolare dei disordini mieloidi eseguiti nella pratica clinica. L'obiettivo è stato quello di valutare la frequenza e la distribuzione delle varianti potenzialmente germinali, analizzare l'adeguatezza del pannello NGS impiegato e identificare le principali criticità che hanno motivato lo sviluppo di un approccio diagnostico più integrato e specificamente mirato alle forme ereditarie.

All'interno di una coorte eterogenea per manifestazioni fenotipiche e per età di insorgenza, è emersa una frazione rilevante di pazienti (circa il 30%) per i quali si renderebbe necessaria la conferma della variante individuata nello screening somatico mediante l'analisi di un tessuto di origine germinale al fine di distinguere la componente ereditaria da quella acquisita.

Il pannello NGS utilizzato nella diagnostica routinaria non risulta tuttavia esaustivo per soddisfare le esigenze di identificazione delle varianti associate alle condizioni ereditarie. Inoltre, l'assenza di dati anamnestici familiari dettagliati comporta un rischio significativo di mancata identificazione di una diagnosi molecolare mirata, soprattutto considerando che circa il 30% dei pazienti (55 su 162) presenta un'età di insorgenza inferiore ai 65 anni.

Per tali motivazioni, si è ritenuto necessario implementare il progetto mediante l'introduzione di criteri diagnostici più mirati e lo sviluppo di un pannello NGS custom dedicato all'identificazione delle predisposizioni ereditarie ai disordini mieloidi.

La definizione di criteri diagnostici per il riconoscimento delle condizioni HMN, mediante l'integrazione di dati clinici, familiari e genetici, rappresenta un passaggio fondamentale per guidare in maniera efficace la selezione dei pazienti candidati a test genetici avanzati. Questo approccio ha l'obiettivo di ridurre i falsi negativi e ottimizzare l'impiego delle risorse cliniche.

L'implementazione, nella pratica di laboratorio, di un pannello NGS custom e l'utilizzo di campioni alternativi, come i linfociti T, dimostrano la fattibilità di questo iter diagnostico anche nella routine laboratoristica. La copertura degli esoni target ($\geq 95\%$) e l'elevata riproducibilità inter-run dei parametri qualitativi delle analisi NGS confermano la robustezza tecnica e il potenziale utilizzo clinico di routine del pannello.

I linfociti T isolati si sono confermati come una fonte alternativa valida al DNA derivato dal sangue periferico per la rilevazione delle varianti germinali, soprattutto nei soggetti non sottoposti a trapianto o in quelli con chimerismo completo. Essendo cellule derivate dalla linea mieloide/linfocitaria primordiale e non direttamente coinvolte nel clone neoplastico, i linfociti T forniscono un substrato biologico affidabile per valutare lo stato germinale delle varianti. Mentre la saliva, pur risultando non idonea a causa dell'elevata contaminazione da cloni neoplastici, può rappresentare un'alternativa non invasiva utile per screening preliminari, facilitando così il follow-up dei familiari.

Il numero limitato di campioni analizzati rendono i dati presentati sufficienti per una validazione preliminare ma non risultano rappresentativi di una validità clinica.

8.2 Impatto dello studio nella pratica diagnostica di laboratorio

Questo studio rappresenta una valutazione *proof of concept* preliminare all'introduzione in pratica clinica di un percorso medico-diagnostico che implica un profondo cambiamento di paradigma. Come descritto nel capitolo introduttivo, i progressi nelle tecnologie di sequenziamento di nuova generazione hanno significativamente aumentato la capacità di analisi e la quantità di informazioni genetiche disponibili. Tuttavia, tali tecnologie hanno comportato anche un incremento dei tempi di elaborazione, dei costi e soprattutto della complessità interpretativa, rispetto alle indagini monogeniche o mirate a singoli *hot-spot*. Le analisi NGS possono, infatti, produrre risultati inattesi o di difficile interpretazione, come la rilevazione di varianti in geni "secondari" o "incidental" rispetto al pannello somatico richiesto. Questi risultati possono rappresentare una sfida per i medici richiedenti, che talvolta non dispongono delle esperienze necessarie per interpretare correttamente i dati nel contesto di un'indagine somatica e per comunicarli in modo appropriato ai pazienti.

Approcciarsi all'analisi genetico-costituzionale in ambito ematologico rende pertanto necessaria l'adozione del concetto di "*Mainstreaming Cancer Genetics-MCG*", che si riferisce all'integrazione delle consulenze genetico-oncologiche nella pratica clinica, consentendo agli specialisti oncologi ed ematologi di prescrivere e comunicare direttamente i risultati dei test genetici, senza il coinvolgimento sistematico di un genetista. Questa strategia ha il vantaggio di accelerare le decisioni terapeutiche, in particolare nei pazienti con malattia avanzata, riducendo i tempi e i costi associati ai rinvii a consulenza genetica. Tuttavia, comporta anche l'assunzione, da parte dei clinici, di responsabilità tradizionalmente attribuite ai genetisti, incluso il delicato processo di consenso e consulenza pre- e post-test e la gestione dei risultati dei test genetici, soprattutto in presenza di varianti a significato incerto (VUS).

Come passaggio iniziale verso questo nuovo approccio, lo sviluppo dello studio ha portato all'introduzione in pratica clinica di strumenti documentali quali la nota informativa e il consenso informato, indispensabili per comunicare in maniera chiara e trasparente ai pazienti i rischi e le implicazioni di un eventuale reperto genetico costituzionale [70].

Il consenso informato costituisce una componente essenziale della pratica etica, sia clinica sia di ricerca; la sua applicazione presuppone la capacità e la volontà del soggetto di sottoporsi al test, la comprensione dei benefici e dei limiti e la consapevolezza della possibilità di risultati incidentali.

In ambito ematologico, l'autorizzazione al test genetico può essere estesa anche alle analisi somatiche, poiché molti geni inclusi nei pannelli NGS hanno un ruolo sia germinale sia somatico e, in questi casi, non è sempre possibile disporre di un tessuto sano di confronto. L'introduzione del consenso informato rivolto al rischio di risultati con implicazione eredo-familiari rappresenta inoltre una formale giustificazione per segnalare nei referti diagnostici di laboratorio varianti potenzialmente germinali a seguito di un'indagine di tipo somatico, senza prescindere dal concetto fondamentale che l'integrazione del dato somatico e genetico richiede un'attenta distinzione nell'interpretazione delle varianti [71; 72].

L'estensione dell'analisi agli aspetti genetici costituzionali ha comportato un perfezionamento significativo nell'interpretazione dei referti somatici, introducendo nella pratica diagnostica la possibilità di segnalare varianti che potrebbero richiedere un test germinale di conferma o un percorso diagnostico dedicato [73].

9. Discussione e conclusioni: rilevanza del progetto per la medicina personalizzata in ematologia

Nel presente progetto si è affrontato l'approccio diagnostico delle forme ereditarie di MDS, MPN e LAM, integrando aspetti clinici, genetici e bioinformatici.

I risultati emersi possono presentare rilevanti implicazioni per la pratica clinica, contribuendo a:

- Migliorare la diagnosi precoce delle forme ereditarie, riducendo il rischio di evoluzione leucemica non identificata;
- Ottimizzare la selezione del donatore familiare per il trapianto di CSE;
- Supportare una gestione clinica personalizzata, basata sulle caratteristiche genetiche specifiche di ciascun paziente.

La complessità diagnostica delle forme ereditarie di MDS, MPN e LAM ha reso necessaria l'implementazione di un algoritmo diagnostico utile a standardizzare il processo decisionale, migliorando la sensibilità e specificità dell'identificazione dei pazienti a rischio.

L'integrazione della valutazione della componente eredo familiare nella diagnosi e gestione delle neoplasie mieloidi, rappresenta un approccio promettente in termini di medicina di precisione e preventiva. La sua applicazione diffusa richiede tuttavia adeguamenti normativi e infrastrutturali, una formazione mirata degli operatori coinvolti e una corretta informazione dei pazienti. L'espansione del sequenziamento germinale solleva questioni etiche di particolare rilievo, tra cui la gestione del rischio aumentato di sviluppo di una condizione ematologica nei soggetti asintomatici, il diritto alla non conoscenza e la tutela dei dati genetici personali. In particolare, l'identificazione di mutazioni germinali in pazienti adulti comporta implicazioni familiari significative, rendendo indispensabile un approccio comunicativo sensibile e multidisciplinare, nel quale il counselling genetico-ematologico riveste un ruolo centrale.

Si riconoscono, infine, alcuni limiti legati principalmente alla dimensione ridotta dei dati di validazione, alla necessità di approfondimenti funzionali e di studi di segregazione familiare per le varianti di significato sconosciuto. Siamo consapevoli che questo studio rappresenta un contributo preliminare all'analisi delle forme ereditarie di neoplasie mieloidi e costituisce un primo passo verso uno scenario più ampio che dovrà essere esplorato nei prossimi anni. Tuttavia, l'impiego combinato di un algoritmo diagnostico, di un pannello NGS custom e dell'analisi di tessuti alternativi rappresenta un passo significativo verso la standardizzazione della diagnostica genetica in ematologia. Il progetto offre un modello riproducibile che presenta un potenziale impatto significativo sulla pratica clinica e sulla medicina di

precisione, contribuendo ad una migliore identificazione dei pazienti a rischio e a strategie terapeutiche più sicure ed efficaci.

10. Riferimenti Bibliografici

1. Papaemmanuil E, et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2016;374(23):2209–2221.
2. Goldberg SL, et al. Incidence and clinical complications of myelodysplastic syndromes among United States Medicare beneficiaries. *J Clin Oncol*. 2010;28(17):2847–2852.
3. Godley LA, et al. Genetic predisposition to hematologic malignancies: Management and surveillance. *Blood*. 2017;130(4):424–432.
4. Arber DA, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391–2405.
5. Khoury JD, et al. The 5th edition of the World Health Organization classification of haematolymphoid tumours: Myeloid and histiocytic/dendritic neoplasms. *Leukemia*. 2022;36(7):1703–1719.
6. Alter BP, et al. Fanconi anemia and the development of leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2014;27(3–4):214–221.
7. Dale DC, et al. Severe chronic neutropenia: Treatment and follow-up of patients in the Severe Chronic Neutropenia International Registry. *Am J Hematol*. 2003;72(2):82–93.
8. Dokal I, et al. Dyskeratosis congenita in all its forms. *Br J Haematol*. 2000;110(4):768–779.
9. Myers KC, et al. Variable clinical presentation of Shwachman-Diamond syndrome: Update from the North American Shwachman-Diamond Syndrome Registry. *J Pediatr*. 2014;164(4):866–870.
10. Zhang J, et al. Germline mutations in predisposition genes in pediatric cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(24):2336–2346.
11. Lu C, et al. Patterns and functional implications of rare germline variants across 12 cancer types. *Nat Commun*. 2015;6:10086.
12. Polprasert C, et al. Inherited and somatic defects in DDX41 in myeloid neoplasms. *Cancer Cell*. 2015;27(5):658–670.
13. Bernard E, et al. Molecular taxonomy of myelodysplastic syndromes and its clinical implications. *Blood*. 2024;144(15):1617–1632.
14. Arber DA, et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood*. 2022;140(11):1200–1228.
15. Thiele J, et al. The international consensus classification of myeloid neoplasms and acute leukemias: Myeloproliferative neoplasms. *Am J Hematol*. 2023;98(1):166–179.
16. Papaemmanuil E, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2013;122(22):3616–3627.

17. Haferlach T, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2014;28(2):241–247.
18. Döhner H, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*. 2022;140(12):1345–1377.
19. Fenwarth L, et al. Hereditary predisposition to acute myeloid leukemia in older adults. *Hemasphere*. 2021;5(4):e552.
20. Drazer MW, et al. How I diagnose and manage individuals at risk for inherited myeloid malignancies. *Blood*. 2016;128(14):1800–1813.
21. Kennedy AL, et al. Genetic predisposition to MDS: Clinical features and clonal evolution. *Blood*. 2019;133.
22. Bannon SA, et al. Hereditary predispositions to myelodysplastic syndrome. *Int J Mol Sci*. 2016;17.
23. Rafei H, et al. Hereditary myeloid malignancies. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2019;32(2):163–176.
24. Abelson S, et al. Prediction of acute myeloid leukaemia risk in healthy individuals. *Nature*. 2018;559:400–404.
25. Schaefer EJ, et al. Significance of clonal mutations in bone marrow failure and inherited MDS/AML predisposition syndromes. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2018;32:643–655.
26. Hartmann L, et al. Clonal hematopoiesis and preleukemia—Genetics, biology, and clinical implications. *Genes Chromosomes Cancer*. 2019;58:828–838.
27. Desai P, et al. Clonal hematopoiesis and therapy-related MDS/AML. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2019;32:13–23.
28. Tsai FD, et al. Clonal hematopoiesis in the inherited bone marrow failure syndromes. *Blood*. 2021;136:1615–1622.
29. Young AL, et al. Clonal hematopoiesis and risk of acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2019;104:2410–2417.
30. Desai P, et al. Clonal hematopoiesis and risk of acute myeloid leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2019;32:177–185.
31. Ferrando AA, et al. Clonal evolution in leukemia. *Nat Med*. 2017;23(10):1135–1145.
32. Sperling AS, et al. The genetics of myelodysplastic syndrome: From clonal hematopoiesis to secondary leukemia. *Nat Rev Cancer*. 2017;1:5–19.
33. Mandelker D, et al. Germline-focussed analysis of tumour-only sequencing: recommendations from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol*. 2019;30(8):1221–1231. doi:10.1093/annonc/mdz136.

34. Godley LA, et al. Germline predisposition in hematologic malignancies: Testing, management, and implications. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2024;44(3):e432–e218.
35. Furutani E, et al. Germline genetic predisposition to hematologic malignancy. *J Clin Oncol*. 2017;35(9):1018–1028.
36. Baliakas P, et al. Nordic guidelines for germline predisposition to myeloid neoplasms in adults: recommendations for genetic diagnosis, clinical management and follow-up. *Hemasphere*. 2019;3(6):e321.
37. Speight B, et al. Germline predisposition to haematological malignancies: Best practice consensus guidelines from the UK Cancer Genetics Group (UKCGG), CanGene-CanVar and the NHS England Haematological Oncology Working Group. *Br J Haematol*. 2023;201(1):25–34.
38. Jerez J, et al. Unraveling germline predisposition in hematological neoplasms: Navigating complexity in the genomic era. *Blood Rev*. 2024;64:101143.
39. Rio-Machin A, et al. The complex genetic landscape of familial MDS and AML reveals pathogenic germline variants. *Nat Commun*. 2020;11(1):1044.
40. University of Chicago Hematopoietic Malignancies Cancer Risk Team, et al. How I diagnose and manage individuals at risk for inherited myeloid malignancies. *Blood*. 2016;128(14):1800–1813.
41. Clark A, et al. Management of patients with germline predisposition to haematological malignancies considered for allogeneic blood and marrow transplantation: Best practice consensus guidelines from the UK Cancer Genetics Group (UKCGG), CanGene-CanVar, NHS England Genomic Laboratory Hub (GLH) Haematological Malignancies Working Group and the British Society of Blood and Marrow Transplantation and cellular therapy (BSBMTCT). *Br J Haematol*. 2023;201(1):35–44.
42. Schlegelberger B, et al. Review of guidelines for the identification and clinical care of patients with genetic predisposition for hematological malignancies. *Fam Cancer*. 2021;20(4):295–303.
43. Shim V, et al. Mainstream germline genetic testing with expanded eligibility for early breast cancer patients in a large integrated health system. *Ann Surg Oncol*. 2025;32(1):75–83.
44. Coiteux V, et al. Management of genetic predisposition to hematologic malignancies in patients undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation (HCT): Guidelines from the SFGM-TC. *Bull Cancer*. 2023;110(2S):S13–S29.
45. Richards S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17:405–423.
46. Garrett A, et al. Classification of variants of reduced penetrance in high-penetrance cancer susceptibility genes: Framework for genetics clinicians and clinical scientists by CanVIG-UK (Cancer Variant Interpretation Group-UK). *Genet Med*. 2025;27(2):101305.

47. Gurnari C, et al. Germline predisposition traits in allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for myelodysplastic syndromes: a survey-based study and position paper on behalf of the Chronic Malignancies Working Party of the EBMT. *Lancet Haematol*. 2023;10(12):e994-e1005.
48. Xiao H, et al. First report of multiple CEBPA mutations contributing to donor origin of leukemia relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2011;117(19):5257–5260.
49. Berger G, et al. Re-emergence of acute myeloid leukemia in donor cells following allogeneic transplantation in a family with a germline DDX41 mutation. *Leukemia*. 2017;31(2):520–522.
50. Galera P, et al. Donor-derived MDS/AML in families with germline GATA2 mutation. *Blood*. 2018;132(18):1994–1998.
51. Williams LS, et al. Donor-derived malignancy and transplantation morbidity: Risks of patient and donor genetics in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplant Cell Ther*. 2024;30(3):255–267.
52. Deshmukh KG, et al. Lessons learned from donor cell-derived myeloid neoplasms: Report of three cases and review of the literature. *Life (Basel)*. 2022;12(4):559.
53. Li MM, et al. Standards and guidelines for the interpretation and reporting of sequence variants in cancer: A joint consensus recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn*. 2017;19(1):4–23. doi:10.1016/j.jmoldx.2016.10.002.
54. Tettero JM, et al. Acute myeloid leukemia: does sex matter? *Leukemia*. 2024;38(11):2329–2331.
55. Kamphuis P, et al. Sex differences in the spectrum of clonal hematopoiesis. *Hemasphere*. 2023;7(2):e832.
56. Romine KA, et al. Rise of the clones: Myelodysplastic syndrome to secondary acute myeloid leukemia. *Blood Cancer Discov*. 2022;3(4):270–272.
57. Stewart BL, et al. Risk assessment and genetic counseling for hematologic malignancies—Practice resource of the National Society of Genetic Counselors. *J Genet Couns*. 2025;34(2):e1959.
58. Greenberg PL, et al. NCCN Guidelines® Insights: Myelodysplastic Syndromes, Version 3.2022. *J Natl Compr Canc Netw*. 2022;20(2):106–117.
59. Fenwarth L, et al. Hereditary predisposition to acute myeloid leukemia in older adults. *Hemasphere*. 2021;5(4):e552.
60. Ana Rio-Machin et al. The complex genetic landscape of familial MDS and AML reveals pathogenic germline variants. *Nat Commun*. 2020;11:1044.
61. Hamidi A, et al. Clinical guideline variability in the diagnosis of hereditary hematopoietic malignancy syndromes. *Leuk Lymphoma*. 2023;64(9):1562–1565.

62. Kuzbari Z, et al. Germline-focused analysis of tumour-detected variants in 49,264 cancer patients: ESMO Precision Medicine Working Group recommendations. *Ann Oncol*. 2023;34(3):215–227. doi:10.1016/j.annonc.2022.12.003.
63. Gillis N, et al. Clinical impact of clonal hematopoiesis in hematopoietic cell transplantation: a review, meta-analysis, and call to action. *Haematologica*. 2024;109(12):3952–3964. doi:10.3324/haematol.2024.285392.
64. Beer A, et al. A rare PALB2 germline variant causing G2/M cell cycle arrest is associated with isolated myelosarcoma in infancy. *Mol Genet Genomic Med*. 2021;9(9):e1746.
65. Li Z, et al. Potential influence of hematological or immunological hereditary predisposition genes on the outcomes of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with hematological malignancies. *Blood*. 2019;134(Suppl_1):2037.
66. Riddle L, et al. The role of polygenic risk scores in breast cancer risk perception and decision-making. *J Community Genet*. 2023;14(5):489–501.
67. Mulherkar N, et al. What is the role of the bone marrow microenvironment in AML? *Best Pract Res Clin Haematol*. 2021;34(4):101328.
68. Pimenta DB, et al. The bone marrow microenvironment mechanisms in acute myeloid leukemia. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:764698.
69. Xie X, et al. Clonal hematopoiesis and bone marrow inflammation. *Transl Res*. 2023;255:159–170.
70. Marron JM, et al. Informed consent for genetic testing in hematology. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2020;2020(1):213–218.
71. van de Haar J, et al. ESMO recommendations on clinical reporting of genomic test results for solid cancers. *Ann Oncol*. 2024;35(11):954–967.
72. Garrett A, et al. Combining evidence for and against pathogenicity for variants in cancer susceptibility genes: CanVIG-UK consensus recommendations. *J Med Genet*. 2021;58(5):297–304. doi:10.1136/jmedgenet-2020-107248.
73. Christinat Y, et al. Reporting of somatic variants in clinical cancer care: recommendations of the Swiss Society of Molecular Pathology. *Virchows Arch*. 2024;485(6):1033–1039. doi:10.1007/s00428-024-03951-0.