



open access journal - supplement 1, 2009

pediatric **reports**

eISSN 2036-7503 | www.pagepress.org/pr

Primo Workshop

AIEOP... in Lab

Milano, 22-23 ottobre 2009



PEDIATRIC REPORTS is an Open Access, peer-reviewed journal which publishes research articles, reviews, and case reports regarding all disorders and diseases in neonates, children and adolescents, as well as related molecular genetics, pathophysiology, and epidemiology.

Editor-in-Chief
Maurizio Aricò, Florence, Italy

Editorial Staff
Anne Freckleton, Managing Editor
Cristiana Poggi, Production Editor
Filippo Lossani, Technical Support

All PAGEPress journals are Open Access. PAGEPress articles are freely available online and deposited in a public archive immediately upon publication. You are free to copy, distribute, and reuse PAGEPress content as long as you credit the original author and source.

PEDIATRIC REPORTS is published by PAGEPress Publications, a division of MeditGroup and is completely free online at www.pagepress.org. Publishing costs are offset by a publication fee charged to authors.

Copyright Information
All works published in PAGEPress journals are subject to the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) unless otherwise noted. Copyright is retained by the authors. Any non-commercial reuse is permitted if the original author and source are credited.

Correspondence
Our publishing offices are located in via Giuseppe Belli 4, 27100 Pavia, Italy. Our telephone number is +39.0382.1751762 and our fax number is +39.0382.1750481. E-mail: info@pagepress.org

For more information and manuscript submission please go to <http://www.pagepress.org/pr>

Primo Workshop

AIEOP... in Lab

Milano, 22-23 ottobre 2009

Pediatric Reports 2009
[volume 1]
[supplement 1]

Indice

Leucemie Acute.....	1
Nuovi Farmaci	
Terapie Cellulari.....	21
Insufficienze Midollari.....	29
Tumori cerebrali.....	34

Primo Workshop

AIEOP.. in Lab

Milano, 22-23 ottobre 2009

LEUCEMIE ACUTE

02

UN CASO DI SINDROME MIELODISPLASTICA CON TRISOMIA DEL CROMOSOMA 21 IN UNA PAZIENTE CON MICRODELEZIONE COSTITUZIONALE DEL CROMOSOMA 21Q22

I. Caliendo,¹ R. Di Concilio,² P. Danise,³ A. Guerriero,⁴ A. M. Aurino,² M. Amendolara,² G. D'Urzo,² L. Luciano,⁴ M. Ingenito,¹ G. Amendola

¹Laboratorio di Genetica Molecolare e Citogenetica, ²U.O.C Di Pediatria-TIN e ³U.O. di Diagnostica Ematologica, Ospedale "Umberto I", Nocera Inferiore (SA), ⁴U.O.C di Ematologia, Università "Federico II", (NA)

Introduzione. Numerosi studi hanno dimostrato che le alterazioni cromosomiche e genomiche acquisite e costituzionali che determinano l'attivazione di oncogeni o l'aploinsufficienza di geni onco-soppressori, sono alla base dei meccanismi patogenetici del cancro. Il riscontro frequente di trisomia del cromosoma 21 nelle mielodisplasie (MDS) e nelle leucemie mieloidi acute (AML) e l'alta incidenza di leucemia acuta in soggetti con sindrome di Down suggeriscono che alcuni geni, tra i quali il *RUNX1/AML1*, localizzati sul cromosoma 21 possano svolgere un particolare ruolo nel processo di leucemogenesi e dell'emopoiesi. Viene descritto il caso clinico di una paziente con piastrinopenia sindromica, ritardo psicomotorio, microcefalia e bassa statura che ha sviluppato una MDS all'età di diciassette anni. Le indagini eseguite, con tecniche di citogenetica convenzionale e di citogenetica molecolare ci hanno permesso di definire che la paziente è portatrice di una microdelezione costituzionale a carico del braccio lungo del cromosoma 21, che coinvolge il gene *RUNX1*, e che le metafasi del clone displastico sono caratterizzate dalla trisomia del cromosoma 21.

Materiali e metodi. Al momento della diagnosi con le cellule del midollo osseo della paziente sono state allestite colture a breve termine, mentre dal sangue periferico sono state allestite colture a 72 ore stimolate con fittoemoagglutinina (PHA). Le metafasi ottenute dalle colture sono state sottoposte a bandeggio GTG e il cariotipo è stato descritto secondo l'ISCN (*International System for Human Cytogenetic Nomenclature 2005*). La sospensione di cellule fissate dell'aspirato midollare è stata utilizzata anche per l'indagine FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*) che è stata eseguita con sonda locus specifica, LSI *AML1/ETO* Dual Color, Dual Fusion translocation probe (Abbott), per il gene *ETO* e *RUNX1*. Il DNA della paziente estratto dal sangue periferico è stato analizzato mediante la tecnica array-CGH (*array-Comparative Genomic Hybridization*). L'analisi è stata effettuata utilizzando il kit Agilent Human Genom CGH Microarray 44B, costituito da vetrini contenenti circa 43,000 sonde oligonucleotidiche con una risoluzione spaziale media di circa 75kb.

Risultati finali. L'analisi di 20 metafasi, ottenute dall'aspirato midollare della paziente, ha evidenziato il seguente cariotipo: 46,XX[14]/47,XX,+21[6], mentre dal sangue periferico sono state analizzate 20 metafasi tutte con normale assetto cromosomico 46,XX. Con l'array-CGH è stato dimostrato che nel DNA della paziente è presente una microdelezione costituzionale *de novo* sul cromosoma 21. Tale delezione interstiziale è di circa 4,4Mb (Megabasi) ed ha *break-points* localizzati in 21q22.11 e in 21q22.12. La del(21)(q22.11q22.12) include i seguenti geni malattia: *MRAP*, *IFNAR2*, *IFNGR2*, *KCNE2*, *KCNE1* e *RUNX1*. L'indagine FISH ci ha permesso di discriminare due tipi di pattern di segnali nelle cellule analizzate. Nel 60% di cellule sono stati visualizzati due segnali in rosso che corrispondono al gene *ETO* e un solo segnale in verde che corrisponde al gene *RUNX1*; nel 40% di cellule, invece, sono stati osservati due segnali in rosso e due segnali in verde. Il primo gruppo di cellule corrisponde a quelle

con cariotipo 46,XX ed è evidente un solo segnale in verde perché un cromosoma 21 è deletto. Il secondo gruppo di cellule corrisponde a quelle con cariotipo 47,XX,+21 e, quindi, i due segnali in verde sono determinati dalla trisomia del cromosoma 21. Questi risultati della FISH ci hanno permesso di stabilire anche che il terzo cromosoma 21 non presenta la delezione costituzionale della paziente.

Conclusioni. Sono stati descritti recentemente altri tre casi clinici, con delezione costituzionale della banda 21q22 e il coinvolgimento del gene *RUNX1*, caratterizzati anch'essi da piastrinopenia sindromica, ritardo psicomotorio e segni dismorfici. Uno dei tre pazienti ha sviluppato una AML all'età di sei anni. I nostri risultati rafforzano, quindi, la teoria che la trisomia del cromosoma 21 e il gene *RUNX1*, insieme ad altri geni non ancora identificati sul cromosoma 21, possano svolgere un'importante funzione nello sviluppo della piastrinopenia e della predisposizione a manifestare MDS/AML.

Bibliografia

1. Shinawi M, Erez A, Shardy DL, et al. Syndromic thrombocytopenia and predisposition to acute myelogenous leukemia caused by constitutional microdeletions on chromosome 21q. *Blood* 2008;112:1042-7.
2. Roche-Lestienne C, Deluche L, Corm S, et al. *RUNX1* DNA-binding mutations and *RUNX1-PRDM16* cryptic fusions in BCR-ABL+ Leukemias are frequently associated with secondary trisomy 21 and may contribute to clonal evolution and imatinib resistance. *Blood* 2008; 111:3735-41.
3. Malinge S, Izraeli S, Crispino JD. Insights into the manifestations, outcomes, and mechanisms of leukemogenesis in Down syndrome. *Blood* 2009;113: 2619-28.
4. Buijs, Arjan, University Medical Center Utrecht, Utrecht, Netherlands (P). Constitutional *RUNX1* deletion in non-syndromic thrombocytopenia; 21q22 ITS1 a candidate gene in mental retardation. 14th Congress of the EHA, June 4-7 2009, Berlin, Germany.

05

MOZ-CBP, UN RARO SOTTOTIPO DI LAM M5B IN UN ADOLESCENTE

S. Serravalle, F. Melchionda, A. Astolfi, V. Libri, R. Masetti, A. Pession

Oncologia ed Ematologia Pediatrica "Lalla Seràgnoli", Policlinico Sant'Orsola-Malpighi, Bologna

Introduzione. Le leucemie mieloidi acute (LAM) con traslocazione cromosomica t(8;16)(p11;p13) rappresentano un raro sottotipo di LAM caratterizzato da prognosi sfavorevole. L'analisi della letteratura indica che le LAM con t(8;16) costituiscono solo il 0.2-0.4% delle LAM *de novo*, mentre la maggior parte dei casi risulta essere secondaria a chemioterapia precedentemente eseguita (t-LAM). La traslocazione t(8;16) fonde il gene *MYST3/MOZ*, localizzato sul cromosoma 8p11, con il gene *CBP/CREBBP* sul cromosoma 16p13. Finora sono stati identificati nei pazienti adulti ed adolescenti sette varianti di trascritti di fusione MOZ-CBP.¹ Entrambi i geni codificano per proteine con attività di acetiltrasferasi istoniche e dal punto di vista molecolare questo riarrangiamento genera una proteina di fusione MOZ-CBP che inibisce la trascrizione regolata da *RUNX1*, portando ad un blocco del differenziamento. In tutti i geni di fusione di MOZ, la regione N-terminale è mantenuta mentre la regione C-terminale è sostituita con i *partners* di fusione, quale CBP. Entrambi i geni della t(8;16) sono coinvolti in altri riarrangiamenti bilanciati rari, tutti associati a LAM con prognosi infausta.² Nonostante lo scarso numero di casi descritti finora in letteratura, le LAM con t(8;16) possono essere classificate come un'entità distinta con uno specifico profilo clinico, citomorfologico e genetico.² Qui riportiamo il caso di una ragazza di 10 anni affetta da LAM M5b *de novo* con t(8;16) quale unica anomalia cromosomica.

Materiali e metodi. L'analisi citogenetica è stata effettuata secondo le tecniche standard per il bandeggio-G su cellule del midollo osseo mantenute in coltura per 48 ore. Sono state analizzate 20 metafasi. Il cariotipo è stato descritto secondo i criteri dell'*International System for human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN, 1995). L'ibridazione *in situ* fluorescente (FISH) è stata eseguita su interfasi e metafasi utilizzando due sonde a singolo clone BlueFISH (BlueGenome): una sonda per il gene MOZ (clone BAC RP11-313J18 marcato con fluorocromo di spettro rosso) ed una sonda che copre la regione del punto di rottura di CBP (clone BAC RP11-75P12 marcato in verde). Le immagini sono state analizzate utilizzando il siste-

ma Cytovision (Applied Imaging). L'RNA totale è stato estratto dalle cellule del midollo osseo del paziente utilizzando il kit RNeasy (Qiagen) ed è stato retrotrascritto a cDNA utilizzando la retrotrascrittasi inversa *Avian Myeloblastosis Virus* (Roche), seguendo il protocollo indicato dalla casa produttrice. La *Nested PCR* è stata effettuata come descritto da Schmidt *et al.*,³ utilizzando i primers esterni sull'esone 16 di *MYST3* (*MYST3_3536F*: 5'-CCTTTTGAAGATTCT-GACTCCG-3') e sull'esone 5 di *CBP* (*CBP_1201R*: 5'-GTTGCAATTGCTTGTG TGGGTAC-3') e i primers interni sull'esone 16 di *MYST3* (*MYST3_3558F*: 5'-GAGCCAATGCCAAGATTAGAAC-3') e sull'esone 3 di *CBP* (*CBP_404R*: 5'-CCTCGTAGAAGCTCCGACAGTT-3'). La sequenza nucleotidica del prodotto di PCR è stata ottenuta mediante sequenziamento su entrambi i filamenti utilizzando un sequenziatore automatico 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems). Il DNA genomico è stato marcato e ibridato al chip Mapping 250K Styl (Affymetrix, Santa Clara, CA) seguendo il protocollo della casa produttrice. L'analisi dei dati è stata eseguita utilizzando il software Partek Genomic Suite 6.4, mediante *genomic segmentation* ($p < 0.001$, > 5 marker) e LOH (max probability > 0.999) rispetto ad un pool di 90 controlli sani derivati dal progetto Hapmap.

Risultati e conclusioni. L'analisi del sangue periferico all'esordio mostrava il 23% di blasti, WBC 11000/mmc, HB 11,8g/dL, PLT 41000/mmc. Il midollo osseo era iperplastico con l'80% di blasti aventi morfologia ed immunofenotipo suggestivi per LAM sottotipo FAB M5b. L'analisi citomorfologica del midollo osseo ha mostrato mieloblasti mieloperossidasi positivi ed ha evidenziato numerosi fenomeni di eritrofagocitosi. L'analisi citogenetica all'esordio della malattia ha rivelato un cariotipo anormale 46,XX, t(8;16)(p11;p13) in tutte le metafasi analizzate. Lo studio citogenetico ha identificato questo riarrangiamento come l'unica anomalia cromosomica. Il riarrangiamento genomico dei geni MOZ e di CBP è stato confermato usando la tecnica FISH. L'analisi molecolare RT-PCR sull'RNA del paziente ha rilevato il trascritto di MOZ-CBP di tipo I ed il sequenziamento ha confermato la fusione *in frame* fra l'esone 16 di MOZ e l'esone 3 di CBP. Per identificare altri eventi oncogenici, oltre alla traslocazione t(8;16), potenzialmente coinvolti nella leucemogenesi, è stato svolto uno studio di *genotyping* sui blasti delle cellule leucemiche alla diagnosi utilizzando la tecnica degli SNP array Affymetrix. Le analisi di *Loss of Heterozygosity* (LOH) e di *Copy Number Variation* (CNV) hanno mostrato l'assenza completa di tutti gli eventi di LOH o guadagni o perdite crip-

tiche di materiale genomico, oltre alle regioni fisiologiche di CNV. La paziente è stata sottoposta a chemioterapia di induzione secondo il protocollo nazionale per la leucemia mieloide acuta pediatrica (AIEOP AML 2002/01) che include due cicli ICE (idarubicina, citarabina, etoposide). Alla fine del primo ciclo ICE è stato possibile documentare lo stato di remissione ematologica completa sia in morfologia che mediante biologia molecolare/FISH. Durante il secondo ICE la paziente ha manifestato tossicità epatica di grado IV WHO ed ematologica di grado III WHO, con quadro clinico e laboratoristico caratterizzato da spiccata emolisi, iperbilirubinemia a prevalenza diretta ed epatomegalia, che rapidamente hanno condotto alla morte la paziente. L'esame autoptico non ha permesso di identificare una causa di tale tossicità. Nonostante in letteratura sia riportata una scadente risposta alla chemioterapia delle LAM t(8;16), la nostra paziente ha raggiunto prontamente la remissione ematologica. Purtroppo la fatale tossicità sviluppata non ha permesso di sottoporre la paziente a trapianto allogenico, terapia che potrebbe migliorare la prognosi dei pazienti con LAM t(8;16). La caratterizzazione delle alterazioni genetiche nei pazienti pediatrici con LAM t(8;16) potrebbe essere fondamentale per la generazione di farmaci ad azione mirata a livello molecolare, che in futuro potrebbero migliorare il decorso clinico e la prognosi di questi pazienti.

Bibliografia

1. Terui K et al. Two novel variants of MOZ-CBP fusion transcripts in spontaneously remitted infant leukemia with t(1;16;8)(p13;p13;p11), a new variant of t(8;16)(p11;p13). *Haematologica* 2008; 93:591-3.
2. Haferlach, T, et al. AML with translocation t(8;16)(p11;p13) demonstrates unique cytomorphological, cytogenetic, molecular and prognostic features. *Leukemia* 2009;23:934-43.
3. Schmidt HH, et al. RT-PCR and FISH analysis of acute myeloid leukemia with t(8;16)(p11;p13) and chimeric MOZ and CBP transcripts: breakpoint cluster region and clinical implications. *Leukemia* 2004;18:1115-21.

10

SIGNIFICATO CLINICO DEL MONITORAGGIOLABORATORISTICO ATTRAVERSO REVERSE TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN REACTION IN PAZIENTI PEDIATRICI AFFETTI DA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA TEL-AML1 POSITIVA

W. Morello, V. Libri, F. Melchionda, A. Pession

Oncoematologia Pediatrica "Lalla Seràgnoli"

gnoli", Policlinico Sant'Orsola-Malpighi, Bologna

Introduzione. Il monitoraggio dello stato di malattia attraverso marcatori molecolari consente di verificare la reale risposta al trattamento, di differenziare il successivo percorso terapeutico o di identificare precocemente una recidiva (REC) di malattia. Esempi di uso consolidato di marcatori molecolari in ambito oncologico sono il monitoraggio della malattia residua minima (MRM) nelle leucemie linfoblastiche acute (LAL), la ricerca del trascritto PML/RAR α nelle leucemie acute promielocitiche (LAP) e quella del trascritto BCR-ABL nella leucemia mieloide cronica (LMC). La t(12;21) è la traslocazione più frequentemente riscontrata nelle B-LAL pediatriche, identificata in circa il 25% dei casi. La sua presenza alla diagnosi (D) costituisce un fattore prognostico positivo in termini di sopravvivenza e risposta al trattamento. Studi effettuati su gemelli omozigoti ed analisi retrospettive su *screening* neonatali hanno evidenziato come la t(12;21) ed il suo prodotto di traslocazione TEL-AML1 siano presenti già in utero e possano persistere per anni, clinicamente silenti. Si ipotizza essa rappresenti un primo evento in un processo *multi-step* in cui l'insorgenza di ulteriori anomalie genetiche conduca allo sviluppo finale della LAL.

L'espressione di TEL-AML1 in precursori emopoietici umani isolati da sangue cordonale è stata associata all'espansione di una popolazione staminale con fenotipo caratteristico (CD34⁺/CD38⁻/CD19⁻) e vantaggio di crescita selettivo in presenza di TGF β .¹ Popolazioni cellulari con immunofenotipo CD34⁺/CD38⁻/CD19⁻, ottenute da pazienti pediatrici affetti da LAL, sono capaci di indurre LAL *in vivo* su modelli di xenotrapianti in topi NOD/SCID/IL2r γ^{null} .² Una popolazione di cellule staminali con tali caratteristiche potrebbe rappresentare un clone cellulare pre-leucemico a rischio di trasformazione neoplastica.

Materiali e metodi. Allo scopo di verificare se la presenza del prodotto di trascrizione TEL-AML1 in pazienti con LAL t(12;21)⁺ e in remissione completa (RC) possa rappresentare una REC molecolare o identificare un gruppo di pazienti a più alto rischio di REC, abbiamo analizzato i dati relativi a 25 pazienti affetti da LAL t(12;21)⁺, alla D (20 casi) o alla REC (5 casi), trattati presso il nostro Istituto dal febbraio 2004 al luglio 2009. I pazienti sono stati trattati secondo il protocollo AIEOP LAL 2000/LAL R2006 in caso di nuova D e AIEOP LAL-REC 2003 in caso di REC, una paziente di età inferiore ad 1 anno è stata trattata secondo protocollo AIEOP Interinfant 99. 7/25 pazienti sono stati sottoposti a trapianto di cellule staminali emopoietiche (TCSE) allogenico.

Campioni di sangue midollare (BM) ottenuti alla D o REC, ed a ogni successivo controllo BM, sono stati testati mediante *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR), sia in *first*- che in *nested*-PCR, per l'amplificazione del trascritto di fusione TEL-AML1.³ I campioni di BM sono stati ottenuti ed analizzati fino allo stop terapeutico, a circa 24 mesi dalla D per i pazienti non sottoposti a TCSE e non recidivati; fino all'ultimo BM eseguito in base allo schema di *follow-up* negli altri casi. I dati relativi allo stato di malattia sono stati raccolti fino a luglio 2009, con un tempo di osservazione mediano (min-max) di 49 (29-65) mesi dalla D o REC. Il riscontro di TEL-AML1 nei BM, così analizzati, non ha modificato il successivo iter terapeutico.

Risultati. Al termine del *follow-up* 21/25 pazienti sono vivi ed in RC, 2/25 sono recidivati ed attualmente vivi in seconda e terza RC, 2/25 sono deceduti dopo REC, a distanza di 9 e 17 mesi, rispettivamente. Dei pazienti in RC 3/21 hanno mostrato livelli riscontrabili di TEL-AML1 fino all'ultimo BM; 13/21 hanno dimostrato positività per TEL-AML1 in alcuni dei campioni analizzati, non confermate in tutti i controlli; 5/21 pazienti si sono dimostrati stabilmente negativi dopo RC. I due pazienti deceduti non hanno mostrato positività per il trascritto TEL-AML1 precedenti alla REC. In entrambi i casi la REC si è dimostrata negativa per la t(12;21) sia attraverso RT-PCR che tramite *fluorescent in situ hybridization* (FISH). I due pazienti recidivati ed attualmente in RC hanno mostrato livelli evidenziabili di TEL-AML1 (confermati in tutti i controlli in un caso, positivi solo in alcuni campioni nell'altro) nei controlli BM precedenti alla REC; in entrambi i pazienti la REC è risultata t(12;21)⁺. Dopo aver acquisito una nuova RC i successivi controlli mediante RT-PCR sono risultati positivi solo in alcuni dei BM analizzati. Complessivamente 18/25 pazienti (di cui 5/7 sottoposti a TCSE) hanno mostrato, almeno ad un controllo BM, livelli evidenziabili di TEL-AML1 tramite RT-PCR durante RC. Di questi, al termine del *follow-up*, solo 2/18 sono clinicamente recidivati.

Conclusioni. Il nostro è il primo studio che indaga il ruolo clinico del monitoraggio tramite RT-PCR per TEL-AML1 in un gruppo numeroso di pazienti con LAL t(12;21)⁺. I dati ottenuti permettono di escludere che la presenza del trascritto TEL-AML1 in BM di pazienti affetti da LAL t(12;21)⁺ ed in RC rappresenti una REC molecolare. Ciò appare in linea con quanto precedentemente osservato su una coorte di 5 pazienti⁴ e con il ruolo ipotizzato per la t(12;21), quale primo evento nel successivo percorso di leucemogenesi. Data la caratteristica peculiare delle LAL t(12;21)⁺ di recidivare a

distanza di diversi anni dalla D, solo il successivo *follow-up* a lungo termine potrà chiarire se i 18 pazienti TEL-AML1⁺ ed in RC sono a maggior rischio di REC. La ricerca attraverso RT-PCR di TEL-AML1, a differenza della MRM, non individuerebbe cellule leucemiche resistenti alla terapia, ma la persistenza di un clone pre-leucemico a rischio potenziale di trasformazione neoplastica. Le positività per TEL-AML1 evidenziate in alcuni dei nostri pazienti e non confermate a tutti i controlli successivi potrebbero essere legate alla presenza di un clone scarsamente rappresentato, persistente nonostante la polichemioterapia effettuata, forse proprio perché privo delle caratteristiche di malignità su cui agiscono la maggior parte dei farmaci anti-neoplastici. Il clone pre-leucemico inoltre, non sembra essere eradicato nemmeno da una chemioterapia ad alte dosi o dal possibile effetto *graft versus leukemia* (GVL) di un TCSE allogenico. Secondo tale ipotesi il clone cellulare, potenzialmente identificabile all'immunofenotipo come CD34⁺/CD38⁻/CD19⁻, persisterebbe durante lo sviluppo della LAL t(12;21)⁺ che ne deriva, rimanendo identificabile anche in tempi successivi. Per confermare tale ipotesi, determinando la presenza di tale popolazione cellulare, intendiamo in futuro effettuare una valutazione con immunofenotipo su ogni BM risultato positivo attraverso RT-PCR per TEL-AML1 ed in RC. Un approfondimento tramite FISH, eventualmente mirato su cellule purificate in base all'espressione contemporanea di CD34 e CD19, potrebbe identificare sia la presenza della t(12;21) che l'eventuale perdita dell'altro allele TEL; i risultati potrebbero essere utili non solo per il *follow-up* di questi pazienti, ma anche per la caratterizzazione dei primi eventi necessari per lo sviluppo della leucemia.

Bibliografia

1. Ford AM, Palmi C, Bueno C, et al. The TEL-AML1 leukemia fusion gene dysregulates the TGF-beta pathway in early B lineage progenitor cells. - *J Clin Invest* 2009;119:826-36.
2. Kong Y, Ishikawa F, et al. CD34⁺CD38⁻CD19⁺ as well as CD34⁺CD38⁻CD19⁺ cells are leukemia-initiating cells with self-renewal capacity in human B-precursor ALL. *Leukemia* 2008;22:1207-13.
3. van Dongen JJM, Biondi A. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcript from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1999; 13: 1901-28
4. Endo C, Oda M, Nishiuchi R, Seino Y. Persistence of TEL-AML1 transcript in acute lymphoblastic leukemia in long-term remission. *Pediatr Int* 2003;45:275-80.

11

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE E FUNZIONALE DELLE ALTERAZIONI DEL GENE PAX5 NELLA LAL PEDIATRICA

G. Fazio,¹ L. Impera,² A. Leszl,³
M. Giordan,³ V. Cazzaniga,¹ I. Brunati,¹
C. Palmi,¹ C. Storlazzi,² M. Rocchi,²
G. Basso,³ G. te Kronnie,³ A. Rolink,⁴
A. Biondi,¹ G. Cazzaniga¹

¹Centro Ricerca M. Tettamanti, Clinica Pediatrica Università di Milano-Bicocca, Monza, Italy; ²Dipartimento di Genetica e Microbiologia, Università degli Studi di Bari; ³Clinica Pediatrica Università Padova, Italy; ⁴University of Basel, Switzerland

Introduzione. Il gene *PAX5* (o *BSAP*) appartiene alla famiglia dei fattori di trascrizione dei geni *PAX* ed è essenziale per lo sviluppo ed il differenziamento dei linfociti B, dove esso agisce sia da attivatore che da repressore della trascrizione di numerosi geni coinvolti nel differenziamento di specifici tipi cellulari ematopoietici. Recentemente, il gene *PAX5* è stato descritto come frequente bersaglio di anomalie genetiche di vario tipo in casi pediatrici di LAL dei precursori delle cellule B, suggerendo che queste alterazioni possano risultare nell'aploinsufficienza del gene. *PAX5* è implicato in un numero crescente di traslocazioni cromosomiche in pazienti affetti da LAL-B, che danno origine ad una varietà di trascritti di fusione, i cui geni *partner* codificano per proteine con ruoli diversi, quali fattori di trascrizione, proteine strutturali, proteine ad attività chinasi o con funzione non nota. La traslocazione più frequente è associata al gene di fusione *PAX5/TEL*, che coinvolge due dei più importanti fattori di trascrizione del sistema ematopoietico, entrambi con un ruolo chiave del differenziamento dei linfociti B. Nonostante la frequente identificazione di tali traslocazioni, la loro attività funzionale nella leucemogenesi è ancora poco compresa. Il presente studio ha lo scopo di caratterizzare le funzioni delle aberrazioni genetiche che coinvolgono il gene *PAX5*, che potenzialmente hanno un forte impatto sia nella comprensione di eventi di trasformazione che portano alla leucemia, sia nell'identificazione di nuovi meccanismi, che possono costituire un bersaglio di specifici farmaci. In primo luogo, allo scopo di identificare nuove lesioni genetiche, stiamo procedendo alla caratterizzazione di casi di pazienti pediatrici affetti da LAL che presentano anomalie citogenetiche che coinvolgono la regione cromosomica 9p13. In secondo luogo, la proteina di fusione *PAX5/TEL* è da noi studiata come modello per caratterizza-

re il ruolo molecolare e funzionale di tali fattori di trascrizione aberranti. **Materiali e metodi.** Citogenetica: tecniche di analisi FISH, utilizzando BAC e fosmidi. Biologia Cellulare: modello *in vitro* costituito dalle cellule primarie pre-BI murine, che rappresentano un modello fisiologico unico e peculiare in quanto prive di altre aberrazioni genetiche che possano avere effetti confondenti sui risultati sperimentali; il modello cellulare pre-BI e le tecniche di trasduzione retrovirale sono state ottimizzate nel nostro laboratorio. **Biologia molecolare:** tecnica di RACE PCR per l'identificazione di nuovi partner di traslocazione di *PAX5*. Le analisi di profili di espressione genica di cellule pre-BI *PAX5/TEL* e pre-BI *MIGR-GFP* sono state condotte con la tecnologia Affymetrix GeneChip; le validazioni dei dati ottenuti sono state effettuate utilizzando RQ-PCR con UPL probe library system (Roche) e tecnologia TaqMan (Applied Biosystems). **Statistica:** le analisi sono state effettuate impiegando strumenti statistici appositamente sviluppati per l'analisi di profili di espressione genica. **Risultati.** 1) Lesioni genetiche coinvolgenti *PAX5*: All'interno dei casi pediatrici affetti da LAL ed arruolati al protocollo AIEOP abbiamo selezionato i campioni che da analisi citogenetica standard presentassero anomalie nella regione 9p13 e potenzialmente coinvolgenti il gene *PAX5*; quindi tali campioni sono stati sottoposti ad ulteriori indagini di FISH con sonde nel locus del gene *PAX5*. Abbiamo identificato 15 casi con anomalie nella regione in 9p13; all'interno di tale gruppo abbiamo identificato 4/15 con traslocazioni di *PAX5* (2 casi *PAX5/AUTS2* e 2 casi con partner non ancora caratterizzato), 11/15 con delezioni che comprendono il gene *PAX5*, spesso includendo geni ad esso adiacenti. 2) Ruolo delle traslocazioni di *PAX5* nella leucemia: la proteina di fusione *PAX5/TEL* reprime numerosi geni target di *PAX5* (ad es. i geni *CD19*, *BLNK*, *MB1*), dati di espressione genica indicano un forte impatto di *PAX/TEL* sul profilo trascrizionale delle cellule, in cui agisce prevalentemente da repressore della trascrizione. Inoltre, la presenza della proteina di fusione è in grado di interferire in modo significativo sul pathway trascrizionale di *PAX5*, con un effetto di dominanza negativa rispetto a *PAX5 wt*, determinando l'attivazione di geni target fisiologicamente repressi da esso e la repressione di una più numerosa coorte di suoi target fisiologicamente attivati. I geni differenzialmente espressi (inibiti) in presenza di *PAX5/TEL* sono prevalentemente coinvolti in processi fondamentali per i linfociti B, quali il loro differenziamento e adesione e la via di segnale del B-cell receptor.

Conclusioni. 1) Anomalie genetiche di

PAX5 sono identificate in casi di pazienti pediatrici affetti da LAL di tipo B e si presentano sia come delezioni che come traslocazioni. 2) la presenza della proteina di fusione *PAX5/TEL* porta ad un rimodellamento del profilo di espressione genica di precursori B, con effetto di dominanza negativa su *PAX5 wt*. In particolare, si ha il coinvolgimento di geni essenziali per differenziamento, adesione e segnale tramite BCR, processi fondamentali per la trasformazione cellulare e la leucemogenesi.

12

L'ASSENZA DI LESIONI SECONDARIE AGGIUNTIVE NELLA LAL INFANT SOSTIENE IL RUOLO PREVALENTE DI MLL NELLA LEUCEMOGENESI

M. Bardini,^{1,2} R. Spinelli,³ S. Bungaro,¹
E. Mangano,^{4,5} L. Corral,¹ I. Cifola,³
G. Fazio,¹ G. Basso,⁶ G. De Rossi,⁷
A. Biondi,¹ C. Battaglia,^{4,5} G. Cazzaniga¹

¹Centro Ricerca M. Tettamanti, Clinica Pediatrica Univ. Milano-Bicocca, Monza; ²International PhD in Molecular Medicine, Università Vita-Salute San Raffaele, Milano; ³Istituto di Tecnologie Biomediche-Segrate, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Milano; ⁴Centro Interdisciplinare Studi bio-molecolari e applicazioni industriali (CISI), Università degli Studi di Milano, Milano; ⁵Dipartimento di scienze e tecnologie biomediche (DiSTeB) and Scuola di dottorato di Medicina Molecolare, Università degli Studi di Milano, Milano; ⁶Clinica Pediatrica Università Padova, Padova; ⁷Divisione di Ematologia, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Città del Vaticano, Roma

Introduzione. Studi recenti hanno dimostrato che singole lesioni genetiche, sia nella LAL pediatrica che dell'adulto, non sono sufficienti per l'insorgenza della leucemia, ma è necessaria la cooperazione di ulteriori anomalie successive (es. delezioni e amplificazioni). Al contrario, la patogenesi delle LAL con insorgenza entro il primo anno di vita ("LAL Infant") non è ancora ben chiara. La LAL Infant è una malattia molto aggressiva, caratterizzata nella maggior parte dei casi dal riarrangiamento del gene *MLL*, di origine prenatale. La breve latenza e l'elevata concordanza di insorgenza di LAL in gemelli infant monocorionici *MLL* positivi, suggerisce che il solo riarrangiamento di *MLL* sia sufficiente per la manifestazione clinica della malattia. Tuttavia, risultati discordanti ottenuti in studi su modelli animali non chiarificano definitivamente se mutazioni secondarie aggiuntive siano o meno necessarie per il rapido sviluppo della leucemia. Scopo del lavoro è valutare la presenza di aberrazioni genomiche non rile-

vabili con tecniche convenzionali, che cooperano nello sviluppo della LAL Infant. L'identificazione di tali lesioni è necessaria per indagare la patogenesi della leucemia e per individuare eventuali bersagli per una terapia mirata.

Metodi. È stata eseguita un'analisi di SNParray, esplorando circa 100.000 SNPs distribuiti su tutto il genoma; questa metodica permette di identificare la perdita di eterozigosi (LOH) associata o meno ad alterazioni numeriche di regioni cromosomiche. Per ridurre la possibile eterogeneità genetica, è stato analizzato il DNA alla diagnosi, remissione e ricaduta di 28 casi di LAL Infant con t(4;11).

Risultati. Rispetto ai pazienti LAL ad insorgenza in età pediatrica (dopo l'anno) e adulta, negli infant affetti da LAL con MLL riarrangiato è stato identificato un numero estremamente limitato di alterazioni di numero di copie geniche (delezioni e amplificazioni) all'esordio, mentre in alcuni casi tali aberrazioni genetiche aggiuntive sono acquisite tardivamente, alla ricaduta. Inoltre nei pazienti infant sono stati riscontrati numerosi tratti di omozigotità (disomie uniparentali segmentali), per la maggior parte dei casi costitutivi (non esclusivamente associati al tumore in quanto presenti anche alla remissione) e largamente distribuiti su tutto il menoma.

Conclusioni. Questi risultati dimostrano che nella LAL Infant il riarrangiamento di MLL non è associato alle anomalie cromosomiche identificate nei pazienti LAL pediatrici ed adulti. Pertanto può essere ipotizzato che questo primo e unico evento, sia capace di indurre la rapida insorgenza della malattia e velocizzare il processo di leucemogenesi, confermando ulteriormente l'unicità di questa malattia.

Bibliografia

- Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2007;446: 758-64.
- Kuiper RP, Schoenmakers EF, van Reijmersdal SV, et al. High-resolution genomic profiling of childhood ALL reveals novel recurrent genetic lesions affecting pathways involved in lymphocyte differentiation and cell cycle progression. *Leukemia* 2007;21:1258-66.
- Kawamata N, Ogawa S, Zimmermann M, et al. Molecular allelotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemias by high resolution single nucleotide polymorphism oligonucleotide genomic microarray. *Blood* 2008;111:776-84.
- Paulsson K, Cazier JB, Macdougall F, et al. Microdeletions are a general feature of adult and adolescent acute lymphoblastic leukemia: Unexpected similarities with pediatric disease. *Proc Natl Acad Sci* 2008;105:6708-13.

13

ORIGINE PRENATALE DEL CROMOSOMA PHILADELPHIA E DELEZIONE POST-NATALE DI IKAROS IN UNA COPPIA DI GEMELLI MONOZIGOTI AFFETTI DA LAL PEDIATRICA

S. Bungaro,¹ L. Lo Nigro,² J. Score,³ F. van Delft,⁴ I. Iacobucci,⁵ L. Corral,¹ A. Ford,⁴ G. Martinelli,⁵ N.C.P. Cross,³ M. Greaves,⁴ A. Biondi,¹ G. Cazzaniga¹

¹Centro Ricerca M. Tettamanti, Clinica Pediatrica Univ. Milano-Bicocca, Monza, Italy; ²Centro di Ematologia e Oncologia Pediatrica, Azienda Policlinico, Università di Catania, Catania, Italy; ³Wessex Regional Genetics Laboratory, University of Southampton, Salisbury, UK; ⁴Section of Haemato-Oncology, The Institute of Cancer Research, Sutton, United Kingdom; ⁵Dipartimento di Ematologia/Oncologia L. e A. Seràgnoli, Università di Bologna, Bologna, Italy

Introduzione. Gli studi compiuti su coppie di gemelli affetti da leucemia linfoblastica acuta (LLA) concordante hanno permesso di dimostrare l'origine prenatale di aberrazioni cromosomiche associate allo sviluppo di leucemia, sia nel caso di t(4;11), presente in sottogruppi rari a latenza breve, sia nel caso di t(12;21) e iperdiploidia, presenti in sottogruppi più prevalenti ma associate a leucemie con maggiore latenza e minore aggressività. Studi genomici condotti tramite l'uso di SNP-arrays hanno evidenziato che la successione di lesioni cooperative nella storia naturale della LLA sia necessaria per la conversione del clone pre-leucemico in leucemia conclamata, in particolare nei sottogruppi t(12;21) e iperdiploidi. Questo sembra verificarsi anche nel caso di LLA Philadelphia positiva (Ph⁺). Nonostante la prognosi avversa suggerisca che il gene di fusione BCR/ABL possa da solo essere sufficiente ad indurre la comparsa di leucemia, studi di SNP-arrays hanno mostrato che più dell'80% delle LLA Ph⁺ presentano la delezione del gene Ikaros (*IKZF1*).¹ Ad oggi, non è mai stata dimostrata una prova formale della successione di eventi nella patogenesi della LLa Ph⁺. Il presente lavoro riporta una coppia di gemelli monozygoti (T1 e T2) affetti da LLa Ph⁺, che hanno permesso di dimostrare per la prima volta sia l'origine prenatale della traslocazione t(9;22) che la delezione postnatale del gene Ikaros come evento cooperativo. **Materiali e metodi.** I riarrangiamenti clonali delle Ig/TcR sono stati identificati all'esordio e monitorati (giorni +33, +78) secondo le linee guida internazionali ESG-MRD-ALL.² Il breakpoint genomico della t(9;22) è stato identificato tramite "long range PCR".³ La sequenza così ottenuta è stata utilizzata come template per la definizione di un saggio di RQ-PCR

paziente-specifico. Il DNA genomico di entrambi i gemelli all'esordio è stato analizzato tramite Affymetrix Gene Chip Mapping 500K SNP arrays per l'identificazione di lesioni genomiche e di perdita di eterozigosi. Con lo scopo di caratterizzare la regione di giunzione della delezione di Ikaros, i dati derivanti dall'analisi di SNP arrays di T2 sono stati utilizzati per disegnare primers specifici per la regione prossimale e distale del breakpoint e usati per esperimenti di "long range PCR".⁴ L'analisi FISH con sonde specifiche per i centromeri dei cromosomi 6, X, 21, e per il gene di fusione BCR/ABL (Vysis) è stata effettuata su differenti popolazioni cellulari (CD3⁺, CD34/33⁺, CD34-19+/20+, CD34+/19-33+/38+) di midollo osseo sortate con citofluorimetro FACS Aria (BD).

Risultati. T1 e T2 sono stati diagnosticati come LLa Ph⁺ all'età di 32 e 36 mesi, rispettivamente, e trattati secondo il protocollo AIEOP-BFM ALL2000. Alla diagnosi è stato riscontrato un pattern differente di riarrangiamenti clonali Ig/TcR, nonostante attraverso un 'test incrociato' sia stato identificato un marcatore condiviso dai due gemelli e presente in una sottopopolazione in T2. I due gemelli hanno manifestato una differente risposta precoce al trattamento, essendo T1 un PGR (Prednisone Good Responder) e T2 PPR (Prednisone Poor Responder) secondo i parametri definiti dal protocollo AIEOP-BFM ALL2000. Entrambi sono stati sottoposti a trapianto di midollo osseo dallo stesso fratello donatore, ed hanno avuto una prognosi differente: mentre T2 è deceduto, T1 è attualmente in remissione completa dopo 6 anni.

La dimostrazione formale di un'origine comune prenatale della LLa Ph⁺ è derivata dall'identificazione del breakpoint genomico di BCR/ABL, identico in entrambi i gemelli. Il monitoraggio precoce della malattia residua minima (MRM), utilizzando i marcatori Ig/TcR in parallelo con un saggio di RQ-PCR genomica paziente-specifica, ha indicato la presenza persistente di alti livelli di MRD in T2 con entrambi i metodi. Al contrario, un alto livello persistente del segnale genomico di BCR/ABL è stato rilevato durante il monitoraggio di T1, nonostante la presenza di remissione morfologica, la negatività immunofenotipica e dei marcatori Ig/TcR sia al giorno +33 che al +78. Con lo scopo di identificare la natura delle cellule Ph⁺, Ig/TcR- presenti nel campione della remissione di T1, è stata effettuata un'analisi FISH su cellule midollari sorte. Il 51% delle cellule CD3⁺ e il 45% delle CD34-19+/20+ (il 40% e 6% della popolazione totale sortata CD45⁺, rispettivamente) sono risultate BCR/ABL⁺ e disomiche, dimostrando in questo modo che le cellule Ph⁺ sono cellule mature linfoidi. Al contrario, il compartimento mieloide

non è risultato mutato, essendo tutte le cellule CD34+/33+ e CD34+/19-/33+/38+ BCR/ABL negative. L'analisi effettuata con 500K SNP arrays ha identificato differenti anomalie aggiuntive nei due gemelli: T1 ha mostrato un subclone con un cariotipo iperdiploide a più di 50 cromosomi, mentre T2 ha mostrato la delezione di *IKZF1* ($\Delta 4-7$) e *EBF1*. Inoltre, entrambi i gemelli hanno presentato delezioni identiche coinvolgenti gli stessi esoni di *ABL* e *BCR*, a conferma dell'origine comune della traslocazione.

L'analisi di RQ-PCR genomica paziente-specifica non ha evidenziato la presenza della delezione di *IKZF1* in T1, dimostrando la natura postnatale di questa lesione che rappresenta un secondo evento genetico nelle cellule Ph⁺ di T2.

Conclusioni. In conclusione, in questa coppia di gemelli il cromosoma Philadelphia è originato *in utero* in una cellula precursore linfoide già indirizzata verso il differenziamento, generando il clone Ph⁺ prenatale non leucemico condiviso. Dopo la nascita, un secondo evento indipendente ha trasformato il clone Ph⁺, inducendo la comparsa di iperdiploidia in T1 e la delezione di *IKZF1* in T2, e di conseguenza una prognosi differente. Le cellule residue Ph⁺ prenatali non leucemiche sono persistite durante la normale linfopoiesi. Questa coppia di gemelli rappresenta un modello vivente che, nella storia naturale della LLA Ph⁺, supporta non solo l'origine prenatale del cromosoma Philadelphia ma anche la necessità di eventi genetici postnatali (delezione di *Ikaros*).

Bibliografia

- Mullighan CG, Miller CB, Radtke I, et al. BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of *Ikaros*. *Nature* 2008;453:110-4.
- van der Velden VH, Cazzaniga G, Schrauder A, et al. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia* 2007;21:604-11.
- J. Score, M.J. Calasanz, F. Pane, et al. Analysis of t(9;22) breakpoints indicates that p210 and p190 BCR-ABL are formed by distinct mechanisms. *Haematologica* 2007;92,Suppl.1
- Iacobucci I, Storlazzi CT, Cilloni D, et al. Identification and molecular characterization of recurrent genomic deletions on 7p12 in the *IKZF1* gene in a large cohort of BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukaemia patients: on behalf of GIMEMA AL WP. *Blood* 2009;114:2159-67.
- Iacobucci I, Lonetti A, Messa F, et al. Expression of spliced oncogenic *Ikaros* isoforms in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: implications for a new mechanism of resistance. *Blood* 2008;112:3847-55.

14

IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DELLE CELLULE STAMINALI LEUCEMICHE IN LAL INFANT CON t(4;11)

M. Bardini,^{1,2,3} L. Wittmann,² L. Corral,¹ L. Lo Nigro,⁴ Z. Ma,¹ R. Singh,¹ G. De Rossi,⁵ G. Basso,⁶ M. Greaves,⁷ A. Biondi,¹ G. Cazzaniga,¹ S.E. Jacobsen^{2,8}

¹Centro Ricerca M. Tettamanti, Clinica Pediatrica Univ. Milano-Bicocca, Monza, Italy; ²Stem Cell Center, Lund University BMC B-10, Lund, Sweden; ³International PhD in Molecular Medicine, San Raffaele University, Milan, Italy; ⁴Center of Pediatric Haematology Oncology, University of Catania, Catania, Italy; ⁵Divisione di Ematologia, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Città del Vaticano, Roma, Italy; ⁶Clinica Pediatrica Università Padova, Padova, Italy; ⁷Section of Haematology-Oncology, The Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey, UK; ⁸Hemopoietic Stem Cell Laboratory, Weatherall Institute for Molecular Medicine, University of Oxford, UK

Introduzione. Secondo il modello stocastico tutte le cellule che compongono il tumore sono in grado di sostenerne la crescita e rigenerarlo. Al contrario, è stato ipotizzato che solamente un sottogruppo raro immaturo di cellule, chiamate "cancer stem cells" siano in grado di dare origine al tumore. Nella leucemia, l'esistenza di queste cellule, dette "leukemia stem cells" (LSCs) è stata dimostrata in studi *in vivo* nella leucemia mieloide acuta, in cui tali cellule, similmente alle staminali emopoietiche normali, hanno un'organizzazione gerarchica. Quale di questi due modelli rispecchi meglio la patogenesi tumorale è tuttora argomento di forte dibattito. Soprattutto, nella leucemia linfoblastica acuta l'identità e l'origine della LSC non è ancora ben chiara. In questo studio ci siamo occupati di identificare e alla caratterizzare la LSC nella LAL infant t(4;11) positiva, la più frequente e aggressiva forma di leucemia a insorgenza entro il primo anno di vita. Nello specifico, abbiamo valutato se diverse sottopopolazioni midollari, purificate da campioni diagnostici di pazienti LAL infant all'esordio in base alla espressione di specifici marcatori di superficie (come CD34, CD19 e NG2), erano capaci di ripopolare topi NOD/SCID irradiati e dare leucemia (possedendo perciò proprietà di LSC) e se le popolazioni ripopolanti il midollo murino avevano caratteristiche simili o diverse.

Metodi. Per fare questo ci siamo avvalsi di tecniche di fluorescenza-activated cell sorting (FACS) in combinazione con analisi di fluorescenza *in situ* hybridization

(FISH), saggi di ripopolamento *in vivo* in topi NOD/SCID e analisi di clonalità con RQ-PCR.

Risultati. I nostri studi hanno evidenziato che nella LAL infant t(4;11) la popolazione cellulare 34+19- (staminali/progenitori immaturi) è normale (in quanto non presenta il riarrangiamento di MLL) e le proprietà di LSC sono ristrette al compartimento CD19+. Infatti le cellule che non esprimono il CD19 non sono capaci di ripopolamento nei topi NOD/SCID (CD34+) oppure danno luogo a una ricostituzione di cellule normale, non leucemiche, MLL negative (CD34-). Al contrario, le CD19+ LSCs sono in grado di ricostituire rapidamente *in vivo* e indurre la leucemia negli animali riceventi, con caratteristiche che rispecchiano la leucemia umana, e possiedono capacità di auto-rinnovamento in trapianti seriali *in vivo*, indipendentemente dall'espressione di CD34 e NG2. Tuttavia, nonostante molteplici sottopopolazioni midollari (separate in base all'immunofenotipo) possiedano caratteristiche di staminalità, abbiamo osservato alcune delle differenze nella cinetica di ripopolamento e nel fenotipo della popolazione leucemica ricostituita. Inoltre, tramite l'uso di sonde paziente-specifiche disegnate sulla regione del riarrangiamento clonale di Ig/TCR, abbiamo potuto analizzare in RQ-PCR il contributo clonale del ripopolamento leucemico. I nostri risultati hanno dimostrato che, similmente a quanto si riscontra nei pazienti infant, la ricostituzione nei topi trapiantati è oligoclonale, poiché diversi cloni indipendenti sono capaci di sostenere il ripopolamento *in vivo*. Tuttavia, abbiamo osservato diversi comportamenti: sia cloni maggiormente rappresentati nel paziente, sia quelli minoritari possono essere dominanti, al contrario, altri cloni maggioritari non sono capaci di ricostituire nei topi. Confrontando la clonalità dei topi primari con i corrispettivi secondari, un clone dominante nel primario può o persistere o estinguersi nei passaggi seriali; mentre altri cloni pur essendo quiescenti nei topi riceventi primari, potevano comunque persistere, riattivarsi e diventare dominanti nei secondari.

Conclusioni. In conclusione il nostro studio ha fornito evidenze che la LSC nella LAL infant t(4;11) risiede nelle cellule B CD19+, all'interno del quale, molteplici sottopopolazioni midollari (separati in base all'espressione di specifici antigeni di superficie) sono capaci di ripopolare e dare leucemia in topi NOD/SCID irradiati, ma con caratteristiche di cinetica e immunofenotipo diverse. Tali evidenze suggeriscono che nella LAL infant t(4;11) la LSCs sono molteplici ma distinte, riconciliando in parte la diafrasi riguardando al modello stocastico o gerarchico

per spiegare l'origine della LSC. Inoltre, i nostri dati relativi all'analisi di clonalità dimostrano l'esistenza di una ulteriore eterogeneità delle LSCs, e implica la coesistenza di diversi cloni che competono tra loro nel dare la leucemia.

Bibliografia

1. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994;367:645-8.
2. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997;3:730-7.
3. Castor A, Nilsson L, Astrand-Grundström I, et al. Distinct patterns of hematopoietic stem cell involvement in acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* 2005; 11:630-7.
4. Kong Y, Yoshida S, Saito Y, et al. CD34+CD38+CD19+ as well as CD34+CD38-CD19+ cells are leukemia-initiating cells with self-renewal capacity in human B-precursor ALL. *Leukemia*.
5. le Viseur C, Hotfilder M, Bomken S, et al. In childhood acute lymphoblastic leukemia, blasts at different stages of immunophenotypic maturation have stem cell properties. *Cancer Cell* 2008; 14:47-58.

15

ANALISI COMPARATIVA DEI PROFILI TRASCRIZIONALI E GENOMICI DEL LINFOMA LINFOBLASTICO T E DELLA LEUCEMIA LINFOBLASTICA

L. Mussolin,¹ K. Basso,^{1,2} A. Lettieri,³ M. Brahmachary,⁴ G. Cazzaniga,³ A. Califano,⁴ W.K. Lim,⁴ G. Basso,² A. Biondi,³ A. Rosole²

¹Clinica di Oncematologia Pediatrica Università di Padova; ²Institute for Cancer Genetics, and ⁴Joint Centers for Systems Biology, Columbia University, New York, NY, USA; ³Centro Ricerca Tettamanti, Università Milano-Bicocca, Ospedale San Gerardo, Monza

Introduzione. Molte sono le analogie tra il linfoma linfoblastico T (LL-T) e la leucemia linfoblastica T (LLA-T) dell'età pediatrica: oltre alla morfologia e all'immunofenotipo indistinguibili, le due malattie presentano anche simili caratteristiche genetiche (traslocazioni cromosomiche di fattori trascrizionali). La principale discriminante clinica tra LL-T e LLA-T riguarda la sede principale di presentazione della malattia, il mediastino per i LL-T ed il midollo osseo per la LLA-T. Il LL-T si presenta spesso con massa mediastinica, talora accompagnata da adenopatia subdiaframmatica, parziale o minimo coinvolgimento del midollo osseo e, raramente, del sistema nervoso centrale. Operativamente, la percentuale

di cellule tumorali nel midollo osseo distingue LL-T (<25%) da LLA-T (>25%). Rispetto alla LLA-T, il LL-T si manifesta in pazienti di età media maggiore, con un picco di incidenza nella seconda decade di vita; inoltre mostra una prevalenza nei maschi rispetto alle femmine (rapporto 2:1).¹ Il presente studio ha come scopo principale l'analisi delle basi biologiche e genetiche che caratterizzano i LL-T e le LLA-T, al fine di migliorare le conoscenze sulla patogenesi molecolare di queste malattie e di individuare marcatori molecolari con significato prognostico. Mediante l'analisi integrata di dati ottenuti tramite *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) e *gene expression microarrays*, sono stati confrontati il genotipo e i profili di espressione genica di una serie di pazienti affetti da LL-T e da LLA-T, con lo scopo di meglio caratterizzare analogie e differenze tra le due patologie.

Materiali e metodi. I profili di espressione genica sono stati generati presso il laboratorio di Biologia Tumori Solidi, Padova, utilizzando la tecnologia GeneChip, HG-U133 Plus 2.0 (Affymetrix) su residui di materiale diagnostico ottenuto da pazienti affetti da LL-T (20), LLA-T,¹⁰ linfoma linfoblastico B⁷ e leucemia common.⁶ Lo studio del genotipo è stato condotto presso il laboratorio del Centro Ricerca Tettamanti di Monza, utilizzando gli *Human Mapping* 100K arrays; l'analisi è stata condotta in 9/20 LL-T e 9/10 LLA-T, in quanto per i rimanenti casi non vi era materiale disponibile. L'analisi bio-informatica dei dati ottenuti è stata condotta in collaborazione con la Columbia University di New York.

Risultati. L'analisi dei profili di espressione genica ha dimostrato come la principale differenza tra LL-T e LLA-T sia rappresentata dalla componente tissutale normale. Per poter distinguere geni associati alla componenete midollare o linfonodale, sono stati inclusi nell'analisi i profili di espressione genica di linfomi linfoblastici delle linea B e di leucemie linfoblastiche tipo common (CD10+). I geni differenzialmente espressi tra i linfomi e le leucemie indipendentemente dall'origine cellulare sono stati considerati parte della signature prodotta dalle cellule normali infiltranti e quindi è stata eliminata nell'analisi di confronto tra i linfomi T e le leucemie T. I 78 geni rimanenti sono risultati rilevanti per la discriminazione tra LL-T e LLA-T. Si tratta di geni coinvolti nella risposta chemiotattica, nell'adesione cellulare e nell'angiogenesi che potrebbero giocare un ruolo importante nella diversa localizzazione delle cellule tumorali. In particolare geni associati alla promozione dell'angiogenesi e dell'invasività sono risultati up-regolati nei LL-T, come ad esempio Syndecan-2, che codifica per un proteoglicano di

membrana il cui ruolo pro-angiogenesi è stato scoperto molto di recente; EPAS1, un fattore di trascrizione abbondantemente espresso negli organi vascolarizzati e PTPRB, una fosfatasi tirosin-chinasi che è coinvolta nella vascolarizzazione di molti tumori. Così pure geni coinvolti nella risposta chemiotattica come ESAM, una molecola di adesione cellulare, la cui espressione identificata in altri tumori come il carcinoma colon-rettile correla significativamente con le metastasi nodali tanto da essere considerato un fattore prognostico negativo. Un aspetto di particolare rilievo è stato l'identificazione di una over-espressione di Stra13, un fattore di trascrizione in grado di reprimere l'attivazione di NOTCH1 inibendo il legame con il suo recettore nucleare CFB-1. È stato dimostrato che più del 50% delle LLA-T del bambino presenta mutazioni attivanti NOTCH1,² indicando un ruolo centrale di questo pathway nella patogenesi delle LLA-T. In questa casistica è attualmente in corso uno studio mutazionale per NOTCH1 che permetterà di identificare eventuali correlazioni tra espressione di Stra13 e mutazioni. L'identificazione di aberrazioni genetiche che causano cambiamenti nel numero di copie di un segmento genico è stata condotta analizzando i dati ottenuti dagli SNP arrays con due algoritmi (Partek e CYNAG). Sono state quindi considerate solo le alterazioni identificate da entrambi gli approcci in modo ricorrente (in due o più pazienti) identificando circa 200 loci con alterazioni nei casi di LL-T e LLA-T analizzati. L'aberrazione più comune è la delezione 9p21.3 identificata in 5/9 casi di LLA-T e 3/9 di LL-T. In questa regione si trovano i geni CDKN2A/B, che codificano per tirosin chinasi che svolgono un ruolo importante nella regolazione della progressione cellulare.^{3,4,5} In accordo con reports pubblicati in letteratura l'amplificazione del gene MYB è stata trovata in 2/9 casi di T-ALL. Sebbene molte aberrazioni sono state trovate in entrambe le patologie, alcune sono risultate ricorrenti solo nei T-LL e non nei campioni di T-ALL e viceversa; lo studio esteso ad una casistica più ampia ci consentirà di confermare se tali anomalie sono peculiari di ciascuna neoplasia.

Conclusioni. È attualmente in corso uno studio di convalida mediante analisi FISH di alcune delle anomalie trovate e abbiamo iniziato uno studio mutazionale del gene NOTCH1 in questa serie di pazienti affetti da linfoma e leucemia T in modo tale da poter completare lo studio genetico di queste due neoplasie. I dati ottenuti fino ad ora mettono in evidenza che pur condividendo molte caratteristiche biologiche, i linfomi T e le leucemie linfoblastiche T presentano un diverso pat-

tern di alterazioni genetiche e di espressione genica che possono contribuire ad una migliore comprensione dell'evoluzione delle due patologie.

Bibliografia

1. Thomas DA, Kantarjian HM. Lymphoblastic lymphoma. In: *Advances in the treatment of adult acute lymphocytic leukemia-Part II. Hematology/Oncology Clinics of North America* 2001;15:51-95.
2. Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP 4th, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 2004;306:269-71.
3. Irving JAE, Bloodworth L, Bown NP, et al. Loss of heterozygosity in childhood acute lymphoblastic leukemia detected by genome-wide microarray single nucleotide polymorphism analysis. *Cancer Res* 2005;65:3053-8.
4. Bungaro S, Raghavan M, Dell'Oro MG, et al. Assessment of submicroscopic genetic lesions by SNP arrays in a child with AML and FLT3-ITD: from birth to diagnosis and relapse. *Haematologica* 2006;91:998-1000.
5. Raghavan M, Lillington DM, Skoulakis S, et al. Genome-wide single nucleotide polymorphism analysis reveals frequent partial uniparental disomy due to somatic recombination in acute myeloid leukemias. *Cancer Res* 2005;65:375-8.

16

VALIDAZIONE DI MODELLI MURINI DI LEUCEMIA ACUTA CON RIARRANGIAMENTO DEL GENE MLL MEDIANTE IMAGING IN VIVO

R. Fazzina,¹ L. Lombardini,¹
L. Mezzanotte,³ A. Roda,³ R. Tonelli,^{1,2}
A. Pession¹

¹Oncoematologia Pediatrica "Lalla Seragnoli" Policlinico Sant'Orsola-Malpighi Bologna; ²Dipartimento di Farmacologia, Università di Bologna; ³Dipartimento di Scienze farmaceutiche, Università di Bologna

Introduzione. I nuovi approcci terapeutici per la cura delle neoplasie ematopoietiche mirano allo sviluppo di terapie dirette contro le anomalie molecolari che sono alla base della patologia. Il gene *MLL* (mixed lineage leukemia) è un sito ricorrente di riarrangimenti genetici nelle leucemie acute, mieloidi e linfoidi, ed identifica una popolazione di pazienti con prognosi particolarmente negativa. La probabilità di sopravvivenza nei pazienti con leucemia correlata a *MLL* sono basse, nonostante la possibilità di effettuare chemioterapie e trapianto di midollo osseo. Il gene *MLL*, sul locus 11q23 codifica per una proteina coinvolta nella regolazione epigenetica della trascrizione ed ha dunque un ruolo cruciale nell'ematopoiesi sin dalle prime fasi dello sviluppo embrionale. Le alterazioni

11q23 comprendono diverse anomalie cariotipiche, tra cui delezioni duplicazioni, traslocazioni reciproche, inversioni. Nel 70% dei pazienti pediatrici con leucemia acuta si hanno riarrangimenti di *MLL*, in particolare traslocazioni con geni partners, di cui se ne conoscono circa 50, che portano alla formazione di oncogeni di fusione. Le traslocazioni più frequenti nelle leucemie linfoidi (*ALL*) sono la t(4;11) e la t(11;19) con espressione rispettivamente degli oncogeni *MLL-AF4* e *MLL-ENL*, mentre le leucemie mieloidi (*AML*) sono più comunemente associate alle traslocazioni t(9;11) e t(6;11) con espressione di *MLL-AF9* e *MLL-AF6*. La gravità e la prognosi sfavorevole delle leucemie acute correlate a riarrangimenti del gene, nonché la mancanza di terapie efficaci e specifiche per questo tipo di leucemie rendono necessario lo studio di nuovi farmaci mirati. A questo scopo si possono utilizzare modelli murini xenograft, nei quali il tumore si genera a partire da cellule neoplastiche umane inoculate in topi immunodeficienti. Il modello xenograft è estremamente utile per comprendere la crescita e la diffusione del tumore, nonché i meccanismi di azione e l'efficacia terapeutica di nuovi agenti antitumorali. Per quanto riguarda il monitoraggio terapeutico sono in uso sistemi di imaging *in vivo* di nuovissima generazione come la bioluminescenza, un sistema reporter basato sulla reazione enzimatica catalizzata dalla luciferasi, che ossidando il suo substrato naturale, la D-luciferina, genera luce nel campo del visibile. La bioluminescenza possiede numerosi vantaggi rispetto ad altre metodiche, come ad esempio la PET, tra cui quello di essere molto sensibile, poco invasiva per l'animale, veloce, poco dispendiosa e di non avere segnali di fondo dovuti alle normali funzioni metaboliche delle cellule.

Materiali e metodi. Le cellule leucemiche THP-1 e MOLM-13 con traslocazione *MLL-AF9*, le cellule leucemiche SEM con traslocazione *MLL-AF4* e le cellule KOPN-8 con traslocazione *MLL-ENL*, sono state ingegnerizzate per l'espressione stabile della luciferasi di lucciola *Photinus pyralis* utilizzando la tecnica di trasfezione retrovirale con il vettore pMMP-LucNeo (gentilmente donato da Andrew Kung, Harvard Medical School, Boston, MA). I cloni positivi per il gene della luciferasi sono stati selezionati e analizzati in base al grado di espressione della proteina e di intensità del segnale luminoso. Le cellule luminescenti ingegnerizzate sono state utilizzate per lo sviluppo di modelli murini xenograft di leucemia acuta con riarrangimenti del gene *MLL*. Tutte e quattro le linee cellulari esprimenti la luciferasi di lucciola *Photinus pyralis* possono dunque essere monitorate *in vivo* mediante sistemi di

bioluminescenza. I modelli murini xenograft sono stati realizzati mediante l'utilizzo di topi NOD/SCID immunodeficienti (Charles River) di circa 6 settimane. Per ciascun modello sono stati utilizzati 10 topi, i quali sono stati inoculati con 5-10 milioni di cellule leucemiche per via endovenosa e monitorati una volta a settimana mediante uno strumento di imaging *in vivo* costituito da una camera CCD (charge-couple device) ultrasensibile (Berthold Night owl LB 980). La rilevazione della luminescenza è stata effettuata singolarmente per ciascun topo previa anestesia ed iniezione intraperitoneale di D-luciferina alla concentrazione di 150mg/Kg (D-luciferin potassium salt, Gold biotechnology). Le immagini prodotte sono state elaborate e quantificate utilizzando il software Windlight (Berthold). **Risultati.** L'andamento della leucemia nei modelli murini xenograft è stato studiato mediante l'analisi delle quantificazioni effettuate a partire dal 7° giorno, con cadenza settimanale fino ad un end-point in cui gli animali sofferenti venivano sacrificati. L'aumento del segnale luminoso, corrispondente alla crescita e allo sviluppo della malattia, ha permesso di tracciare delle curve di crescita per i suddetti modelli e valutarne le caratteristiche fenotipiche. Per i diversi modelli murini la malattia progredisce a partire dal midollo osseo per poi disseminarsi nel circolo periferico. La curva della luminescenza ha mostrato un aumento lineare del numero di fotoni fino al 15° giorno con un forte incremento a partire dal 20° giorno fino a raggiungere il plateau dal 26° giorno per i modelli *MLL-ENL* (KOPN-8) e *MLL-AF9* (MOLM-13), e dal 39° giorno per *MLL-AF4* (SEM) e *MLL-AF9* (THP-1). I tempi di latenza per ciascun modello coincidevano con il plateau della curva della luminescenza, a livello del quale comparivano segni di sofferenza tali da comportare il sacrificio o la morte dell'animale. I diversi modelli murini hanno mostrato delle differenze fenotipiche nello sviluppo e nella progressione della malattia. Nel modello *MLL-AF9* (MOLM-13) sono state riscontrate metastasi diffuse a livello sottocutaneo ed in prossimità del piano osseo, nonché infiltrazione di strutture linfatiche, quali i linfonodi. Il modello *MLL-AF4* (SEM) ha evidenziato infiltrazione di cellule neoplastiche a livello della milza, con marcata splenomegalia, mentre nel modello *MLL-AF9* (THP-1), la massa neoplastica si è sviluppata prevalentemente a livello del midollo osseo e delle ossa lunghe senza disseminazione nel circolo periferico.

Conclusioni. La prognosi sfavorevole e la mancanza di terapie efficaci per le leucemie acute correlate a riarrangimenti del

gene MLL rendono necessario lo studio di nuovi farmaci specifici. Per lo studio pre-clinico di nuovi farmaci è necessario l'utilizzo di modelli animali che possano mimare il più possibile lo sviluppo della neoplasia e l'effetto del farmaco nell'uomo. A questo scopo sono stati generati quattro modelli murini xenograft di leucemia acuta con differenti riarrangiamenti del gene MLL, quali MLL-ENL (KOPN-8), MLL-AF9 (MOLM-13 e THP-1) ed MLL-AF4 (SEM). L'andamento della malattia è stato studiato mediante sistemi di bioluminescenza *in vivo* nei quattro diversi modelli murini xenograft, che hanno evidenziato delle differenze fenotipiche nello sviluppo e nella progressione della malattia. Per ciascun modello sono stati analizzati diversi parametri oncologici, quali la localizzazione e la modalità di crescita della massa tumorale, la specificità di invasione tissutale, la capacità di metastatizzare e i tempi di sopravvivenza. Lo sviluppo di tali modelli murini di leucemia acuta con sistemi di imaging di bioluminescenza rappresenta dunque un'importante strumento preclinico per lo studio *in vivo* della patogenesi e per la valutazione dell'efficacia terapeutica di nuovi potenziali farmaci specifici.

Bibliografia

- Liedtke M, Cleary ML. Therapeutic targeting of MLL. *Blood* 2009;113:6061-8.
- Stubbs MC, Kim YM, Krivtsov AV, et al. MLL-AF9 and FLT3 cooperation in acute myelogenous leukemia: development of a model for rapid therapeutic assessment. *Leukemia* 2008;22:66-77.
- Kerbel RS. Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anti-cancer drug activity in humans: better than commonly perceived-but they can be improved. *Cancer Biol Ther* 2003 Jul-Aug.

17

ESPRESSIONE DI ANNESSINA 2 NELLA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA B PEDIATRICA: MARKER DI AGGRESSIVITÀ E POTENZIALE TARGET TERAPEUTICO

M. Tumino,¹ B. Accordi,² M. Sciro,² G. Milani,² F. Tognazzo,² M. Giordan,² G. te Kronnie,² G. Basso,² L. Lo Nigro¹

¹Centro di Ematologia ed Oncologia Pediatrica, Università di Catania; ²Centro di Ematologia ed Oncologia Pediatrica, Università di Padova

Introduzione. Annessina II (Anxa2), proteina legante i fosfolipidi di membrana in maniera calcio-dipendente, appartiene alla superfamiglia delle Annessine ed è coinvolta in numerosi meccanismi di proliferazione e comunicazione cellulare;

recentemente è stato trovato un suo coinvolgimento in diversi tumori, in cui ne favorirebbe la progressione. Scopo di questo studio è la valutazione dell'espressione di Anxa2 nella leucemia linfoblastica acuta B-lineage (LLA-B) pediatrica, con l'obiettivo di identificare un potenziale nuovo marcatore prognostico e target terapeutico.

Materiali e metodi. Sono state studiate 77 nuove diagnosi di pazienti pediatriche diagnosticate e trattate nei Centri di Oncoematologia Pediatrica di Catania e di Padova, secondo il protocollo AIEOP LLA-2000. L'espressione di Anxa2 è stata studiata in tutti i campioni e in 3 linee cellulari di LLA-B (REH, SEM, 697), mediante *reverse phase protein array* (RPPA), *western blot* e *real-time PCR* (RQ-PCR). Contestualmente, mediante immunofluorescenza ed analisi citofluorimetrica, è stata valutata la localizzazione di Anxa2 nei blasti leucemici. L'associazione tra l'espressione di Anxa2, le caratteristiche molecolari e la prognosi dei pazienti studiati è stata valutata mediante analisi multivariata, test di Wilcoxon, t-Test con le correzioni di molteplicità e analisi di Kaplan-Mayer. La presenza o meno di corrispondenza tra i livelli di espressione proteica e quelli di mRNA è stata valutata mediante correlazione di Pearson.

Risultati. Dal confronto tra i pazienti con traslocazioni prognosticamente sfavorevoli (t(9;22), t(4;11)) e i pazienti con alterazioni favorevoli (t(12;21)) è emersa una differenza statisticamente significativa nell'espressione di Anxa2, presente a livelli maggiori nel primo gruppo (*p-value* <0,05). Sia a livello proteico sia di espressione di mRNA, Anxa2 era maggiormente espressa in 24 dei 77 pazienti studiati; in questo gruppo 8 pazienti (33%) sono andati incontro a recidiva, a differenza del minor numero degli stessi osservato nel gruppo di pazienti con livelli bassi di espressione della proteina (8 su 53 pazienti (15%). Inoltre, 5 pazienti (21%) con Anxa2 elevata sono deceduti per progressione di malattia, contro 1 solo caso (2%) osservato nel gruppo con livelli bassi. La nostra analisi ha mostrato una correlazione positiva tra i livelli di espressione proteica e di mRNA (correlazione di Pearson 0,6). L'analisi multivariata ha permesso di identificare Anxa2 come predittore indipendente di aggressività nella nostra popolazione. Nonostante tali dati evidenziassero l'esistenza di una forte associazione tra gli elevati livelli di Anxa2 e una peggiore prognosi, a causa della eterogeneità di risposta al trattamento tra i pazienti studiati che implicava una stratificazione sulla base del dato riguardante la malattia residua minima, tale correlazione non raggiungeva la significatività statistica (Kaplan-Mayer *p*>0.05). Infine, l'immunofluore-

scenza e la successiva analisi citofluorimetrica eseguiti sulle linee cellulari (SEM e 697) hanno permesso di localizzare Anxa2 a livello della membrana cellulare esterna, dove la proteina svolgerebbe gran parte delle funzioni cellulari.

Conclusioni. Si tratta del primo studio finora effettuato sull'espressione di Anxa2 nelle LLA pediatriche. I nostri risultati suggeriscono che Anxa2 rappresenta un marker di aggressività nelle LLA-B infantili, confermato questo dalla correlazione della sua presenza ad elevati livelli nei pazienti e linee cellulari con riarrangiamenti molecolari prognosticamente sfavorevoli, come MLL/AF4. La valutazione dell'impatto prognostico della sua espressione necessita di ulteriore studio da effettuare su una popolazione più ampia e selezionata. Infine, la stretta correlazione tra l'espressione proteica e quella dell'mRNA suggerisce una regolazione a livello trascrizionale della produzione della proteina, dato quest'ultimo utile ai fini di un potenziale futuro target terapeutico.

Bibliografia

- Hastie C, et al. *J Biol Chem* 2008;283:12595-603.
Takano S, et al. *Ann Surg Oncol* 2008;15:3157-68.

19

LLA NEI BAMBINI AFFETTI DA SINDROME DI DOWN: UNA MALATTIA ETEROGENEA NELLA QUALE L'ESPRESSIONE ABERRANTE DI CRLF2 COOPERA CON JAK2 MUTATO. UNO STUDIO DEL IBFM-STUDY GROUP

E. Vendramini,¹ L. Hertzberg,^{2,3,4} I. Ganmore,^{2,3} G. Cazzaniga,⁵ G. te Kronnie,¹ E. S. Izraeli,^{2,3}

¹Laboratorio di Oncoematologia, Dipartimento di Pediatria, Università di Padova, Padova, Italia; ²Emato-oncologia pediatrica e Centro di Ricerca Oncologica, Sheba Medical Center, Tel Hashomer, Ramat-Gan, Israele; ³Facoltà di Medicina Sackler, Università di Tel Aviv, Tel Aviv, Israele; ⁴Dipartimento di Fisica dei Sistemi Complessi, Istituto di Scienza Weizmann, Rehovot, Israele; ⁵Centro Ricerca Tettamanti, Clinica Paediatrica Università di Milano-Bicocca, Ospedale San Gerardo, Monza, Italy

Introduzione. Le leucemie acute nei bambini affetti da sindrome di Down (DS-LLA) si presentano con un'alta incidenza, prevalentemente originano da cellule precursori B (B-cell precursor, BCP) e sono simili per età alla diagnosi e immunofenotipo alle LLA caratterizzate da

iperdiploidia o t(12;21).¹ Poiché queste aberrazioni citogenetiche sono meno frequenti nelle DS-LLA, è stata ipotizzata l'esistenza di eventi genetici somatici collaboranti alternativi. Recentemente è stata riportata la presenza di una mutazione somatica attivante *JAK2* nel 20% delle DS-LLA. *JAK2* mutato in R683 trasforma le cellule Pro-B murine dipendenti da citochine solo in presenza di eritropoietina o trombopoietina. Questi dati ci hanno spinto a ipotizzare che *JAK2* mutato possa cooperare con un recettore per le citochine di tipo I con espressione aberrante nelle BCP DS-LLA.²

Materiali e metodi. È stato analizzato RNA e DNA derivato da aspirati midollari alla diagnosi di bambini con BCP LLA e sindrome di Down. Per lo studio genomico sono stati utilizzati arrays Affymetrix; la somiglianza tra DS-LLA e gli altri sottotipi di BCP LLA è stata esplorata analizzando le 1500 probe sets con la maggior deviazione standard tra i campioni AIEOP. Sono stati usati due algoritmi di analisi non supervisionata quali SPIN (*Sorting Points Into Neighborhoods*) e PCA (*Principal Component Analysis*, MATLAB 7.4 software). Per le analisi di espressione genica sono stati consultati i *datasets* AIEOP (HG-U133 Plus 2.0), BFM e St. Jude (HG-U133A). Il DNA genomico di 42 aspirati midollari alla diagnosi di LLA e 34 dei corrispondenti aspirati midollari alla remissione sono stati genotipizzati con Affymetrix GeneChip Human Mapping 100K. Le analisi mutazionali del gene per il recettore per le citochine *cytokine receptor-like factor 2 (CRLF2)*, sono state effettuate mediante sequenziamento o FISH per identificare la traslocazione *IGH@CRLF2* o la presenza di microdelezioni. Le qRT-PCR sono state effettuate utilizzando il *Applied-Biosystems TaqMan® Gene-Expression Assays*.² Le analisi citofluorimetriche (Becton-Dickinson Canto-II, FlowJo software) sono state realizzate su cellule primarie di LLA crio-preserved dopo xenotrapianto in topi Nod/LtSzScid IL2 γ null. FLAG-mJAK2 *wild-type* e R683S sono stati clonati nel vettore lentivirale pHRINC5GW, che contiene il promotore SFFV e emerald-GFP come reporter. pMX-hCRLF2 è stato usato come template per la generazione di mutazioni in CRLF2 attraverso mutagenesi sito-specifica (QuikChangeTM-II-XL, Stratagene).

Risultati. Le analisi non supervisionate di espressione genica SPIN e PCA rivelano che le DS-LLA sono marcatamente meno omogenee degli altri sottotipi di BCP LLA e non possono essere considerate come un unico sottotipo molecolare. La *signature* di espressione genica comune costruita nel database AIEOP (792 geni *up* regolati e 535 geni *down* regolati) è stata testata e rifinito su altri due *datasets*: selezionando solo i geni con un pattern consistente di espressione in almeno due dei

tre *datasets* abbiamo ottenuto un profilo DS-LLA costituito da 152 geni *up* e 199 geni *down* regolati in DS-LLA. Il *database* DAVID ha identificato la "Risposta agli stimoli di danno al DNA" quale *pathway* maggiormente arricchito in DS-LLA e *BCL6* uno dei geni maggiormente *up* regolati. La *signature* di *BCL6* (identificata mediante Oncomine) e il *pathway* in risposta al danno al DNA sono consistenti con lavori precedenti sull'indebolita risposta cellulare al danno al DNA nella DS e alla prevalenza di traslocazioni cromosomiche nel locus IgH nelle DS-LLA. Il terzo dei geni maggiormente differenzianti le DS-LLA è il recettore per le citochine *CRLF2*, *over* espresso nel 62% dei casi (confermato con PCR quantitativa e analisi citofluorimetriche). Sono stati identificati casi con traslocazioni e delezioni interstiziali già descritte quali causa di un'aberrante espressione di *CRLF2*.³ L'analisi dei geni differenzialmente espressi tra pazienti con e senza l'*up* regolazione di *CRLF2* suggerisce nei primi un'attivazione dei *pathways downstream* a *CRLF2* e la presenza della *signature* di *BCL6*, che permette di ipotizzare un'associazione biologica tra l'espressione di *BCL6* e gli eventi genomici che portano all'*over* espressione di *CRLF2*. Per esaminare la presenza di una cooperazione tra *CRLF2* e *JAK2* mutato sono state transfettate cellule BaF3 esprimenti hCRLF2 con vettori esprimenti mJAK2 *wt* e mutato (R683S). La maggior crescita cellulare osservata nelle cellule esprimenti hCRLF2 e mJAK2 mutato dimostrano un sinergismo tra *CRLF2* e *JAK2* (sia *wt*, ma soprattutto mutato). Dal punto di vista clinico, i pazienti con un'espressione di *CRLF2* media/alta hanno un'età media alla diagnosi inferiore e una minore probabilità di sopravvivenza libera da eventi rispetto agli altri. Analisi genomiche con i 100K SNP-arrays hanno dimostrato nelle DS-LLA la presenza di delezioni già riscontrate nelle BCP LLA con frequenze paragonabili a queste.⁴ Si nota una frequenza più alta di delezione di *IKAROS* nelle DS-LLA che *over* esprimono *CRLF2*.

Conclusioni. Da questo lavoro emergono due informazioni rilevanti. Primo, le DS-LLA sono molto meno omogenee rispetto agli altri sottotipi genetici di BCP-LLA. Le DS-LLA che clusterizzano vicine non sono molto simili tra loro suggerendo che la condizione DS predispone ad un maggior numero di sottotipi genetici rispetto alle BCP-LLA. Secondo, nonostante questa eterogeneità, l'espressione aberrante del recettore per le citochine di tipo I *CRLF2* è un'anomalia comune ai due terzi dei pazienti. *CRLF2* da solo non è in grado di trasformare le cellule BaF3, ma in presenza di alti livelli di *JAK2 wt*, *JAK2* mutato (R683) o di mutazioni in *CRLF2* che portano ad una fosforilazione costitutiva di

STAT5, conferisce alle cellule BaF3 un'augmentata capacità di crescita indipendente dalle citochine. Questo dimostra per la prima volta che la cooperazione tra queste due proteine conferisce un vantaggio nella crescita e sopravvivenza delle cellule. Questi dati ci consentono di proporre un modello per il ruolo di *CRLF2* nell'evoluzione delle LLA nei pazienti con DS, nel quale nel 60% dei pazienti un evento genomico causa l'espressione aberrante di *CRLF2* che provoca l'espansione di un clone pre-leucemico, il clone pre-leucemico acquisisce aberrazioni genetiche addizionali come mutazioni attivanti in *JAK2* o *CRLF2* o eventi che coinvolgono il *pathway* JAK/STAT. Le analisi bioinformatiche rivelano un arricchimento per i geni attivati da *BCL6* e coinvolti nei *pathways* di riparazione al danno al DNA, questo ci permette di speculare che la condizione DS può predisporre allo sviluppo di LLA attraverso un'instabilità genomica specifica delle cellule B che coinvolge *BCL6*. I nostri dati implicano che terapie che abbiano come target il *pathway* di JAK/STAT potrebbero essere rilevanti per la maggior parte delle DS-LLA. Dal momento che *CRLF2* è un recettore coinvolto in disturbi infiammatori e allergici, è possibile che anticorpi specifici per *CRLF2* già sviluppati per questi disturbi possano essere utilizzati in terapie di LLA con espressione aberrante di *CRLF2*.

Bibliografia

1. Malinge S, Izraeli S, Crispino JD. Insights into the manifestations, outcomes, and mechanisms of leukemogenesis in Down syndrome. *Blood* 2009;113:2619-2628.
2. Bercovich D, Ganmore I, Scott LM, et al. Mutations of *JAK2* in acute lymphoblastic leukaemias associated with Down's syndrome. *Lancet* 2008;372:1484-1492.
3. Russell LJ, Capasso M, Vater I, et al. Deregulated expression of cytokine receptor gene, *CRLF2*, is involved in lymphoid transformation in B cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2009.
4. Mullighan CG, Zhang J, Harvey RC, et al. *JAK* mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:9414-9418.

22

CARATTERIZZAZIONE IN VITRO DELLA FASE PRE-LEUCEMICA INDOTTA DAL GENE DI FUSIONE *TEL-AML1*

C. Palmi, I. Brunati, G. Fazio, V. Cazzaniga, A. Biondi, G. Cazzaniga
 Centro Ricerca M. Tettamanti, Clinica Pediatrica Università di Milano-Bicocca, Monza

Introduzione. *TEL-AML1*, prodotto dalla

traslocazione cromosomica t(12;21), è il gene di fusione più comune nella LAL pediatrica. La fusione si verifica solitamente durante l'emopoiesi fetale ed è insufficiente per la trasformazione leucemica completa, generando piuttosto un clone pre-leucemico di precursori B clinicamente silente che può mantenersi nell'individuo fino a 15 anni. La transizione dalla fase pre-leucemica alla malattia conclamata avviene in seguito a mutazioni secondarie post-natali ed evidenze epidemiologiche suggeriscono che in questa conversione potrebbe avere un ruolo importante una risposta immunitaria anomala. In precedenza abbiamo dimostrato che *TEL-AML1* ha un effetto inibitorio sulla risposta a TGF β , un fattore apoptotico prodotto dai linfociti T nel corso di una potente reazione infiammatoria.¹ In tale contesto il clone pre-leucemico *TEL-AML1* positivo potrebbe aver un vantaggio competitivo nella proliferazione o nella sopravvivenza a stimoli apoptotici, e quindi ricevere eventi mutazionali addizionali che determinano la trasformazione leucemica completa. Anche il micro-ambiente midollare potrebbe essere importante per il mantenimento del clone pre-leucemico. Pertanto vogliamo indagare i meccanismi che sostengono il clone *TEL-AML1* positivo promuovendone la persistenza a lungo termine nel midollo osseo.

Materiali e metodi. Abbiamo utilizzato la linea Ba/F3 murina e colture primarie di cellule preB1 murine. *TEL-AML1* è trascritto sotto il controllo di un sistema di espressione inducibile (Invitrogen).

Per gli esperimenti di chemiotassi *in vitro* sono state utilizzate Transwell (Corning Costar) con membrana a pori con diametro di 8 μ m. Sono state caricate 5x10⁵ cellule riospese in 100 μ L di RPMI 1% FBS, mentre nei pozzetti inferiori sono stati depositati 600 μ L dello stesso terreno addizionato o meno di CXCL12 umano 100 ng/mL (PeproTech). Dopo 3 ore di incubazione, le cellule migrate nel pozzetto inferiore sono state fissate e contaminate al FACS. L'internalizzazione di CXCR4 in seguito all'esposizione a CXCL12 è stata determinata incubando le cellule Ba/F3 con o senza CXCL12 100 ng/mL (PeproTech) per 15, 30, 60 e 90 minuti a 37°C.

Risultati preliminari. L'espressione di *TEL-AML1* induce un'alterazione della morfologia cellulare in Ba/F3, caratterizzata dall'acquisizione di lunghe estensioni. Tali modificazioni morfologiche sono accompagnate da alterazioni del fenotipo: *TEL-AML1* up-regola le molecole di adesione CD44 e CD54, le integrine CD18, CD11a e CD11b, e l'antigene CD135/FLT3, che oltre ad essere un proto-oncogene e a svolgere un ruolo importante nella proliferazione cellulare e nella sopravvivenza, è in grado di regolare la migrazione

delle cellule ematopoietiche, modulando l'asse CXCL12/CXCR4. D'altra parte *TEL-AML1* causa una down-regolazione delle integrine CD49d e CD49e. Tali risultati, confermati anche in pre B1, sono in linea con quanto descritto da altri gruppi che hanno dimostrato come alterazioni dell'espressione e della funzione di molecole di adesione e recettori chemochinici nei blasti leucemici possano determinare risposte adesive e migratorie anomale.^{2,4} Infatti abbiamo osservato che, sia in Ba/F3 che in pre B1, ma non nella linea cellulare REH (*TEL/AML1* positiva), *TEL-AML1* inibisce la capacità migratoria delle cellule verso CXCL12, un potente chemoattrattore che richiama i precursori B nel midollo. Il deficit migratorio verso CXCL12 non è imputabile a difetti generali della motilità, né ad alterazioni dell'espressione o del riciclo del suo recettore CXCR4.

Conclusioni. I risultati preliminari che abbiamo ottenuto sono di particolare interesse, in quanto numerose evidenze *in vitro* e *in vivo* suggeriscono che il signalling dell'asse CXCL12/CXCR4, in altri contesti garantisce alle cellule leucemiche, come ai progenitori ematopoietici normali, l'*homing* ed il mantenimento nel microambiente midollare, favorendone la crescita, la sopravvivenza e la resistenza ai chemioterapici. D'altra parte anomalie morfologiche e difetti della migrazione verso CXCL12 simili a quelli riscontrati nel nostro studio sono stati identificati anche nei campioni di alcuni pazienti LAL⁵ e nelle cellule di pazienti con leucemia mieloide cronica o trasdotte con *BCR-ABL1*.^{2,4} Quindi il ruolo dell'asse CXCL12/CXCR4 nella leucemia sembra essere più complesso di quanto sappiamo finora. Infatti è stato dimostrato che i blasti LAL non responsivi a CXCL12 nei saggi di migrazione *in vitro*, sono però capaci di dare *engraftment* nei topi NOD/SCID, indicando che potrebbero esistere altri meccanismi chemiotattici che direzionano il traffico delle cellule LAL dal circolo sanguigno nel midollo, e che le attirano e trattengono forse in nicchie diverse da quelle popolate dalle cellule staminali ematopoietiche normali. Per approfondire tale aspetto intendiamo studiare *in vivo* l'*homing* dei precursori B murini *TEL-AML1* positivi in topi riceventi *wild-type*, per indagare se le cellule pre-leucemiche, che mostrano un'espressione alterata delle molecole di adesione e proprietà migratorie anomale, risiedono in una delle nicchie fisiologiche, da cui ricevono i segnali di sopravvivenza, o se siano disseminate nel midollo. Inoltre sarà interessante studiare la funzionalità di CXCR4, valutando l'attivazione del segnale a valle per identificare a quale livello del *pathway TEL-AML1* determina il blocco della risposta chemotattica.

Bibliografia

1. Ford AM, Palmi C, Bueno C, Hong D, et al. The TEL-AML1 leukemia fusion gene dysregulates the TGF β pathway in early B lineage progenitor cells. *J Clin Invest.* 2009;119:826-836.
2. Chen YY, Malik M, Tomkowicz BE, Collman RG, Ptasznik A. BCR-ABL1 alters SDF-1 α -mediated adhesive responses through the beta2 integrin LFA-1 in leukemia cells. *Blood.* 2008;111:5182-6.
3. Corcione A, Arduino N, Ferretti E, et al. Chemokine receptor expression and function in childhood acute lymphoblastic leukemia of B-lineage. *Leuk Res* 2006;30:365-72.
4. Salgia R, Quackenbush E, Lin J, et al. The BCR/ABL oncogene alters the chemotactic response to stromal-derived factor-1 α . *Blood* 1999;94:4233-46.
5. Bendall LJ, Baraz R, Juarez J, Shen W, Bradstock KF. Defective p38 mitogen-activated protein kinase signaling impairs chemotactic but not proliferative responses to stromal-derived factor-1 in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 2005;65:3290-8.

23

INTEGRAZIONE DI TECNOLOGIE INNOVATIVE DI DIAGNOSI MOLECOLARE PER IDENTIFICARE NUOVI FATTORI PROGNOSTICI DI LEUCEMIA ACUTA LINFOLASTICA E STRATEGIE TERAPEUTICHE MIRATE. 'ADD-ON PROJECT' DEL NUOVO PROTOCOLLO LLA

G. Cazzaniga,¹ G. te Kronnie²

¹Centro Ricerca M. Tettamanti, Clinica Pediatrica Univ. Milano-Bicocca, Monza;

²Clinica Pediatrica Università Padova, Padova

Introduzione. Circa il 75% dei pazienti con leucemia linfoblastica acuta (LLA) ottengono la remissione completa e duratura; tuttavia, il 25% dei casi presenta una ripresa della malattia, altamente resistente alla terapia e spesso causa di morte del paziente, nonostante approcci terapeutici aggressivi come il trapianto di cellule staminali emopoietiche. È inoltre stimato che un analogo 25% dei pazienti che oggi guarisce grazie ai trattamenti intensivi adottati, potrebbe ottenere lo stesso risultato con terapie meno intensive e più mirate, con un significativo beneficio in termini di effetti collaterali a lungo termine. La comprensione della patogenesi molecolare della malattia e delle basi biologiche della diversa risposta clinica rappresentano le sfide più rilevanti della ricerca nel campo della LLA del bambino dei prossimi anni, per identificare nuovi fattori prognostici e nuovi target terapeutici. Nell'ambito della proficua collaborazione europea con il gruppo cooperativo I-BFM, l'AIEOP ha contribuito a dimostra-

re che l'analisi molecolare della malattia residua minima (MRM) valutata nei primi tre mesi di trattamento costituisce il parametro più sensibile e indipendente per identificare pazienti con diversa prognosi, oggi principale fattore di selezione dei pazienti nei protocolli della LLA. Tuttavia, i gruppi di rischio definiti dalla MRM mantengono un elevato grado di eterogeneità biologica e clinica (pazienti nel gruppo a basso rischio che ricadono e pazienti con esito favorevole nel gruppo ad alto rischio). Tuttavia non è ancora noto quali siano i meccanismi funzionali della diversa risposta alla terapia. Inoltre, fattori prognostici ottimali dovrebbero migliorare l'accuratezza nella stratificazione dei pazienti nei protocolli terapeutici della LLA.

Materiali e metodi. Tra i circa 350 casi/anno di LLA di linea B e T diagnosticati con metodiche convenzionali e MRM e arruolati a protocolli AIEOP, verranno selezionati sottogruppi di pazienti sulla base della risposta alla terapia (MRM) e assenza di lesioni genetiche note, cui verranno applicate le più aggiornate tecnologie di indagine cellulare e molecolare secondo la seguente modalità: Analisi morfologica, istochimica, immunofenotipica. Analisi citogenetica e molecolare per identificare aberrazioni geniche note. Analisi molecolare e immunofenotipica della malattia residua minima. Analisi del profilo cromosomico strutturale (tecnologia Affymetrix). Analisi del profilo di espressione genica (tecnologia Affymetrix). Analisi del profilo di espressione di microRNA (Applied Biosystems Low density cards e tecnologia Affymetrix). Analisi dello stato di attivazione delle vie di trasduzione del segnale (analisi fosfoproteomica RPPA). I dati ottenuti verranno integrati per un'analisi complessiva, in modo da ottenere associazione tra le diverse variabili biologiche e con la prognosi e la risposta clinica alla terapia dei pazienti. Test funzionali saranno necessari per confermare i risultati ottenuti e caratterizzare i meccanismi patogenetici.

Risultati attesi. 1. Identificare fattori prognostici indipendenti per nuovi criteri di stratificazione dei pazienti a protocolli terapeutici. La MRM consente di identificare tre gruppi di rischio entro il terzo mese di chemioterapia comune, mentre la disponibilità di fattori prognostici alla diagnosi consentirebbe di differenziare la terapia fin dal suo inizio; 2. Identificare proteine bersaglio per trattamenti farmacologici mirati; 3. Identificare profili di espressione genica correlati alla prognosi; 4. Identificazione, di proteine coinvolte nelle vie di trasduzione del segnale nelle cellule tumorali; 5. Identificazione di microRNA con ruolo di regolazione biologica nelle leucemie.

Conclusioni e prospettive future. L'integra-

zione delle nuove tecnologie disponibili consente un approccio complessivo all'eterogeneità della malattia, per chiarire le basi molecolari della diversa risposta alla terapia.

La definizione di proteine specifiche di sottogruppi prognostici permetterà di porre le basi per sviluppare e sperimentare farmaci diretti a bersagli identificati, in alternativa o in associazione alla terapia multi-chemioterapica convenzionale. Si ritiene che tale approccio rappresenti la condizione per garantire ai bambini italiani con LLA un continuo progresso nella probabilità di cura, riducendo la morbilità e mortalità associate agli attuali protocolli multi-chemioterapici.

I risultati richiederanno la convalida in un'ampia casistica prospettica.

24

RUOLO DELLA MALATTIA RESIDUA MINIMA NEL TRAPIANTO DI MIDOLLO OSSEO ALLOGENICO IN PAZIENTI CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA

L. Di Maio,¹ S. Songia,² S. Bonanomi,¹ A. Rovelli,¹ A. Biondi,^{1,2} G. Cazzaniga,² A. Balduzzi¹

¹Clinica Pediatrica Università Milano-Bicocca, Ospedale San Gerardo, Monza, ²Centro Ricerca M. Tettamanti, Clinica Pediatrica Università Milano-Bicocca, Monza

Introduzione. La recidiva di leucemia linfoblastica acuta (LLA) dopo trapianto di midollo osseo (TMO) ha prognosi infausta; l'analisi della malattia residua minima (MRM) è uno strumento prognostico che può offrire opportunità di intervento precoce.

Pazienti e metodi. Presso la Clinica Pediatrica di Monza i pazienti sottoposti a trapianto per LLA vengono analizzati per MRM al TMO e a +1, +3, +6, +9 e +12 mesi, o in base all'andamento clinico, tramite RQ-PCR per marcatori Ig/TcR clone-specifici. Ai fini di questa analisi, la MRM è considerata positiva al TMO se $>1 \times 10^{-4}$ e successivamente al TMO, se positiva, a qualunque livello di sensibilità. Da maggio 2001 a febbraio 2009, con 6 mesi di follow-up minimo potenziale, sono stati analizzati per MRM 57 (età mediana 8 anni) di 70 pazienti consecutivi pediatrici (età alla diagnosi <18 anni, al trapianto < 21 anni) sottoposti a trapianto allogenico di midollo osseo per LLA in prima (n=16), seconda (n=33) e terza (n=8) remissione completa (RC); per 13 pazienti non è stato disponibile materiale di malattia per lo studio (n=7) o non è stato possibile identificare un marcatore di malattia (n=6, 2 recidive midollari e 4 extramidollari). I pazienti hanno ricevuto

cellule ematopoietiche da sangue midollare (n=47, 2 dei quali associato a sangue cordonale), periferico (n=9) o cordonale (n=1) da donatore familiare (n=23) che era HLA identico (n=17) o compatibile (n=2; 8/10) o aploidentico (n=4) o da donatore non familiare (n=34; 15 con compatibilità 10/10, 10 con 9/10, 7 con 8/10 e 2 con 7/10). È stato utilizzato un regime di condizionamento mieloablativo in 48 casi, che ha incluso irradiazione corporea totale in 47 casi, associata a ciclofosfamide (n=9), etoposide (n=15) o entrambi (n=21) o tiotepa e fludarabina (n=2); in un paziente inferiore all'anno è stato utilizzato regime di condizionamento con busulfano, ciclofosfamide e melphalan; nei pazienti sottoposti a secondo trapianto (n=9), dopo trapianto autologo, sono stati utilizzati regimi di condizionamento ad intensità ridotta. La profilassi della GVHD è consistita in ciclosporina nel TMO da fratello HLA identico (+methotrexate in 3 casi di ricevente >14 anni), in ciclosporina associata a MTX+ATG nel TMO da altro donatore.

Risultati: outcome del TMO. Dei 57 pazienti, 28 hanno sviluppato GvHD acuta di II-IV grado. Il follow-up è stato aggiornato al 30/08/09 e la durata mediana del follow-up per i pazienti vivi in continua RC è di 48 mesi. Dei 57 pazienti in studio, 31 pazienti sono in vivi in RC, 8 sono deceduti in RC e 18 sono deceduti dopo recidiva (mediana 5 mesi, range 2-24). **MRM al TMO.** All'analisi MRM al momento del trapianto 24 (8 in 1RC, 14 in 2RC e 2 in 3RC) pazienti erano positivi, mentre 33 (8 in 1RC, 19 in 2RC, e 6 in 3RC) erano negativi. Dei 24 pazienti con MRM positiva al TMO 12 (50%) sono recidivati ad una mediana di 3 mesi (range: 2-9 ms) dal TMO e dei 33 pazienti con MRM negativa al TMO 6 (18%) sono recidivati ad una mediana di 10 mesi (range: 3-24 ms). Pertanto il test MRM ha presentato una sensibilità del 67% e una specificità del 70%; la predittività del test negativo è stata dell'82% e la predittività del test positivo è stata del 50%. **MRM post TMO.** Nei 24 pazienti positivi al TMO la MRM post-trapianto è rimasta sempre positiva in 8 pazienti che sono tutti recidivati e si è negativizzata in almeno un punto in 16. Dei 16, 10 sono successivamente rimasti sempre negativi, dei quali 9 sono in RC e 1 è deceduto in RC, e 6 hanno ripresentato almeno un punto positivo, 4 dei quali sono recidivati. Nei 33 pazienti negativi al TMO, la MRM post-trapianto è rimasta sempre negativa in 30, 3 dei quali sono recidivati, tutti oltre l'anno dal TMO, mentre 3 si sono positivizzati a 6 mesi dal TMO, con successiva recidiva ad un intervallo di 3, 8, e 8 mesi dalla prima positivizzazione post-TMO. I casi che hanno presentato almeno un valore positivo di MRM post-

trapianto, ma che non sono recidivati, avevano un valore stabile o decrescente e comunque inferiore a 5×10^{-4} .

Conclusioni. In conclusione, la positività della MRM al TMO è associata ad un aumentato rischio di recidiva; la positività della MRM post-trapianto è associata quasi invariabilmente a recidiva. Pertanto sono auspicabili strategie di immunomodulazione nei pazienti con MRM positiva.

Bibliografia

1. Bader P, Kreyenberg H, Henze GH et al. Prognostic value of minimal residual disease quantification before allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia: the ALL-REZ BFM Study Group. ALL-REZ BFM Study Group. *J Clin Oncol* 2009;27:377-84;
2. van der Velden VH, van Dongen JJ. MRD detection in acute lymphoblastic leukemia patients using Ig/TCR gene rearrangements as targets for real-time quantitative PCR. *Methods Mol Biol* 2009;538:115-50.
3. Kreyenberg H, Eckert C, Yarkin Y, et al. Immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements as PCR-based targets are stable markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia after stem cell transplantation. *Leukemia* 2009;23:1355-8.
4. Goulden N, Bader P, Van Der Velden V, et al. Minimal residual disease prior to stem cell transplant for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2003;122:24-9.

25

STUDIO DEL PROFILO DI ESPRESSIONE GENICA COME PREDITTORE PROGNOSTICO NEI PAZIENTI CON LEUCEMIA MIELOMONOCITICA GIOVANILE

S. Bresolin,¹ M. Zecca,² L. Trentin,¹ A. Zangrando,¹ L. Saianti,¹ G. Basso,¹ F. Locatelli,² G. te Kronnie¹ a nome dell'EWOG-MDS SG

¹Laboratorio di Oncoematologia, Dipartimento di Pediatria, Università degli Studi di Padova; ²Laboratorio di Oncoematologia, Fondazione IRCSS, Policlinico San Matteo, Università di Pavia

Introduzione. Le leucemie mielomonocitiche giovanili (JMML) sono disordini rari dell'età pediatrica. Sono caratterizzate da un'eccessiva proliferazione delle cellule monocitiche e granulocitiche¹ e da un'ipersensibilità al fattore stimolante colonie granulocitiche-macrofagiche (GM-CSF) causata dall'incapacità di down-regolare la via dipendente da Ras². Circa il 75% dei soggetti con JMML presentano mutazioni, mutualmente esclusive, dei geni *KRAS*, *NRAS*, *PTPN11* e *NFI*¹.

Le JMML sono caratterizzate da un decorso clinico aggressivo con una sopravvivenza media nei bambini non trapiantati inferiore ai 12 mesi dalla diagnosi³. Attualmente l'unico trattamento possibile per i pazienti con JMML è il trapianto di cellule staminali. L'età alla diagnosi e la percentuale di emoglobina fetale (HbF) sono gli unici parametri clinici identificati dall'EWOG-MDS per la predizione della prognosi e della sopravvivenza⁴.

Materiali e metodi. Abbiamo ottenuto il profilo d'espressione genica, mediante piattaforma Affymetrix HG U133 Plus 2.0, di 44 pazienti alla diagnosi di JMML. Il profilo ottenuto è stato poi analizzato utilizzando il classificatore DC *model* sviluppato durante lo studio MILE in grado di distinguere 16 sottoclassi di leucemia acuta e cronica, sindromi mielodisplastiche (MDS) e non-leucemia⁵. Analisi statistiche sono state utilizzate per determinare il valore prognostico della classificazione ottenuta mediante il DC *model*. Mediante "R" software, utilizzando i 538 geni del classificatore sono stati identificate le possibili *pathways* associate ai due gruppi prognostici.

Risultati. L'analisi del profilo d'espressione genica (GEP) mediante il classificatore DC *model* ha permesso di suddividere i pazienti JMML in due gruppi principali. Venti pazienti sono stati classificati nella sottoclasse delle leucemie mieloidi acute (AML) senza abberazioni note chiamate successivamente nello studio come AML-like; 18 pazienti sono stati classificati come non-leucemia e 2 pazienti come leucemia linfatica cronica (CLL); questi ultimi 20 pazienti sono stati raggruppati nel gruppo non AML-like. Quattro pazienti presentavano una bassa confidenza di classificazione e pertanto sono stati esclusi dalle future analisi.

La suddivisione dei pazienti JMML nei 2 gruppi ottenuta dal classificatore tra AML-like e non AML-like presenta un significato prognostico. L'*overall survival* dalla diagnosi dei 20 pazienti classificati come AML-like è del 7% e quella del gruppo non AML-like del 74% ($p=0.0005$). Considerando solo i 35 pazienti che hanno ricevuto il trapianto l'*overall survival* dal trapianto è del 9% e del 73% per il gruppo AML-like e non AML-like, rispettivamente ($p=0.0025$). L'*event free survival* (EFS) ai 10 anni dal trapianto è del 6% per i pazienti classificati come AML-like e del 63% per i pazienti non AML-like ($p=0.001$). Nell'analisi univariata solo l'età alla diagnosi maggiore di 2 anni e la presenza della monosomia del cromosoma 7 risultano essere statisticamente significative come predittori di prognosi peggiore; la presenza delle mutazioni nei geni *RAS*, *PTPN11* e *NFI* risulta essere equamente distribuita tra i 2 gruppi identificati. Considerando i fattori in grado di

influenzare l'EFS nell'analisi multivariata solo il risultato ottenuto dalla classificazione basata sull'analisi del profilo d'espressione risulta essere statisticamente significativa con un rischio di fallire il trattamento del 3.25 ($p=0.046$). Presupponendo che vi fosse un'evoluzione della malattia nel tempo verso una forma più aggressiva alla ricaduta abbiamo analizzato mediante il DC *model* il profilo d'espressione genica di 8 pazienti con materiale disponibile sia alla diagnosi di JMML sia alla ricaduta. Dai risultati ottenuti emerge che i pazienti JMML presentano la stessa *signature* sia alla diagnosi sia alla ricaduta.

Conclusioni. Dal nostro studio emerge che l'analisi del profilo d'espressione genica mediante l'utilizzo del DC *model* suddivide le JMML in due sottogruppi con significato prognostico. I pazienti JMML classificati come AML-like presentano una sopravvivenza peggiore sia dalla diagnosi sia dal trapianto rispetto ai pazienti JMML classificati come non AML-like. Inoltre la classificazione evidenzia come vi possa essere una maggiore possibilità del gruppo non AML-like rispetto al gruppo AML-like di beneficiare del trapianto di cellule staminali. L'analisi del GEP mediante DC *model* risulta essere un importante strumento prognostico nei pazienti JMML superiore a tutti gli altri parametri clinici fino ad ora disponibili.

Bibliografia

1. Niemeyer CM and Kratz CP. Paediatric myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukaemia: molecular classification and treatment options. *Br J Haematol* 2008;140:610-24.
2. Flotho C, Kratz C, Niemeyer CM. Targeting RAS signaling pathways in juvenile myelomonocytic leukemia. *Curr Drug Targets* 2007;8:715-25.
3. Niemeyer CM, Arico M, Basso G, et al. Chronic myelomonocytic leukemia in childhood: a retrospective analysis of 110 cases. European Working Group on Myelodysplastic Syndromes in Childhood (EWOG-MDS). *Blood* 1997; 89: 3534-43.
4. Locatelli F, Nollke P, Zecca M, et al. Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in children with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML): results of the EWOG-MDS/EBMT trial. *Blood* 2005;105:410-9.
5. Mills KI, Kohlmann A, Williams PM, et al. Microarray-based classifiers and prognosis models identify subgroups with distinct clinical outcomes and high risk of AML transformation of myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood* 2009.

LA DIVERSA ESPRESSIONE DI HOXA5, HOXA9 E HOXA10 IDENTIFICA LA PRESENZA DI DUE SOTTOGRUPPI ALL'INTERNO DEI PAZIENTI CON LLA B E MLL/AF4

L. Trentin,¹ M. Giordan,¹ S. Bresolin,¹
T. Dingermann,² G. Basso,¹
R. Marschalek,² G. te Kronnie¹

¹Dipartimento di Pediatria, Laboratorio di Oncoematologia Pediatrica, Padova;
²Institute of Pharmaceutical Biology/ZAFES/DCAL/CEF, JWG-University Frankfurt, Biocenter, Frankfurt/Main, Germany

Introduzione. Studi d'espressione genica mediante microarray hanno evidenziato come l'elevata espressione dei geni *HOXA10*, *HOXA9*, *HOXA7* e *HOXA5* sia una caratteristica peculiare delle leucemie acute sia linfoblastiche (LLA) di tipo B, T che mieloidi (LMA) e con traslocazioni a carico del gene *MLL*.¹⁻³ Studi condotti *in vitro* ed *in vivo* hanno tuttavia messo in discussione il ruolo dei geni *HOXA* nella leucemogenesi delle LMA con riarrangiamenti *MLL*.⁴ Inoltre, è stata descritta una linea cellulare linfoide con t(4;11) con una bassa espressione dei geni *HOXA*.⁵ In questo studio abbiamo valutato se una simile *down* regolazione dei geni *HOXA* fosse presente in pazienti con LLA a cellule precursori B (BCPs) e t(4;11).

Materiali e metodi. Il profilo d'espressione genica di 32 aspirati midollari o sangue periferico di pazienti all'esordio (22 *infant* e 10 non *infant*) con LLA B e t(4;11), di 7 aspirati midollari di controlli normali e di 5 linee cellulari (RS4;11, SEM, MV4;11, THP-1 e NOMO-1) è stato ottenuto mediante arrays Affymetrix HG-U133 Plus 2.0. L'analisi dei dati di espressione genica è stata effettuata impiegando il software R (www.r-project.org); i tools DAVID e Ingenuity Pathways Analysis 6.5 sono stati utilizzati per le analisi dei *networks* e di *gene ontology* (GO). L'espressione relativa di *HOXA9* è stata valutata mediante qRT-PCR con SYBR Green impiegando come calibratore cellule CD19+ separate da sangue periferico, *GUS B* come *reference gene* ed il metodo del 2^{-ΔΔCt}.

Risultati. L'analisi del profilo d'espressione dei geni *HOXA5*, *HOXA9* e *HOXA10* nei 32 pazienti ha permesso di suddividere i campioni in due sottogruppi: il primo (n=23), indicato come "HOXA high", presenta un'elevata espressione dei geni *HOXA* mentre il secondo (n=9), indicato come "HOXA low", presenta una minore espressione degli stessi geni *HOXA*. Tutte le linee cellulari presentano un'elevata espressione dei geni *HOXA*. La diversa espressione di *HOXA9* nei due gruppi è stata confermata mediante qRT-PCR in 22 pazienti all'esordio e 2 coppie esordio/ricaduta ed è risultata essere statisticamente significativa ($p=0.0002$).

Inoltre, il livello di espressione di *HOXA9* rimane inalterato nei due pazienti (uno "HOXA high" ed uno "HOXA low") analizzati sia all'esordio che alla ricaduta. La suddivisione dei pazienti in "HOXA high" e "HOXA low" non è il risultato della sola diversa espressione dei geni *HOXA5*, *HOXA9* e *HOXA10*. Infatti, l'analisi supervisionata tra i pazienti "HOXA high" e "HOXA low" ha individuato 225 geni ($p \leq 0.05$) diversamente regolati tra i due gruppi. Nei pazienti "HOXA low", i geni *over* espressi sono riconducibili a processi biologici quali la proliferazione, la morfogenesi e lo sviluppo cellulare (es. *PDGFA*, *VEGFA*, *BMP2*, *CDKN2A* e *POU2F2*). I geni *down*-regolati (es. *HOXA3*, *HOXA6*, *HOXA5*, *HOXA9*, *HOXA7*, *HOXA10*, *IRX3*, *ZNF503*, *RUNX2*, *HIST1H2AC*) afferiscono a processi biologici quali la regolazione della trascrizione, il modellamento della cromatina e lo sviluppo cellulare vincolato ai geni *HOXA*. Successivamente, usando 7 campioni di controlli normali, sono stati identificati sia i geni comuni che quelli esclusivamente espressi dai due gruppi di pazienti ("HOXA high" e "HOXA low").

L'analisi dei *network* tra i geni *up*- e *down*-regolati espressi sia nei pazienti "HOXA low" che "HOXA high" ha evidenziato come alcuni geni (es. *PLAGL1*, *ELL*, *NQO2*, *STK17A* e *JDP2*) presentino un'elevata correlazione con *TP53*, gene *up*-regolato in tutti i pazienti analizzati.

I geni *up*-regolati nei soli pazienti "HOXA high" (es. *RUNX1*, *RUNX2*, *MLL3* e *HISTH2AK*) sono coinvolti in processi biologici quali la regolazione della trascrizione e della cromatina mentre i geni *down*-regolati (es. *JAK1*, *PDCD4*, *VEGFA*) afferiscono alla regolazione dell'apoptosi, alla trasduzione del segnale e allo sviluppo cellulare. Nei soli pazienti "HOXA low", i geni *over* espressi (es. *VEGFA*, *PDGFA* e *ALDH18A1*) sono riconducibili a processi biologici quali la regolazione del metabolismo e la differenziazione cellulare mentre i geni *down*-regolati (es. *SOD2*, *TNFSF13B* e *KLF11*) a processi quali la risposta immunitaria, l'inibizione dell'apoptosi e la risposta allo stress. Infine, nessuna correlazione significativa è stata individuata tra i sottogruppi "HOXA high" e "HOXA low" e dati clinici quali la conta dei bianchi all'esordio, l'età alla diagnosi, la classe di rischio, la risposta al prednisone al giorno +8 e l'*event free survival*. Tuttavia, tutti i pazienti "HOXA low" sono *infant* con età alla diagnosi \leq ai 6 mesi.

Conclusioni. La diversa espressione di *HOXA5*, *HOXA9* e *HOXA10* risulta essere un fattore inaspettato in grado di suddividere il gruppo omogeneo dei pazienti con LLA B e t(4;11) in due sottogruppi con un profilo d'espressione ben distinto. I pazienti "HOXA low" esprimono un maggior numero di geni riconducibili allo sviluppo e alla crescita cellulare. I pazienti

"HOXA high" presentano una maggior espressione di geni coinvolti nella regolazione della trascrizione. Sebbene caratterizzati da due diversi profili d'espressione genica, i pazienti "HOXA high" e "HOXA low" presentano un simile decorso della malattia. È altresì interessante notare che i pazienti con una bassa espressione dei geni *HOXA5*, *HOXA9* e *HOXA10* sono tutti *infant* con età alla diagnosi \leq a 6 mesi.

Bibliografia

1. Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, et al. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet* 2002;30:41-7.
2. Ferrando AA, Armstrong SA, Neuberg DS, et al. Gene expression signatures in MLL-rearranged T-lineage and B-precursor acute leukemias: dominance of HOX dysregulation. *Blood* 2003;102:262-8.
3. Rozovskaia T, Feinstein E, Mor O, et al. Upregulation of Meis1 and HoxA9 in acute lymphocytic leukemias with the t(4;11) abnormality. *Oncogene* 2001;20:874-8.
4. So CW, Karsunky H, Wong P, et al. Leukemic transformation of hematopoietic progenitors by MLL-GAS7 in the absence of Hoxa7 or Hoxa9. *Blood* 2004;103:3192-9.
5. Bertrand FE, Spengeman JD, Shah N, LeBien TW. B-cell development in the presence of the MLL/AF4 oncoprotein proceeds in the absence of HOX A7 and HOX A9 expression. *Leukemia* 2003;17:2454-9.

27

IDENTIFICAZIONE DI NUOVI TARGET TERAPEUTICI NELLE B-ALL PEDIATRICHE TRAMITE ANALISI DEL PROFILO FOSFOPROTEOMICO: EFFETTO DELL'INIBIZIONE DI AMPK NELLE B-ALL CON RIARRANGIAMENTO DEL GENE MLL

B. Accordi,¹ V. Espina,² M. Giordan,¹
A.J. VanMeter,² L. Galla,¹ G. Milani,¹
M. Sciro,¹ R. De Maria,³ G. te Kronnie,¹
E.F. Petricoin,² L.A. Liotta,² G. Basso¹

¹Laboratorio di Oncoematologia Pediatrica, Università degli Studi di Padova, Italia, ²Center for Applied Proteomics and Molecular Medicine, George Mason University, VA, USA., ³Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italy

Introduzione. Le nuove tecnologie che permettono di studiare le aberrazioni che avvengono nelle cellule tumorali, a livello delle vie di trasduzione del segnale, sono un valido strumento per identificare nuovi target molecolari per terapie paziente-specifiche più efficaci e meno tossiche. Le informazioni riguardo ad un'errata regolazione dei processi che controllano la proliferazione, la differen-

ziazione e la morte cellulare sono perciò fondamentali per capire il meccanismo di crescita tumorale e identificare le proteine attivate in modo anomalo che potrebbero rappresentare nuovi bersagli molecolari per terapie mirate. Allo scopo di ottenere queste informazioni, nella prima parte del nostro studio è stata utilizzata la tecnica dei *Reverse Phase Protein Arrays* (RPPA)^{1,2} per analizzare il profilo fosfoproteomico, quindi lo stato di attivazione, dei blasti leucemici in 118 pazienti pediatrici affetti da B-ALL all'esordio. La correlazione tra i livelli di attivazione delle vie di trasduzione del segnale e le caratteristiche clinico-molecolari dei pazienti ci ha permesso di identificare alcuni possibili nuovi marcatori molecolari che necessitano di essere validati con ulteriori e approfonditi studi funzionali. Nella seconda parte dello studio abbiamo cominciato la validazione del primo risultato ottenuto dall'analisi RPPA utilizzando linee cellulari modello e uno specifico inibitore chinasi.

Materiali e metodi. È stato analizzato lo stato di attivazione di 92 diverse proteine in 118 pazienti pediatriche affette da B-ALL tramite RPPA. I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistiche allo scopo di identificare le vie di trasduzione del segnale attivate in modo differente nei diversi sottogruppi di pazienti. Sulla base dei risultati ottenuti è stato quindi testato mediante analisi *in vitro* l'effetto del Compound C, inibitore della proteina AMPK, sulla sopravvivenza di linee cellulari di B-ALL con riarrangiamento del gene MLL (SEM e RS4;11) e non traslocate (MHH-CALL-2 e MHH-CALL-4). È stato determinato tramite saggio di proliferazione cellulare (MTT) l'IC50 per ciascuna linea allo scopo di stabilire la diversa sensibilità all'inibitore e determinare le condizioni ottimali di trattamento per studiare gli effetti indotti dall'inibizione di AMPK. Inoltre, sono in corso ulteriori saggi di apoptosi mediante misurazione dell'annessione V e PI, analisi del ciclo cellulare, studio di marcatori di differenziazione tramite citometria a flusso e di proteine coinvolte nell'apoptosi tramite western blot.

Risultati. Dall'analisi dei dati ottenuti con i RPPA è stato osservato l'aumento del segnale di alcune proteine nei gruppi di pazienti a prognosi peggiore: (i) Il primo risultato interessante è emerso dal confronto tra i pazienti non traslocati e quelli riarrangiati per il gene *MLL*. In questi pazienti, caratterizzati da un outcome sfavorevole, è risultata iperattivata un'intera via che, attraverso la produzione di ossido nitrico, porta all'attivazione di Bcl-2 (3): LKB1 S428 → AMPK α S485 and AMPK, S108 → eNOS S116 → Bcl-2 S70. L'attivazione di Bcl-2 conferisce alla cellula tumorale resistenza all'apoptosi, e questo potrebbe contribuire alla scarsa

risposta alla terapia osservata in questi pazienti. (ii) Il secondo risultato interessante riguarda i pazienti che non rispondono al giorno +8 (*Prednisone Poor Responders*, PPR). Nei pazienti che rispondono alla terapia cortisonica al giorno +8 (*Prednisone Good Responders*, PGR), è risultata inibita la chinasi Lck. L'inibizione di questa proteina, membro della famiglia Src, tramite farmaci già in uso come il BMS-354825 (Dasatinib) e l'STI-571 (Imatinib) è già stata dimostrata essere in grado di indurre apoptosi nei linfociti T.⁴ Nei pazienti PPR questa chinasi non è inibita, e sarà quindi interessante valutare se inibitori di Lck potrebbero essere di supporto alle terapie tradizionali nel trattamento di questi pazienti. (iii) È stata infine condotta un'analisi di Relapse Free Survival (RFS) sui pazienti arruolati nei protocolli AIEOP LLA 88, 91, 95 e 2000 allo scopo di identificare proteine correlate ad una maggiore aggressività della malattia. È risultato che pazienti con livelli di Ciclina E superiori a 1.228 hanno una maggiore probabilità di ricadere: 15 su 28 pazienti (53%) con alti livelli di Ciclina E ricadono, mentre tra gli 84 pazienti con bassa Ciclina E solo 14 ricadono (17%). Inoltre, alti livelli di Ciclina E sono stati trovati in 6 su 7 pazienti con riarrangiamento del gene MLL, 3 su 3 pazienti con la t(9;22) e 4 su 5 pazienti High Risk per malattia residua minima (MRM), mentre bassi livelli di Ciclina E sono stati rilevati in 16 su 19 pazienti Standard Risk per MRM.

Allo scopo di approfondire il primo di questi risultati, l'attivazione della via di AMPK nelle B-ALL MLL riarrangiate, sono in corso le analisi sull'effetto dell'inibizione di AMPK in linee cellulari selezionate come modello *in vitro*: SEM e RS4;11 come modello di B-ALL con t(4;11), e MHH-CALL-2 e MHH-CALL-4 come controlli. Per inibire AMPK viene usato il suo inibitore specifico Compound C.⁵ Tramite test MTT e saggi di apoptosi è stata messa in luce la sensibilità estremamente diversa di queste linee cellulari all'inibizione dell'AMPK: mentre per le linee con riarrangiamento MLL già a 48 ore, alla concentrazione 6 μM di Compound C, si osserva solo il 50% di cellule vive, le linee non traslocate risultano fino alle 96 ore, 50μM Compound C, completamente insensibili. Lo spegnimento dell'intera via in seguito all'inibizione dell'AMPK nelle SEM e nelle RS4;11 è stato verificato tramite Western Blot. Per approfondire l'apoptosi indotta dal Compound C nelle linee MLL riarrangiate, sono ora in corso analisi per studiare le alterazioni del ciclo cellulare e le variazioni dei marker di differenziazione e delle proteine coinvolte nell'apoptosi.

Conclusioni. Questo lavoro sottolinea l'importanza dello studio dell'attivazione

delle vie di trasduzione del segnale come strumento per l'identificazione di disordini molecolari nelle B-ALL pediatriche. Proteine che hanno un ruolo nella sopravvivenza e nella proliferazione cellulare come AMPK, Lck e la Ciclina E sono risultate essere iperattivate o iperespresse nei sottogruppi di pazienti a prognosi peggiore, e potrebbero rappresentare nuovi bersagli molecolari per farmaci inibitori delle chinasi di recente sviluppo o già utilizzati in terapia in differenti contesti clinici. L'inibizione dell'AMPK risulta infatti essere efficace nell'indurre l'apoptosi nelle cellule con riarrangiamento del gene MLL. I risultati finora ottenuti incoraggiano quindi futuri studi funzionali di validazione dei diversi target identificati. La scoperta dei meccanismi molecolari alla base della resistenza risulterà importante per disegnare terapie personalizzate e migliorare la stratificazione dei pazienti e la prognosi.

Bibliografia

1. Liotta LA, Espina V, Mehta AI, et al. Protein microarrays: meeting analytical challenges for clinical applications. *Cancer Cell* 2003;3:317-25.
2. Wulfkühle JD, Aquino JA, Calvert VS, et al. Signal pathway profiling of ovarian cancer from human tissue specimens using reverse-phase protein microarrays. *Proteomics* 2003;3:2085-90.
3. Thomsen LL, Miles DW, Happerfield L, Bobrow LG, Knowles RG, Moncada S. (1995). Nitric oxide synthase activity in human breast cancer. *Br J Cancer* 72: 41-44.
4. Blake S, Hughes TP, Mayrhofer G, Lyons AB. The Src/ABL kinase inhibitor dasatinib (BMS-354825) inhibits function of normal human T-lymphocytes in vitro. *Clin Immunol* 2008;127:330-9.
5. Baumann P, Mandl-Weber S, Emmerich B, et al. Inhibition of adenosine monophosphate-activated protein kinase induces apoptosis in multiple myeloma cells. *Anticancer Drugs* 2007;18:405-10.

28

L'INTERLEUCHINA 12 È IN GRADO DI INIBIRE DIRETTAMENTE LA CRESCITA DI CELLULE DI LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA

E. Ferretti,¹ C. Cocco,² E. Di Carlo,³ D. Montagna,⁴ D. Ribatti,⁵ E. Ognio,⁶ F. Locatelli,⁴ V. Pistoia,¹ I. Airoidi²

¹Laboratory of Oncology, G. Gaslini Institute, Genova; ²A.I.R.C. Tumor Immunology Unit, Department of Experimental and Laboratory Medicine, G. Gaslini Institute, Genova; ³Department of Oncology and Neurosciences, "G. d'Annunzio" University and Ce.S.I. Aging Research Center, "G. d'Annunzio" University Foundation, Chieti; ⁴Pediatric Hematology/Oncology Fondazione, IRCCS Policlinico San

Matteo, Pavia; ⁵Department of Human Anatomy and Histology, University of Bari, Bari; ⁶Animal Model Facility, Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genova, Italy

Introduzione. La leucemia mieloide acuta (LMA) è un tumore del sangue derivante dalla trasformazione maligna di blasti di origine mieloide, che iniziano a replicarsi in maniera rapida e incontrollata, accumulandosi nel midollo. In molti casi, all'infiltrazione leucemica nel midollo segue il manifestarsi di anemia e trombocitopenia.¹ La leucemia mieloide acuta ha un'incidenza di circa il 15-20% delle varie leucemia del bambino, e presenta un'elevata mortalità.^{2,3} Vi sono attualmente studi che dimostrano successi nel trattamento di questa malattia, ma il problema della severità e dell'elevata probabilità di ricaduta che la patologia presenta, rendono necessari ulteriori analisi. Questo studio si inserisce proprio nel tentativo di trovare una sostanza capace di avere effetto positivo sulla malattia. In quest'ottica ci siamo chiesti quali possano essere gli effetti sulla LMA della interleuchina 12 (IL-12). È noto, infatti, come questa citochina presenti una potente attività anti-tumorale in differenti tipologie neoplastiche, quali, per esempio, la leucemia linfoblastica acuta, la leucemia linfatica cronica e il mieloma multiplo.^{4,5} Obiettivo dello studio è stato investigare: i) l'espressione e la funzione dei recettori della IL-12 su cellule di LMA; ii) l'attività anti-tumorale diretta, *in vitro* e *in vivo*, operata dalla citochina su cellule di LMA e iii) i meccanismi coinvolti in tali fenomeni.

Materiali e metodi. L'espressione di superficie delle due catene del recettore della IL-12 (beta 1 e beta 2) è stata studiata, tramite marcatura e successiva analisi citofluorimetrica, su differenti linee di LMA (U937, K562, THP-1) e su cellule primarie isolate da 15 pazienti affetti da LMA, che presentavano più del 90% di popolazione blastica. Inoltre, per studiare la funzionalità del recettore per la IL-12, le cellule di LMA (sia di linee che primarie) sono state trattate a differenti tempi (16, 24 e 48 ore) con la citochina ricombinante umana (20 ng/mL), e quindi sono state analizzate apoptosi, proliferazione e angiogenesi. Apoptosi e proliferazione sono state studiate mediante analisi citofluorimetrica, con marcature rispettivamente per annessina V/ioduro di propidio (apoptosi) e ki67 (proliferazione). L'angiogenesi delle cellule mieloidi neoplastiche coltivate in presenza o in assenza di IL-12 ricombinante è stata valutata sia tramite test su membrane corioallantoidee (CAM), che tramite analisi, con PCR, di vari geni coinvolti nel fenomeno angiogenico. La parte *in vivo* dello studio, si è svolta utilizzando come

modello animale topi SCID/NOD. In questi animali sono state inoculate, via intraperitoneale, 3 milioni di cellule della linea cellulare U937. Gli animali sono stati suddivisi in due gruppi: un gruppo è stato trattato tre volte la settimana con 1mg di IL-12 ricombinante umana, mentre il secondo gruppo è stato inoculato col solo mezzo di coltura. Dopo due settimane, in presenza di masse tumorali intraperitoneali, gli animali sono stati sacrificati, le masse sono state misurate e sottoposte a differenti analisi. In parte le masse sono state conservate in formalina, per consentire una successiva indagine immunostochimica; in parte sono state recuperate da esse le cellule e sono state analizzate la percentuale di cellule proliferanti (ki67⁺), la percentuale di cellule apoptotiche (annexinaV⁺), e la modulazione di geni coinvolti nell'angiogenesi (tramite analisi con PCR array).

Per l'inoculo *in vivo* di cellule derivate da midollo osseo da un paziente affetto da LMA sono stati utilizzati topi SCID/NOD *Il2rg*^{-/-}. Due gruppi da quattro animali ciascuno sono stati inoculati sottocute con 6 milioni ciascuno di cellule primarie: un gruppo è stato trattato con due dosi settimanali di IL-12 ricombinante umana, e l'altro col solo mezzo, come controllo. Dopo due settimane gli animali sono stati sacrificati e le masse espianate per successivi studi tissutali.

Risultati. In primis, dall'analisi citofluorimetrica è emerso come cellule primarie di LMA, così come cellule di linee, esprimano in modo costitutivo in superficie entrambe le catene (1 e 2) del recettore della IL-12. Successivamente ci siamo occupati dello studio della funzionalità del recettore per la IL-12 su cellule derivate da pazienti affetti da LMA. Trattando per 48ore tali cellule con la citochina ricombinante, si assiste ad una significativa diminuzione della proliferazione; al contrario non si hanno effetti sulla apoptosi. Nessun effetto significativo è presente agli altri tempi testati. Sulle stesse sospensioni, il trattamento per 24 ore con la citochina ricombinante induce una significativa riduzione dell'angiogenesi, come dimostrato mediante test CAM. A conferma di questo dato, attraverso l'analisi con PCR di 84 geni coinvolti nell'angiogenesi, è stata evidenziata la modulazione, nelle cellule trattate 48 con IL-12, di alcuni geni pro angiogenici, quali Neuropilina2, JAG-1, CXCL6, IL-6, Leptina e VEGF-D. L'analisi funzionale è stata effettuata anche sulle linee di LMA. Il trattamento su tali cellule con IL-12 per 24, 48 o 72 ore non influenza né la proliferazione né l'apoptosi. Effetto del trattamento a 24 ore è invece presente a livello angiogenico (misurata tramite test CAM). Lo studio *in vivo* è stato effettuato in topi SCID/NOD. Due gruppi da dieci animali ciascuno sono stati inoculati per

via intraperitoneale con 3 milioni ciascuno della linea mieloide umana U937: il primo è stato trattato tre volte alla settimana con IL-12 ricombinante umana (1 µg dose); il secondo è stata inoculato agli stessi tempi col solo mezzo di coltura. Dopo 15 giorni, al sacrificio degli animali, le masse tumorali dei topi trattati con la citochina risultavano essere significativamente più piccole; le cellule isolate da questi animali presentavano una proliferazione diminuita ed una apoptosi aumentata (misurate tramite citofluorimetria) rispetto alle cellule isolate dalle masse dei topi di controllo. L'analisi molecolare ha, inoltre, evidenziato una modulazione di differenti geni pro angiogenici negli animali trattati, e l'analisi tissutale ha rilevato, nelle masse di tali topi, la presenza di aree necrotiche emorragiche, associate ad una ridotta espressione del marcatore angiogenico VEGF, presente, invece, negli animali di controllo, ad una severa mancanza di vascolarizzazione e alla presenza di alcuni eventi apoptotici nei tessuti. Inoculando cellule primarie in animali SCID/NOD *Il2rg*^{-/-} e trattando un gruppo con IL-12 ricombinante umana, si è assistito allo svilupparsi di masse tumorali ridotte rispetto agli animali trattati con il solo mezzo di controllo. Sono in corso studi di immunostochimica sulle masse espianate.

Conclusioni. Questo studio dimostra per la prima volta la capacità della citochina IL-12 di inibire direttamente la crescita e proliferazione di cellule derivate da pazienti affetti da leucemia mieloide acuta, come supportato dallo stesso modello murino. Questi risultati possono fare ipotizzare il passaggio dell'utilizzo della citochina IL-12 nella clinica.

Bibliografia

1. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002;100:2292-302.
2. Kaspers GJ, Zwaan CM. Pediatric acute myeloid leukemia: towards high-quality cure of all patients. *Haematologica* 2007;92:1519-32.
3. Kaspers GJ, Creutzig U. Pediatric acute myeloid leukemia: international progress and future directions. *Leukemia* 2005;19:2025-9.
4. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 133-46.
5. Airoidi I, Di Carlo E, Banelli B, et al. The IL-12Rbeta2 gene functions as a tumor suppressor in human B cell malignancies. *J Clin Invest* 2004;113:1651-9.

LA METILAZIONE DEL PROMOTORE DEL MIR-34B CONTROLLA LA TRASFORMAZIONE MIELOIDE MODULANDO I LIVELLI DI CREB

M. Pigazzi, E. Baron, A. Beghin, C. Zanon, E. Manara, G. Basso

Università di Padova, Dipartimento di Pediatria, Laboratorio di Oncoematologia

Introduzione. Il fattore di trascrizione cAMP response element binding protein (CREB) è sovra-espresso nella leucemia e contribuisce alla trasformazione neoplastica attivando la trascrizione di geni target per lo più coinvolti nella proliferazione cellulare. CREB è noto promuovere la progressione tumorale *in vitro* e *in vivo* (Pigazzi *et al.*, 2008). La ricerca delle cause della sovra-espressione di CREB ha dimostrato un ruolo del miR-34b in grado di controllare la sua traduzione nella leucemia. La correlazione inversa tra l'espressione di CREB e miR-34b è stata descritta in linee leucemiche, e il transiente ripristino di questo miRNA *in vitro* è stato dimostrato essere sufficiente ad abbassare i livelli di CREB e a contrastare il fenotipo leucemico. È stato recentemente scoperto che miR-34b si mantiene a sotto-espresso nelle linee leucemiche perché il promotore è iper-metilato (Pigazzi *et al.*, 2009).

Materiali e metodi. L'espressione di miR-34b è stata condotta in una serie di pazienti affetti da leucemia mieloide acuta (LAM) e in soggetti affetti da disordini mieloproliferativi (MPD) mediante RQ-PCR. I risultati mostrano che l'espressione di miR-34b è più bassa negli esordi LAM rispetto a controlli sani. La bassa espressione di miR-34b nei pazienti LAM supporta gli elevati livelli di CREB, ampiamente documentati negli esordi, confermando i dati ottenuti nelle linee cellulari *in vitro*. L'espressione di miR-34b negli MPD si mantiene significativamente più alta rispetto ai campioni LAM, aprendo una nuova ricerca sul ruolo che gioca miR-34b nel controllare CREB e l'evoluzione da MPD a LAM. Per testare questa ipotesi, è stato condotto lo studio della metilazione del promotore di miR-34b mediante MS-PCR.

Risultati. I risultati rivelano che nei pazienti LAM miR-34b è sottoespresso perché il suo promotore è iper-metilato, mentre nei pazienti MPD questo non avviene. L'ipotesi che la metilazione del promotore di miR-34b costituisca l'evento precoce di trasformazione tumorale, aumentando i livelli di CREB nelle LAM, è in corso di validazione mediante lo studio di una serie di colture primarie. Le colture primarie derivanti da esordi LAM sono state trattate con un agente demetilante, la 5-azacitidina. I conseguenti innalzamenti dei livelli di espressione di

miR-34b hanno provocato un abbassamento di CREB e dei suoi target, evidenziando una propensione alla morte cellulare. Viceversa l'utilizzo di oligonucleotidi sintetici antisenso per miR-34b inseriti in colture di midolli sani ha provocato un abbassamento del miR-34b, un conseguente aumento di CREB e l'acquisizione di altri fattori trascrizionali determinanti nello sviluppo della leucemia mieloide, tra cui PU.1 e MEIS1.

Conclusioni. La metilazione del promotore di miR-34b è un evento epigenetico di rilevante importanza nell'insorgenza della LAM attraverso l'attivazione del pathway di CREB, che si conferma un proto-oncogene nella leucemia mieloide. miR-34b si delinea essere un importante oncosoppressore *in vivo* aprendo nuove visioni sui meccanismi molecolari di azione di CREB e dei segnali associati a questo pathway nella leucemia. La messa a punto di modelli in topo rivelerà le potenzialità di miR-34b e CREB come futuri target terapeutici.

Bibliografia

- Pigazzi M, Manara E, Baron E, Basso G. ICER expression inhibits leukemia phenotype and controls tumor progression. *Leukemia* 2008; 22: 2217-2225.
 Pigazzi M, Manara E, Baron E, Basso G. Mir-34b targets cAMP response element binding protein (CREB) in acute leukemia. *Cancer Res* 2009; 69: 2471-2478.

ANALISI CITOFUORIMETRICA DEL PATHWAY DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE NELLA LEUCEMIA MIELOMONOCITICA GIOVANILE (JMML): FATTIBILITA' DI UNO STUDIO RETROSPETTIVO

C. Bugarin,¹ E. Giarin,² D. Longoni,² M. Zecca,³ G. Basso,² A. Biondi,¹ G. Gaipa¹

¹Centro Ricerca M. Tettamanti, Clinica Pediatrica Università Milano-Bicocca, Ospedale San Gerardo, Monza (MI); ²Laboratorio di Oncoematologia Pediatrica, Dipartimento di Pediatria, Università, Padova; ³Oncoematologia Pediatrica, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Introduzione. La JMML è una malattia rara dell'infanzia con prognosi estremamente sfavorevole, caratterizzata da un'eccessiva proliferazione delle cellule mieloidi (monociti e granulociti) che si infiltrano numerose nei tessuti emopoietici e non (Aricò *et al.*, 1997). Si tratta di una patologia emopoietica clonale, originata da cellule staminali pluripotenti, con caratteristiche sia mielodisplastiche che mieloproliferative caratterizzata inoltre da una selettiva ipersensibilità al

fattore di crescita GM-CSF (Emanuel *et al.*, *Blood*, 1991). L'iter diagnostico della JMML prevede la conferma della crescita anormale *in vitro* di colonie CFU-GM a basse concentrazioni di GM-CSF e/o il saggio di proliferazione spontanea in assenza di uno stimolo esogeno. Mutazioni a carico del gene RAS (N-RAS e K-RAS), la perdita di eterozigotà del gene NF1, e le mutazioni somatiche del gene PTPN11 sono caratteristiche dei pazienti con JMML con incidenza mutualmente esclusiva di circa il 70% (Emanuel PD *et al.*, *Mol Med Today* 1996; Tartaglia M *et al.*, *Nat Genet* 2003). La citofluorimetria multiparametrica permette attualmente di effettuare misure simultanee di parametri fenotipici e funzionali (trasduzione del segnale) a livello di singola cellula.

È stato recentemente dimostrato che la risposta *in vitro* di precursori emopoietici raccolti da pazienti con JMML al fattore GM-CSF, consiste in un incremento della percentuale di cellule STAT-5 positive significativamente superiore rispetto a quanto si osserva nei precursori di soggetti sani (Gaipa G *et al.*, *Leukemia*, 2008; Kotecha N *et al.*, *Cancer Cell*, 2008). L'approccio citofluorimetrico allo studio della trasduzione del segnale nella JMML potrebbe contribuire ad una significativa riduzione della tempistica di diagnosi. Inoltre l'estensione di tale approccio ad una serie più numerosa di campioni potrebbe permettere di studiare una eventuale correlazione tra profilo genetico e profilo di fosforilazione di STAT-5.

Materiali e metodi. Al fine di stabilire la fattibilità della analisi citofluorimetrica di STAT-5 anche in campioni criopreservati di JMML abbiamo analizzato 12 campioni di cellule mononucleate di midollo osseo (5 freschi e 7 scongelati) da 9 pazienti con JMML e 35 campioni (17 freschi e 18 scongelati) di cellule midollari mononucleate appartenenti a soggetti di controllo. Per caratterizzare l'immunofenotipo delle cellule responsive a dosi crescenti di GM-CSF in termini di fosforilazione di STAT-5 abbiamo applicato un pannello a 3 (CD34/CD33/STAT5) o a 7 colori (Live-Dead dye/CD33/CD34/CD14/CD45/STAT5/CD38).

Risultati e conclusioni. Il profilo aberrante di fosforilazione di STAT-5 è stato confermato nella popolazione di precursori mieloidi CD34+/CD33+ in tutti i campioni di JMML freschi rispetto ai controlli. Al contrario tale evidenza non è stata confermata nei campioni scongelati di JMML che non sono risultati distinguibili dai controlli. In particolare abbiamo notato che l'espressione di STAT-5 è risultata down-modulata in funzione della estensione temporale tra raccolta del campione e congelamento. Abbiamo successivamente calcolato l'incremento di cellule STAT-5 positive normalizzando al 100% la

risposta ottenuta con la massima dose di GM-CSF e ponendo 0 la risposta in assenza di stimolo, come proposto da Kotecha *et al.* Mediante tale approccio il profilo aberrante di fosforilazione di STAT-5 dei campioni scongelati di JMML è risultato significativamente differente rispetto a quello dei controlli. L'estensione di tale approccio ad una serie più ampia di pazienti con JMML potrà portare nuovi contributi alla comprensione dei meccanismi biologici alla base di questa malattia, oltre che alla validazione di tale approccio citofluorimetrico nell'iter diagnostico della JMML.

35

ATTIVITÀ ANTITUMORALE DIRETTA DI IL-23 SULLE CELLULE DI LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA B (B-ALL) PEDIATRICA

S. Canale,¹ C. Frasson,² E. Di Carlo,³ E. Ognio,⁴ C. Cocco,¹ D. Ribatti,⁵ I. Prigione,¹ G. Basso,² V. Pistoia,¹ I. Airolidi¹

¹Istituto G.Gaslini Genova; ²Università di Padova; ³Università di Chieti; ⁴IST Genova; ⁵Università di Bari

Introduzione. IL-23 è una citochina eterodimerica pro-infiammatoria appartenente alla superfamiglia dell'IL-12.¹ È prodotta principalmente da cellule dendritiche attivate e macrofagi ed è ritenuta una delle principali citochine coinvolte nello sviluppo di molte malattie infiammatorie T-dipendenti. Il ruolo di IL-23 come agente anti-tumorale è ancor oggi molto controverso. È stato infatti dimostrato come tale citochina può inibire la crescita di vari tumori attraverso l'attivazione di linfociti T e NK.² Diversamente, è stato riportato come IL-23 può promuovere lo sviluppo tumorale e la neo-vascolarizzazione.³ Obiettivo specifico di questo lavoro è definire se IL-23 può svolgere un'attività antitumorale diretta sulle cellule di B-ALL e identificare gli eventuali meccanismi coinvolti.

Materiali e metodi. Colture cellulari. Le cellule neoplastiche primarie sono state ottenute, previo consenso informato, da aspirati midollari di pazienti pediatrici affetti da B-ALL non in terapia al momento del prelievo. In particolare, sono stati studiati 4 campioni primari di pro B-ALL, 19 di pre-B e 6 di early pre-B. Le linee cellulari umane di B-ALL utilizzate sono RS4;11 (pro-B-ALL), Nalm6 e 697 (pre-B-ALL). Le cellule sono state coltivate in terreno RPMI 1640 con 10% FCS in presenza ed assenza di IL-23 umana ricombinante alla concentrazione di 100 ng/mL. **Anticorpi e citofluorimetria.** Sono stati utilizzati anticorpi IgG goat anti IL-23R umana, anticorpi monoclonali anti BCL-2, anticorpi diretti anti CD10, CD19,

CD20, IFN- γ e Ki67 umani, anticorpi secondari coniugati PE anti-goat IgG. L'analisi citofluorimetrica è stata effettuata mediante lettura al FaCS Calibur analyzer utilizzando CellQuest software. **Test di proliferazione e apoptosi.** Cellule primarie di B-ALL sono state messe in coltura per 6, 24, 48 ore, sia in presenza che in assenza di IL-23. La proliferazione cellulare è stata misurata mediante l'utilizzo di anticorpi anti-Ki67, mentre l'apoptosi è stata valutata attraverso l'utilizzo del kit per l'Annexina V e ioduro di propidio. Inoltre, sono stati studiati alcuni pathways apoptotici quali ERK 1/2, AKT e le caspasi 3, 7, 8 e 10. **Studio angiogenesi.** Gli studi di angiogenesi sono stati eseguiti mediante l'impiego della tecnica CAM (*Coriallantoic membrane*) utilizzando il sovrantante alle 48 ore delle colture di B-ALL (primarie e linee) trattate e non con IL-23. **Analisi dei miRNA.** L'analisi dei miRNA è stata effettuata sia sulle cellule primarie di B-ALL che sulla linea cellulare umana 697. Dopo coltura delle cellule in presenza ed in assenza di IL-23 per 36 h, è stato estratto l'RNA con trizolo, successivamente sono stati isolati i miRNA maturi utilizzando il kit RT² qPCR-Grade per poi studiare e comparare il profilo dell'espressione dei miRNA nelle cellule trattate e non mediante MiRNA RT² Profiler PCR array e RT² Real-Timer. **Modelli animali.** Sono stati utilizzati 24 topi SCID-NOD di 4-6 settimane, divisi in due gruppi. Tutti i topi sono stati inoculati endovena con 5x10⁶ cellule 697. Un gruppo di 12 topi è stato trattato con IL-23 (3 dosi settimanali, 1 μ g/dose/topo), mentre l'altro è stato trattato con PBS. 14 giorni dopo l'inoculo delle cellule tumorali i topi sono stati sacrificati e sottoposti ad autopsia. Le masse tumorali asportate sono state misurate e studiate sotto il profilo molecolare, morfologico ed immunostochimico. **Analisi statistica.** Tutti i risultati ottenuti ricadono in un intervallo di confidenza pari al 99%. I dati sono stati analizzati utilizzando test statistici come t di Student e Mann Whitney e solo i valori di $p < 0.05$ sono stati ritenuti statisticamente significativi.

Risultati. Espressione di IL-23R nelle B-ALL primarie e nella loro controparte normale. Le cellule di B-ALL prelevate dai pazienti esprimono costitutivamente il recettore di IL-23 (espressione media nel 66% delle cellule neoplastiche). Tale espressione è significativamente più alta rispetto alla controparte normale (espressione media del 3%). IL-23 induce apoptosi ed inibisce la proliferazione cellulare nelle B-ALL primarie. IL-23 induce un significativo aumento dell'apoptosi ed una contemporanea diminuzione della proliferazione cellulare dopo 24 e 48 ore di trattamento. Tali effetti non sono apprezzabili alle 6 ore. IL-23 non ha

alcun effetto sul potenziale angiogenetico delle B-ALL primarie. IL-23 modula l'espressione dei micro(mi) RNA nelle B-ALL. Sei campioni di B-ALL ottenuti da pazienti sono stati analizzati per la modulazione dell'espressione di miRNA in seguito a trattamento con IL-23. IL-23 induce la down-regolazione di miRNA96 e la up-regolazione dei miRNA122, 15a, 18b, let7g, let7c, let7e, 100, 155, let7i, 149, 23b e 203. In particolare, il miRNA15a, che si comporta come tumor-suppressor in vari tumori,⁴ è l'unico miRNA costantemente up-regolato in tutti i campioni testati. IL-23 induce apoptosi nelle B-ALL primarie attraverso la up-regolazione del miRNA15a e la conseguente down-regolazione di BCL-2. Cellule primarie di B-ALL down-regolano BCL-2 in seguito al trattamento con IL-23. Abbiamo inoltre stabilito una relazione di causa-effetto tra IL-23, BCL-2, miR-15a e apoptosi. B-ALL primarie trattate con IL-23 e trasfettate con uno specifico inibitore anti-miRNA15a aumentano l'espressione di BCL-2 rispetto alle cellule trattate con la sola IL-23. Le cellule in cui viene inibito selettivamente miRNA15a non vanno in apoptosi. ERK1/2, AKT, caspasi 3, 7, 8, e 10 non sono infine coinvolti nell'apoptosi indotta da IL-23. IL-23 inibisce la crescita delle 697 nei topi SCID-NOD. Le masse tumorali che si sviluppano nei topi trattati con IL-23 sono significativamente più piccole rispetto a quelle dei topi trattati con PBS (volume medio tumori nei topi trattati con IL-23=24.8 mm³, volume medio tumori nei topi trattati con PBS= 40.8 mm³). I tumori espunti dai topi trattati con IL-23 presentano un'alta percentuale di cellule apoptotiche, a differenza delle masse tumorali provenienti da topi non trattati che, invece, risultano per la maggior parte costituite da cellule linfoblastiche proliferanti.

Conclusioni. In questo lavoro abbiamo dimostrato per la prima volta come IL-23 ricombinante umana abbia un effetto antitumorale diretto sulle cellule di B-ALL pediatrica sia *in vitro* che *in vivo*. Tale effetto è dovuto all'attività della citochina di indurre apoptosi ed inibire la proliferazione nelle cellule tumorali. L'effetto pro-apoptotico di IL-23 passa attraverso l'up-regolazione di miRNA15a che a sua volta induce la down-regolazione di BCL-2, con un conseguente incremento dell'apoptosi. Questi risultati aprono interessanti prospettive terapeutiche per i pazienti pediatrici affetti da B-ALL che non rispondono alle terapie convenzionali.

Bibliografia

1. Oppmann B, Lesley R, Blom B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological

- activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 2000;13:715-25.
- Langowski JL, Kastelein RA, Oft M. Swords into plowshares: IL-23 repurposes tumor immune surveillance. *Trends Immunol* 2007;28:207-12.
 - Langowski JL, Zhang X, Wu L, et al. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature* 2006;442:461-5.
 - Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet* 2007;39:673-77.

36

CALM-AF10 NON E' UN FATTORE PROGNOSTICO SFAVOREVOLE NEI BAMBINI AFFETTI DA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA T-LINEAGE (T-LLA) TRATTATI CON I PROTOCOLLI AIEOP LLA-2000 E LLA-R-2006

E. Mirabile,¹ M. Tumino,¹ C Caserta,¹ G. Cazzaniga,² C. Rizzari,² D. Silvestri,³ E. Barisone,⁴ F. Casale,⁵ M. Luciani,⁶ F. Locatelli,⁷ C. Messina,⁸ C.Micalizzi,⁹ A. Pession,¹⁰ R. Parasole,¹¹ N. Santoro,¹² G. Maserà,² G. Basso,⁷ M. Aricò,¹³ M.G. Valsecchi,³ A. Biondi,² V. Conter,¹⁴ L. Lo Nigro¹ on behalf of AIEOP - Scientific Committee of ALL

¹Center of Pediatric Hematology Oncology University of Catania, Catania, Italy;

²Monza, Ospedale Nuovo San Gerardo, University of Milano-Bicocca; ³Milano, University of Milano-Bicocca; ⁴Torino, Ospedale Regina Margherita; ⁵Napoli Federico II; ⁶Roma, Ospedale Bambin Gesù; ⁷Pavia, Policlinico San Matteo; ⁸Padova, Dipartimento di Pediatria; ⁹Genova Gaslini; ¹⁰Bologna, Ospedale S. Orsola; ¹¹Napoli, Pausillipon; ¹²Bari, Policlinico; ¹³Firenze, Ospedale Meyer; ¹⁴Bergamo, Ospedali Riuniti

Introduzione. La T-LLA rappresenta il 15% delle LLA pediatriche. Più del 30% di questi casi presenta una recidiva di malattia che a volte risulta esser fatale. L'identificazione precoce di alterazioni molecolari ad impatto prognostico può esser utile per identificare rapidamente i casi ad alto rischio di recidiva allo scopo di pianificare il più appropriato trattamento, compreso il ricorso al trapianto di cellule staminali ematopoietiche (TCSE). *CALM-AF10* è il più frequente trascritto di fusione riscontrato nelle T-LLA ed è il risultato della traslocazione cromosomica t(10;11)(p13;q14-21), riscontrata nelle T-LLA sia del bambino che dell'adulto. La sua presenza è stata associata ad una cattiva prognosi (Asnafi V et al, *Blood* 2003; van Groel M et al., *Haematologica* 2006). L'obiettivo del nostro studio è stato quello di i) definire l'incidenza di *CALM-AF10* in una popolazione di bambini con T-LLA omogeneamente trattati e ii) di valutare la prognosi di questi

pazienti. **Materiali e metodi.** Abbiamo studiato 201 pazienti con T-LLA, diagnosticati ed arruolati tra il 9/2000 ed il 12/2007 nei protocolli AIEOP-BFM (LLA-2000 e LLA-R-2006). I pazienti sono stati stratificati principalmente secondo la risposta al prednisone (buona risposta o good response se la conta dei blasti al giorno + 8 era >1000/mm³) e secondo la valutazione della malattia minima residua (MRD) eseguita al giorno +33 (Timepoint 1) e +78 (Timepoint 2). Quando entrambi i Timepoints erano negativi i bambini venivano considerati a Rischio Standard (SR); se TP1 e/o TP2 era positivo e TP2 ≤10³ erano considerati a rischio intermedio (MR); se TP2 positive ≥10³ a rischio alto (HR). I casi con cattiva risposta al prednisone (*prednisone poor response*: PPR) e MRD-HR venivano considerati eleggibili per il TCSE da donatore familiare compatibile. *L'event free survival* (EFS) e la *overall survival* (OS), valutate con 95% di CI, sono state generate mediante il metodo Kaplan-Meier e comparate con il test log-rank. Le reazioni di RT-PCR per la determinazione del *CALM-A10* sono state eseguite come riportato precedentemente.¹ **Risultati.** Dieci pazienti sono risultati non eleggibili e sono stati esclusi dall'analisi. Tra i 191 casi di T-LLA valutabili, 14 (7.3%) sono risultati positivi per la presenza di *CALM-AF10*. Dodici erano maschi. L'età mediana era di 8 anni (2-13 anni). La caratterizzazione immunofenotipica ha mostrato un quadro di T-LLA intermedia in 6 casi, matura in 5, immatura o precoce in 1 caso, biclonale in 1 caso e sconosciuto in un caso, rispettivamente. Otto casi sono risultati PPR. In base allo studio randomizzato del protocollo LLA-2000 sull'efficacia del PDN versus il desametonone (DXM), 8 bambini sono stati trattati con PDN, mentre 3 con DXM. I rimanenti 3 casi, inseriti nello studio LLA R-2006, sono stati così trattati: 2 con il DXM ed 1 con il PDN, rispettivamente. La stratificazione secondo l'analisi MRD ha comportato l'assegnazione di 3, 8 e 3 casi alle fasce SR, MR e HR rispettivamente. Quattro casi hanno mostrato una recidiva (3 al sistema nervoso centrale; 1 midollare). L'EFS a 5 anni dei 14 casi *CALM-AF10* positivi vs quello dei 177 negativi, era di 70.1% vs 63.9% (p-value log-rank=0.61).

Conclusioni. Questo studio effettuato su una grande coorte di bambini con T-LLA dimostra che *CALM-AF10* è presente in circa il 7% dei bambini con T-LLA e che non è correlato ad un prognosi sfavorevole quando una strategia chemioterapica intensiva è applicata.

Bibliografia

- Asnafi V, Radford-Weiss I, Dastugue N,

et al. *CALM-AF10* is a common fusion transcript in T-ALL and is specific to the TCR γ lineage. *Blood* 2003;102:1000-6.

- Van Grotel M, Meijerink JP, Beverloo HB, et al. The outcome of molecular-cytogenetic subgroups in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia: a retrospective study of patients treated according to DCOG or COALL protocols. *Haematologica* 2006;91:1156A.

37

IL GENE UMANO AF9 OMOLOGO DI ZEBRAFISH E' COINVOLTO NELLA EMATOPOIESI PRIMITIVA

G. Germano,¹ I. Guariento,¹ N. Tiso,² F. Argenton,² G. Basso¹

¹Laboratorio di Oncoematologia, Dipartimento di Pediatria, Università di Padova; ²Laboratorio di Biologia dello Sviluppo, Dipartimento di Biologia, Università di Padova

Introduzione. *AF9* (MLLT3) è una proteina nucleare appartenente alla famiglia proteica YEAST che promuove positivamente il differenziamento eritroide/megacariocitico durante la normale ematopoiesi umana. Nella leucemia mieloide acuta *AF9* è il principale gene partner di *MLL* (*Mixed-Lineage-Leukemia*). In questo studio abbiamo identificato il gene *AF9* omologo di zebrafish (*af9*) e abbiamo valutato il suo ruolo durante lo sviluppo embrionale in condizioni di sovraespressione e di silenziamento utilizzando mRNA sintetici e morfolini oligonucleotidi.

Metodi e risultati. Il gene *af9* è stato identificato mediante analisi in silico (www.ncbi.nlm.nih.gov), analisi di filogenesi (www.phylogeny.fr) e di sintenia (www.ensembl.org). La proteina ipotetica tradotta mostra il 60% d'identità e il 70% di similarità con la controparte umana. Mediante ibridizzazione *in situ* abbiamo rilevato l'espressione specifica di mRNA *af9* nel mesoderma laterale posteriore (PLM) allo stadio di 5 somiti (10 ore dopo fecondazione, hpf) e in seguito nella regione ICM (*Intermediate Cell Mass*) tra le 10 e le 24 hpf. Entrambi i siti PML e ICM sono importanti per lo sviluppo intraembrionico dell'ematopoiesi primitiva di zebrafish. In seguito a questi risultati abbiamo esaminato il ruolo del gene *af9* durante lo sviluppo dell'ematopoiesi embrionale, analizzando l'espressione di una serie di marcatori ematopoietici mediante PCR quantitativa (qPCR). Iniettando mRNA *af9* sintetico allo stadio di 1-2 cellule abbiamo osservato dopo 22 hpf un aumento dell'espressione di *gata1* e *hbae1* (marcatori del compartimento eritroide) e una riduzione dell'espressione di *scl*, *lmo2* (marcatori associati ai precursori ematopoietici) oltre che di *pu.1* e *l-plastin* (marcatori mieloidi).

Mediante esperimenti di *knock-down* utilizzando morpholins oligonucleotidi abbiamo osservato allo stadio di 22 hpf una diminuzione dell'espressione di *gata1* e *hbae1*, ed un aumento dell'espressione di *pu.1* e *l-plastin*. Per quanto riguarda l'espressione dei marcatori *scl* e *lmo2* risultata invariata.

Conclusioni. I risultati ottenuti suggeriscono che il gene *af9* modula l'espressione di *gata1*, il principale gene che contribuisce al differenziamento eritroide. Pertanto questo studio mostra che *af9* è coinvolto nell'ematopoiesi primitiva di zebrafish e si può quindi ipotizzare un suo ruolo nell'eritropoiesi di zebrafish. Considerando, quindi, che il programma genetico di AF9 nell'uomo e in zebrafish sono evolutivamente conservati questi risultati aprono nuove prospettive negli studi ematopoietici e nella ricerca sulle leucemie mieloidi acute.

38

L'ESPRESSIONE DI BAG-1 NELLA LEUCEMIA ACUTA

S. Aveiç, M. Pigazzi, G. Basso

Università di Padova, Dipartimento di Pediatria, Laboratorio Oncoematologica, Padova

Introduzione. Il gene Bcl-2 associated athanogene-1 (*BAG-1*) amplifica gli effetti anti-apoptotici mediati da BCL-2 e rappresenta uno dei fattori in grado di regolare i meccanismi antiapoptotici. *BAG-1* produce 3 isoforme proteiche grazie a tre siti di inizio traduzione presenti nel medesimo mRNA.¹ La localizzazione di ognuna di queste isoforme, nel citosol o nel nucleo, varia a seconda del tipo cellulare, di particolari stimoli intracellulari e dalle proteine che recluta come cofattori nei suoi domini di attivazione. BAG-1 infatti lega e interagisce con una serie molto ampia di proteine, la più importante Hsc70/Hsp70, determinando in modo specifico vie di segnale e il destino della cellula.² Per questo motivo BAG-1 svolge un ruolo fondamentale impiegandosi nelle più importanti attività cellulari tra cui proliferazione, differenziazione, embriogenesi, oncogenesi, motilità e soprattutto nel fenomeno dell'autofagia.³ *BAG-1* è noto per essere implicato in malattie neurodegenerative: recentemente è stato associato anche ad alcuni tumori dove, insieme alla proteina BAG-3, controlla principalmente i pathway di degradazione proteici proteasomali o lisosomiali. Ci sono delle evidenze che BAG-1 sia sovra-espresso anche nella leucemia⁴, per questa ragione la sua espressione è stata studiata in una serie di linee leucemiche e pazienti pediatrici affetti da leucemia acuta mieloide (LAM) e linfocitica (LAL) per comprendere se possa

avere un ruolo in questa patologia. Studi *in vitro* sono stati condotti per chiarire gli eventuali meccanismi molecolari di interazione e azione.

Materiali e metodi. I livelli di proteina BAG-1 sono stati misurati sia in linee cellulari leucemiche umane mieloidi (ML2, THP1, NOMO1, NB4, MV4;11 e HL60) che linfocitici (REH, RS4;11, 697 e JURKAT). Una serie di campioni di midollo osseo di pazienti LAM e LAL alla diagnosi e in remissione terapeutica sono stati inclusi nell'analisi. L'espressione dell'mRNA e della proteina sono stati condotti mediante RQ-PCR e Western blot in lisati di proteine citoplasmatiche e nucleari. È stato poi silenziato BAG-1 in linee cellulari leucemiche e in colture primarie derivate da pazienti con LAM all'esordio di malattia. Dopo il silenziamento di BAG-1 sono state condotte analisi sulla sopravvivenza cellulare con saggi per annessina-V-PI, ciclo cellulare e western blot per la caratterizzazione dei principali pathway interessati ed è stato fatto il co-silenziamento BAG-1 e BAG-3.

Risultati preliminari. I nostri risultati di espressione riguardano tutte e tre le isoforme, BAG-1L, BAG-1M e BAG-1S. Le isoforme BAG-1L e 1M sono per lo più a localizzazione nucleare e a funzione non nota, mentre l'isoforma 1S ha localizzazione citoplasmatica ed è quella di cui la funzione è più studiata. I risultati hanno dimostrato che tutte e tre le isoforme erano sovra-esprese nelle linee cellulari (4/4) linfocitici e nei pazienti LAL (9/9) alla diagnosi di malattia; mentre nei prelievi in remissione LAL solo l'isoforma 1S si manteneva espressa, mentre 1L e 1M erano non detectabili nei lisati proteici totali, ma la loro ridotta espressione risultava visibile nei lisati nucleari. Un differente pattern di espressione proteica è stato osservato nelle linee cellulari mieloidi e nelle LAM. In particolare, Bag-1L è stata trovata espressa in 2/5 linee mieloidi ed in 2/12 LAM alla diagnosi. Bag-1M era presente in tutte le linee di mieloidi (5/5) ed in 3/12 LAM. In modo più significativo invece riportiamo la sovra-espressione dell'isoforma Bag-1S in tutti i campioni LAM alla diagnosi. Per capire se la forma nucleare era assente o sotto-espressa nelle LAM sono stati studiati i lisati nucleari che hanno determinato una bassa espressione dell'isoforma 1L nelle LAM differenziate dalle LAL, che invece ne producevano ad alti livelli riscontrabili nei lisati totali. Nei prelievi LAM in remissione di malattia si è osservato un decremento evidente dell'espressione proteica di Bag-1S, mentre Bag-1L e Bag-1M erano completamente assenti. Nelle colture primarie di LAM è stato riscontrato che la proteina BAG-1 era normalmente presente solo come isoforma 1S all'inizio dell'allestimento della coltura, mentre i livelli di BAG-1L e

BAG-1M aumentavano con il processo di differenziamento indotto dai fattori di crescita usati in coltura. Il silenziamento di BAG-1 ha condotto l'arresto nella differenziazione con evidente blocco in G1 del ciclo cellulare. Gli effetti alla morte cellulare dopo che BAG-1 era silenziato erano molto più significativi nelle LAM rispetto ai risultati ottenuti nelle linee cellulari leucemiche. Il doppio silenziamento di BAG-1 e BAG-3 ha rinforzato questi risultati aumentando i livelli di morte cellulare e confermando l'ipotesi che BAG-1 giochi un ruolo nel mantenimento delle cellule leucemiche. Per caratterizzare i pathway di azione di BAG-1 e di BAG-3 sono state studiate diverse proteine implicate nei processi di stress cellulare (HSP70, P38), apoptosi (BCL-2, BAX, PARP, CASPASI 3), controllo di ciclo cellulare (CDK2, P27, CYCLINA D1) e autofagia (LC3, p62). L'utilizzo di alcuni coloranti cellulari inoltre ha permesso di delineare un ruolo per BAG-1 e/o BAG-3 nel mantenimento dell'autofagia nelle cellule leucemiche oggi giorno in corso di approfondimento.

Conclusioni. I risultati ottenuti rivelano una anomala espressione della proteina BAG-1 nella leucemia acuta. La differente espressione delle isoforme nei pazienti LAL o LAM all'esordio di malattia identifica un suo potenziale ruolo nella differenziazione dei blasti totipotenti in LAL o LAM, così come un potenziale ruolo nel fenomeno di switch leucemico. La diversa espressione dell'isoforma BAG-1S nei prelievi di LAM all'esordio rispetto alla remissione apre una discussione sulla funzione oncogena di questa proteina. Lo studio *in vitro* di colture primarie invece evidenzia che le proteine BAG-1 e BAG-3 partecipano a un fenomeno chiave della vita cellulare, quello che controlla il bilanciamento tra apoptosi e autofagia, ma il chiarimento dei meccanismi molecolari sarà necessario per identificarlo come nuovo target nella leucemia.

Bibliografia

- Yang X, Chernenko G, Hao Y, Ding Z, Pater A, et al. Human Bag-1/RAP46 protein is generated as four isoforms by alternative translation initiation and overexpressed in cancer cells. *Oncogene* 1998; 17:981-989.
- Takayama S, Bimston DN, Matsuzawa S, Freeman BC, Aime-Sempere C, Xie, et al. Bag-1 modulates the chaperone activity of Hsp-70/Hsc-70. *EMBO J* 1997; 16:4887-4896.
- Townsend PA, Cutress RI, Sharp A, Brimmell M, Packham G. BAG-1: a multi-functional regulator of cell growth and survival. *Biochem Biophys Acta* 2003;1603:83-89.
- Xiong J, Chen J, Chernenko G, Beck J, Liu H, Pater A, Tang SC. Antisense Bag-1 sensitizes HeLa cells to apoptosis by multiple pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 312:585-591.

SWITCH FENOTIPICO NELLE LEUCEMIE ACUTE PEDIATRICHE

E. Seganfredo, B. Buldini, M. Paganin, K. Polato, V. Conter, G. Cazzaniga, G. Basso

Laboratorio di Oncoematologia Pediatrica, Università degli Studi di Padova

Introduzione. Lo switch fenotipico dalla diagnosi alla ricaduta nelle leucemie acute, ovvero la conversione dell'immunofenotipo da linfoide a mieloide o viceversa, è un evento raro (5-7% dei casi di recidiva di leucemia acuta) (Stass *et al.*, 1984; van Wering *et al.*, 1995). Due ipotesi sono al momento considerate come causa di switch fenotipico: la possibile eradicazione del clone predominante presente alla diagnosi con la conseguente espansione di un clone minoritario a diverso fenotipo alla ricaduta o alterazioni al clone originario indotte dalla terapia. Nel nostro studio sono stati analizzati i riarrangiamenti delle Immunoglobuline e del Recettore T in cinque casi di leucemia acuta pediatrica con switch fenotipico al fine di caratterizzare i blasti leucemici e di differenziare una ricaduta con switch fenotipico da una forma secondaria.

Materiali e metodi. Sono stati analizzati campioni di sangue midollare di 5 pazienti pediatriche con diagnosi di leucemia linfoblastica acuta e arruolati nel protocollo AIEOP-BFM ALL2000 all'esordio e alla ricaduta. La diagnosi di malattia e la successiva recidiva sono state definite mediante precisi criteri morfologici e immunofenotipici. All'esordio 2 pazienti erano affetti da leucemia linfoblastica acuta a precursori B (1 Common LLA ed 1 PRE-B LLA) e 3 da leucemia linfoblastica di linea T (EARLY-T), negativi per le traslocazioni t(4,11), t(9,22) e t(12,21). I cinque pazienti presentavano alla ricidiva blasti mieloperossidasi positivi con immunofenotipo mieloide.

L'analisi dei riarrangiamenti delle Immunoglobuline e del recettore T è stata eseguita seguendo i protocolli BIOMED-1 e 2. I riarrangiamenti risultati clonali dopo analisi omo-eteroduplex, sono stati analizzati mediante sequenziamento per identificare la regione di giunzione (N-region) specifica per ciascun riarrangiamento. I dati ottenuti sono stati confermati mediante RQ-PCR, in accordo con le linee guida pubblicate dall'European Study Group on MRD detection in ALL (van der Velden *et al.*, 2007).

Risultati. Nei due pazienti con diagnosi di leucemia a precursori B sono stati identificati all'esordio i seguenti riarrangiamenti: #1 Ig/DH2-JH biclonale, Ig/VKIII-Kde, TCR/Dd2Dd3 biclonale; #2 Ig/VH6-JH, Ig/VKIV-Kde, Ig/DH3-JH biclonale, TCR/Vd2Dd3. I blasti leucemici alla ricaduta

risultano negativi per tutti riarrangiamenti genici testati alla diagnosi; tale negatività è stata confermata anche con RQ-PCR in almeno 2 riarrangiamenti positivi all'esordio con sensibilità $\geq 1E-04$. Nei tre pazienti con diagnosi di LLA-T sono stati individuati all'esordio i seguenti riarrangiamenti: #3 Ig/DH1-JH e TCR/Vd1Jd1 biclonale; #4 TCR/VÁIJÁ.1.3 biclonale; #5 TCR/VÁIVJÁ.1.3 e TCR/Dd2Jd1 biclonali. Questi riarrangiamenti genici sono risultati positivi alla ricaduta LMA, in particolare presentano anche la stessa N-region. Tali risultati sono stati confermati in RQ-PCR, sono stati testati almeno due markers paziente-specifici mediante dei saggi con sensibilità $\geq 1E-04$.

Conclusioni. Dai risultati ottenuti si è osservato che nelle leucemie a precursori B con recidiva di tipo mieloide, i blasti leucemici non presentano i riarrangiamenti clonali dell'esordio; è quindi ipotizzabile una forma secondaria alla terapia. Nelle 3 LLA-T ricadute in LMA, invece, i blasti hanno mantenuto gli stessi riarrangiamenti clonali con la stessa N-region presenti all'esordio. È possibile, pertanto, che non si tratti di due leucemie distinte ma che la leucemia linfoide sia evoluta in mieloide. L'analisi citogenetica dei campioni della ricaduta LMA da LLA-T dimostrano in tutti i pazienti un cariotipo complesso diverso rispetto quello identificato alla diagnosi, ipotizzando una possibile evoluzione del medesimo clone. Il meccanismo alla base dello shift fenotipico non è ancora ben definito, ma l'analisi dei riarrangiamenti genici ha suggerito che le leucemie (LLA-T evolute in LMA) possano originare da uno stesso precursore staminale multipotente in grado di proliferare sia in blasti linfoidi sia in mieloidi ed evolvere citogeneticamente. La media del tempo intercorso tra diagnosi di LLA-T e ricaduta con immunofenotipo LMA è di 610 giorni. Mentre nei 2 casi LLA-B la ricaduta risulta essere più tardiva (media 1054 giorni) e conferma i dati presenti in letteratura riguardanti le forme secondarie.

Bibliografia

1. Stass S *et al.* Lineage switch in acute leukemia. *Blood* 1984;64:701-6.
2. van Wering *et al.* Immunophenotypic changes between diagnosis and relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1995;9:1523-33.
3. van der Velden VH, *et al.* Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia* 2007;21:604-11.

NUOVI FARMACI TERAPIE CELLULARI

PENTRAXINA-3: UN MARCATORE SOLUBILE DI FACILE MISURAZIONE UTILE PER PREDIRE E MONITORARE LA GRAFT VERSUS HOST DISEASE POST-TRAPIANTO

E. Dander,¹ I. Cuccovillo,² P. Vinci,¹ S. Bonanomi,³ L. Di Maio,³ G. Lucchini,³ M. Migliavacca,³ P. Perseghin,⁴ A. Rovelli,³ A. Balduzzi,³ A. Mantovani,² B. Bottazzi,² A. Biondi,^{1,3} G. D'Amico¹

¹Centro Ricerca "M. Tettamanti", Clinica Pediatrica Università degli Studi di Milano-Bicocca, Monza; ²Dipartimento di Immunologia e Infiammazione, Istituto Clinico Humanitas, Rozzano-Milano; ³Clinica Pediatrica, Università degli Studi di Milano Bicocca, Ospedale San Gerardo, Monza; ⁴Servizio Trasfusionale, Unità di Aferesi e Criobiologia, Ospedale San Gerardo, Monza

Introduzione. Il trapianto allogenico di cellule staminali (HSCT) è il trattamento di elezione per numerose patologie di tipo tumorale e non. Nonostante gli avanzamenti nel campo della terapia immunosoppressiva post-trapianto, la graft-versus-host disease (GVHD), che si sviluppa in un elevato numero di pazienti e si associa ad un esito sfavorevole, continua ad essere la principale causa di mortalità post-trapianto. Le basi patofisiologiche della GVHD sono ancora da chiarire e la diagnosi di tale patologia dipende principalmente dalle manifestazioni cliniche e da biopsie invasive. Si comprende che l'identificazione di biomarcatori specifici per la GVHD permetterebbe di riconoscere e diagnosticare precocemente questa malattia facilitando il monitoraggio dei pazienti in risposta al trattamento farmacologico anti-GVHD adottato. Con lo scopo di identificare nuovi marcatori affidabili per predire e monitorare l'andamento di tale patologia, abbiamo focalizzato la nostra attenzione sulla pentraxina-3 (PTX-3), una proteina di fase acuta, che svolge un ruolo cruciale nell'orchestrare la risposta immunitaria di tipo infiammatorio.

Pazienti e Metodi. Dopo aver ottenuto il consenso informato, abbiamo raccolto campioni di plasma da 46 pazienti sottoposti a HSCT allogenico e da 9 donatori sani (HD). Dopo il trapianto, 25/46 pazienti hanno sviluppato GVHD ad interessamento cutaneo (18 GVHD acute e 7 GVHD croniche), mentre 21/46 non hanno sviluppato la GVHD. Per quanto

riguarda i pazienti che hanno sviluppato la GVHD, i campioni di sangue sono stati raccolti al giorno di insorgenza o di riattivazione della GVHD, prima e dopo l'inizio della terapia farmacologica specifica anti-GVHD. I livelli plasmatici di PTX-3 sono stati monitorati mediante saggi ELISA.

Risultati. I pazienti che non hanno sviluppato la GVHD dopo il trapianto presentano livelli plasmatici di PTX-3 (media=3.3 ng/ml, intervallo=1.1-8.6 ng/mL) aumentati rispetto agli HD (media=1.2 ng/mL, intervallo=0.3-2.5 ng/mL, $p<0.01$). Molto interessante, abbiamo osservato un notevole incremento dei livelli plasmatici di PTX-3 nei pazienti con GVHD acuta (media=42.2 ng/mL, intervallo=6.7-218.2 ng/ml) o con riattivazioni (flair-ups) di GVHD cronica (media=15.8 ng/ml, intervallo=9-44.3 ng/mL). Tale aumento dei livelli di PTX-3 nei pazienti con GVHD acuta o cronica attiva si è dimostrato essere statisticamente significativo ($p<0.01$ e $p<0.05$ rispettivamente) rispetto sia agli HD che ai pazienti sottoposti a trapianto che non hanno sviluppato GVHD.

Conclusioni. Questi risultati preliminari suggeriscono che i livelli plasmatici di PTX-3 aumentino molto rapidamente nei pazienti con GVHD attiva, candidando così PTX-3 come un marcatore solubile di facile misurazione utile per corroborare le osservazioni cliniche in una malattia in cui i segni e i sintomi sono spesso confondenti e mutevoli. Ulteriori studi saranno necessari per chiarire se PTX-3 possa avere un significato prognostico e/o diagnostico utile per individuare i pazienti ad alto rischio di insorgenza di GVHD e capire la responsabilità alla terapia farmacologica.

09

CELLULE KILLER INDOTTE DA CITOCHINE (CIK) PER LA TERAPIA CELLULARE DELLA LEUCEMIA MIELODE ACUTA: OTTIMIZZAZIONE E MIGLIORAMENTO DELLA LORO ATTIVITA' ANTILEUCEMICA MEDIANTE L'ESPRESSIONE DI RECETTORI CHIMERICI CD33-SPECIFICI

V. Marin,¹ I. Pizzitola,¹ V. Agostoni,¹ M. Pule,² R. Rousseau,³ A. Biondi,¹ E. Biagi¹

Centro Ricerca M. Tettamanti, Clinica Pediatrica, Ospedale San Gerardo, Università Milano-Bicocca, Monza, Italy; University College London, London, UK; Centre Leon Berard, Lyon, France

Introduzione. Le CIK sono cellule T facilmente e rapidamente espandibili *ex vivo*, con una potente attività antitumorale *in vitro* e *in vivo* contro svariati tipi

di neoplasie.¹ Il nostro gruppo ha recentemente dimostrato, in uno studio clinico di fase I,² che l'infusione di cellule CIK in pazienti con LMA ricaduti dopo trapianto allogenico di cellule staminali è sicura e ben tollerata. Tuttavia le risposte cliniche osservate sono state limitate, e tale osservazione potrebbe essere ricondotta sia alla modesta e variabile attività basale anti-leucemica delle cellule CIK, sia alla scarsa sopravvivenza *in vivo* delle cellule CIK stesse. Pertanto, con l'obiettivo di incrementare l'efficacia di tale approccio, il presente progetto si è preposto di modificare geneticamente le cellule CIK con due differenti recettori chimerici diretti contro l'antigene mieloide CD33, contenenti rispettivamente, nel loro dominio intracellulare, la sola catena ζ del complesso CD3-TCR o la catena ζ in associazione al dominio costimolatorio CD28-OX40, che è riportato aumentare notevolmente le proprietà funzionali indotte dai recettori chimerici.³ Tale strategia potrebbe rappresentare un'evoluzione della terapia con l'anticorpo monoclonale anti-CD33 gemtuzumab ozogamicina (GO): il suo utilizzo clinico ha mostrato un moderato effetto (tasso di remissione completa medio in pazienti con LMA in ricaduta di malattia in seguito al trattamento con GO pari al 25%) associato ad un'elevata tossicità (mielodepressione e danni epatici).⁴ L'utilizzo di un approccio immunoterapeutico basato su cellule esprimenti un recettore chimerico specifico per il medesimo antigene CD33, potrebbe accompagnarsi ad un miglioramento del profilo efficacia/tossicità, grazie ad una potenziale migliore infiltrazione intratumorale, all'amplificazione della risposta immune antitumorale, all'elusione dei meccanismi di farmaco-resistenza e ad una possibile riduzione della tossicità associata alla calicheamicina.

Materiali e metodi. Le cellule CIK sono state trasdotte con i vettori retrovirali contenenti il recettore anti-CD33- ζ e anti-CD33-CD28-OX40- ζ . L'attività citotossica contro le leucemiche HL-60 e KG-1, o contro blasti primari di LMA è stata misurata dopo co-cultura di 4 ore con rilascio di ⁵¹-Cromo (citotossicità a breve termine) o di 6 giorni su uno strato di cellule mesenchimali in assenza di IL-2 mediante conta citofluorimetrica (citotossicità a lungo termine). L'attività proliferativa è stata valutata mediante incorporazione di ³H-timidina dopo stimolazione per 72 ore con cellule HL-60 o blasti primari di LMA irradiati, a rapporto 1:1 e in assenza di IL-2. Il rilascio di citochine dalle cellule CIK stimulate per 24 ore con cellule HL-60 irradiate a rapporto 1:5 è stato misurato mediante citofluorimetria.

Risultati. Le cellule CIK sono state efficientemente generate dal sangue periferico di donatori sani e trasdotte con i recettori chimerici anti-CD33- ζ e anti-CD33-CD28-OX40- ζ (espressione media dei recettori, 65% per entrambi; n=20). Abbiamo osservato che il processo di trasduzione non comporta alterazioni delle proprietà fenotipiche e funzionali naturali delle cellule CIK, che hanno mostrato al termine del periodo di coltura (21 giorni) un arricchimento nella quota di cellule CD3+CD56+ paragonabile a quello osservato nella popolazione non manipolata (% media di cellule CD3+CD56+, 40%, 42% e 45%, rispettivamente per cellule CIK non trasdotte e trasdotte con recettore anti-CD33- ζ e anti-CD33-CD28-OX40- ζ). Inoltre si è osservato un simile fenotipo memoria, e un'analoga attività litica contro la linea cellulare K562, con una lisi percentuale media del 59% ad un rapporto effetto:target di 20:1 per cellule CIK non trasdotte, del 76% per cellule CIK-anti-CD33- ζ e del 66% per cellule CIK-anti-CD33-CD28-OX40- ζ n=5 ζ . In ultimo, non sono state riscontrate variazioni nell'attività chemiotattica *in vitro* delle cellule CIK in risposta alla chemochina CXCL12 e nei livelli di espressione del corrispondente recettore CXCR4. Come dato più significativo, le cellule CIK esprimenti i recettori chimerici anti-CD33 acquisiscono una potente attività citotossica contro cellule tumorali umane di LMA: dopo 4 ore di incubazione abbiamo riscontrato una lisi % media della linea cellulare HL-60 a rapporti effetto:target di 5:1, pari al 79% e 71%, rispettivamente per cellule CIK-anti-CD33- ζ e per cellule CIK-anti-CD33-CD28-OX40- ζ , contro il 28% ($p=0.001$) delle cellule non trasdotte. Analoga efficienza litica è stata osservata contro la linea cellulare KG-1, nota per la sua resistenza all'azione del GO e contro blasti primari di LMA, con attività citotossica >50%, contrariamente alle cellule non trasdotte, che allo stesso rapporto effetto:target di 5:1 hanno mostrato valori medi di lisi <10% contro entrambi i bersagli ($p=0.005$). Di notevole interesse è l'osservazione che, in co-culture a lungo termine a rapporto effetto:bersaglio 1:200, in assenza di IL-2, nonostante la sola espressione del recettore anti-CD33- ζ sia in grado di conferire una notevole efficacia citotossica contro bersagli di LMA, la presenza del dominio costimolatorio nel recettore risulta in un'attività significativamente più potente. Le cellule CIK esprimenti il recettore anti-CD33-CD28-OX40- ζ mostrano infatti la capacità di eliminare la quasi totalità delle cellule leucemiche, con una % media di cellule leucemiche residue pari al 4% (n=3) nel caso di co-cultura con cellule HL-60 e al 16%

(n=7) nel caso di co-cultura con blasti primari di LMA contro rispettivamente l'87% ($p=0.001$) e 91% ($p=0.001$) delle cellule non trasdotte e il 25% ($p=0.001$) e 31% ($p=0.05$) rispettivamente delle cellule CIK anti-CD33- ζ . La più vigorosa attività effettrice conferita alle cellule CIK dal recettore anti-CD33-CD28-OX40- ζ è stata evidenziata anche in saggi di proliferazione con cellule HL-60 e blasti di LMA, con un indice di proliferazione medio (cellule stimolate/cellule non stimolate) rispettivamente pari a 4.4 e 3.7, circa due volte ($p=0.05$) maggiore di quello riscontrato nelle cellule esprimenti il recettore anti-CD33- ζ e quattro volte ($p=0.005$) maggiore di quello registrato nelle cellule non manipolate. Oltre ad un'augmentata proliferazione indotta dai bersagli CD33+, le cellule CIK trasdotte con il recettore anti-CD33-CD28-OX40- ζ hanno mostrato un'elevata secrezione di citochine immunostimolatorie dopo stimolazione con HL-60 (n=3), con valori medi pari a 8159 pg/ml per l'IFN- γ , 14748 pg/mL per il TNF- α , 585 pg/mL per il TNF- β , e 5056 pg/mL per l'IL-2, rispettivamente 10-volte ($p=0.001$), 283-volte ($p=0.001$), 500-volte ($p=0.001$) e 300-volte ($p=0.05$) superiori rispetto alle cellule non manipolate.

Conclusioni. Questi risultati preliminari indicano che l'espressione di recettori chimerici anti-CD33 è in grado di potenziare notevolmente l'attività antileucemica delle cellule CIK e tale effetto è particolarmente evidente per il recettore contenente il dominio costimolatorio CD28-OX40, suggerendo che cellule CIK esprimenti tale molecola potrebbero rappresentare uno strumento innovativo e potenzialmente efficace per l'immunoterapia della LMA.

Bibliografia

1. Verneris MR et al. J Clin Immunol 2002; 22:131-6.
2. Introna, et al. Haematologica 2007; 92: 952-9.
3. Pule MA, et al. Mol Ther 2005;12:933-41.
4. Stasi R et al. Cancer Treat Rev 2008;34: 49-60.

20

ANALISI IN VITRO DELL'ATTIVITÀ ANTI-TUMORALE DOPO INIBIZIONE SPECIFICA DI MYCN MEDIANTE PNA-NLS ANTI-GENE NEL MEDULLOBLASTOMA UMANO

C. Camerin,^{1,4} E. De Marco,¹ L. Venturelli,¹ V. Di Giacomo,¹ B. Pellicani,¹ L. Montemurro,¹ A. Astolfi,¹ A. Faccini,² R. Corradini,² R. Tonelli,^{1,3} A. Pession¹

¹Laboratorio di Oncologia ed Ematologia Pediatrica "Lalla Seragnoli", Clinica Pe-

diatrica, Università di Bologna; ²Dipartimento di Chimica Organica, Università di Parma; ³Dipartimento di Farmacologia, Università di Bologna

Introduzione. Il medulloblastoma (MB) è il più frequente tumore cerebrale maligno nell'infanzia. Durante la neurogenesi N-Myc svolge un ruolo essenziale per l'espansione rapida della popolazione delle cellule progenitrici neuronali. In MB è presente un'elevata espressione di MYCN, prevalentemente nel sottotipo desmoplastico. L'obiettivo del lavoro è l'analisi *in vitro* dell'attività anti-tumorale dopo inibizione specifica di MYCN mediante acidi peptido-nucleici anti-gene (PNA) nel MB.

Materiali e Metodi. Sono state utilizzate 7 linee cellulari di MB: DAOY, ONS-76, D556, D384, D341, D425 e D283. Per inibire la trascrizione di MYCN è stato utilizzato un acido peptido-nucleico senso (PNAwt) anti-gene. Per valutare la specificità dell'attività del PNAwt è stato utilizzato un PNA mutato (PNAmut). L'inibizione della trascrizione e della traduzione di MYCN e di altri geni regolati da MYCN, individuati tramite l'analisi dei microarray, è stata valutata mediante analisi in RT-PCR Real-Time e Western-blot. La vitalità cellulare è stata valutata mediante la metodica dell'ATPlite.

Risultati finali. L'analisi dell'mRNA MYCN e della proteina N-Myc ha mostrato che le linee di MB prese in considerazione presentavano buoni livelli del gene bersaglio. La vitalità cellulare nelle cellule di MB dopo il trattamento con il PNAwt a 10 uM ha mostrato una consistente riduzione della vitalità cellulare. La specificità dell'effetto è stata confermata dalla mancanza di effetto del PNAmt. L'inibizione del trascritto di MYCN mediante RT-PCR in Real-Time dopo trattamento con il PNAwt a 12 ore ha mostrato una consistente riduzione nella quantità di mRNA di MYCN in tutte le linee di MB prese in considerazione. Tale diminuzione è stata confermata anche dalla diminuzione della proteina di N-Myc dopo trattamento delle linee cellulari a 12 ore con PNAwt ad una concentrazione di 10uM. Per confermare la specificità di sequenza del PNAwt per il gene MYCN è stata valutata la variazione di espressione del gene omologo MYC dopo il trattamento con il PNAwt anti-MYCN: l'assenza di variazione di espressione dell'mRNA e proteina di MYC dimostra la specificità di azione del PNAwt anti-MYCN. Mediante i microarray effettuati sulle DAOY si sono individuati dei geni con diverso profilo di espressione tra le cellule di controllo e quelle trattate con il PNAwt. Dopo un'analisi più attenta è stato possibile raggruppare questi geni in diversi pathways tra cui quelli più interessanti sono risultati quelli dell'apoptosi e ciclo cellulare.

Conclusioni. L'inibizione di MYCN mediante un PNA anti-gene anti-MYCN ha mostrato sia una forte e specifica inibizione dell'espressione di MYCN sia una forte attività anti-tumorale in cellule di MB. La sua specificità di sequenza del PNAwt anti-MYCN è stata confermata dalla valutazione dell'espressione del gene MYC, che non risente di modificazioni né nell'mRNA né nella proteina, dopo il trattamento con il PNAwt. L'analisi dei microarray ha permesso di individuare geni direttamente regolati da MYCN, permettendo di capire meglio il ruolo di MYCN in MB.

Bibliografia

1. Pession A, Tonelli R. The MYCN oncogene as a specific and selective drug target for peripheral and central nervous system tumors. Current Cancer Drug Targets 2005; 5:273-83.
2. Tonelli R, Purgato S, Camerin C, et al. Anti-gene peptide nucleic acid specifically inhibits MYCN expression in human neuroblastoma cells leading to cell growth inhibition apoptosis. Mol Cancer Ther 2005;4:779-86.
3. Kenney AM, Cole MD, et al. Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors. Development 2003, 130:15-28.
4. Hyrup B, Nielsen PE. Peptide nucleic acids (PNA): synthesis, properties and potential applications. Bioorg Med Chem 1996;4:5-23.
5. Nielsen PE, Egholm M, et al. Peptide nucleic acids (PNAs): potential antisense and anti-gene agents. Anticancer Drug Des 1993;8:53-63.

21

IMAGING MOLECOLARE IN VIVO DELLA PROGRESSIONE DEL NEUROBLASTOMA CON AMPLIFICAZIONE DI MYCN NEI MODELLI MURINI XENOGRAFT ORTOTOPICO E TRANSGENICO TH-MYCN

E. Cantelli,^{1,5} A. Fasci,¹ K. Di Leo,¹ C. Quarta,² L. Mezzanotte,³ C. Nanni,² S. Fanti,² A. Roda,³ R. Tonelli,^{1,4} A. Pession¹

¹Oncologia ed Ematologia Pediatrica "Lalla Seragnoli", ²Dip. Medicina Nucleare, ³Dip. Scienze Farmaceutiche, ⁴Dip. Farmacologia, Università degli Studi di Bologna, Bologna

Introduzione. Il neuroblastoma è il tumore solido extracranico più comune nell'infanzia. Il 25% dei casi, caratterizzato da una maggiore aggressività della malattia e da un'alta percentuale di ricadute, presenta l'amplificazione dell'oncogene MYCN. La funzione di attivatore e repressore trascrizionale dell'oncogene gli consente di alterare un elevato numero di geni, di conseguenza permette al neuroblastoma di evolversi e di sviluppare

resistenza nei confronti dei trattamenti antiblastici. Per questa ragione vi è la necessità di trovare nuove strategie terapeutiche e per questo sono diventati indispensabili i modelli tumorali animali, che mostrano caratteristiche fenotipiche e genetiche simili ai neuroblastomi umani. Tale lavoro ha avuto come obiettivo principale la messa a punto di due modelli murini di neuroblastoma quali lo xenograft ortotopico¹ ed il transgenico TH-MYC² e di due diversi metodi di valutazione del tumore *in vivo*, la bioluminescenza³ e la micro-PET (*Positron Emission Tomography*).⁴ Entrambi i metodi di Imaging permettono di quantificare la crescita tumorale e la risposta ai trattamenti *in vivo* in maniera rapida e non invasiva. In particolare la bioluminescenza rileva la luce emessa dalla massa costituita da cellule tumorali umane che esprimono in maniera costitutiva il gene della luciferasi, mentre la micro-PET permette di valutare il metabolismo tumorale utilizzando un radiotracciante, ¹⁸F-FDG, che viene trattenuto dai tessuti con un'alta attività metabolica in quanto analogo del glucosio.

Materiali e metodi. Per il modello xenograft ortotopico, che prevede l'inoculo di cellule tumorali umane nella sede di origine del tumore in studio, tre linee cellulari di Neuroblastoma umano con amplificazione del gene MYCN (IMR-32, IMR-5, SK-N-BE(2)c) sono state ingegnerizzate con vettore plasmidico pMMP-LucNeo contenente il gene della luciferasi. Ciascuna linea è stata inoculata nella ghiandola surrenale destra di 10 esemplari murini immunodeficienti appartenenti al ceppo NOD/SCID di 4-5 settimane. La valutazione dello sviluppo tumorale mediante tecnica di *Imaging Molecolare Bioluminescente* (BLI) è stata effettuata a partire dal giorno dell'inoculo con cadenza settimanale. Gli animali, sedati con atropina (0.5 mg/kg) e zoletil (0.5 mg/kg) i.p., sono stati sottoposti a scan in posizione prona, previa iniezione intraperitoneale di D-luciferina (150 mg/Kg). Le immagini sono state acquisite tramite camera CCD (*charge-couple-device*) (Berthold Night-owl LB 980), analizzate e quantificate con software Windlight (Berthold). Il modello transgenico TH-MYC² esprime il cDNA dell'oncogene umano MYCN sotto il controllo del promotore della tirosin-idrossilasi che viene espresso in maniera tessuto specifica nelle cellule originate dalla cresta neurale.² L'amplificazione di MYCN determina la comparsa di un tumore con caratteristiche molecolari, biologiche e citogenetiche che rispecchiano il neuroblastoma umano. Un gruppo di 25 topi transgenici TH-MYC² appartenenti al ceppo 129x1/Svj omozigoti per il gene MYCN è stato sottoposto ad esame micro-PET al fine di identificare l'inter-

vallo temporale relativo allo sviluppo e alla progressione tumorale. L'analisi è stata effettuata utilizzando il radiotracciante metabolico ¹⁸F-FDG con scan ogni 4 giorni a partire dal ventisettesimo giorno di vita di ogni esemplare. Gli animali anestetizzati con anestesia gassosa (sevofluorano 3-5% e ossigeno 1L/min) hanno ricevuto per via endovenosa 30MBq di ¹⁸F-FDG, in un volume di 0,15 ml. Dopo l'assorbimento del radiotracciante, vengono sottoposti a scan con il tomografo (GE, eXplore Vista DR). L'immagine acquisita è stata ricostruita con software OSEM 2D ed è stata interpretata tramite analisi semi-quantitativa calcolando il *Tumor-to-Background-Ratio* (TBR). Gli animali sono stati soppressi alla comparsa di evidenti segni di sofferenza. Per entrambi i modelli a tempi prestabiliti 5 animali sono stati sacrificati per confermare il risultato di Imaging; il materiale raccolto, tumorale e di controllo (milza), è stato conservato sia in azoto liquido sia incluso in paraffina. Sono stati effettuati esami istologici con colorazione ematossilina-eosina (H&E) ed immunohistochimici con anticorpo monoclonale N-Myc (Oncogene) su tutte le masse tumorali riscontrate in entrambi i modelli; dal materiale congelato è stato estratto DNA genomico (MN, NucleoSpin[®] Tissue), RNA (GE Healthcare, RNAspin Mini RNA Isolation Kit) poi retroscritto in cDNA (INVITROGEN, Superscript[™] II), proteine. Tale materiale è stato utilizzato per fare un confronto del gene di interesse (MYCN) a livello genomico, trascrittomico mediante RT-PCR (Roche, Light Cycler 480) e proteomico mediante Western blot. **Risultati.** Il modello xenograft ortotopico ha mostrato un'incidenza del 100%, una latenza intorno alle 2 settimane dal giorno dell'inoculo ed una progressione di 5 settimane per le linee IMR-5Luc e SK-N-BE(2)cLuc; una latenza intorno alle 5 settimane ed una progressione di 7 settimane per le IMR-32Luc. Nel modello derivato dalla linea SK-N-BE(2)cLuc sono state riscontrate metastasi al fegato e al cuore, la progressione è risultata protratta e sostenuta fin dalle prime settimane. Per gli altri due modelli il decorso della malattia è risultato simile sia per la localizzazione e l'assenza di metastasi, sia per l'evoluzione della patologia: costante nelle primissime settimane ed in crescita esponenziale nelle ultime. Il modello transgenico omozigote ha mostrato un'incidenza del 100%, una latenza intorno alle 4 settimane di vita, ed una progressione di 5 settimane. Non sono state riscontrate metastasi, il tumore è localizzato a livello addominale. Per entrambi i modelli l'analisi istologica ha confermato la presenza del tumore. In tutti i campioni raccolti è stata confermata l'amplificazione di MYCN, misurata la sua espres-

sione e determinato i livelli della proteina relativa.

Conclusioni. Entrambi i modelli animali messi a punto in questo lavoro si sono rivelati altamente predittivi per studiare i neuroblastomi MYCN amplificati: sia il transgenico che l'ortotopico infatti hanno definito un'incidenza del 100% ed una latenza di 2-4 settimane. Osservando l'andamento tumorale, grazie ai sensibili strumenti di rilevazione utilizzati, è stato possibile definire una finestra temporale, specifica per ogni modello, nella quale sarà possibile valutare l'efficacia di trattamenti farmacologici rispetto ad un set di animali di controllo.

Bibliografia

1. Kerbel RS. Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anti-cancer drug activity in humans: better than commonly perceived-but they can be improved. *Cancer Biol Ther* 2003;2: S134-9.
2. Weiss WA, et al. Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. *Embo J* 1997;16:2985-95.
3. Dickinson PV et al. In vivo bioluminescence imaging for early detection and monitoring of disease progression in a murine model of neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 2007;42:1172-9.
4. Nanni C, et al. FDG small animal PET permits early detection of malignant cells in a xenograft murine model. *Imaging model Eur J Nucl Mol* 2007 34: 755-62.

31

TRAPIANTO APLOIDENTICO DI CELLULE STAMINALI EMPOIETICHE IN PAZIENTI AFFETTI DA TUMORI SOLIDI AD ALTO RISCHIO: ANALISI DEL MISMATCH KIR PER LA SELEZIONE DEL DONATORE

A. Bosi,¹ L. Ruggeri,⁶ C. D'ippolito,² L. Lorenzi,² F. Bolda,¹ F. Shumacher,² L. Notarangelo,² L. Berchich,³ S. Lonardi,³ G. Carella,⁴ C. Gorio,² S. Pulcini,² L. Tonegatti,⁵ A. Velardi,⁶ F. Porta,² A. Lanfranchi¹

¹Laboratorio Cellule Staminali Oncoematologia Pediatrica e Trapianto Midollo Osseo Ospedale dei Bambini - A.O. Spedali Civili di Brescia - Brescia; ²Oncoematologia Pediatrica e Trapianto Midollo Osseo Ospedale dei Bambini, A.O. Spedali Civili di Brescia - Brescia; ³Anatomia e Istologia Patologica A.O. Spedali Civili di Brescia - Brescia; ⁴Laboratorio Immunologia U.O. Reumatologia e Immunologia Clinica A.O. Spedali Civili di Brescia - Brescia; ⁵U.O. Chirurgia Pediatrica Ospedale dei Bambini - A.O. Spedali Civili di Brescia - Brescia; ⁶Sezione di Ematologia ed Immunologia Clinica Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale Ospedale Santa Maria della

Misericordia - Sant'Andrea delle Fratte, Perugia

Introduzione. Studi nazionali ed internazionali hanno evidenziato l'effetto anti-leucemico svolto dalle cellule Natural Killer (NK) nell'ambito dei trapianti aploidentici ed hanno dimostrato come questo sia imputabile ad una incompatibilità nei ligandi per i recettori KIR tra donatore e ricevente in direzione trapianto verso ospite. Poco è ancora ad oggi noto sul ruolo di tale mismatch nel setting dei tumori solidi pediatrici non ematologici ad alto rischio, laddove nuove strategie terapeutiche sono auspicabili e per i quali l'incidenza risulta in aumento e la prognosi rimane molto sfavorevole. Questo studio si prefigge di analizzare il mismatch nei ligandi KIR nei genitori dei pazienti affetti da tumori solidi ad alto rischio attraverso la tipizzazione HLA, e di valutare l'attività citotossica delle cellule NK diretta contro le cellule del tumore primario, al fine di identificare il genitore che possiede le cellule NK dotate di maggiore attività citotossica *in vitro*.

Materiali e metodi. Da Ottobre 2008 a Luglio 2009 sono stati arruolati quindici pazienti afferenti al Reparto di Oncematologia Pediatrica dell'Ospedale dei Bambini di Brescia: tre affetti da neuroblastoma IV stadio, tre affetti da rhabdomyosarcoma, tre da tumore di Wilms, due da sarcoma di Ewing, uno da neoplasia mesenchimale delle guaine nervose periferiche, uno da angiosarcoma epitelioidale del rachide cervicale, uno da sarcoma alveolare dei tessuti molli, uno da sarcoma fusiforme dell'adulto. Dodici pazienti e i rispettivi genitori sono stati sottoposti a tipizzazione HLA di classe I sierologica e molecolare a bassa risoluzione, ed è stato valutato il *mismatch KIR* secondo il modello ligando-ligando. Di 9 tumori è stata allestita la coltura cellulare primaria da tessuto tumorale, poi valutata attraverso analisi morfologiche, immunostochimiche ed immunofenotipiche. Per quattro di questi pazienti è stata svolta l'analisi funzionale di alloreattività attraverso un test standard di citotossicità con rilascio del Cromo (^{51}Cr), usando come targets linfoblasti attivati con PHA dei pazienti e, come effettori, cloni NK ottenuti dal sangue periferico dei genitori, a verifica e conferma dei risultati attesi in base al modello ligando-ligando. Di una coltura tumorale è stata valutata la citotossicità NK direttamente contro le cellule tumorali da coltura primaria con test di rilascio del Cromo (^{51}Cr). **Risultati.** Dei dodici pazienti di cui è stato valutato l'HLA, otto posseggono tutti e tre i ligandi per i recettori KIR: la probabilità di alloreattività NK in direzione graft versus host per i nostri pazienti è risultata quindi dell'ordine del 33%, limitando ai genitori la ricerca di un donatore aplo-

identico. I test funzionali che sono stati svolti in quattro coppie paziente-genitori hanno confermato le previsioni del modello ligando-ligando.

Per quanto riguarda le colture cellulari primarie da tessuto tumorale, la percentuale di successo è stata variabile; sono state ottenute una coltura cellulare da rhabdomyosarcoma (percentuale di cellule tumorali maggiore del 60%), tre colture da tumore di Wilms (porzione tumorale maggiore del 95%, del 70% e del 10% rispettivamente), una coltura da neuroblastoma (in corso di valutazione), una coltura da sarcoma delle guaine nervose periferiche (percentuale cellule tumorali pari a 90%), una da sarcoma alveolare dei tessuti molli (percentuale cellule tumorali superiore a 70%). I test di alloreattività NK contro le cellule da tumore primario ad oggi svolti evidenziano una scarsa lisi NK, indipendentemente dalla presenza di mismatch; i risultati dovranno essere comparati con quelli ottenuti da saggi paralleli eseguiti con linee tumorali stabilizzate; attualmente è in corso la valutazione dell'espressione di ligandi attivatori sulle colture allestite.

Conclusioni attese. Durante l'arruolamento per questo studio cinque dei sedici pazienti sono deceduti per progressione della malattia. Per questo nuove strategie terapeutiche sono auspicabili per i pazienti affetti da tumori solidi ad alto rischio. Una terapia cellulare come il trapianto aploidentico permette di associare alla chirurgia e alla chemioterapia standard un'arma immunologica avvalendosi del ruolo antitumorale proprio delle cellule NK. Tale reattività, analizzata *in vitro*, può permettere di selezionare il donatore con l'attività NK antitumorale più spiccata, estendendo ai familiari (fratelli, zii, cugini), se necessario, la ricerca di un candidato donatore. Potrà inoltre essere di aiuto nella valutazione del ruolo del mismatch KIR nell'ambito del trapianto aploidentico in pazienti pediatrici affetti da tumori solidi ad alto rischio.

Bibliografia

- Lang P, Pfeiffer M, Müller I, et al. Haploidentical stem cell transplantation in patients with pediatric solid tumors: preliminary results of a pilot study and analysis of graft versus tumor effects. *Klin Padiatr* 2006;218:321-6.
- Pérez-Martínez A, Leung W, Muñoz E, et al. KIR-HLA receptor-ligand mismatch associated with a graft-versus-tumor effect in haploidentical stem cell transplantation for pediatric metastatic solid tumors. *Pediatr Blood Cancer* 2009;53:120-4.
- Re F, Staudacher C, Zamai L, Vecchio V, Bregni M. Killer cell Ig-like receptors ligand-mismatched, alloreactive natural killer cells lyse primary solid tumors. *Cancer* 2006;107:640-8.

- Velardi A. Role of KIRs and KIR ligands in hematopoietic transplantation. *Curr Opin Immunol* 2008;20:581-7.
- Ruggeri L, Capanni M, Urbani E. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002;295:2097-100.

40

MODIFICAZIONI DEL CICLO CELLULARE COME NUOVA STRATEGIA TERAPEUTICA NEGLI ALCL PEDIATRICI

P. Bonvini, E. Zorzi, L. Mussolin, G. Monaco, M. Pigazzi, G. Basso, A. Rosolen

Clinica di Oncoematologia Pediatrica, Azienda Ospedaliera di Padova-Fondazione Città della Speranza

Introduzione. Il ciclo cellulare è un processo altamente regolato ed organizzato che prevede l'esecuzione di una serie di eventi biochimici e morfologici durante quattro fasi: G1, S, G2 e M. La progressione ordinata delle fasi è controllata dall'attivazione sequenziale di serin/treonin chinasi ciclina-dipendenti (cdks, *cyclin-dependent kinases*), enzimi eterodimerici costitutivamente espressi e ciclicamente attivati.¹ Sono state identificate 9 cdk: sei sottendono alla progressione del ciclo cellulare (cdk1-6), una (cdk7) fosforila e regola positivamente l'attività chinasi delle prime, tre sono implicate nella trascrizione cellulare attraverso l'attivazione (cdk7 e cdk9) o inibizione (cdk8) della RNA Polimerasi II (RNA Pol II). L'attività catalitica delle cdk è controllata da proteine regolatorie note come cicline, la cui espressione variabile durante il ciclo cellulare assicura l'attivazione periodica delle singole cdk. Nel loro stato attivo le cdk fosforilano proteine indispensabili per la progressione del ciclo cellulare (RB, *retinoblastoma tumor suppressor protein*) e la sintesi di DNA (E2F1), tanto che l'inibizione diretta dell'attività enzimatica delle cdk causa il blocco del ciclo cellulare e della proliferazione.² La natura della risposta agli inibitori delle cdk nelle cellule proliferanti è oltremodo complessa, e può essere citostatica, quando secondaria all'inibizione delle cdk coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare, o citotossica, per inibizione delle cdk che regolano l'attività trascrizionale.³ Nei tumori i meccanismi di progressione e controllo del ciclo cellulare sono spesso deregolati, come conseguenza di alterazioni genetiche ed epigenetiche (traslocazioni cromosomiche, amplificazione genica, mutazioni puntiformi e metilazione) che risultano nell'aumentata attività di cdk e cicline, o nella mancata espressione dei loro inibitori (CKI, *cdk kinase inhibitors*).⁴ Molti oncogeni partecipano alla regolazione del ciclo cellulare attraverso il con-

trollo diretto o indiretto dell'espressione delle cdk e delle cicline, e la perdita di controllo del ciclo cellulare è causa di forte instabilità genetica, oltre che della proliferazione incontrollata. La frequenza con cui si assiste alla mancata regolazione del ciclo cellulare nei tumori suggerisce che la possibilità di agire direttamente o indirettamente sull'attività enzimatica delle cdk rappresenta una promettente strategia terapeutica in ambito oncologico, anche se gli effetti di tale inibizione non sono ancora stati completamente chiariti, e le varie condizioni sperimentali in cui sono stati indagati suggeriscono che il contesto cellulare è un fattore importante da considerare.⁵ L'ALCL (*Anaplastic Large Cell Lymphoma*) è una neoplasia ancora poco caratterizzata da un punto di vista molecolare, che conserva particolari caratteristiche di aggressività se si considera l'elevato indice mitotico, la presenza dell'oncosoppressore RB inattivo e la frequente sovraespressione di proteine coinvolte nella sopravvivenza cellulare. NPM-ALK, oltre che a rappresentare un marcatore tumorale specifico con rilevanza diagnostica, causa la deregolazione dei segnali che controllano il ciclo cellulare e la sopravvivenza della cellula linfoide normale, attraverso l'attivazione di vie di trasduzione del segnale che coinvolgono proteine quali Ras, Src, e PLC-g, o Jak3, STAT3 e Akt.⁶ Verosimilmente, i linfomi ALCL ALK-positivi esprimono elevati livelli di proteine associate alla proliferazione cellulare e con attività anti-apoptotica, che sono il bersaglio preferenziale dei farmaci antitumorali che interferiscono con la sintesi del DNA, o causano il blocco sequenziale del ciclo cellulare. Tuttavia, il ruolo delle cdk nei linfomi ALCL non è stato ancora caratterizzato, così come non vi sono informazioni sugli effetti della inibizione delle cdk sulla sopravvivenza della cellula di ALCL. Date le scarse informazioni sull'attività degli inibitori del ciclo cellulare nelle neoplasie dell'età pediatrica, questo studio ha valutato l'attività di flavopiridolo (*NSC649890*), un potente inibitore delle cdk, in cellule di linfoma anaplastico a grandi cellule, in cui la perdita di controllo del ciclo cellulare dipende dall'espressione e dall'attività costitutiva della tirosin chinasi NPM-ALK. Questo è il primo studio che utilizza inibitori competitivi di cdk negli ALCL pediatrici, e ne caratterizza gli effetti in funzione dell'espressione e dell'attività di NPM-ALK.

Materiali e metodi. L'attività di flavopiridolo è stata esaminata in cellule di ALCL, rappresentative del sottotipo ALK-positivo e ALK-negativo. L'efficacia del farmaco è stata valutata in popolazioni cellulari asincrone e/o sincronizzate, mediante saggi enzimatici di citotossicità, analisi al citofluorimetro del ciclo cellulare e dell'apoptosi, e quantificazione della trascrizione

endocellulare mediante RQ-PCR. L'effetto inibitorio è stato valutato mediante analisi di espressione e localizzazione di cdk2, cdk4, cdk7 e cdk9; ciclina A, D3, E, B1; dei substrati dei complessi cdk-ciclina (RB-S780, -S612, -T821, e RNA Pol II-S2); e delle proteine coinvolte nei meccanismi di sopravvivenza delle cellule di ALCL.

Risultati e Conclusioni. I dati di questo studio dimostrano che le cellule di ALCL sono particolarmente sensibili all'attività anti-proliferativa di Flavopiridolo, che risulta nell'induzione dell'apoptosi in assenza di blocco del ciclo cellulare ($AV^*/ALK^* = 50\%$; $AV^*/ALK^* = 80\%$ a 24h). La ridotta incorporazione di BrdU e la maggiore citotossicità osservata in cellule di ALCL sincronizzate, suggerisce che l'attività di flavopiridolo non dipende e non è preceduta dal blocco del ciclo cellulare in G1 o G2, ma è direttamente proporzionale alla percentuale di cellule in fase S. In particolare, l'inibizione delle cdk causa l'attivazione della proteina RB e risulta nella mancata fosforilazione dell'enzima RNA polimerasi II. Quando defosforilato (RB-S780, -S612, -T821) RB impedisce la proliferazione delle cellule neoplastiche, mentre RNA polimerasi II (RNA Pol II-S2) regola negativamente trascrizione e traduzione di proteine critiche per l'integrità strutturale e la sopravvivenza cellulare. I dati di questo studio dimostrano che le cdk sono enzimi critici per le cellule di ALCL, dal momento che l'inibizione della loro attività comporta importanti modificazioni del proteoma cellulare, ancora più drammatiche quando indotte in presenza dell'inibizione competitiva di NPM-ALK. Quest'ultima non solo comporta l'inibizione di vie di trasduzione del segnale già note (STAT3, Akt, ERK1/2 e JNK1/2), ma modifica anche stato ed attività di diverse cdk, indipendentemente dalla fase del ciclo cellulare. Quando usati in combinazione, inibitori di cdk e di NPM-ALK risultano fortemente tossici nelle cellule di ALCL, a conferma del ruolo di NPM-ALK nella regolazione degli attivatori ed inibitori del ciclo cellulare in questa patologia pediatrica, e dell'importanza delle cdk come bersaglio farmacologico.

Bibliografia

1. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 2003; 36:131-149.
2. Massague J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* 2004;432:298-306.
3. Berthet C, Kaldis P. Cell-specific responses to loss of cyclin-dependent kinases. *Oncogene* 2007;26:4469-4477.
4. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle kinases in cancer. *Curr Opin Genet Dev*

2007;17:60-65.

5. Malumbres M, Pevarello P, Barbacid M, Bischoff JR. CDK inhibitors in cancer therapy: what is next? *Trends Pharmacol Sci* 2008;29:16-21.
6. Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, Piva R, Inghirami G. The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:11-23.

45

VALIDAZIONE DI UNA METODICA PER LA SELEZIONE IN VITRO DI LINFOCITI T CITOTOSSICI SPECIFICI PER LA PROTEINA EBV LMP2 DA IMPIEGARE NEL TRATTAMENTO DI PAZIENTI CON CARCINOMA INDIFFERENZIATO DEL RINOFARINGE

I. Caruana, A. Gurrado, M. Cioni, M. Labirio, M. Cava, R. Galiano, I. Guido, G. Quartuccio, D. Maio, S. Secondino, P. Pedrazzoli, R. Maccario, F. Locatelli, P. Comoli, S. Basso

Oncematologia Pediatrica, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Università di Pavia, Pavia; Dipartimento di Oncologia, Istituto Clinico Humanitas, Rozzano (MI).

Introduzione. Il carcinoma indifferenziato del rinofaringe (NPC) è una neoplasia EBV-correlata che esprime un numero limitato di antigeni virali, tra le quali la proteina latente di membrana 2 (LMP2). I pazienti che ricadono dopo il trattamento convenzionale di chemio-radioterapia hanno prognosi generalmente infausta.¹ Si rende, quindi, necessaria la sperimentazione di terapie alternative efficaci ed a bassa tossicità. Recentemente, è stato dimostrato che è possibile ottenere risposte cliniche in pazienti con NPC EBV-correlato resistenti a radio/chemioterapia convenzionale, mediante infusione di linfociti T-citotossici (CTL) autologhi EBV-polispecifici.^{2,4} In particolare, i pazienti che hanno mostrato una risposta clinica dopo terapia cellulare presentavano un'espansione di cellule T LMP2-specifiche.³

Obiettivi e metodi. Sulla base di queste premesse, abbiamo eseguito uno studio pre-clinico al fine di delineare una procedura per la generazione *in vitro* di linee T citotossiche LMP2-specifiche da linfociti del sangue periferico di pazienti con NPC o di donatori sani, con il fine di potenziare l'effetto antitumorale delle preparazioni di CTL. La stimolazione *in vitro* delle linee cellulari si è basata sull'impiego di diverse cellule presentanti l'antigene (APC), in particolare monociti attivati e cellule dendritiche (DC) pulsate con una miscela di peptidi, costituiti da 15 aminoacidi, che coprono l'intera sequenza della proteina EBV LMP2. La funzionalità LMP2 specifica delle linee ottenute è stata valutata mediante saggi di citotos-

sicità e analisi della frequenza di cellule produttrici INF γ in saggi Elispot.

Risultati. Sono stati eseguiti esperimenti nei quali abbiamo valutato il diverso potenziale stimolatorio dei monociti attivati e delle DC, pulsati con la miscela di peptidi LMP2, nel generare popolazioni di CTL arricchiti in linfociti citotossici LMP2-specifici. Le linee ottenute con entrambi i metodi di stimolazione hanno mostrato un analogo fenotipo, costituito da cellule *effector memory* CD3⁺CD8⁺ e CD3⁺CD4⁺; tuttavia, i CTL generati a partire dalle DC presentavano una maggior componente CD3⁺CD4⁺. La frequenza di cellule produttrici INF γ in risposta all'antigene LMP2 è risultata aumentata in entrambe le condizioni di coltura, se paragonata all'attività specifica di CTL ottenuti con il metodo standard (stimolazione con linee linfoblastoidi EBV), essendo pari a 123 SFU/10⁵ nel caso delle linee ottenute con stimolazione da monociti, e di 284 SFU/10⁵ in quelle ottenute dopo stimolazione con DC (vs. 35 SFU/10⁵ nei CTL convenzionali). L'attività citotossica verso cellule *target* pulsate con peptidi LMP2 risultava significativamente più alta nelle linee ottenute mediante stimolazione con monociti attivati piuttosto che con DC pulsate (mediana di lisi al rapporto E:T 10:1: 22% e 12%, rispettivamente, vs 7 nei CTL standard di controllo).

Conclusioni. I nostri dati preliminari indicano la fattibilità di espandere linee di CTL LMP2-specifiche da pazienti con NPC o da donatori sani. Inoltre, i risultati ottenuti ad oggi suggeriscono come la stimolazione con monociti attivati sia da preferire all'uso di DC nell'espansione di linee LMP2-specifiche con un alto potenziale citotossico, condizione imprescindibile ai fini di una efficace terapia cellulare antitumorale. L'impiego di CTL con specificità antigenica verso LMP2 potrebbe implementare i protocolli di terapia cellulare attualmente in uso, con lo scopo finale di migliorare l'*outcome* dei pazienti con NPC.

Bibliografia

1. Wei WJ, Sham JST. Nasopharyngeal carcinoma. *Lancet* 2005;365:2041-54.
2. Comoli P, De Palma R, Siena S, et al. Adoptive transfer of allogeneic EBV-specific cytotoxic T cells with *in vitro* anti-tumor activity boosts LMP-2-specific immune response in a patient with EBV-related nasopharyngeal carcinoma. *Ann Oncol* 2004;15:113-7.
3. Comoli P, Pedrazzoli P, Maccario R, et al. Cell therapy of stage IV nasopharyngeal carcinoma with autologous EBV-targeted cytotoxic T-lymphocytes. *J Clin Oncol* 2005;23:8942-9.
4. Straathof KC, Bollard CM, Popat U, et al. Treatment of nasopharyngeal carcinoma with Epstein-Barr virus-specific T lymphocytes. *Blood* 2005;105:1898-904.

46

CARATTERIZZAZIONE A FINI TERAPEUTICI DI LINFOCITI T CITOTOSSICI RESIDENTI A LIVELLO MIDOLLARE IN PAZIENTI CON LLA PH IN TERAPIA CON IMATINIB

C. Quadrelli, S. Basso, G. Riva, P. Barozzi, D. Vallerini, E. Zanetti, I. Guido, G. Quartuccio, F. Locatelli, G. Torelli, L. Potenza, M. Luppi, P. Comoli

Sezione di Ematologia, Dipartimento integrato di Oncologia, Ematologia e Malattie dell'Apparato Respiratorio, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena; Oncematologia Pediatrica, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Università di Pavia, Pavia

Introduzione. Il farmaco imatinib mesilato (IM), trattamento di elezione per i pazienti affetti da leucemia mieloide cronica (CML), si è dimostrato efficace, associato a chemioterapia intensiva, anche nella terapia delle leucemie linfoblastiche acute positive per il cromosoma Philadelphia (Ph⁺ LLA).¹ Recenti studi in pazienti affetti da CML hanno descritto, in concomitanza al trattamento con IM, lo sviluppo di una risposta immunitaria T cellulare Ph-specifica, che si associava al controllo della malattia.² Analogamente, in uno studio preliminare condotto in una coorte di pazienti affetti da LLA Ph⁺ in trattamento con IM, il nostro gruppo ha dimostrato l'emergenza di un'alta frequenza di cellule T *helper* specifiche per p190BCR-ABL a livello midollare, la cui cinetica era inversamente associata all'andamento della malattia residua. Sulla base di questi dati preliminari, e di dati clinici che suggeriscono potenzialità terapeutiche per procedure di vaccinazione con peptidi p210BCR-ABL nell'ambito della CML,³ abbiamo eseguito uno studio preclinico al fine di delineare una procedura di espansione *in vitro* di linfociti T citotossici p190BCR-ABL-specifici da utilizzare in protocolli di terapia cellulare per il trattamento della malattia residua minima (MRM) in pazienti con LLA Ph⁺.

Materiali e metodi. Linfociti T citotossici (CTL) p190BCR-ABL-specifici sono stati espansi a partire da campioni di sangue midollare di 9 pazienti con LLA Ph⁺, mediante stimolazione *in vitro* con cellule dendritiche⁴ pulsate con una miscela di peptidi (9-20 mer) che coprono l'intera regione di fusione di BCR con ABL nella proteina chimerica p190.⁵ Le linee ottenute dopo 13 giorni di coltura sono state testate in saggi di citotossicità a 5 ore con ⁵¹Cr, contro cellule *target* rappresentate da cellule T attivate da fitoemagglutina (blasti PHA) pulsate con peptidi p190BCR-ABL o peptidi irrilevanti, e da

blasti leucemici Ph⁺ autologhi (n=2) o allogenici (n=3) e blasti leucemici Ph-allogenici (n=5). La lisi è stata espressa come unità litiche per 10⁶ cellule al rapporto 10:1 effetto/target (UL10/10⁶).

Risultati. Abbiamo valutato il potenziale stimolatorio delle cellule dendritiche autologhe, pulsate con la miscela di peptidi di BCR-ABL, nel generare CTL specifici per i blasti leucemici BCR-ABL positivi o per *target* autologhi esperimenti la proteina tumorale. La metodica utilizzata ha consentito di espandere popolazioni T cellulari *effector-memory* con fenotipo CD3⁺/CD4⁺ o CD3⁺/CD8⁺ da tutti i soggetti testati. In 7 dei 9 pazienti, le linee cellulari ottenute mostravano una attività litica specifica per l'antigene tumorale p190BCR-ABL. In particolare, si è osservata attività citotossica nei confronti di blasti PHA pulsati con miscele di peptidi BCR-ABL pari ad un valore mediano di 1600 UL₁₀/10⁶ (range 0-3300), con attività verso blasti di PHA pulsati con peptidi di controllo pari a 0 UL₁₀/10⁶. Le linee di CTL p190BCR-ABL-specifiche, inoltre, presentavano una forte attività antitumorale *in vitro*, in quanto nei 2 pazienti testati contro blasti leucemici autologhi la lisi osservata è risultata pari a 10000 e 5000 UL₁₀/10⁶, rispettivamente. Una lisi più bassa, ma misurabile, si è osservata verso blasti leucemici Ph⁺ allogenici (range 500-5000), mentre la mediana di lisi verso blasti leucemici allogenici Ph⁻ è risultata pari a 0 UL₁₀/10⁶ (range 0-500).

Conclusioni. I nostri dati preliminari, pertanto, indicano la presenza di CTL p190BCR-ABL-specifici nel sangue midollare di pazienti affetti da LLA Ph⁺ in trattamento con IM e suggeriscono la fattibilità di espandere queste popolazioni di CTL anti-LLA Ph⁺ mediante stimolazione *in vitro*. E' possibile che questa attività antitumorale specifica *in vivo* possa mediare la lisi mirata delle cellule leucemiche sinergizzando con IM nel mantenimento della remissione della malattia. Resta da approfondire se una eventuale somministrazione terapeutica di queste cellule BCR-ABL-specifiche possa avere un ruolo nel trattamento di pazienti con LLA Ph⁺.

Bibliografia

- Potenza L, Luppi M, Riva G, et al. Efficacy of imatinib mesylate as maintenance therapy in adults with acute lymphoblastic leukemia in first complete remission. *Haematologica* 2005;90:1275-7.
- Chen CI, Maecker HT, Lee PP. Development and dynamics of robust T-cell responses to CML under imatinib treatment. *Blood* 2008;111:5342-9.
- Bocchia M, Gentili S, Abruzzese E, et al. Effect of a p210 multipeptide vaccine associated with imatinib or interferon in patients with chronic myeloid leukaemia and persistent residual disease: a multicentre observational trial. *Lancet*

2005;365:657-62.

Montagna D, Maccario R, Locatelli F, et al. Ex-vivo priming for long-term maintenance of antileukemia human cytotoxic T cells suggests a general procedure for adoptive immunotherapy. *Blood* 2001; 98:3359-66

Kessler JH, Bres-Vloemans SA, van Veelen PA, et al. BCR-ABL fusion regions as a source of multiple leukemia-specific CD8+ T-cell epitopes. *Leukemia* 2006;20: 1738-50.

48

INFUSIONE DI CTL ANTI-LEUCEMIA PER IL TRATTAMENTO/PREVENZIONE DELLA RECIDIVA DOPO TRAPIANTO ALLOGENICO DI CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE

I. Turin, E. Montini, L. Calogna, S. Faravelli, D. Lisini, A. Moretta, R. Maccario, F. Locatelli, D. Montagna

Laboratorio Trapianto di Midollo Osseo e Oncoematologia Pediatrica; Unità di Oncoematologia Pediatrica; Cell Factory; Laboratori Ricerca, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia; Dipartimento di Scienze Pediatriche, Università degli Studi di Pavia

Introduzione. L'infusione di linee di T linfociti citotossici (CTL)-anti-leucemia, di origine del donatore, selettivamente in grado di lisare i blasti leucemici del paziente, rappresenta un promettente approccio terapeutico in pazienti affetti da recidiva di malattia dopo trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche (CSE). Riportiamo i dati dell'infusione di CTL anti-leucemia in pazienti pediatrici affetti da leucemia linfatica acuta (LLA) e leucemia mieloide acuta (LMA), trapiantati non in remissione completa o in 2/3 remissione, in ricaduta clinica di malattia o ad alto rischio di ricaduta, per la comparsa di un chimerismo misto, dopo trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche (CSE).

Materiali e metodi. CTL anti-leucemia con alta capacità citotossica verso i BL del paziente sono stati generati ed espansi *in vitro* utilizzando terreni di coltura e reagenti GMP, mediate stimolazione leucemia-specifici ed espansione rapida antigene-indipendente.^{1,5} Alla fine delle colture i CTL sono stati validati per uso *in vivo*.⁶ Sono stati trattati due gruppi di pazienti: a) 5 pazienti sottoposti ad un secondo trapianto da fratello HLA-identico, per ricaduta precoce di malattia dopo il primo trapianto, b) 6 pazienti sottoposti a trapianto T-depletato da donatore familiare parzialmente compatibile.

Risultati. Due dei cinque pazienti (#1 e #2) hanno evidenziato una recidiva clinica precoce anche dopo il secondo trapianto da fratello HLA-compatibile e sono stati trattati con più infusioni di

alte dosi di CTL (range 5×10^8 - 2.5×10^9). Il paziente #2 ha raggiunto uno stato di remissione clinica, ritornando ad un chimerismo completo, successivamente ha sviluppato una recidiva extra-midollare ed è andato in progressione di malattia. Nessuna risposta si è avuta nel paziente #1. Considerando l'alto rischio di recidiva e la bassa probabilità che CTL derivanti da donatore HLA-identico potessero indurre malattia del trapianto verso l'ospite (GVHD) in riceventi un secondo trapianto, i successivi pazienti (#3, #4 e #5) hanno ricevuto infusioni profilattiche di dosi scalari di CTL anti-leucemia dal primo mese dopo il trapianto (range 1×10^8 - 1×10^9). Il paziente #4 ha evidenziato ad alcuni tempi dopo il trapianto, la presenza di chimerismo misto, successivamente risolto, ed al momento i tre pazienti sono in remissione di malattia, in chimerismo completo, con un follow up che va da 22 a 25 mesi. Quattro dei sei pazienti sottoposti a trapianto T-depletato di CSE (#5, #6, #7 e #9) sono stati trapiantati in presenza di malattia, per questo sono stati attentamente monitorati i livelli di malattia residua minima (MRM) dopo il trapianto; i pazienti #5, #6 e #7 hanno ricevuto infusioni di dosi scalari di CTL non è appena si è evidenziato un incremento di MRM, mentre il paziente #9 è stato trattato in presenza di recidiva clinica. I pazienti #8 e #9 sono invece stati trattati presenza di recidiva morfologica. I pazienti #5, #7 e #9 sono al momento in remissione completa di malattia con un follow up che va da 15 mesi a più di 3 anni; il paziente #10 ha mostrato una risposta transitoria, seguita da successiva progressione di malattia; nei pazienti #6 e #9 non è stata osservata nessuna risposta significativa dopo le infusioni di CTL. I pazienti #2 e #8 affetti da LMA, in recidiva clinica, sono stati trattati con anti-CD33 con lo scopo di ridurre il numero dei blasti prima dell'infusione dei CTL. I pazienti #1, #7, #8 e #10 hanno ricevuto basse dosi di IL-2 s.c ad ogni infusione di CTL.

Conclusioni. I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'infusione di grandi quantità di CTL di origine del donatore: i) non ha determinato l'insorgenza di malattia del trapianto verso l'ospite né altre reazioni avverse; ii) ha permesso il ritorno ad uno stato di remissione completa in una quota di pazienti ricaduti dopo trapianto allogenico.

I risultati inoltre suggeriscono che: i) in caso di recidiva clinica con alto numero di blasti presenti, la riduzione del carico tumorale può facilitare l'effetto anti-tumorale dei CTL, mentre ii) nei pazienti ad alto rischio di ricaduta sottoposti ad un secondo trapianto da fratello HLA-identico, l'infusione profilattica di dosi scalari di CTL potrebbe aumentare l'effetto graft-versus-leukemia (GVL) del tra-

pianto e favorire il mantenimento in uno stato di remissione di malattia.

Bibliografia

1. Montagna D, Maccario R, Locatelli F et al. A. Ex vivo priming for long-term maintenance of antileukemia human cytotoxic T cells suggests a general procedure for adoptive immunotherapy. *Blood* 2001;98:3359.
2. Montagna D, Maccario R, Montini E, et al. Generation and ex vivo expansion of cytotoxic T lymphocytes directed toward different types of leukemia or myelodysplastic cells using both HLA-matched and partially matched donors. *Exp Hematol* 2003;31:1031-8.
3. Montagna D, Daudt L, Locatelli F, et al. Single-cell cloning of human, donor-derived antileukemia T-cell lines for in vitro separation of graft-versus-leukemia effect from graft-versus-host reaction. *Cancer Res* 2006;66: 7310.
4. Daudt L, Maccario R, Locatelli F, et al. Interleukin-15 favors the expansion of central memory CD8+ T cells in ex vivo generated, antileukemia human cytotoxic T lymphocyte lines. *J Immunother* 2008;31:385.
5. Turin I, Pedrazzoli P, Tullio C, et al. GMP production of anti-tumor cytotoxic T-cell lines for adoptive T-cell therapy inpatients with solid neoplasia. *Cytotherapy* 2007;9:499.

INSUFFICIENZE MIDOLLARI

01

DIAGNOSI PRENATALE DELLA SINDROME NUDE/SCID

G. Calcagno,^{1,2} M.V. Ursini,³ G. Castaldo,^{1,4} A. Fusco,⁵ P. Martinelli,⁶ C. Pignata,⁵ F. Salvatore^{1,4}

¹CEINGE Biotechnologie Avanzate, scarp, Napoli; ²Dipartimento di Scienze per la Salute, Università del Molise, Campobasso; ³Istituto di Genetica e Biofisica (IGB) A. Buzzati-Traverso, CNR, Napoli; ⁴Dipartimento di Biochimica e Biotechnologie Mediche, Università Federico II, Napoli; ⁵Dipartimento di Pediatria, Università Federico II, Napoli; ⁶Dipartimento di Scienze Ostetriche e Ginecologiche, Università Federico II, Napoli

Introduzione. Le immunodeficienze gravi combinate (SCID) sono caratterizzate da un'alterata funzionalità delle cellule T, B ed NK con conseguente aumento della suscettibilità a contrarre infezioni gravi che, se non trattate adeguatamente, possono risultare fatali nei primi mesi di vita. Ad oggi, sono state descritte più di 7 forme diverse di SCID e, per ognuna di esse, è stato identificato il gene alterato. La maggior parte dei geni responsabili delle diverse forme di SCID sono selettivamente espressi nelle cellule ematopoietiche con alcune eccezioni come l'ADA-SCID associata al deficit di una proteina ubiquitaria, l'adenosina deaminasi e la sindrome Nude/SCID (MIM 601705) dovuta ad un'alterazione del gene FOXP1 espresso selettivamente nell'epitelio timico e cutaneo.¹ Il fenotipo Nude/SCID, descritto per la prima volta nel 1996, è del tutto sovrapponibile a quello murino descritto da Flanagan nel 1966 e si manifesta con alopecia congenita legata ad una anomalia di differenziazione del bulbo pilifero – da cui il termine "Nude" – e atimia dovuta ad una anomalia nel differenziamento delle cellule epiteliali. Il difetto immunologico, la distrofia ungueale e l'alopecia congenita presenti nella sindrome Nude/SCID sono effetti pleiotropici del gene FOXP1, coinvolto nei processi maturativi del timo, del bulbo pilifero e delle unghie. Tale gene nell'uomo, come nel topo e nel ratto, codifica per una proteina appartenente alla famiglia dei fattori di trascrizione *winged-helix*. Ad oggi sono state descritte solo due mutazioni. Una di queste, descritta in Italia, è la mutazione nonsense R255X nell'esone 5 che, in omozigosi, porta alla formazione di una proteina non funzionante² in analogia a quanto già descritto nel topo. Uno studio di popolazione ha permesso di identifica-

re 55 soggetti eterozigoti per la mutazione con una frequenza del 6,52% di portatori sani nella popolazione studiata.³ Pertanto, considerato l'alta frequenza di portatori sani, è stato pianificato un programma mirato di *counselling* genetico.

Materiali e metodi. Il *counselling* genetico è stato effettuato da un'equipe multidisciplinare di pediatri, psicologi, genetisti molecolari e ginecologi. Alle coppie di soggetti eterozigoti è stata offerta la possibilità di accedere ad un programma di diagnosi prenatale per la Nude/SCID approvato dal Comitato Etico Istituzionale. Tale programma si sviluppa attraverso diverse fasi: a) una consulenza multidisciplinare durante la quale vengono illustrate tutte le fasi della diagnostica prenatale, i loro rischi ed i possibili risultati attesi; in questa fase è stato raccolto anche il consenso informato all'esecuzione del prelievo e dell'indagine genetica; b) un'ecografia ostetrica in IX settimana di gestazione al fine di monitorare l'avanzamento della gravidanza; c) il prelievo dei villi coriali eseguito tra l'XI e la XII settimana di gestazione; d) i villi coriali, così prelevati sono poi al microscopio puliti dalla decidua materna e successivamente processati per l'estrazione del DNA fetale; e) il DNA fetale è poi controllato, mediante analisi di 15 STR, per verificare l'assenza di contaminazioni da parte materna e la definizione del sesso del nascituro; f) infine il DNA fetale è processato per la specifica ricerca della mutazione R255X nell'esone 5 del gene FOXP1 tramite metodica di PCR già precedentemente descritta.⁴ Il DNA fetale è sempre analizzato in parallelo al DNA estratto dai genitori (anche allo scopo di confermare il pedigree, attraverso l'analisi di un set di STR), con il DNA di un controllo omozigote per la mutazione ed il DNA di un soggetto non portatore della mutazione in esame. Inoltre, il riscontro della mutazione in omozigosi nel DNA fetale è sempre confermata da analisi eseguita con seconda metodica.

Risultati. Tale programma ha permesso l'identificazione di due feti omozigoti per la mutazione R255X. In entrambi i casi la coppia ha scelto di interrompere la gravidanza. L'esame autoptico ha evidenziato, in entrambi i feti, l'assenza del timo e grossolane anomalie della pelle, tali evidenze sono compatibili con la malattia. Uno dei due feti, inoltre, mostrava anche difetti multipli del tubo neurale, quali anencefalia e spina bifida.⁴

Conclusioni. Il CEINGE, che è dal 2003 Centro di Riferimento Regionale per la Biologia Molecolare Clinica-Genetica di Laboratorio e la Diagnostica Molecolare di Malattie Congenite del Metabolismo, svolge attività di diagnostica prenatale molecolare di malattie genetiche ereditarie, in collaborazione con le strutture cli-

niche del territorio e di altre regioni, e tra queste ha iniziato ad occuparsi anche di immunodeficienze. Tenuto conto dell'alto numero di geni le cui alterazioni causano immunodeficienze, è auspicabile che differenti centri possano lavorare in modo sinergico sull'intero territorio nazionale, al fine di assicurare la più completa copertura di diagnostica molecolare anche per le forme più rare, ma nello stesso tempo venga mantenuta una stretta sinergia tra il laboratorio di genetica molecolare e l'ambiente clinico, anche al fine di offrire ai pazienti e alle famiglie una corretta e completa consulenza multidisciplinare.

Bibliografia

1. Pignata C, Fiore M, Guzzetta V, et al. 1996. Congenital Alopecia and nail dystrophy associated with severe functional T-cell immunodeficiency in two sibs. *Am J Med Genet* 1196;65:167-70.
2. Frank J, Pignata C, Panteleyev A A, et al. Exposing the human nude phenotype. *Nature* 1999;398:473-4.
3. Adriani, M, Martinez-Mir A, Fusco F, et al. Ancestral founder mutation of the nude (FOXP1) gene in congenital severe combined immunodeficiency associated with alopecia in southern Italy population. *Ann Hum Genet* 2004;68: 265-8.
4. Amorosi S, D'Armiento M, Calcagno G, et al. FOXP1 homozygous mutation associated with anencephaly and severe neural tube defect in human athymic Nude/SCID fetus. *Clin Genet* 2008; 73: 380-4.

04

PROGRESSIONE DA NEUTROPENIA A RAEB IN PAZIENTE CON SITO FRAGILE 16Q22

E. Tassano, C. Morerio, E. Tavella, A. Casalero, C. Micalizzi, C. Panarello

Dipartimento di Ematologia ed Oncologia Pediatrica, IRCCS Istituto G. Gaslini, Genova

Introduzione. I siti fragili sono costrizioni o rotture dei cromosomi in metafase che insorgono spontaneamente o quando le cellule coltivate *in vitro* sono esposte ad agenti inibitori della replicazione del DNA. I siti fragili sono classificati come rari o comuni in base alla frequenza di espressione nella popolazione. I siti fragili rari vengono ereditati in maniera mendeliana e sono rilevati in meno del 5% della popolazione. FRA16B, localizzato in 16q22.1, è il sito fragile raro più frequentemente osservato. La caratterizzazione molecolare della regione FRA16B ha mostrato che nell'allele normale questa risulta costituita da sequenze ripetute polimorfiche (7-12 copie) ricche in AT, la sua espressione è associata all'espansio-

ne (fino a 2000 copie) di sequenze ripetute di 33bp.¹

Case report. Presentiamo il caso di un paziente giunto alla nostra osservazione all'età di 20 anni per l'aggravarsi della citopenia, insorta all'età di 10 anni. Il paziente nato a termine con palatoschisi (corretta chirurgicamente all'età di 6 anni) e fistola aorto-polmonare presentava infezioni ricorrenti delle prime vie aeree nei primi anni di vita. Inizialmente il ragazzo presentava neutropenia isolata, a cui si aggiungeva nel corso degli anni anemia macrocitica e piastrinopenia. In occasione della prima osservazione presso il nostro centro l'emocromo era il seguente: GB 1600/mmc, N34%, presenti 15% di elementi immaturi della linea mieloide, L 39%, blasti 5%, Hb 6g/dl, MCV 83, PIA 32000/mmc. L'analisi del puntato midollare e la biopsia ossea erano compatibili con diagnosi di RAEB: cellularità 80%, eritroide diminuita, mieloide ipomaturante e displasica, micromegacariociti, ALIP, marcato incremento del reticololo, blasti 20%. Non era evidente clone PNH e veniva esclusa la diagnosi di anemia di Fanconi. Le valutazioni midollari effettuate in altra sede, negli anni precedenti mostravano un quadro di MDS con ipoplasia: il tentativo terapeutico con terapia immunosoppressiva (ATG+CSA+steroidi) effettuato all'età di 15 anni non determinava miglioramento dei parametri clinici.

Risultati. L'analisi citogenetica dell'aspirato midollare e del sangue periferico non stimolato del paziente mostrava monosomia 7 in tutte le cellule analizzate; il cariotipo del sangue periferico stimolato con fitoemoagglutinina evidenziava del(16)(q22) nel 4%, fra(16)(q22) nel 6% delle cellule analizzate. La FISH eseguita con sonda subtelomerica 16q su nuclei in interfase di sangue periferico del paziente mostrava del(16)(q22) nel 10% dei nuclei analizzati. Il cariotipo costituzionale della madre rilevava fra(16)(q22) nel 33% delle cellule e nessuna delezione. Anche la madre era stata sottoposta ad intervento di correzione di palatoschisi, soffriva di infezioni ricorrenti e occasionalmente presentava bassa conta dei neutrofili.

Conclusioni. È stato riportato uno studio su madre e figlia entrambe con neutropenia benigna cronica e fra(16)(q22) presente sia nel sangue periferico che nel midollo osseo come unica anomalia citogenetica; viene ipotizzato che fra(16)(q22) e la conseguente del(16)(q22) possano essere un fattore di rischio per lo sviluppo di MDS/LMA.² Nel nostro caso lo scarso numero di metafasi ottenute non ha evidenziato fra(16)(q22) nelle cellule coltivate di midollo osseo; alcuni autori hanno riportato l'espressione differenziale di FRA16B tra i linfociti del

sangue periferico e le cellule del midollo osseo in pazienti con linfoma non-Hodgkin e leucemia mielomonocitica cronica.³ La progressione maligna della neutropenia in RAEB è risultata associata alla comparsa di monosomia 7. È noto che i pazienti con citopenia refrattaria e -7 hanno il più alto rischio di trasformazione in LMA. La monosomia 7 è tra le alterazioni citogenetiche più comuni delle MDS de novo e delle MDS/LMA che insorgono nei pazienti con sindromi ereditarie predisponenti (anemia di Fanconi, sindrome di Shwachman-Diamond, neutropenia congenita severa, neurofibromatosi tipo 1 ecc.). fra(16)(q22) e del(16)(q22), come già descritto in neutropenia familiare, potrebbero giocare un ruolo nel processo *multistep* della leucemogenesi inteso come accumulo di lesioni genetiche, rappresentando un fattore predisponente per lo sviluppo di disordini ematopoietici.

Bibliografia

1. Schwartz M, Zlotorynski E, Kerem B. The molecular basis of common and rare fragile sites. *Cancer Lett* 2006;232: 13-26.
2. Glasser L, Meloni-Ehrig A, Joseph P, Mendiola J. Benign chronic neutropenia with abnormalities involving 16q22, affecting mother and daughter. *Am J Hematol* 2006;81:262-70.
3. Zollino M, Genuardi M, Neri G. Differential expression of FRA16B in peripheral lymphocytes and bone marrow cells. *Cancer Genet Cytogenet* 1990; 49:229-33.

06

ANALISI D'ESPRESSIONE DEL GENE FAZF IN DIFFERENTI SOTTOPOPOLAZIONI DI CELLULE MONONUCLEATE MIDOLLARI IN PAZIENTI CON ANEMIA DI FANCONI

E. Cappelli,¹ J. Svahn,¹ F. Corsolini,¹ M. Pillon,² U. Ramenghi,³ D. Longoni,⁴ P. Faruggia,⁵ C. Dufour¹

¹IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genova;

²Università degli Studi di Padova, Padova;

³Università di Torino, Torino; ⁴Ospedale S. Gerardo, Monza; ⁵Ospedale dei Bambini "G. Di Cristina", Palermo

Introduzione. Il principale sintomo comune a tutti i pazienti con anemia di fanconi, indipendentemente dal gruppo di complementazione, è l'aplasia midollare. La progressiva pancitopenia è il risultato di una ridotta cellularità midollare, in modo particolare dei progenitori ematopoietici, dovuta ad una aumentata apoptosi e una aumentata sensibilità alle citochine. Una complessa rete di segnali guidano il passaggio delle cellule staminali

pluripotenti a cellule del sangue mature, un processo che è il risultato della regolazione di differenti geni durante le varie fasi della maturazione. Gli specifici cambiamenti di espressione di RNA osservate in cellule fanconi suggeriscono un ruolo regolatore delle proteine fanconi nell'espressione dei geni coinvolti nella differenziazione delle cellule della linea mieloide e nella risposta infiammatoria. FAZF (fanconi anemia zinc finger) appartiene alla famiglia dei fattori di trascrizione BTB/POZ-ZF che ha una forte omologia con PLZF ed è stato mostrato legare sia PLZF che la proteina FANCC. FAZF è espressa ad alti livelli durante i primi stadi di differenziamento delle cellule staminali ematopoietiche e sembra poi diminuire durante la differenziazione nella linee mieloidi e eritroidi. La sovraespressione di FAZF in una linea cellulare mieloide monocito/macrofagica U937 induce un notevole aumento dell'apoptosi e un arresto delle cellule in G1. Topi Knock Out per FAZF non mostrano alterazione nello sviluppo del sistema ematopoietico. Tuttavia topi deficienti per FAZF mostrano un difetto nella omeostasi delle cellule staminali ematopoietiche, un incremento di proliferazione di linfociti T e aumentata produzione di citochine in cellule CD4⁺ e CD8⁺. L'insieme di questi risultati suggerisce un possibile ruolo di FAZF nei processi di differenziazione dei progenitori midollari.

Materiali e metodi. In questo lavoro abbiamo studiato tramite real-time PCR l'espressione di FAZF in mononucleate midollari di pazienti con anemia di fanconi. Lo studio è stato fatto sulle cellule mononucleate totali e nei sottogruppi di cellule linfocitarie CD3⁺ e mieloidi/eritroidi CD3⁻. Abbiamo poi studiato l'effetto della sovra espressione di FAZF in cellule linfoblastoidi normali (HSC93) per valutare se l'aumento di espressione di FAZF può indurre un fenotipo fanconi in cellule normali.

Risultati. I risultati preliminari su 10 pazienti e 10 controlli non mostra alcuna differenza di espressione nelle MNC totali (come anche riportato dai dati di macroarray su geneshifter). Quando però si studia l'espressione nella sottopopolazione CD3⁻, i pazienti FA mostrano un livello di espressione notevolmente differente dal controllo. Poiché sembra che FAZF sia in grado di regolare l'attività di NF-kB, questa è stata studiata in estratti nucleari ottenuti da cellule CD3⁻ midollari. Inoltre è stata studiata l'espressione di alcuni geni a valle di NF-kB nelle cellule CD3⁻ quali MAPK8 e FLIP. Tuttavia sia l'attività di NF-kB e l'espressione dei suddetti geni non variano significativamente nelle CD3⁻ dei pazienti fanconi rispetto al controllo. Se la sovra espressione di FAZF è conseguenza della mancanza di

una proteina fanconi, allora è possibile che quando noi sovra esprimiamo FAZF nelle cellule queste acquisiscano un fenotipo fanconi-simile. Per verificare ciò, abbiamo sovra espresso FAZF in cellule linfoblastoidi normali (HSC93) e abbiamo testato il loro comportamento in relazione ad alcune caratteristiche fenotipiche delle cellule fanconi. La sensibilità agli agenti alchilanti è una caratteristica tipica delle cellule fanconi. Risultati preliminari mostrano che le cellule HSC93 che sovra esprimono FAZF hanno una sensibilità alla MMC intermedia tra la linea normale HSC93 e una linea FA-A (HSC072). La sensibilità delle cellule fanconi agli agenti alchilanti dipende da un difetto nella riparazione del DNA. Tuttavia è stato dimostrato che la sensibilità alla MMC di cellule FA è notevolmente ridotta quando nel medio di coltura si mette un antiossidante e quindi la sensibilità alla MMC dipende almeno in parte anche dalla risposta al danno ossidativo causato nelle cellule dal farmaco. Per verificare l'ipotesi che FAZF sia in qualche modo coinvolta nella regolazione della sensibilità al danno ossidativo, abbiamo testato la sensibilità di queste cellule ad un agente ossidante come il KBrO₃. Come da noi ipotizzato queste cellule mostrano una alta sensibilità al KBrO₃ supportando l'ipotesi che una alterata espressione di FAZF modifichi la capacità della cellula di rispondere allo stress ossidativi.

Conclusioni. Noi ipotizziamo un ruolo delle proteine fanconi nella regolazione dell'espressione di geni specifici, come FAZF, in differenti linee ematologiche. I risultati sullo studio di espressione di FAZF ottenuti mostrano come la scelta di dividere le cellule mononucleate midollari in varie sottopopolazioni permetta di identificare variazioni di espressione altrimenti nascoste. I risultati preliminari sulla linea cellulare che sovra esprime FAZF sostengono l'ipotesi di un ruolo di FAZF nel determinare il fenotipo cellulare fanconi, in particolare nella risposta allo stress ossidativo. Un futuro studio di proteomica indirizzato a capire come varia l'espressione di proteine responsabili della risposta allo stress ossidativo nelle cellule che sovra esprimono FAZF, potrebbe aiutare a meglio comprendere i meccanismi molecolari che portano all'aplasia midollare in pazienti con FA e indirizzare verso nuove terapie farmacologiche.

Bibliografia

1. Bagby GC, Alter BP. Fanconi anemia. *Semin Hematol* 2006;43:147-56.
2. Hoatlin ME, et al. A novel BTB/POZ transcriptional repressor protein interacts

- with the Fanconi anemia group C protein and PLZF. *Blood* 1999;94:3737-47.
3. Dai MS, et al. The effects of the Fanconi anemia zinc finger (FAZF) on cell cycle, apoptosis, and proliferation are differentiation stage-specific. *J Biol Chem* 2002; 277:26327-34.
4. Piazza F, et al. Disruption of PLZF in mice leads to increased T-lymphocyte proliferation, cytokine production, and altered hematopoietic stem cell homeostasis. *Mol Cell Biol* 2004;24:10456-69.
5. Du W, et al. Oxidative stress in Fanconi anemia hematopoiesis and disease progression. *Antioxid Redox Signal* 2008;10:1909-21.

29

MONITORAGGIO DEI CLONI EPN IN PAZIENTI PEDIATRICI CON ANEMIA APLASTICA ACQUISITA

F. Timeus,¹ N. Crescenzo,¹ A. Lorenzati,¹ A. Doria,¹ L. Foglia,¹ S. Pagliano,¹ P. Quarello,¹ I. Rana,² A. Ruggiero,³ A. Misuraca,⁴ D. V. Longoni,⁵ C. Dufour,⁶ U. Ramenghi,¹ P. Saracco¹

¹Ematologia Pediatrica Dipartimento di Scienze Pediatriche e dell'Adolescenza Università di Torino; ²Dipartimento Oncematologia Pediatrica Ospedale Bambin Gesù Roma; ³Oncologia Pediatrica Policlinico Gemelli Roma; ⁴Dipartimento Oncematologia Pediatrica Ospedale Pausilipon, Napoli; ⁵Dipartimento Oncematologia Ospedale San Gerardo Monza; ⁶Dipartimento Oncematologia Pediatrica Istituto G. Gaslini, Genova

Introduzione. L'aplasia midollare acquisita (AA) e l'emoglobinuria parossistica notturna (EPN) sono due patologie strettamente correlate con possibile evoluzione reciproca. L'EPN è un disordine delle cellule staminali ematopoietiche causato da una mutazione acquisita del gene X-linked PIG-A, che codifica per un enzima necessario nel primo step della biosintesi dell' ancora glicosilfosfatidilinositolo (GPI). Le mutazioni del gene PIG-A determinano l'assenza o la diminuzione sulla superficie delle cellule di tutte le proteine legate da GPI, tra cui il *decay accelerating factor*, DAF (CD55) e il *membrane inhibitor of reactive lysis*, MIRL (CD59), che regolano l'attivazione del complemento sulla superficie delle cellule. Studi su pazienti adulti con AA hanno evidenziato una elevata incidenza di cloni EPN alla diagnosi, apparentemente correlata alla risposta alla terapia immunosoppressiva (IST). Il significato biologico della presenza di cloni EPN nell'AA rimane tuttora controverso e nella popolazione pediatrica deve ancora essere ben definito: sembra infatti che il meccanismo che sottosta a queste forme di aplasia sia differente nel bambino rispetto all'adulto. Nell'AA è stato dimostrato un aumento dei progenitori midollari apoptotici non solo nel midollo,

ma anche nel sangue periferico. La valutazione simultanea della conta assoluta e dell'indice apoptotico delle cellule CD34+ circolanti nei pazienti pediatrici con AA ci ha permesso in uno studio precedente di evidenziare precocemente una ricaduta o un'evoluzione in senso mielodisplastico. L'obiettivo del presente studio è stato quello di monitorare la presenza di cloni EPN, la conta assoluta e l'indice apoptotico delle cellule CD34+ circolanti alla diagnosi e durante il follow-up nei bambini con AA, con lo scopo di studiare la correlazione di questi valori con la risposta alla terapia e con l'outcome della malattia.

Materiali e metodi. Ventiquattro pazienti pediatrici con diagnosi di AA effettuata presso il Centro di Torino tra 1990 e il 2009, sono stati studiati per la presenza di cellule EPN. Diciotto (75%) presentavano una forma severa (SAA) o molto severa (VSAA) e 6 (25%) una forma non severa (nSAA). L'età mediana alla diagnosi era di 8.7 anni, 14 (58,3%) erano maschi e 10 (41,7%) femmine. Il monitoraggio dei cloni EPN alla diagnosi, durante e dopo IST è stato eseguito mediante analisi citofluorimetrica in doppia fluorescenza per CD59 e CD11b sui neutrofili circolanti. In base alle analisi effettuate su 72 soggetti sani è stato definito un cut-off di normalità pari allo 0,15% (media cloni PNH nei soggetti sani = 0,030 ± 0,042). La conta assoluta delle cellule CD34+ e il loro indice apoptotico sono state valutate mediante citofluorimetria con un'analisi in tripla fluorescenza per CD45, CD34 e annessina V. Il monitoraggio dei cloni EPN è avvenuto tramite 141 determinazioni, con una media di 6 per paziente; la valutazione delle cellule CD34+ e della loro conta assoluta è avvenuta tramite 615 analisi. Tutti i 23 pazienti tranne 4 (che ricevettero come primo trattamento il trapianto di midollo osseo da familiare HLA compatibile), sono stati trattati con IST secondo il protocollo EBMT (siero antilinfocitario, ciclosporina, CSA, +/- G-CSF). Le variabili quantitative sono state presentate come valori medi e range o valori assoluti e percentuali. Nell'ambito di uno studio multicentrico AIEOP iniziato nel marzo 2008 e tuttora in corso, sono stati analizzati per la presenza di cloni EPN 35 ulteriori pazienti, di cui valutabili 30, per complessive 51 analisi. Di questi 4 erano AA alla diagnosi, 13 in trattamento immunosoppressivo con CSA e in RC o RP e 10 off-therapy.

Risultati. Centro di Torino: nei 16 pazienti seguiti dalla diagnosi il clone EPN è stato riscontrato in 9 (56%) (range neutrofili CD59 negativi 0,2-2,2%), nei pazienti IST un clone EPN è stato osservato almeno in una determinazione nell'87% (0,2-12,6%) e in off therapy nel 67% (0,2-1,58%). In dettaglio nei pazienti seguiti dalla diagnosi EPN positivi, 7 hanno ricevuto come primo trattamento IST e sono stati monitorati durante il trattamento e in off thera-

py; due hanno ricevuto TMO da familiare compatibile e sono stati esclusi dal monitoraggio. Dei 7 pazienti EPN+ trattati con IST, 4 hanno avuto risposta parziale o completa dopo 1 o 2 cicli. A 3-6 mesi dall'ALG presentavano tutti un significativo aumento della conta assoluta delle cellule CD34+ circolanti e una riduzione del loro indice apoptotico con una scomparsa del clone EPN. Tuttavia il clone si è successivamente ripresentato in corso di terapia con CSA a pieno dosaggio ed è rimasto presente anche alla sospensione della CSA (range 0.28-1.33%); contemporaneamente abbiamo osservato una riduzione della conta assoluta delle cellule CD34+ circolanti e un aumento del loro indice apoptotico. Dei restanti 3 pazienti EPN+ alla diagnosi e trattati con IST, uno, non-responder, ha sviluppato MDS e ha quindi ricevuto un TMO aploidotico ed è ancora in vita; in questo paziente il monitoraggio dei cloni EPN è rimasto costantemente positivo, al momento dell'evoluzione clonale l'analisi citofluorimetrica delle cellule CD34+ presentava il tipico pattern da noi precedentemente osservato nelle MDS, caratterizzato da alta conta assoluta delle cellule CD34+ e basso indice apoptotico; uno, non-responder, è attualmente al giorno 180+, ha ripresentato un clone EPN al giorno 30+, poi scomparso; uno, attualmente non responder al giorno 90+, dopo la diagnosi non ha più presentato il clone EPN. Tra i pazienti EPN negativi alla diagnosi (7/15 pazienti, 47%), 5 sono stati trattati con IST, hanno avuto una risposta parziale e sono rimasti costantemente EPN negativi. I due pazienti EPN negativi alla diagnosi non trattati con IST hanno ricevuto TMO familiare come primo trattamento e sono stati esclusi dal successivo monitoraggio. Nei pazienti EPN+ alla diagnosi sono stati osservati valori significativamente più bassi di neutrofili ($p < 0.001$), emoglobina ($p < 0.01$), reticolociti ($p < 0.001$) e CD34+/uL ($p < 0.001$) rispetto ai pazienti EPN-, tuttavia l'andamento clinico della malattia non ha presentato significative differenze tra i due gruppi. Otto pazienti sono stati monitorati solo dopo la diagnosi (avvenuta prima dell'inizio del presente studio); quattro erano in trattamento con CSA e 4 off therapy. Il follow up medio in questi pazienti è stato di 127 mesi (range 14-277). Sono stati tutti persistentemente negativi per la ricerca di cloni EPN durante il monitoraggio, tranne tre, in cui la comparsa dei cloni (range 0.2-12.6%) si è verificata in 2 pazienti in corrispondenza della ricaduta ematologica e in una paziente è avvenuta 25 mesi prima di un calo significativo delle conte periferiche che ha richiesto un incremento dei dosaggi di CSA. In questi 3 pazienti in concomitanza della comparsa dei cloni EPN abbiamo osservato un significativo aumento dell'indice apoptotico delle cel-

lule CD34+ circolanti associato ad una bassa conta assoluta. Studio multicentrico: dei pazienti AA alla diagnosi il 50% presentava cloni EPN (range 0.55-0.91%); in IST il 31% (range 0.16-5.51%) e off-therapy il 40% (range 0.32-4%). Di un paziente con clone EPN alla diagnosi abbiamo una analisi a 3 mesi da ATG, con scomparsa del clone. Di interesse il caso di un paziente sottoposto a TMO da fratello e successivamente recidivato, in cui alla recidiva era presente un clone EPN del 2.27%, successivamente negativizzato dopo IST. **Conclusioni.** Nei pazienti della casistica del singolo centro analizzati abbiamo osservato la presenza di cloni EPN alla diagnosi in un'alta percentuale di casi (56%), in accordo con i dati della letteratura che si riferiscono per lo più agli adulti con AA. A differenza dello studio di Sugimori et al. non abbiamo tuttavia osservato una chiara correlazione tra presenza di cloni EPN alla diagnosi e la risposta all'IST. La presenza di cloni EPN alla diagnosi sembra comunque correlata ad un maggiore danno immunomediato. Nei pazienti EPN+ alla diagnosi si è osservata una scomparsa temporanea del clone EPN a tre mesi dall'ALG e in trattamento con CSA, associata apparentemente ad una fase di notevole intensità immunosoppressiva. In questi pazienti tuttavia il clone EPN è successivamente ricomparso senza correlazione con l'andamento clinico. Nei pazienti EPN negativi per un lungo periodo di follow up, la comparsa di un clone EPN sembrerebbe predittiva di ricaduta. Nell'unico paziente che ha presentato evoluzione in MDS un clone EPN era presente fin dalla diagnosi e non abbiamo osservato significative variazioni della percentuali di cellule EPN al momento dell'evoluzione clonale. I dati dello studio multicentrico, per quanto preliminari, confermano le osservazioni precedenti. In conclusione, il monitoraggio dei cloni EPN, della conta assoluta e dell'indice apoptotico delle cellule CD34+ circolanti nei pazienti pediatrici con AA sembra fornire dei dati indiretti sul danno immunomediato a carico della cellula staminale emopoietica molto precoci rispetto alle variazioni dei reticolociti e dell'esame emocromocitometrico e potrebbe essere di aiuto nel modulare il trattamento immunosoppressivo.

Bibliografia

1. Yoshida N, Yagasaki H, Takahashi Y, et al. Clinical impact of HLA-DR15, a minor population of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria-type cells, and an aplastic anaemia-associated autoantibody in children with acquired aplastic anaemia. *Br J Haematol* 2008;142:427-35.
2. Timeus F, Crescenzo N, Doria A, et al. Flow cytometric evaluation of circulating CD34+ cell counts and apoptotic

rate in children with acquired aplastic anemia and myelodysplasia. *Exp Hematol* 2005;33:597-604.

3. Sugimori C, Chuhjo T, Feng X, et al. Minor population of CD55-CD59- blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia. *Blood* 2006;107:1308-14.

41

MUTAZIONI DEL GENE TERC IN PAZIENTI CON ANEMIA APLASTICA: CORRELAZIONE GENOTIPO-FENOTIPO ED EFFETTO DELLE CITOCHINE MIELOSOPPRESSIVE SUI PROGENITORI MIDOLLARI

S. Indaco, M. Lanciotti,¹ S. Pigullo,¹ E. Ferretti,² A. Corcione,² MT Van Lint,³ C. Dufour¹

¹Unità Operativa Onco-Ematologia Pediatrica; ²Laboratorio di Oncologia, Istituto Giannina Gaslini, Genova; ³Dipartimento di Ematologia, Ospedale S. Martino, Genova

Introduzione. La discheratosi congenita (DC) è una rara malattia multisistemica caratterizzata da una triade di sintomi muco-cutanei, che comprende anomalie della pigmentazione cutanea, distrofia ungueale e leucoplachia delle mucose. Possono essere presenti anche altre anomalie. L'insufficienza del midollo osseo è la causa principale di morte precoce, unitamente alla predisposizione alle lesioni tumorali e alle complicazioni polmonari ad esito fatale. La DC presenta una notevole eterogeneità clinica e genetica, infatti, sono note forme recessive, legate al cromosoma X, forme autosomiche dominanti e forme autosomiche recessive. La penetranza della malattia è molto variabile con forme difficilmente diagnosticabili e forme severe come nella sindrome di Hoyeraal-Hreidarson. Con la recente identificazione di 6 geni (*DKC1*, *TERC*, *TERT*, *NOPI10*, *NHP2* e *TINF2*)¹ responsabili della DC è sempre più evidente che le caratteristiche muco-cutanee possono non essere presenti. La maggior parte dei geni responsabili della DC codificano per componenti del complesso delle telomerasi o della scelterina entrambe coinvolte nel mantenimento del telomero, per questo, si ritiene che la DC sia causata da un accorciamento del telomero. L'identificazione di mutazioni di *TERC*, *TERT* e *TINF2* in alcuni pazienti con anemia aplastica (AA) e mielodisplasia (MDS),² hanno posto il quesito se questi pazienti possono essere inquadrati nella DC o pur condividendo il difetto genico presentano caratteristiche biologiche differenti. L'obiettivo di questo studio è la caratterizzazione biologica di pazienti con diagnosi di anemia aplastica che presentano mutazioni del gene *TERC*.

NUOVE MUTAZIONI DEL GENE HAX1 ASSOCIATE A RITARDO PSICOMOTORIO IN DUE PAZIENTI ITALIANI AFFETTI DA NEUTROPENIA CONGENITA SEVERA

S. Indaco,¹ M. Calvillo,¹ S. Bonanomi,² T. Coliva,² E. Mastrodicasa,³ G. Caridi,⁴ C. Dufour,¹ M. Lanciotti¹

¹Unità di Ematologia, Dipartimento di Emato-Oncologia Pediatrica, Istituto G. Gaslini, Genova; ²Clinica Pediatrica, Università di Milano Bicocca, Ospedale San Gerardo, Monza; ³Unità di Pediatria ed Oncologia, Ospedale S. Maria della Misericordia, Perugia; ⁴Laboratorio di Patofisiologia dell'Uremia, Istituto G. Gaslini, Genova

Introduzione. La neutropenia congenita severa (NCS) è una rara malattia genetica caratterizzata sin dai primi mesi di vita da grave neutropenia, ricorrenti infezioni batteriche e arresto della maturazione mieloide alla fase di promielocita/mielocita. È considerata una sindrome pre-leucemica, infatti, ha un'incidenza cumulativa di circa il 25% dopo 20 anni di osservazione. Inizialmente descritta come malattia autosomica recessiva e meglio conosciuta come sindrome di Kostmann, alla luce di nuove conoscenze, basandosi sul tipo di ereditarietà si possono dividere due maggiori sottotipi: ad ereditarietà autosomica dominante causata da mutazioni eterozigoti del gene *ELANE* (*ELA2*) responsabili di circa il 60% dei casi di SCN¹ e ad ereditarietà autosomica recessiva causata da mutazioni omozigoti del gene *HAX1*.² La proteina HAX1 ha una predominante localizzazione mitocondriale, dove esercita un controllo sull'integrità della membrana interna e regola l'apoptosi, ma sono state descritte numerose altre funzioni e localizzazioni cellulari. Il meccanismo attraverso il quale la mancanza di questa proteina provochi NCS non è chiaro. I pazienti con mutazioni nei geni *ELANE* o *HAX1* hanno un identico fenotipo clinico e morfologico, ciò suggerisce che potrebbe esserci un evento comune causato da entrambe le mutazioni. Finora i pazienti con NCS descritti sono individui del Medio Oriente, Giappone e della famiglia svedese originariamente studiata da Kostmann.^{2,4} Per capire se mutazione del gene *HAX1* sono caratteristiche di specifiche popolazioni o possono essere causa di NCS anche in popolazioni europee abbiamo studiato la nostra coorte di pazienti italiani con NCS.

Materiali e metodi. Il DNA genomico è stato estratto dal sangue periferico dei pazienti e dei componenti delle loro famiglie con kit commerciali. Le mutazioni del gene *ELANE* sono state analizzate

come precedentemente descritto.⁵ I sette esoni del gene *HAX1* e le relative regioni fiancheggianti sono state amplificate mediante PCR e le sequenze dei prodotti relativi analizzate tramite sequenza diretta utilizzando il Big Dye Terminator v3.1 kit e ABI PRISM3100 (Applied Biosystem).²

Risultati. L'analisi dei pazienti studiati ha permesso di identificare due pazienti italiani che presentavano mutazioni del gene *HAX1*. Nel primo paziente, un bambino di 4 anni con gravi infezioni sin dai primi giorni di vita e con un grave ritardo psicomotorio, abbiamo trovato una mutazione eterozigote composta nell'esone 3, formata da una frame-shift c.430_431insG che dava origine ad un prematuro codone di stop Val144GlyfsX5 ereditato dal padre e una mutazione missense c.389T>G causante una sostituzione di aminoacidi Leu130Arg ereditata dalla madre. Questa sostituzione non è stata precedentemente descritta ed abbiamo escluso fosse un polimorfismo perché non è stata trovata in 90 campioni di controllo. Entrambi i genitori ed un fratello portatori eterozigoti non presentavano segni clinici della malattia. Il secondo paziente, un bambino di 7 anni con diagnosi di NCS associata a grave ritardo psicomotorio e miopia bilaterale severa, presentava una mutazione omozigote c.409C>T, nell'esone 3, che dava origine ad un prematuro codone di stop p.Gln137X. Questa mutazione è nuova ed entrambi i genitori sono portatori, non consanguinei, ma entrambe le famiglie originarie della stessa zona geografica.

Conclusioni. In base ai nostri risultati le mutazioni del gene *HAX1* che causano NCS ad ereditarietà autosomica recessiva non sono limitate a popolazioni con particolari origine etnica, ma possono essere presenti anche in altre popolazioni, come quella italiana. I nostri dati confermano la stretta correlazione fra genotipo e fenotipo precedentemente descritta.³ Le mutazioni presenti nel trascritto 1 sono associate solo a NCS, mentre le mutazioni che interessano sia il trascritto 1 che il trascritto 2 causano NCS associata a sintomi neurologici, nei nostri pazienti le mutazioni descritte sono nell'esone 3 e quindi interessano entrambi i trascritti 1 e 2, infatti, entrambi sono affetti da NCS associata a gravi disturbi psicomotori. Il gene *HAX1* è largamente espresso, ma le sue mutazioni sono relativamente poco comuni, quindi la descrizione di ogni nuovo paziente, e la comprensione di come il tipo di mutazione può influire sul fenotipo e/o sulla suscettibilità alla trasformazione leucemica aggiunge nuove e preziose informazioni necessarie per meglio caratterizzare le peculiarità cliniche dei pazienti *HAX1* mutati e il ruolo della proteina HAX1.

Materiali e metodi. Il DNA dei pazienti e dei familiari è stato estratto, amplificato mediante PCR, ed analizzato con sequenziamento diretto. Le cellule midollari sono state incubate con anticorpi anti TNF- α e IFN- γ ed analizzate in citofluorimetria. I progenitori midollari sono stati coltivati in metil-cellulosa con e senza anticorpi anti TNF- α e/o IFN- γ .

Risultati preliminari. Paziente #1: esordio all'età di 14 anni con AA non grave. La sua mutazione, c.53T>A determina un cambiamento nella sequenza "stampo" del telomero. La stessa mutazione è stata identificata nel fratello più giovane, asintomatico, HLA identico e candidato alla donazione di midollo. La mamma non è mutata e non è stato possibile estendere l'analisi al padre, deceduto per leucemia all'età di 46 anni. L'espressione di TNF- α e di IFN- γ è superiore rispetto ai controlli. *In vitro*, l'inibizione di TNF- α e di IFN- γ , ha causato un rilevante incremento della crescita di BFU-e, assente nei controlli normali. Paziente #2: esordio a 47 con AA grave. La mutazione c.210C>G determina una modificazione della struttura terziaria dell'RNA di *TERC*. Lo studio del gene non è stato esteso alla famiglia perché non disponibile. L'espressione di TNF- α e di IFN- γ è risultata paragonabile a quella dei controlli e l'inibizione delle citochine non dà incremento della crescita di BFU-e. Paziente #3: esordio all'età di 16 anni, presenta una mutazione c.300G>C. Lo studio genetico della famiglia e la caratterizzazione biologica sono in corso.

Conclusioni. Lo studio dei pazienti ha rivelato una correlazione tra gravità di malattia all'esordio e tipo di mutazione. Le citochine mielosoppressive sembrano avere un ruolo nell'insufficienza midollare in uno dei pazienti mutati, studiati. L'analisi dei familiari indica l'utilità dello studio del gene *TERC* al fine di individuare portatori asintomatici, escluderli come donatori di midollo e impostare un adeguato protocollo di sorveglianza.

Bibliografia

1. Walne AJ and Dokal I. Advances in the understanding of dyskeratosis congenita. *British J. Haematol* 2009;145:164-72.
2. Du HY, Pumbo E, Ivanovich J, et al. Terc and TERT gene mutations in patients with bone marrow failure and the significant of telomere length measurements. *Blood* 2009;113:309-16.

Bibliografia

1. Horwitz M, Duan Z, Korkmaz B, et al. Neutrophil elastase in cyclic and severe congenital neutropenia. *Blood* 2007; 109:1817-24.
2. Klein C, Grudzien M, Appaswamy G, et al. HAX1 deficiency causes autosomal recessive severe congenital neutropenia (Kostmann disease). *Nat Genet* 2007;39: 86-92.
3. Germeshausen M, Grudzien M, Zeidler C, et al. Novel HAX1 mutations in patients with severe congenital neutropenia reveal isoform-dependent genotype-phenotype associations. *Blood* 2008;111:4954-7.
4. Ishikawa N, Okada S, Miki M, et al. Neurodevelopmental abnormalities associated with severe congenital neutropenia due to the R86X mutation in the HAX1 gene. *J Med Genet* 2008; 45: 802-7.
5. Lanciotti M, Caridi G, Rosano C, et al. Severe congenital neutropenia: a negative synergistic effect of multiple mutations of ELA2 gene. *Br J Haematol* 2009; 146:573-82.

TUMORI CEREBRALI

03

RUOLO DEI POLIMORFISMI DEL PAI-1 E DELLA TROMBOSI INTRATUMORALE NELL'INVASIVITÀ DEI TUMORI INFANTILI

M. Roberti, D. Lucente, A. Clerico, F.M. Perla

Università "Roma Sapienza" Dipartimento di Pediatria e Neuropsichiatria Infantile UOC Oncematologia Pediatrica, Roma

Introduzione. Esiste una relazione complessa tra il sistema del plasminogeno e l'invasività tumorale. Come è noto, l'aumentata produzione di Attivatore urochinasi del plasminogeno (uPA) e la maggiore espressione del recettore specifico (uPA-R) da parte della cellula neoplastica, conduce non soltanto ad aumentata conversione del plasminogeno in plasmina (con conseguente proteolisi della matrice extracellulare ed incremento dell'invasività), ma anche per azione dell'uPA-R ad aumento della proliferazione, del movimento e dell'adesione della cellula neoplastica. Normalmente l'inibitore 1 del plasminogeno (PAI-1) agisce sugli attivatori (urochinasi e tissutale) modulando la trasformazione del plasminogeno in plasmina. Il gene del PAI-1 situato sul braccio lungo del cromosoma 7, presenta alcuni polimorfismi (4G/4G, 5G/5G, 4G/5G) che sono stati diversamente correlati all'invasività tumorale.^{1,2} Da un recente studio effettuato su preparati istologici di tumori diversi (in prevalenza tumori del sistema nervoso centrale) è stata trovata una stretta correlazione tra la presenza di focolai di trombosi intratumorale ed aggressività. In particolare nell'astrocitoma di II e III grado, la progressione in glioblastoma è risultata molto più veloce, rispetto ai tumori che non presentavano fenomeni trombotici.³ Lo studio tuttavia, non ha valutato se nei casi con trombosi intratumorale, fossero anche presenti fattori di rischio trombofilico. Sulla base di queste premesse abbiamo intrapreso uno studio con il fine di correlare la presenza dei diversi polimorfismi del PAI-1 e di focolai di trombosi intratumorale, con il grado di aggressività e la risposta alla chemioterapia in un gruppo di bambini affetti da neoplasie di diversa origine.

Materiali e metodi. 1) Tutti i bambini del campione sono stati sottoposti a screening per i fattori di rischio trombofilico (genetici ed acquisiti) per valutarne la predisposizione alla trombosi indipendentemente dalla malattia. 2) A tutti è stata effettuata ricerca dei polimorfismi

genetici del PAI-1. 3) Tutti i preparati istologici da tumore primario, sono stati rivalutati per la ricerca di focolai di trombosi intratumorale, come descritto in letteratura.³ 4) Sono stati segnalati e descritti i casi di trombosi extratumorali. **Risultati.** Sono stati reclutati 8 bambini: tre bambini hanno presentato neoplasie cerebrali (ependimoma, medulloblastoma, disgerminoma); negli altri casi si sono avuti i seguenti istotipi: osteosarcoma, rhabdomyosarcoma alveolare, rhabdomyosarcoma embrionale, linfoma B, istiocitosi X. Allo studio dei polimorfismi 3 bambini hanno presentato polimorfismo 4G/4G, 3 il polimorfismo 4G/5G e due il 5G/5G. Trombosi intratumorali sono state evidenziate in due bambini, l'uno affetto da ependimoma, l'altro da osteosarcoma.

Gli stessi bambini hanno presentato inoltre trombosi a carico di grossi vasi venosi (rispettivamente seno sagittale, vena poplitea). Dallo studio dei polimorfismi genetici relativo ad un pre-esistente stato trombofilico sono risultati in entrambi i casi presenza di polimorfismo MTHFR 677TT. Mentre nel caso di ependimoma il tumore è risultato rapidamente progressivo, nell'osteosarcoma - rimosso completamente ed attualmente in trattamento chemioterapico post-chirurgico - al momento non si sono avute recidive.

Conclusioni. Dallo studio in corso prevediamo di porre in evidenza diversi aspetti l'importanza di sottoporre a screening trombofilico i bambini affetti da neoplasia maligna al fine di selezionare una predisposizione che può favorire il fenomeno trombotico indipendentemente dall'azione procoagulante svolta dal tumore. La prevalenza di un polimorfismo del PAI-1 rispetto ad un altro come indice di aggressività tumorale, richiede studi allargati per confermare il dato. La valutazione istologica della neoplasia dovrebbe comprendere sempre anche la ricerca di focolai di trombosi intratumorale per individuare una sua correlazione con l'aggressività del tumore.

Bibliografia

1. Lei H, Hemminki K, Johansson R, et al. PAI-1 -675 4G/5G polymorphism as a prognostic biomarker in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2008;109:165-75.
2. Försti A, Lei H, Tavelin B, et al. Polymorphisms in the genes of the urokinase plasminogen activation system in relation to colorectal cancer. *Ann Oncol* 2007;18:1990-4.
3. Teharani M, Friedman M, Olson J, Brat J. Intravascular thrombosis in central nervous system malignancies: a potential role in astrocytoma progression to glioblastoma. *Brain Pathol* 2008;18:164-71.

08

STUDIO PROTEOMICO APPLICATO AD UNA CASISTICA DI MEDULLOBLASTOMA: RISULTATI PRELIMINARI

I. Morra, C. Zanini,² G. Mandili,³
P. Peretta,¹ M. Forni, D. Bertin,⁴
E. Basso⁴

Servizi di Anatomia Patologica; ¹Neurochirurgia OIRM Torino; ²EuroClone Life Sciences Division; ³Istituto di Biochimica e SCDU; ⁴Oncoematologia Pediatrica Università di Torino

Sono stati analizzati 8 campioni provenienti da 6 pazienti operati presso la Neurochirurgia OIRM e trattati dall'Oncoematologia Pediatrica. L'approccio proteomico alle neoplasie neuroectodermiche può fornire una più precisa caratterizzazione molecolare del medulloblastoma e permettere di identificare marcatori biomolecolari di possibile utilità nella stratificazione dei pazienti secondo l'aggressività biologica delle varie categorie diagnostiche identificate dall'analisi anatomopatologica e dalla biologia molecolare. La disponibilità di campioni tumorali adeguatamente congelati ha permesso di intraprendere lo studio e la precisa correlazione tra aspetti macroscopici e microscopici; inoltre l'analisi proteomica ha permesso di analizzare aspetti di variabilità intratumorale, il che riveste un aspetto di una certa rilevanza nell'ambito di queste neoplasie. L'analisi proteomica è partita dalle mappe ottenute mediante la tecnica di "finger printing" e dalla successiva identificazione delle proteine mediante l'utilizzo del MALDI-TOF in spettrometria di massa. La classificazione istologica dei casi studiati è così distribuita (WHO 2007): cinque medulloblastomi di tipo "classico" - e tra questi uno del sottotipo melanotico - e un medulloblastoma anaplastico a grandi cellule. Di questo ultimo caso è stato possibile esaminare anche un prelievo post-radioterapia relativo ad un secondo intervento neurochirurgico. Sono state identificate sui tutti i casi esaminati un centinaio di proteine che permettono di descrivere il profilo proteico del MDB. Le proteine maggiormente espresse nei tumori con istologia classica appartengono a varie categorie e mostrano una certa costanza di espressione. In generale si osserva l'espressione di proteine coinvolte nel processo di trasformazione neoplastica e le *stress response proteins* (HSP). Rilevante è l'iperespressione di HSP70 e HSP60 nonché della disolfuro isomerasi, di proteine apoptotiche come MAP kinasi e altre proteine del ciclo cellulare, proteine nucleari (homeobox) e del citoscheletro. Nel caso con componente melanotico

ca l'analisi di differenti aree - macroscopicamente di aspetto differente e colore più scuro e microscopicamente caratterizzate da granuli di melanina e cellule perivascolari positive con l'anticorpo HMB45 - ha permesso di studiare le proteine presenti nelle limitate aree pigmentate del caso di sottotipo melanotico, correlate alla sintesi della melanina di tipo oculo-cutaneo e confrontarle con la componente cellulare non pigmentata molto più rappresentata. L'identificazione a livello proteomico dell'espressione di proteine legate alla sintesi enzimatica di melanina conferma gli scarsi dati della letteratura sul MDB melanotico (sulla presenza della forma oculocutanea e non di neuromelanina o lipofuscine nelle aree pigmentate). La disomogeneità proteomica tumorale nell'ambito di queste neoplasie neuroectodermiche appare quindi limitata e può essere un aspetto di differenziazione divergente. Il caso con istologia a grandi cellule mostra l'espressione di proteine collegate alla elevata aggressività biologica: CD140 (recettore che lega sia il PDGFA che il PDGFB ed ha proprietà tirosin chinasi), annessina VIII e chinasi 9 chinasi dipendente. Il MDB anaplastico esprime anche un certo numero di proteine coinvolte nella invasione tumorale e metastatizzazione come la NDKA (*Tumor metastatic process associated protein*). È stato possibile analizzare di questo caso anche il prelievo al momento del secondo intervento chirurgico per recidiva: il complesso profilo proteico del MDB anaplastico si semplifica di molto dopo il processo radioterapico, che mostra la perdita delle proteine citoplasmatiche e della membrana cellulare e la comparsa di nuove proteine nucleari e di proteine correlate alla resistenza farmacologica. La modificazione radioindotta del corredo proteico con la comparsa di nuove proteine (correlate all'ubiquitina e suo metabolismo), ma soprattutto la semplificazione delle proteine espresse (con perdita dell'HSP27) è di notevole interesse perché potrebbe aprire nuovi scenari nella scelta dei chemioterapici da utilizzare dopo la radioterapia che rimane un pilastro fondamentale nella terapia combinata del medulloblastoma.

18

LA DISTRIBUZIONE DELLE CELLULE STAMINALI DEL GLIOBLASTOMA È DETERMINATA DAL GRADIENTE IPOSSICO INTRA-TUMORALE

F. Pistollato,¹ S. Abbadi,¹ E. Rampazzo,¹
L. Persano,¹ A. Della Puppa,² E. Sarto,¹
C. Frasson,¹ G. Basso¹

Laboratorio di Oncoematologia Pedia-

trica, Dipartimento di Pediatria, Università di Padova; ²Dipartimento di Neurochirurgia, Università di Padova

Introduzione. I glioblastomi multiformi (GBM) sono tumori cerebrali eterogenei, altamente proliferanti, a tutt'oggi trattati in modo non soddisfacente e classificati come gliomi di IV grado. Vengono asportati chirurgicamente, e poi trattati con radioterapia e chemioterapia a base di agenti alchilanti. Tuttavia, recenti scoperte supportano nuove ipotesi biologiche^{1,2} che potrebbero portare a riconsiderare i tradizionali approcci terapeutici. A questo riguardo, risulta cruciale definire le caratteristiche biologiche e microambientali del GBM. In particolare, è stato dimostrato che i tumori cerebrali sono caratterizzati da un microambiente ipossico, che correla con l'aggressività del tumore,^{3,4} e l'iper-attivazione del hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α), la molecola sensore dell'ipossia maggiormente descritta, è implicata nella progressione del tumore. L'ipossia correla anche con la resistenza ai chemoterapici, il che suggerisce che una più approfondita comprensione della nicchia tumorale potrebbe essere essenziale ai fini di un miglioramento delle attuali strategie terapeutiche. Recenti studi hanno anche suggerito che i geni regolati da HIF sono preferenzialmente espressi nelle cellule staminali di glioma rispetto alle cellule staminali normali e che l'ipossia induce il de-differenziamento nei neuroblastoma.⁴ Queste scoperte confermano una potenziale forte correlazione fra il livello di staminalità del tumore e il tasso di ipossia propria della nicchia. Le attuali ricerche sulle culture primarie dei tumori cerebrali vengono generalmente condotte su porzioni random di materiale biotico, non determinabile a livello regionale. In base ad un recente studio, sembra che all'interno della massa tumorale di GBM sussistano due tipi di cellule staminali cancerose (CSC) con caratteristiche regionali specifiche.⁵
Scopo e metodi. In questo studio abbiamo investigato il profilo fenotipico delle regioni concentriche presenti nella massa di GBM in correlazione al gradiente di O₂. Mediante chirurgia image-guided sono stati campionati delle aree intratumorali specifiche, al fine di definirne la potenziale eterogeneità fenotipica e i diversi gradi di attivazione di importanti signaling pathways. Sono state analizzate la regione periferica, più vascularizzata, quella intermedia, immediatamente circostante al core tumorale ed il core tumorale necrotico stesso. Abbiamo utilizzato tecniche di immunostochimica, biologia cellulare in condizioni di ipossia, immunocitochimica, citofluorimetria e western blot.

Risultati. Abbiamo riscontrato che i tre layer hanno proprietà cellulari molto diverse. Infatti, le cellule staminali si collocano principalmente nella regione anossica e soprattutto intermedia/ipossica della massa tumorale, caratterizzate da un'elevata espressione di HIF-1 α , mentre le cellule piú differenziate si collocano nella regione piú periferica e neovascolarizzata. Inoltre, astrociti GFAP⁺ sembrano esprimere un alto livello di VEGF, mentre le cellule nestin⁺ sono collocate in corrispondenza della distribuzione di HIF-1 α . Analisi condotte sulle colture cellulari di queste cellule indicano che queste caratteristiche fenotipiche permangono e segnali molecolari pro-differenziativi, soprattutto Smad 1/5/8 e Stat3, risultano attivati piú fortemente nella regione periferica, dove la tensione di ossigeno è maggiore. Quindi i nostri dati indicano l'esistenza di una forte correlazione fra il gradiente di ipossia nel tumore ed il fenotipo cellulare.

Conclusioni. Questi risultati portano alla formulazione di un modello tridimensionale concentrico di distribuzione delle cellule tumorali staminali e differenziate, e tale distribuzione è determinata dal gradiente ipossico intra-tumorale. Riteniamo che tali informazioni potrebbero essere utili per il miglioramento delle strategie terapeutiche e diagnostiche.

Bibliografia

- 1 Sanchez-Martin M, Curr Stem Cell Res Ther 2008;3:197.
- 2 Altaner C. Neoplasma 2008;55:369.
- 3 Azuma Y, et al. Clin Cancer Res 2003;9:4944.
- 4 Jogi A, et al. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99:7021.
- 5 Piccirillo S.G. et al. Oncogene 2009;28:1807.

30

IDENTIFICAZIONE DI DUE NUOVE MUTAZIONI DEL GENE NF1 IN PAZIENTI AFFETTI DA NEUROFIBROMATOSI

S. Cannella,¹ G. Bruno,¹ A. Santoro,² M. Piccione,³ O. Ziino,¹ G. Corsello,³ P. D'Angelo¹

¹U.O. di Oncoematologia Pediatrica, Ospedale dei Bambini "G. Di Cristina", Palermo; ²Divisione di Ematologia, Azienda Ospedaliera "V. Cervello", Palermo; ³Istituto Materno Infantile, Cattedra di Pediatria, Università degli Studi, Palermo

Introduzione. La neurofibromatosi di tipo 1 (NF1) è una malattia genetica autosomica dominante, le cui caratteristiche cliniche dipendono dalla variabile espressività fenotipica: dalla presenza

delle sole manifestazioni cutanee a gravi quadri clinici con deficit intellettivo, neurofibromi diffusi, neoplasie del SNC etc. Il gene NF1, localizzato sul cromosoma 17q11.2, 57 esoni costitutivi e almeno tre esoni alternativi, è stato associato alla malattia nel 1990.¹ Ad oggi sono state descritte piú di 700 mutazioni, riportate sulla *Human Gene Mutation Data Base*. Circa il 50% delle mutazioni sono state osservate in casi sporadici.² Le mutazioni si distribuiscono in maniera "random" lungo tutto il gene.³ Approssimativamente il 45% delle mutazioni, causano alterazioni dello splicing.^{4,5}

Pazienti e metodi. Lo studio del gene NF1 è stato eseguito in 6 pazienti ed in 8 familiari, mediante sequenziamento automatico del cDNA e del DNA genomico (Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, ABIPRISM 3130 Applied Biosystem). Il clonaggio dell'esone d'interesse è stato eseguito utilizzando il Kit TOPO TA cloning/TOP10 (Invitrogen).

Risultati. Quattro dei 6 pazienti e 2 degli 8 familiari presentavano una mutazione del gene NF1. In 2 dei 4 pazienti con anomalia del gene, entrambi siciliani, sono state riscontrate 2 nuove mutazioni.

La mutazione missenso c.4268 A>T localizzata sull'esone 24 (K1423M) è stata rilevata in una bambina di 16 anni, affetta da neurofibromatosi familiare con espressione cutanea rilevante e deficit neurocognitivo di grado moderato; la stessa mutazione è stata identificata anche nel padre e nella sorella di 7 anni, caratterizzati da espressione clinica sovrapponibili. La mutazione c.2410-14 A>G localizzata sull'introne 15 (IVS 15) è stata rilevata in una bambina di 5 anni affetta da neurofibromatosi sporadica, manifestazioni cutanee tipiche e glioma delle vie ottiche. Dai dati ottenuti dalla sequenza e dal clonaggio dell'RNA messaggero, abbiamo dimostrato che la c.2410-14 A>G introduce un sito criptico di splicing, provocando l'inclusione degli ultimi 13 nucleotidi di sequenza intronica nella sequenza codificante (esonizzazione dell'introne) e interrompendo il corretto frame di lettura.

Conclusioni. Le mutazioni descritte, rilevate in queste 2 pazienti siciliane, non risultano descritte in letteratura. Riteniamo quindi di aver fornito un contributo all'ampliamento dei dati genetici sulla NF1.

Bibliografia

1. Roberts L. Down to the wire for the NF gene. Science 1990;249:236-8.
2. Upadhyaya M, Cooper DN. The mutational spectrum in neurofibromatosis 1 and its underlying mechanisms. Bios Scientific Publishers 1998:65-88.
3. Friedman JM. Epidemiology of

Neurofibromatosis type1. Am J Med Genet 1999;89:106.

4. Ars E, et al. Mutations affecting mRNA splicing are the most common molecular defects in patients with neurofibromatosis type 1. Hum Mol Genet 2000;9:237-47.
5. Ars E, et al. Recurrent mutations in the NF1 gene are common among neurofibromatosis type 1 patients. J Med Genet 2003;40:82.

32

SOPPRESSIONE DELL'ESPRESSIONE DEL GENE DKK3 NEL MEDULLOBLASTOMA CLASSICO

S. Coco,¹ F. Valdora,² P. Scaruffi,¹ S. Moretti,³ S. Bonassi,³ I. Adolfo,⁴ M. Zollo,⁴ M. Forni,⁵ A. Oberthuer,⁶ J. Theissen,⁶ G. Cinalli,⁷ A. Iolascon,⁴ G.P. Tonini¹

¹Oncologia Traslazionale Pediatrica, Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro (IST) Genova; ²Dipartimento di Oncologia Biologia e Genetica (DOBiG), Università degli studi di Genova; ³Epidemiologia Molecolare (IST), Genova; ⁴CEINGE Napoli; ⁵Università di Torino; ⁶Paediatric Oncology Centre, University Children's Hospital, Cologne (Germany); ⁷A.O. Santobono Napoli

Introduzione. Il medulloblastoma (MB) è il piú comune tumore embrionale del sistema nervoso centrale che origina dal neuroectoderma e si sviluppa nel cervello. Rappresenta circa il 20-30% dei tumori pediatrici con un picco d'incidenza nei bambini con età compresa tra i 5-10 anni. Dal punto di vista istologico il MB è distinto in tre principali varianti istologiche: classico, desmoplastico e large cells. A oggi tre pathways (Shh-Ptch, Notch e Wnt) sono state conosciute essere implicate nello sviluppo, nella crescita e nell'aggressività del MB. La pathway di Wnt è stata dimostrata giocare un ruolo essenziale nelle fasi precoci dello sviluppo embrionale del sistema nervoso centrale nel differenziamento e nell'oncogenesi. Per meglio caratterizzare le basi molecolari responsabili dello sviluppo e dell'aggressività del MB noi abbiamo eseguito uno studio di integrazione genoma-trascrittoma focalizzando sulla variante classica, che rappresenta circa 85% dei MB.

Materiali e metodi. È stato studiato il genoma di 32 MB appartenenti alla variante classica per mezzo di array-CGH con piattaforma ad alta risoluzione 244K (Agilent Technologies). Cinquecento ng di DNA tumorale e di DNA reference (pool commerciale di DNA ottenuto da individui sani) sono stati rispettivamente marcati con Cy3-dUTP con Cy5-dUTP. L'analisi dei dati di array-CGH è stata eseguita utilizzando il software CGH-

Analytics (Agilent Technologies) e l'algoritmo Z-score. Al fine di incrementare il numero di casi e raggiungere la significatività statistica abbiamo aggiunto alla casistica i dati di arrayCGH presenti nei lavori di Lo *et al.* 2007 e di Lo *et al.* 2008 utilizzando un approccio di meta-analisi. È stato possibile studiare il profilo di espressione genica di 19 dei 32 tumori analizzati in CGHarray. Tale analisi è stata eseguita utilizzando una piattaforma ad oligonucleotide whole-genome microarray 44K (Agilent Technologies). Cinquecento ng di RNA sono stati amplificati e marcati seguendo il protocollo *One-color microarray-based gene expression analysis* (Agilent Technologies). L'analisi dei dati è stata eseguita identificando quei geni che in tutti i tumori mostravano un livello di espressione di almeno tre volte maggiore o minore rispetto al livello di espressione del controllo, un pool commerciale di 25 RNA di cervelletti normali.

Risultati Preliminari. DNA Copy Number Aberrations (CNAs) sono state identificate in 48/50 casi. Le CNAs osservate con più frequenza sono state le seguenti: gain del 17q (33%), 1q (25%), 7q (22%), e loss del 8p (20%), 17p (18%), 16q (17%), 10q (15%), 11p (12%). L'analisi di espressione genica dei MB ha permesso di selezionare 365 probesets di cui 216 sono stati trovati *down-regulated* e 149 aumentati rispetto all'RNA di controllo. L'analisi di *Gene Ontology* ha evidenziato un'elevata espressione di geni correlati ad attività mitotica, al contrario i geni down regolati appartenevano a pathways del sistema nervoso centrale, comunicazione cellulare e differenziamento neuronale, indicando un'alterata regolazione del differenziamento cellulare nel MB. Tra i geni che sono stati trovati down-regolati nei MB, abbiamo evidenziato una bassa espressione del gene DKK3. DKK3 (chr: 11p15.3-15.2) appartiene a una famiglia di 4 geni (DKK1-4) evolutivamente conservati che codificano per delle proteine secrete che tipicamente antagonizzano la *pathway Wnt/β-catenin*, attraverso l'inibizione del co-recettore di Wnt (Glinka *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2000). I geni DKK sono stati osservati down regolati in numerose neoplasie. Una down regolazione di DKK3 contribuirebbe all'attivazione della *pathway* di Wnt determinando una deregolazione della proliferazione cellulare e del differenziamento. Recenti pubblicazioni hanno evidenziato un aberrante iper-metilazione del promotore di DKK3, suggerendo un possibile ruolo come repressore nella crescita di numerosi tumori (Kobayashi *et al.*, 2002; Hsieh *et al.*, 2004).

Conclusioni attese. I nostri dati preliminari suggeriscono che DKK3 è un candidato tumor suppressor gene nello sviluppo del MB classico. Siccome la delezione 11p

rappresenta un fenomeno poco frequente nella patogenesi del MB classico (circa il 10-15%) noi ipotizziamo che esistano altri meccanismi responsabili della sua minore espressione. Successive analisi sono in corso per chiarire il ruolo di DKK3 nel MB.

Bibliografia

1. Kobayashi K, Ouchida M, Tsuji T, et al. Reduced expression of the REIC/Dkk-3 gene by promoter-hypermethylation in human tumor cells. *Gene* 2002;9:282:151-8.
2. Hsieh SY, Hsieh PS, Chiu CT, Chen WY. Dickkopf-3/REIC functions as a suppressor gene of tumor growth. *Oncogene* 2004;23:9183-9.
3. Glinka A, Wu W, Delius H, et al. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 1998;391:357-62.
4. Wu W, Glinka A, Delius H, Niehrs C. Mutual antagonism between dickkopf1 and dickkopf2 regulates Wnt/beta-catenin signaling. *Curr Biol* 2000;10:1611-4

39

IDENTIFICAZIONE DI ASSOCIAZIONE TRA PROGNOSI SFAVOREVOLE E SIGNATURE DI RNA NON CODIFICANTI NEL NEUROBLASTOMA AD ALTO RISCHIO

P. Scaruffi,¹ S. Stigliani,¹ S. Moretti,² S. Coco,¹ C. De Vecchi,¹ F. Valdora,³ A. Garaventa,⁴ S. Bonassi,⁵ G.P. Tonini¹

¹Oncologia Traslazionale Pediatrica e ²Epidemiologia Molecolare, Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro (IST), ³Dipartimento di Oncologia e Genetica (DOBIG), Università di Genova, ⁴Dipartimento di Ematologia-Oncologia, Istituto G. Gaslini, Genova; ⁵Epidemiologia Clinica e Molecolare, IRCCS San Raffaele Pisana, Roma

Introduzione. Il neuroblastoma è il più frequente tumore solido maligno extracranico dell'età pediatrica. Nonostante approcci terapeutici multimodali, la prognosi dei pazienti ad alto rischio è sfavorevole, con una sopravvivenza a lungo termine inferiore al 40%. In questo studio abbiamo analizzato i profili di espressione di due classi di RNA non codificanti costituite dai microRNA e dalle sequenze *Transcribed Ultra Conserved Region* (TUCR). È noto che i microRNA sono regolatori dell'espressione genica e che specifici *pattern* di espressione di microRNA sono associati alla progressione di malattia, alla prognosi e alla resistenza farmacologica di vari tumori. Ad oggi in letteratura sono presenti solo due lavori che riportano una espressione differenziale di microRNA su casistiche limitate di neuroblastomi (Chen *et al.*, 2007; Wei SJ *et al.*, 2009). Recentemente, sono stati individuati 481 TUCR, sequenze altamen-

te conservate tra regioni ortologhe di uomo, ratto e topo e localizzate sia in regioni intra- che inter-geniche. Il profilo di espressione dei TUCR è stato studiato solo in leucemie e carcinomi colonrettali ed epatocellulari dell'adulto, dimostrando l'esistenza di *pattern* di espressione associati alla progressione di tali neoplasie (Calin *et al.*, 2007). In questo studio abbiamo valutato il valore prognostico dei TUCR in pazienti affetti da neuroblastoma di stadio 4 ad alto rischio.

Materiali e metodi. Abbiamo arruolato 34 campioni di neuroblastoma da pazienti in stadio 4 con età > 1 anno alla diagnosi, di cui 17 deceduti per malattia e 17 vivi senza eventi (progressioni o recidive) a 3 anni dalla diagnosi. È stato eseguito lo studio dei profili di espressione di 481 TUCR mediante PCR quantitativa e di 723 microRNA mediante microarray (piattaforma Human microRNA v.2, Agilent Technologies).

Risultati preliminari. Una prima analisi su 8 casi lungo-sopravvivenenti e 12 corto-sopravvivenenti ha dimostrato che 54 TUCR erano significativamente ($p < 0.0491$) over-espressi nel primo gruppo. Per 48 TUCR i livelli di espressione al di sopra dei valori di cut-off definiti dalle curve ROC erano fortemente associati ad una buona prognosi (OS: $0.0001 < p < 0.0185$, EFS: $0.0001 < p < 0.0491$). Abbiamo, quindi, testato il modello di predizione di rischio fornito dalla trascrizione dei 48 TUCR in una coorte indipendente di 14 pazienti. Il profilo di espressione di 28 TUCR era significativamente associato alla prognosi e risultano necessari almeno 15 TUCR up-regolati per discriminare ($p < 0.0001$) i lungo- dai corto-sopravvivenenti con il livello massimo di sensibilità e specificità (94.12%).

Lo studio dei profili di espressione dei microRNA ha identificato una *signature* di 13 microRNA differenzialmente espressi tra i pazienti lungo- e corto-sopravvivenenti. L'analisi comparativa delle due classi di RNA non codificanti ha evidenziato che 9 TUCR presentano un livello di espressione inversamente correlato con l'espressione di 5 microRNA della *signature* ad essi complementari. Questo indica una regolazione negativa della trascrizione dei TUCR mediante un'interazione diretta con i microRNA. Inoltre, 4 microRNA down-regolati nei tumori dei lungo-sopravvivenenti hanno come bersaglio 3 geni (*CHD5*, *FYN* and *NTRK1*) implicati nella differenziazione neuronale, che sono noti essere over-espressi nei neuroblastomi a basso rischio (Vermeulen *et al.*, 2009).

Conclusioni. I nostri dati suggeriscono che una deregolazione del *network* microRNA/TUCR possa giocare un ruolo importante della patogenesi del neuroblastoma. Dopo ulteriori validazioni, tali informazioni potranno essere applicate

come prima *signature* prognostica basata sui TUCR per i pazienti affetti da neuroblastoma metastatico ad alto rischio.

Bibliografia

1. Chen Y, Stallings RL. Differential patterns of microRNA expression in neuroblastoma are correlated with prognosis, differentiation, and apoptosis. *Cancer Res* 2007;67:976-83.
2. Wei JS, Johansson P, Chen QR et al. microRNA profiling identifies cancer-specific and prognostic signatures in pediatric malignancies. *Clin Cancer Res* 2009;15:5560-8.
3. Calin GA, Liu CG, Ferracin M et al. Ultraconserved regions encoding ncRNAs are altered in human leukemias and carcinomas. *Cancer Cell* 2007;12: 215-29.
4. Vermeulen J, De Preter K, Naranjo A et al. Predicting outcomes for children with neuroblastoma using a multigene-expression signature: a retrospective SIOPEN/COG/GPOH study. *Lancet Oncol* 2009;10:663-71.

43

INTERAZIONE DEL MIR34A CON IL NOTCH PATHWAY NEL MEDULLOBLASTOMA

P. De Antonellis,¹ E. Cusanelli,¹ C. Medaglia,¹ R. Camicia,¹ L. Liguori,¹ I. Andolfo,¹ D. De Martino,¹ A. Galeone,² V. Maffia,¹ G. Cinalli,³ R. Migliorati,³ V. D'Onofrio,³ S. Pfister,⁴ A. Iolascon,^{1,5} M. Zollo^{1,5,6}

¹Ceinge, *Biotechnology Avanzate, SCARL*, ²Dipartimento di Chimica delle Sostanze Naturali, Università di Napoli "Federico II"; ³Neurochirurgia Pediatrica, Santobono-Pausilipon, Napoli; ⁴Division of Molecular Genetics and Biostatistics and Clinical Cooperation Unit Neuropathology, German Cancer Research Center, Department of Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany; ⁵Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie mediche, Università degli Studi di Napoli, Federico II; ⁶Facoltà di Scienze Biotecnologiche, Università degli Studi di Napoli, "Federico II"

Introduzione. Il medulloblastoma (MB) è il più comune tumore maligno cerebrale, con un picco d'incidenza che si verifica nei bambini di età tra i 2 e i 8 anni e rappresenta il 25% dei tumori cerebrali dell'età pediatrica con sede nel cervelletto. La sua origine è ancora controversa. Una prima ipotesi indica l'origine istogenetica del midollo a partire dalle cellule staminali e dai precursori dei neuroni granulari dello strato granulare esterno del cervelletto; una seconda ipotesi, invece, prevede che il tumore possa avere origine dai precursori multipotenti presenti

nella zona ventricolare del cervelletto (Gilbertson RJ, et al., 2008). L'attuale cura del MB prevede la resezione chirurgica del tumore con successivi cicli di radioterapia e chemioterapia. Purtroppo la principale causa di morte resta la disseminazione del tumore ad altri organi ed inoltre le terapie hanno effetti collaterali troppo tossici e causano severi danni neurologici (Yang ZJ, et al., 2008) rendendo quindi necessaria la ricerca per cure più efficaci di quelle attuali e con bassa tossicità. Il *Notch pathway* è coinvolto in un sistema di segnalazione cellula-cellula che consente la comunicazione tra cellule in stretto contatto tra loro. Il signaling si accende quando il ligando, presentato da una cellula vicina, interagisce con un recettore Notch. Questo legame scatena due clivaggi. Il primo avviene ad opera della metalloproteasi ADAM e determina il distacco del dominio extracellulare del recettore dal dominio transmembrana ancorato al NEXT (*Notch extracellular truncation fragment*). Il secondo taglio, mediato dalla γ -secretasi, porta alla formazione del NICD (*Notch intracellular domain*) che entra nel nucleo e si associa alla *DNA-binding protein* CSL (caratterizzata da motivi elica-giro-elica). In assenza di NICD CSL reprime la trascrizione dei geni target di Notch complessandosi con dei corepressori. Il legame di CSL con NICD induce in quest'ultima un cambio conformazionale che la converte da repressore ad attivatore trascrizionale e così i geni target di Notch vengono espressi. Nel corso dello sviluppo i progenitori neuronali modificano le loro caratteristiche continuamente, dando luogo a tutti i differenti tipi cellulari presenti nel sistema nervoso (Alvarez Buylla et al., 2001). L'attivazione del Notch promuove la sintesi dei repressori della trascrizione Hes1 ed Hes5, che inibiscono l'espressione dei geni implicati nel differenziamento neuronale (Bertrand et al. 2002). Di conseguenza, la disregolazione di questo *pathway* è coinvolta nella patogenesi di un ampio spettro di patologie umane, che comprende disordini dello sviluppo, malattie che insorgono nell'età adulta e tumori. I microRNAs sono piccole molecole di RNA a singolo filamento lunghi circa 20-22 nucleotidi e non codificanti proteine (Bartel et al. 2004). Sono molecole essenziali per il normale sviluppo di tutti i tessuti perchè preposti al controllo di processi biologici importantissimi, come la crescita ed il differenziamento cellulare, il metabolismo e l'apoptosi (Esquela-Kersner et al. 2006). Essi esercitano tale funzione regolatoria a livello post-trascrizionale legando la regione 3'UTR dei geni target, degradando l'mRNA target o inibendo la traduzione (Bartel DP, et al. 2004). L'obiettivo di tale lavoro è stato descrivere gli effetti, in cellule di medulloblastoma, della ipo-

regolazione della proteina DLL1 (*Delta Like Ligand 1*) mediata dal Mir34a.

Materiali e metodi. Saggi di luciferasi, clonaggi in vettori di espressione, mutagenesi sito-diretta, saggi di caspasi, saggi di proliferazione cellulare, test di crescita in ancoraggio-indipendente (soft agar), analisi di espressione mediante saggi TaqMan.

Risultati. Attraverso un approccio bioinformatico, che analizza le sequenze nucleotidiche delle 3'UTR dei geni e identifica potenziali siti di legame dei miRNA noti, abbiamo identificato il miR34a. Questo microRNA, appartenente ad una famiglia genica altamente conservata interspecie, è capace di bersagliare DLL1 ligando di Notch1. Abbiamo quindi confermato la sua capacità di inibire l'espressione mediante saggi luciferasici nei quali è stata clonata l'intera 3'UTR del gene DLL1 a valle del gene reporter. Successivamente abbiamo dimostrato che l'espressione ectopica del miR34a, in cellule di medulloblastoma DAOY, causa la diminuzione della proteina DLL1 endogena e questo coincide con l'attivazione del signaling di NOTCH 1 e contemporaneamente con l'inibizione del signaling di NOTCH 2. Inoltre l'espressione ectopica del miR34a risulta essere anche causa di una diminuzione della proliferazione cellulare, dell'incapacità di formare colonie in assenza di adesione al substrato e di un aumento dell'attività apoptotica di tali cellule. Inoltre abbiamo dimostrato che l'induzione della trascrizione del miR34a endogeno si traduce in una iporegolazione di DLL1, fenomeno revertibile mediante l'utilizzo di antisenso specifici per il miR34a. Infine, abbiamo valutato l'espressione sia del miR 34a che di DLL1 in 47 pazienti affetti da MB trovando che i pazienti con bassa espressione del miRNA 34a mostrano una bassa sopravvivenza rispetto a quelli con alta espressione, e che l'espressione di DLL1 risulta essere inversamente correlata a quella del miR34a.

Conclusioni. Abbiamo identificato DLL1 come nuovo target del mir 34a ed un possibile nuovo crosstalk tra p53 e il Notch pathway in medulloblastoma.

Questi studi aprono la strada all'utilizzo del mir34a come nuovo target per terapie mirate in quei tumori dove il segnale di Notch è attivo.

Bibliografia

1. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281-97.
2. Hammond SM. MicroRNAs as oncogenes. *Curr Opin Genet Dev* 2006;16:4-9.
3. Yang ZJ, Ellis T, Markant SL, Read TA, Kessler JD, et al. Medulloblastoma can be initiated by deletion of patched in lineage-restricted progeni-

tors or stem cells. *Cancer Cell* 2008; 14:135-45.

- Gilbertson RJ, Ellison DW. The origins of medulloblastoma subtypes. *Annu Rev Pathol* 2008;3:341-65.

44

L'EPIGENETICA ED IL FATTORE DI TRASCRIZIONE HES1 CONTROLLANO L'ESPRESSIONE DEL MIRNA 199B-5P NEL MEDULLOBLASTOMA

I. Andolfo,¹ E. Cusanelli,¹ G. Petrosino,¹ D. De Martino,¹ G. Cinalli,² R. Miglorati,² V. D'Onofrio,² S. Pfister,³ A. Iolascon,^{1,4} M. Zollo^{1,4,5}

¹Ceinge, *Biotechnologie Avanzate, SCARL, Napoli*; ²Neurochirurgia Pediatrica, *Santobono-Pausilipon, Napoli*; ³Division of Molecular Genetics and Biostatistics and Clinical Cooperation Unit Neuropathology, *German Cancer Research Center, Department of Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany*; ⁴Dipartimento di Biochimica e Biotechnologie mediche, *Università degli Studi di Napoli, "Federico II"*; ⁵Facoltà di Scienze Biotechnologiche, *Università degli Studi di Napoli, "Federico II", Napoli*

I miRNAs sono piccoli RNA a singolo filamento di circa 22 nucleotidi che costituiscono una nuova classe di geni regolatori. Essi svolgono la loro funzione legando la regione 3'UTR dei geni target, degradando l'mRNA target o inibendo la traduzione (Bartel DP, et al., 2004). L'espressione dei miRNA è stata ritrovata alterata in diversi tumori ed è stato scoperto che possono funzionare da oncogeni ed oncosoppressori (Hammond SM, et al., 2006). Il medulloblastoma (MB) è il più comune tumore maligno cerebrale dell'età pediatrica con sede nel cervelletto. L'origine di tale tumore è ancora ambito di discussione con due possibili derivazioni: dalle cellule staminali e dai precursori dei neuroni granulari dello strato granulare esterno del cervelletto oppure dai precursori multipotenti presenti nella zona ventricolare del cervelletto

(Gilbertson RJ, et al., 2008). L'attuale cura del MB prevede la resezione chirurgica del tumore con successivi cicli di radioterapia e chemioterapia. Purtroppo la principale causa di morte resta la disseminazione del tumore ad altri organi ed inoltre, le terapie sono ancora troppo tossiche e causano severi danni neurologici (Yang ZJ, et al., 2008). Nel medulloblastoma è quindi di fondamentale importanza riuscire a trovare nuove cure più efficaci di quelle attuali e con bassa tossicità. In un recente lavoro del nostro gruppo (Garzia et al., 2009) abbiamo studiato il ruolo del miRNA 199b-5p nell'inibizione della progressione del MB. Questo miRNA lega la regione 3'UTR del gene target Hes1, il principale fattore di trascrizione, effettore del pathway di segnalazione di Notch. L'aumento di espressione del miRNA 199b-5p riduce la proliferazione cellulare ed il potenziale clonogenico delle linee cellulari di MB, favorendo il differenziamento neuronale. Un'altra fondamentale funzione di questo miRNA è la riduzione della quota di cellule staminali cancerose definita "side population" e della quota CD133 positiva. La somministrazione del miRNA 199b-5p in modelli xenograft ortotopici murini ha mostrato la riduzione della progressione tumorale, *in vivo*. Infine, abbiamo dimostrato il ruolo del miRNA nella progressione metastatica del tumore nell'uomo, evidenziando la perdita di espressione del miRNA nei casi metastatici rispetto ai non metastatici. L'obiettivo di tale lavoro è capire il meccanismo di regolazione della trascrizione del miRNA 199b-5p. *Materiali e metodi.* Saggi di luciferasi, clonaggi in vettori di espressione, mutagenesi sito-diretta, saggi di immunoprecipitazione della cromatina, saggi di metilazione, immunoistochimiche, analisi di espressione mediante saggi TaqMan. *Risultati.* Il miRNA 199b-5p mappa nella regione intronica 9q34.1 e viene retrotrascritto in direzione antisense rispetto al gene DNMI. Questo ci ha fatto ipotizzare che il miRNA potesse avere un promotore autonomo. La regione a monte del miRNA è stata studiata mediante saggi di luciferasi, individuando il promotore minimo. Nella stessa regione promotore

riale è stato trovato un sito di legame per il gene Hes1 e mediante saggio di immunoprecipitazione della cromatina è stato dimostrato che il target Hes1 lega il promotore del miRNA. Dopo aver evidenziato l'aumento di espressione del miRNA in linee di MB trattate con il farmaco demetilante 5-aza-deoxycytidine, abbiamo ipotizzato che la perdita di espressione del miRNA nei pazienti con prognosi infausta fosse dovuta anche alla metilazione della regione promotrice. È attualmente in corso lo studio della regolazione epigenetica dell'espressione del miRNA 199b-5p nelle linee cellulari e nei tumori di MB.

Conclusioni. Abbiamo identificato il promotore del miRNA 199b-5p e la regolazione a *feedback negativo* attuata dal target Hes1. Inoltre, è in corso lo studio della regolazione epigenetica dell'espressione del miRNA nel Mb. Queste informazioni, insieme a quelle già fornite in precedenza, potranno essere utilizzate in futuro per regolare *in vivo* l'espressione del miRNA 199b-5p e per formulare un nuovo farmaco da somministrare, in combinazione con quelli già utilizzati nella pratica clinica, per inibire la progressione tumorale del MB. Questi studi tracciano le basi per lo studio della funzione del miRNA 199b-5p in altri tumori della fossa posteriore pediatrici e dell'adulto.

Bibliografia

- Bartel DP. MicroRNA: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116: 281-97.
- Hammond SM. MiRNAs as oncogenes. *Curr Opin Genet Dev* 2006;16:4-9.
- Yang ZJ, Ellis T, Markant SL, et al. Medulloblastoma can be initiated by deletion of Patched in lineage-restricted progenitors or stem cells. *Cancer Cell* 2008;14:135-45.
- Gilbertson RJ, Ellison DW. The origins of medulloblastoma subtypes. *Annu Rev Pathol* 2008;3:341-65.
- Garzia L, Andolfo I, Cusanelli E, et al. MiRNA-199b-5p Impairs Cancer Stem Cells through Negative Regulation of HES1 in Medulloblastoma. *PLoS ONE* 2009;4: e4998.

