

The background of the entire page is a close-up, high-speed photograph of water splashing. The water droplets are frozen in time, creating a complex, crystalline pattern of light and shadow. The colors range from deep, dark blues and purples to bright, shimmering whites and yellows, giving the image a dynamic and textured appearance.

open access journal

# pediatric reports

eISSN 2036-7503 | [www.pagepress.org/pr](http://www.pagepress.org/pr)

IV Workshop

## AIEOP... in Lab

Napoli, 14-15 settembre 2015

**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**

Emanuela Fusinato, Managing Editor  
Claudia Castellano, Production Editor  
Cristiana Poggi, Production Editor  
Tiziano Taccini, 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](http://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](mailto:info@pagepress.org)

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

# IV Workshop

## AIEOP... in Lab

### Napoli, 14-15 settembre 2015

Pediatric Reports 2015  
[volume 7]  
[supplement 1]

# IV Workshop

## AIEOP... in Lab

### Napoli, 14-15 settembre 2015

#### COMUNICAZIONI ORALI

Co-001

#### LA MOLECOLA DI COSTIMOLAZIONE 4.1BB MIGLIORA LA SOPRAVVIVENZA E L'ATTIVITÀ ANTITUMORALE DI CELLULE T GENETICAMENTE MODIFICATE CON UN RECETTORE CHIMERICO ANTIGENICO GD2-SPECIFICO (CAR-GD2) VERSO LINEE DI NEUROBLASTOMA

B. De Angelis,<sup>1</sup> I. Caruana,<sup>1</sup> D. Pagliara,<sup>1</sup> D. Orlando,<sup>1</sup> I. Boffa,<sup>1</sup> D. Barbato,<sup>1</sup> M. Guercio,<sup>1</sup> F. Locatelli,<sup>1,2</sup> C. Quintarelli<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma; <sup>2</sup>Università di Pavia, Pavia; <sup>3</sup>Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italia

**Introduzione.** La terapia con cellule CAR-T ha mostrato un'attività promettente con risposte cliniche complete in pazienti con leucemia. Nonostante i dati clinici incoraggianti i fattori che influenzano la persistenza e l'attività anti-tumorale devono essere migliorati. Noi abbiamo clonato un recettore CAR di terza generazione specifico per l'antigene GD2, altamente espresso in neuroblastoma ed osteosarcoma. Tale CAR-GD2 è stato realizzato incorporando alla frazione variabile a singola catena dell'anticorpo 14g2a, i domini di co-stimolazione CD28-OX40 o CD28-4.1BB, uniti alla catena CD3 $\zeta$ .

**Metodi.** Cellule di sangue periferico di donatori sani sono state attivate con OKT3/CD28 e trasdotte con il vettore CAR-GD2.28.OX40z o CAR-GD2.28.4.1BBz. Cellule T di controllo non trasdotte (NT) e CAR-GD2 sono state coltivate con IL2 e caratterizzate per la loro proliferazione, attività citotossica, sia mediante il saggio di rilascio del cromo che saggi di co-cultura con cellule di neuroblastoma, per la produzione specifica interferone- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) dopo stimolazione con cellule di neuroblastoma. In modelli murini NOD-SCID, 106 cellule della linea di neuroblastoma GD2+GFP.FF-luciferasi (IMR32 o SHSY5Y)

è stata infusa i.p. All'attecchimento, i topi sono stati trattati con 107 cellule NT, CAR-GD2.28.OX40z o CAR-GD2.28.4.1BBz. La crescita del tumore è stata valutata mediante sistema IVIS.

**Risultati.** Le cellule T modificate geneticamente con i CAR-GD2 mostrano un'elevata attività citotossica verso target GD2+ derivanti da pazienti con neuroblastoma, mentre non mostrano reattività verso cellule GD2-. In esperimenti di co-cultura con cellule tumorali GD2+, abbiamo evidenziato un'attività anti-tumorale significativamente più elevata per i linfociti CAR-GD2.28.4.1BBz rispetto ai linfociti CAR-GD2.28.OX40z ( $6.20 \pm 15\%$  vs  $29.50 \pm 15\%$  cellule tumorali residue, rispettivamente.  $p < 0.001$ ). Inoltre, abbiamo dimostrato che i linfociti CAR-GD2.28.4.1BBz producono livelli di IFN $\gamma$  più elevato rispetto ai linfociti CAR-GD2.28.OX40z quando stimolati con cellule GD2+ ( $6.2\text{ng/ml}$  vs  $12.6\text{ng/ml}$ , rispettivamente  $p < 0.001$ ). Esperimenti preliminari *in vivo* hanno confermato un migliore controllo del tumore nei topi trattati con linfociti CAR-GD2.28.4.1BBz.

**Discussione.** I dati sperimentali raccolti mostrano che l'incorporazione di 4.1BB rispetto alla molecola di costimolazione OX40 nel recettore CAR.GD2 di terza generazione sia la capacità proliferativa che antitumorale delle cellule T geneticamente modificate.

Co-002

#### L'INIBIZIONE DEI FATTORI DI TRASCRIZIONE INDUCIBILI DALL'IPPOSSIA IN COMBINAZIONE CON IL TRATTAMENTO CON ACIDO RETINOICO INDUCE IL DIFFERENZIAMENTO GLIALE DELLE CELLULE DI NEUROBLASTOMA

F. Cimmino,<sup>1,2</sup> L. Pezone,<sup>2,3</sup> M. Avitabile,<sup>1,2</sup> G. Acierno,<sup>1,2</sup> I. Andolfo,<sup>1,2</sup> A. Iolascon,<sup>1,2</sup> M. Capasso<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli; <sup>2</sup>CEIN-GE Biotecnologie Avanzate, Napoli; <sup>3</sup>Scuola di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Verona, Verona, Italia

**Scopo.** Il Neuroblastoma (NBL) è un tumore eterogeneo caratterizzato da varie manifestazioni cliniche. Un avanzato stato di differenziamento cellulare correla con uno stadio favorevole e una "buona" prognosi. L'espressione dei fattori di trascrizione inducibili dall'ipossia HIF1- (gene HIF1A) e HIF2- (gene EPAS1) e/o l'attivazione dei pathway ad essi associati, promuove nelle cellule di NBL un fenotipo indifferenziato. Il nostro scopo è stato verificare se l'inibizione dei fattori HIF possa migliorare la risposta alla terapia differenziante nel NBL.

**Metodi.** Per i dati *in vivo*, abbiamo verificato l'espressione dei geni HIF1A ed EPAS1 in due coorti indipendenti di campioni di NBL. Per i dati *in vitro*, abbiamo silenziato l'espressione genica dei fattori HIF in seguito ad infezione lentivirale di linee cellulari di NBL e di seguito abbiamo trattato le stesse cellule con acido retinoico (RA).

**Risultati.** Dal punto di vista clinico, abbiamo osservato che alti livelli d'espressione di HIF1A ed EPAS1 sono associati con una ridotta sopravvivenza nel NBL e che nei tumori con ridotta espressione di HIF1A ed EPAS1 si ha una maggiore attivazione dei pathway coinvolti nel differenziamento neuronale. *In vitro* abbiamo verificato che linee cellulari di NBL trattate con RA in combinazione con il silenziamento di HIF1A ed EPAS1 acquisiscono un fenotipo gliale e l'incremento di espressione di marcatori di differenziamento gliale. Inoltre, il silenziamento di HIF1A o EPAS1 può indurre le cellule in senescenza, indipendentemente dal trattamento con RA.

**Conclusioni.** Nell'insieme questi dati suggeriscono che l'inibizione dei fattori HIF in combinazione con il trattamento con RA promuove il differenziamento delle linee cellulari di NBL in un fenotipo più benigno e le induce in senescenza. Questi risultati aprono la strada a nuove cure per il trattamento della malattia minima residua nel NBL. In particolare l'introduzione di inibitori di HIF nei protocolli terapeutici potrebbe offrire vantaggi per la prevenzione delle recidive che ad oggi rappresentano una barriera da sormontare nei pazienti di NBL ad alto rischio.

Co-003

### RUOLO DEI LINFOCITI T INFILTRANTI IL TUMORE COME POTENZIALI MARCATORI PROGNOSTICI E TERAPEUTICI IN PAZIENTI AFFETTI DA FORME AGGRESSIVE DI NEUROBLASTOMA

O. Melaiu,<sup>1</sup> M. Mina,<sup>2</sup> M. Pezzullo,<sup>1</sup>  
A. Citti,<sup>1</sup> C. Furlanello,<sup>2</sup> A. Castellano,<sup>1</sup>  
R. Boldrini,<sup>1</sup> F. Locatelli,<sup>1</sup> D. Fruci<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Ematologia ed Oncologia Pediatrica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma; <sup>2</sup>Fondazione Bruno Kessler, Povo, TN, Italia

**Scopo.** Recentemente, abbiamo dimostrato che cellule T infiltranti il neuroblastoma (NB) hanno un valore prognostico maggiore ed indipendente da quello degli attuali marcatori, quali amplificazione di MYCN ed età alla diagnosi. Alti livelli di cellule T CD3+, CD4+ e CD8+, valutati mediante analisi quantitativa di colorazioni di immunohistochimica (IHC), sono stati associati ad una migliore sopravvivenza nei pazienti affetti dalle forme più aggressive di NB. In questo lavoro abbiamo valutato i) l'espressione di PD-1 e PD-L1, rispettivamente recettore inibitorio e ligando espressi dalle cellule T e dai tumori, la cui interazione è nota inibire la proliferazione delle cellule CD4+ promuovendone la differenziazione in cellule T regolatorie FOXP3+, ii) l'associazione tra le signature immunologiche CD3, CD4, CD8, CD25, FoxP3, PD-1 e PD-L1 con l'andamento clinico del NB, nonché iii) la loro applicabilità nella definizione di modelli predittivi evoluti.

**Pazienti e Metodi.** L'espressione di PD-1 e PD-L1 è stata analizzata in una coorte di 84 campioni di NB mediante colorazioni di IHC, già caratterizzati per la presenza di cellule T CD3+, CD4+, CD8+, CD25+ e FoxP3+ (Mina *et al.* 2015). L'associazione tra tutti marcatori e l'andamento clinico, unitamente al loro potere predittivo, è stata valutata attraverso tecniche di analisi di sopravvivenza basate su stimatori di Kaplan-Meier (log-rank test) e sulla determinazione degli hazard ratio tramite Cox regression. L'analisi è stata ripetuta anche su due coorti indipendenti di pazienti (n=709 and n=88 rispettivamente), profilati per espressione genica con tecniche di microarray depositati nelle banche dati in GEO ed Array Express, in modo da testare riproducibilità e robustezza delle predizioni.

**Risultati.** I risultati confermano l'associazione tra i marcatori considerati e l'andamento clinico nel NB, rilevabile anche a livello di espressione genica. In particolare, alti livelli di espressione genica di CD3 e CD8 sono significativamente associati a una prognosi positiva. La significativa

variabilità di PD-1 e PD-L1 suggerisce l'esistenza di meccanismi di regolazione del sistema immunitario nel microambiente tumorale, con potenziale ruolo nella resistenza alla sorveglianza immunologica.

**Conclusioni.** Oltre a confermarne il potere predittivo, questo studio apre la strada allo sviluppo di tecniche di screening e valutazione della progressione del NB che integrino le signature immunologiche proposte.

Co-004

### RICERCA DI MUTAZIONI ASSOCIATE ALLA RAPIDA PROGRESSIONE DEL NEUROBLASTOMA AD ALTO RISCHIO MEDIANTE SEQUENZIAMENTO DELL'INTERO ESOMA

M.R. Esposito,<sup>1</sup> M. Pantile,<sup>1</sup> C. Zanon,<sup>1</sup>  
K. Mazzocco,<sup>2</sup> M. Capasso,<sup>3</sup> L. Longo,<sup>4</sup>  
G.P. Tonini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Ricerca Pediatrica (IRP), Fondazione Città della Speranza, Laboratorio Neuroblastoma, Padova; <sup>2</sup>Dipartimento di Patologia, Istituto Giannina Gaslini, Genova; <sup>3</sup>Università di Napoli Federico II, Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche - CEINGE Biotecnologie Avanzate, Napoli; <sup>4</sup>UOC Bioterapie IRCSS AOU San Martino-IST, Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genova, Italia

**Scopo del lavoro.** L'obiettivo di questo studio è identificare mutazioni nella regione codificante del genoma associate alla maggiore aggressività del neuroblastoma (NB) e alla rapida progressione della malattia in pazienti ad alto rischio con NB stadio 4, divisi in: corto sopravvivenza (SS) – pazienti che non rispondono alla terapia, con una rapida progressione della malattia e con esito fatale entro i 60 mesi dalla diagnosi e lungo sopravvivenza (LS) – pazienti con decorso della malattia più lento e con una sopravvivenza oltre i 60 mesi.

**Pazienti e Metodi.** Il gDNA è stato estratto e purificato da 25 biopsie tumorali e da sangue periferico. I campioni tumorali inseriti nello studio sono neuroblastomi con bassa componente schwannica e con almeno l'80% di neuroblasti maligni. I dati di sequenziamento sono stati analizzati con Samtools mpileup e le varianti annotate con Annovar. I dati di sequenziamento dell'esoma sono stati validati mediante Sanger e "deep sequencing" mediante Illumina. Le mutazioni verranno validate su una coorte indipendente di pazienti HR-NB 4 stadio.

**Risultati.** I dati preliminari hanno mostrato un "clustering" di mutazioni ricorrenti

differenti nei due gruppi di pazienti (SS e LS). Con i dati di sequenziamento è stata eseguita l'analisi di perdita di eterozigotità (LOH) e delle alterazioni cromosomiche strutturali (CNAs). Quest'ultima ha mostrato che entrambi i gruppi presentano una marcata aneuploidia e ha confermato la presenza di CNAs quali: perdita del cromosoma 3p e 11q, guadagno del 2p e 17q. Infine, un'analisi con i software EGAN e Cytoscape ha mostrato che geni mutati nel gruppo degli SS quali CDC42, IL6ST, IQGAP2 e AP2B1 sono correlati con la via metabolica di EGFR, nota per essere coinvolta nella formazione dell'asse dorsoventrale durante lo sviluppo della cresta neurale nell'embriogenesi. Inoltre, altri geni mutati negli SS quali: IQCE, FLG, KMT2A, CDC27, PBX2 e MYH13 sono stati associati alla progressione del ciclo cellulare, all'adesione focale e all'interazione cellula-cellula.

**Conclusioni.** Questo è il primo studio italiano di sequenziamento dell'intero esoma di una ampia casistica di pazienti con NB ad alto rischio. Questo lavoro ha evidenziato una lista di geni mutati solo nei casi SS, suggerendo che questi geni sono potenziali candidati quali marker associati ad una rapida progressione della malattia e a una maggiore aggressività di questo tumore pediatrico. Finanziato dalla Fondazione Italiana per la Lotta al Neuroblastoma.

Co-005

### L'ATTIVAZIONE DI AUTOFAGIA IN CELLULE DI NEUROBLASTOMA DIMINUISCE L'EFFICIENZA DI RXDX-101, UN NUOVO INIBITORE DI ALK

S. Aveic,<sup>1</sup> G. Li,<sup>2</sup> G.P. Tonini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Ricerca Pediatrica (IRP), Fondazione Città della Speranza, Italia; <sup>2</sup>Ignyta Inc., San Diego, CA, USA

**Background.** Il Neuroblastoma (NB) è un tumore pediatrico eterogeneo sia dal punto di vista clinico che biologico. La sopravvivenza dei pazienti in stadio 4 non raggiunge il 40% a 5 anni dalla diagnosi. L'espressione anomala del gene ALK è correlata con una prognosi infausta del paziente ed è osservata nel 10% dei tumori. In questi ultimi anni è stato valutato l'uso terapeutico di inibitori farmacologici di ALK.

**Scopo.** Abbiamo eseguito uno studio pre-clinico con RXDX-101, un nuovo inibitore di ALK, per verificare la sua capacità di inibire la crescita di cellule di NB.

**Metodi.** Sono state trattate con RXDX-101 le linee cellulari: NB1 (ALK-amp); NB3 (ALK-R1275Q); SH-SY5Y (ALK-F1174L) e IMR32 (ALK-wt). La crescita cellulare è stata studiata con MTT, la proliferazione

con profilo del ciclo cellulare, e la morte cellulare tramite Tunel. Inoltre, è stata studiata la motilità cellulare e l'espressione proteica di STAT3 ed ERK1/2, componenti della pathway di ALK.

**Risultati.** Abbiamo osservato una diminuzione dell'espressione di proteine STAT3 ed ERK1/2 e della proliferazione cellulare. È stato osservato un accumulo delle cellule in G1, mentre la capacità clonogena delle cellule era ridotta significativamente. Abbiamo osservato l'attivazione di apoptosi in presenza dell'inibitore; ed inoltre, l'inibizione di ALK ha provocato la diminuzione della motilità cellulare. Poiché RXDX-101 non era in grado di indurre completa morte delle cellule SH-SY5Y (ALK-F1174L), abbiamo indagato se il trattamento attivasse l'autofagia. Il ruolo protettivo dell'autofagia contro la morte cellulare è stato confermato osservando la diminuzione di autofagia dopo il trattamento combinato di RXDX-101 con Cloroquina, un inibitore dell'autofagia, che ha indotto un aumento di morte cellulare.

**Conclusioni.** Il nostro studio dimostra la capacità di RXDX-101 di influire la crescita delle cellule di NB. L'inibizione di ALK ha impedito l'attivazione delle principali vie proliferative di ERK e STAT3, aumentando la morte cellulare e riducendo la loro capacità migratoria. È stata, inoltre, osservata l'autofagia come un meccanismo protettivo delle cellule con ALK-F1174L all'azione del farmaco. I nostri risultati indicano che bloccando l'autofagia aumenta l'efficienza di RXDX-101 di inibire la proliferazione delle cellule di NB.

Finanziato dalla Fondazione Italiana per la Lotta al Neuroblastoma.

#### Co-006

### APPLICAZIONE DEL SEQUENZIAMENTO DI NUOVA GENERAZIONE ALLO SCREENING ED IDENTIFICAZIONE DI NUOVI GENI MALATTIA NELLE IMMUNODEFICIENZE PRIMITIVE

I. Brigida,<sup>1</sup> D. Lazarevic,<sup>4</sup> D. Cittaro,<sup>4</sup> S. Scaramuzza,<sup>1</sup> L. Leonardelli,<sup>1</sup> S. Sartori,<sup>4</sup> S. Giannelli,<sup>1</sup> F. Dionisio,<sup>1</sup> S. Martino,<sup>5</sup> M.P. Cicalese,<sup>3</sup> F. Ferrua,<sup>3</sup> D. Rambaldi,<sup>4</sup> M. Chiriaco,<sup>6</sup> G. Di Matteo,<sup>6</sup> S. Di Cesare,<sup>6</sup> P. Ariganello,<sup>7</sup> A. Villa,<sup>1</sup> A. Finocchi,<sup>7</sup> C. Cancrini,<sup>7</sup> M. Bianchi,<sup>4</sup> A. Aiuti<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>San Raffaele Telethon Institute for gene therapy, HSR-TIGET, Milan; <sup>2</sup>Pediatric Immunohematology, San Raffaele Scientific Institute, Milan; <sup>3</sup>Vita-Salute San Raffaele University, Milan; <sup>4</sup>Center for Translational Genomics and Bioinformatics, San Raffaele Scientific Institute, Milan; <sup>5</sup>Department of Public Health and Pediatric Sciences,

Medical School, University of Turin, Turin; <sup>6</sup>Department of Systems Medicine, Tor Vergata University, Rome; <sup>7</sup>Department of Pediatrics, University of Rome "Tor Vergata," Children's Hospital Bambino Gesù, Rome, Italy

**Scopo.** Gli studi di sequenziamento di nuova generazione (NGS) aprono grandi prospettive sulla caratterizzazione dei pazienti con Immunodeficienze Primitive per i quali una correlazione tra fenotipo clinico e genetico non è stata ancora trovata.

**Pazienti e Metodi.** Abbiamo applicato un livello piramidale di analisi NGS a pazienti affetti da immunodeficienza combinata (CID) a diagnosi genetica ignota. I segni clinici di malattia in genere si sviluppano oltre il primo anno di vita, comprendono difetti dell'immunità, aumentata suscettibilità alle infezioni e/o autoimmunità. In un gruppo di pazienti abbiamo analizzato librerie di esoni mediante sequenziamento target di 600 geni che comprendono sia geni noti per le PID che geni candidati. In 8 pazienti (7+1 controllo) è stato eseguito il sequenziamento completo dell'esoma (WES). Un paziente risultato normale per Sanger e WES in un gene candidato è stato analizzato mediante sequenziamento completo del genoma (WGS).

**Risultati.** Abbiamo scelto casi di CID che condividono linfopenia, infezioni ricorrenti e varie manifestazioni cliniche. Utilizzando un pannello di 600 geni abbiamo identificato un caso di eterozigote composto nel gene RAG1 e due pazienti con varianti eterozigoti nel gene codificante per il recettore dell'IL7 (IL7R). Con il WES ad alto coverage abbiamo identificato una mutazione "gain of function" nel gene PI3Kcd, confermata mediante studi molecolari e funzionali. Una delezione di 77Kb è stata identificata nel gene MAGT1 in un secondo paziente, e confermata per variazione del numero di copie e ulteriore WGS. Le analisi di WES sono in corso in altri 4 pazienti. Il WGS è stato applicato in un paziente con fenotipo clinico della sindrome di Wiskott-Aldrich per il quale le classiche analisi molecolari e il WES hanno fallito. Il nostro studio ha identificato un'inversione di 7Kb che comprende il promotore e i primi 7 esoni e ulteriori indagini hanno confermato l'assenza della proteina WASP.

**Conclusioni.** Questi studi mostrano il grande potenziale della tecnologia NGS nell'identificazione delle basi molecolari delle PID e garantiscono un ulteriore sviluppo di una più ampia applicazione clinica di queste piattaforme. Comprendere la base genetica della malattia in base al fenotipo clinico e immunologico contribuirà a definire la storia naturale e il miglior trattamento curativo.

#### Co-007

### SEQUENZIAMENTO TARGET DI NUOVA GENERAZIONE PER LA DIAGNOSI DIFFERENZIALE DI PAZIENTI AFFETTI DA ANEMIE EMOLITICHE EREDITARIE

R. Russo,<sup>1,2</sup> C. Langella,<sup>1,2</sup> A.V. Lasorsa,<sup>1,2</sup> I. Andolfo,<sup>1,2</sup> A. Gambale,<sup>1,2</sup> G. De Rosa,<sup>1,2</sup> M. Capasso,<sup>1,2</sup> A. Iolascon<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli; <sup>2</sup>CEIN-GE Biotecnologie Avanzate, Napoli, Italia

**Scopo.** Il sequenziamento di nuova generazione (next, NGS) svolge un ruolo importante nell'identificazione di genimattoria e nella pratica clinica. L'applicazione principale nella diagnostica prevede l'utilizzo di NGS mirato (targeted-NGS, t-NGS), in cui una frazione selezionata di geni viene sequenziata. Scopo dello studio è sviluppare un metodo diagnostico, basato sul t-NGS, rapido, affidabile e conveniente per la diagnosi differenziale di anemie emolitiche ereditarie (AEE), che comprendono: (1) anemie iporigenerative (AI), (2) anemie emolitiche da difetto di membrana del globulo rosso (AEDM).

**Pazienti e Metodi.** Al fine di valutare l'affidabilità del metodo diagnostico abbiamo effettuato uno studio pilota, allestendo un pannello t-NGS di 10 geni causativi di AEE: come sequenze target sono state selezionate regioni codificanti, UTR, regolatorie e 100 bp fiancheggiati i siti di splicing (211 regioni target, 87383 bp). L'arricchimento del target è stato eseguito su 15 pazienti (6 a genotipo noto, 6 ignoto; 1 famiglia) mediante HaloPlex Target Enrichment System (Agilent Technologies). Il sequenziamento è stato effettuato su piattaforma Illumina HiSeq 2000. L'analisi bioinformatica è stata eseguita utilizzando il software SureCall (Agilent Technologies), la selezione delle varianti mediante una "pipeline" personalizzata. Le varianti selezionate e il pattern di segregazione sono stati validati mediante sequenziamento Sanger.

**Risultati.** Per ciascun paziente, sono state identificate 55-105 varianti totali nei geni target, di cui 48-92 localizzate in regioni introniche/regolatorie e 5-13 in quelle codificanti. La diagnosi molecolare conclusiva è stata ottenuta in 4/4 (100%) pazienti AI e in 6/8 (75%) AEDM. Varianti modificatrici del fenotipo sono state identificate in diversi pazienti.

**Conclusioni.** Le nostre analisi hanno dimostrato che il t-NGS rappresenta uno strumento diagnostico affidabile per i pazienti AEE. Infatti, abbiamo confermato la diagnosi clinica e molecolare in 6 pazienti a genotipo noto. Il nostro studio ha inoltre evidenziato il contributo poli-

genico nella definizione del fenotipo in patologie mendeliane. A tale scopo, abbiamo recentemente allestito un pannello più grande comprendente 34 geni e uno di geni modificatori del fenotipo. Oltre ad ottenere una diagnosi definitiva, conoscere le basi genetiche dei pazienti AEE può essere utile anche per orientare meglio il loro trattamento.

#### Co-008

### FANCA NEL MITOCONDRIO: QUALCHE RUOLO DIRETTO?

R. Bottega,<sup>1</sup> S. Ravera,<sup>2</sup> D. De Rocco,<sup>1</sup>  
R. Bortul,<sup>3</sup> M. Faleschini,<sup>1</sup> E. Nicchia,<sup>1</sup>  
E. Cappelli,<sup>4</sup> C. Dufour,<sup>4</sup> M. Zweyer,<sup>3</sup>  
A. Savoia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Università di Trieste, IRCCS Burlo Garofolo, Trieste; <sup>2</sup>Dipartimento di Farmacia, Università di Genova, Genova; <sup>3</sup>Università di Trieste, Trieste; <sup>4</sup>IRCCS Giannina Gaslini, Genova, Italia

**Scopo.** Anemia di Fanconi (FA) è una malattia geneticamente eterogenea caratterizzata da instabilità cromosomica, anomalie congenite, pancitopenia, e predisposizione al cancro. Nonostante i geni FA siano noti per la loro funzione nel riparo del DNA mediante ricombinazione omologa, i loro prodotti genici sono presenti anche nel citoplasma, suggerendo altre funzioni. Analizzando la presenza di FANCA in linee cellulari linfoblastoidi con mutazioni in FANCA, abbiamo scoperto che in alcune cellule la proteina mutante era espressa. Questo aspetto è stato approfondito al fine di individuare qualsiasi attività residua di queste forme e di esplorare funzioni alternative di FANCA.

**Metodi.** Linee cellulari linfoblastoidi con mutazioni nel gene FANCA (n=30) sono state analizzate mediante Western blot per determinare il livello di espressione di FANCA. Alcune di queste sono state ulteriormente analizzate tramite microscopia elettronica e saggi di immunogold. La funzionalità mitocondriale è stata determinata tramite procedure standard. **Risultati.** In cellule con mutazioni deleterie (nonsense e frameshift) su entrambi gli alleli FANCA non era espressa (neFANCA); tuttavia è stata rilevata la proteina FANCA mutata (eFANCA) allo stesso livello dei controlli o al 50% quando entrambi o solo uno degli alleli, rispettivamente, erano colpiti da mutazioni missense o piccole insdel in frame. Nelle cellule eFANCA, FANCD2 non è ubiquitinata e queste forme mutate risultano espresse solo nel citoplasma, dove la microscopia elettronica non ha rilevato aggregati come invece ci si aspetterebbe nel caso di proteine mutate non degradate. Inoltre abbiamo osservato che i mitocondri sono ridotti nel numero e presen-

tano creste disorganizzate; siamo andati quindi a misurare il trasferimento degli elettroni e il rapporto ATP/AMP rivelando una differenza significativa tra le cellule eFANCA e neFANCA sia dal punto di vista morfologico che funzionale. Il metabolismo energetico e la respirazione sono stati almeno parzialmente ripristinati trasferendo le cellule neFANCA con la forma wt di FANCA o con eFANCA sostenendo un ruolo potenziale di questa proteina a livello mitocondriale. La presenza di FANCA nel mitocondrio è stata confermata sia mediante western blot su frazioni cellulari che con saggi di immunogold.

**Conclusioni.** La scoperta che FANCA, come FANCG, si localizza nel mitocondrio apre delle ipotesi che potrebbero spiegare l'aumentato stato di ossidazione e apoptosi osservato in FA.

#### Co-009

### CARATTERISTICHE BIOLOGICHE E FUNZIONALI DI CELLULE STROMALI MESENCHIMALI ISOLATE DA MIDOLLO OSSEO DI PAZIENTI AFFETTI DA $\beta$ -TALASSEMIA MAJOR

D.M. Ingo,<sup>1</sup> M. Mantelli,<sup>2</sup> E. Lenta,<sup>2</sup>  
M. Zecca,<sup>2</sup> R. Maccario,<sup>2</sup> M.E. Bernardo,<sup>1</sup>  
M.A. Avanzini<sup>2</sup>

<sup>1</sup>San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (TIGET), Pediatric Immunohematology and Bone Marrow Transplantation Unit, San Raffaele Scientific Institute, Milan; <sup>2</sup>Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia

**Scopo.** Le cellule stromali mesenchimali (MSCs) sono cellule multipotenti che costituiscono nel midollo osseo il microambiente fondamentale per la maturazione delle cellule staminali emopoietiche. La  $\beta$  talassemia è un'emoglobinopatia caratterizzata da alterata sintesi delle catene  $\beta$ -globiniche, con conseguente accumulo di ferro a livello plasmatico e d'organo ed emopoiesi extramidollare a livello epatico e splenico. L'obiettivo del nostro lavoro consiste nel valutare le caratteristiche fenotipiche e funzionali di MSCs ottenute da pazienti pediatrici con  $\beta$ -talassemia major ( $\beta$ -thal-MSCs), allo scopo di individuare eventuali alterazioni che potrebbero contribuire alla patogenesi della malattia.

**Pazienti e Metodi.** Sono state isolate ed espanse *ex vivo* MSCs da midollo osseo (MO) di 4 pazienti pediatrici (mediana età 15, range 6-18). Le MSCs sono caratterizzate per capacità clonogenica (CFU-F) e proliferativa (cumulative Population Doubling cPD), morfologia, immunofenotipo (citofluorimetria a flusso), potenzialità di differenziare *in vitro* in adipociti e osteoblasti, capacità immunomodulanti

(inibizione della proliferazione linfocitaria indotta da PHA), capacità di supportare *in vitro* l'emopoiesi e senescenza. I risultati sono confrontati con quelli ottenuti da MSCs di 6 donatori sani (HD-MSCs) paragonabili per età e sesso.

**Risultati.** Le  $\beta$ -thal-MSCs mostrano tipica morfologia affusolata, risultano simili alle HD-MSC per capacità proliferativa (media cPD=7 e 7.45 per  $\beta$ -thal-MSC e HD-MSC, rispettivamente) e immunofenotipo, mentre mostrano un numero di CFU-F inferiore rispetto alle HD-MSCs (media $\pm$ DS: 0.7 $\pm$ 0.3/106; 5 $\pm$ 2/106 cellule piastrate, rispettivamente). Le  $\beta$ -thal-MSCs entrano in senescenza ad un passaggio medio di 11.5, mentre le HD-MSC ad un passaggio medio di 15.7. La valutazione della capacità *in vitro* di differenziare, di immunomodulare e di supportare l'emopoiesi è in corso.

**Conclusioni.** I dati preliminari ottenuti nel presente lavoro, mostrano una ridotta capacità clonogenica delle MSC da pazienti con  $\beta$ -talassemia; sono necessari ulteriori studi e la valutazione di un maggior numero di pazienti per comprendere il significato biologico di questo dato.

#### Co-010

### STUDI GENOTIPO-FENOTIPO IN 70 PAZIENTI IRIDA

L. De Falco, M. Bruno, L. Silvestri,  
C. Kannengiesser, E. Moran, C. Oudin,  
M. Rausa, J. Aranda, B. Argiles,  
I. Yenicesu, M. Falcon-Rodriguez,  
E.Yilmaz-Keskin, U. Kocak, C. Beaumont,  
C. Camaschella, B. Grandchamp,  
M. Sanchez, A. Iolascon

CEINGE, Biotecnologie Avanzate, Napoli, Italia

L'anemia sideropenica refrattaria al trattamento con ferro o IRIDA (codice OMIM:206200; ORPHA209981) è una patologia autosomica recessiva caratterizzata da un'anemia microcitica ipocromica, bassi livelli di ferro sierico, bassa saturazione della transferrina e livelli di ferritina normali o alti. L'epcidina sierica è inappropriatamente normale o alta per i bassi livelli di ferro. Il gene causativo dell'IRIDA è TMPRSS6, che codifica per una serina proteasi, regolatore negativo della sintesi di epcidina. Ad oggi sono state riportate 41 diverse mutazioni nel gene TMPRSS6. Abbiamo effettuato un'analisi di correlazione genotipo-fenotipo in 70 pazienti pediatrici IRIDA (39 dalla letteratura e 31 nuovi pazienti) divisi in due gruppi: gruppo A (n=44), pazienti con due mutazioni missenso e con una mutazione missenso in combinazione con un altro tipo di mutazione (nonsense, frameshift o mutazioni di splicing);

gruppo B (n=26), pazienti con due mutazioni nonsense, due mutazioni frameshift, due mutazioni di splicing, una mutazione nonsense e una mutazione frameshift e un frameshift e una mutazione splicing. In primo luogo abbiamo valutato l'età alla diagnosi che tende ad essere più bassa nel gruppo A (4,20±3,85) rispetto al gruppo B (3,09±4,12) (P=0,29). I livelli di emoglobina sono più bassi nel gruppo B (7,78±1,24 g/dL) che nel gruppo A (8,68±1,34 g/dL) (P=0,01). Anche l'MCV è significativamente più basso nel gruppo B (54,46±5,21fl) rispetto al gruppo A (59,46±6,17 fl) (P=0,0018). I livelli di saturazione della transferrina, di sideremia e di ferritina sierica sono ridotti nel gruppo B. Per quanto riguarda i livelli di epcidina, i pazienti con mutazioni più gravi (gruppo B) presentano livelli di epcidina sierica più alti (n=15 185,60±131,97) rispetto ai pazienti del gruppo A (n=18 92,04±51,11) (P=0,05). Abbiamo infine cercato di correlare il diverso genotipo dei due gruppi (A e B) per quanto riguarda la risposta al trattamento con ferro orale. I pazienti del gruppo A hanno una migliore risposta alla terapia con ferro orale rispetto a quelli del gruppo B (32,3% contro il 20%) (P=0,36). Questi dati indicano una migliore risposta al ferro orale nei pazienti con una mutazione meno severa. In conclusione, abbiamo ipotizzato che il genotipo IRIDA non solo determina la gravità dell'anemia, compresi i livelli di epcidina, ma può aiutare nel predire la risposta al trattamento con ferro orale.

#### Co-011

### L'ACIDO ZOLEDRONICO POTENZIA L'ATTIVITA' DEI LINFOCITI T NEL TRAPIANTO APOLOIDENTICO DI CELLULE STAMINALI EMPOIETICHE

G. Barbarito,<sup>1</sup> I. Airoidi,<sup>1</sup> A. Bertaina,<sup>2</sup> A. Petretto,<sup>1</sup> B. Lucarelli,<sup>2</sup> A. Zorzoli,<sup>1</sup> P. Merli,<sup>2</sup> G. Tripodi,<sup>1</sup> C. Lavarello,<sup>1</sup> L.P. Brescia,<sup>2</sup> V. Bertaina,<sup>2</sup> E. Inglese,<sup>1</sup> F. Antonini,<sup>1</sup> G.M. Milano,<sup>2</sup> F. Locatelli<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Istituto Giannina Gaslini, Genova;  
<sup>2</sup>Ospedale Bambino Gesù, Roma, Italia

**Scopo.** Abbiamo sviluppato un nuovo metodo di trapianto HLA aploidentico di cellule staminali emopoietiche, basato sulla deplezione di linfociti T $\alpha\beta$  e linfociti B CD19. Questo tipo di graft è caratterizzato da cellule staminali CD34 e cellule effettrici mature quali NK e linfociti T $\gamma\delta$ . Il nostro gruppo ha recentemente dimostrato che i linfociti T $\gamma\delta$  prelevati da pazienti che ricevono questo tipo di trapianto, possono essere espansi *ex vivo* con acido zoledronico (ZOL). Il trattamento con ZOL induce la differenziazione di una popolazione di linfo-

citi T $\gamma\delta$  altamente citotossica in grado di lisare leucemie primarie acute sia linfoidi che mieloidi.

**Pazienti e Metodi.** Lo studio si basa su 33 pazienti affetti da leucemia acuta e trapiantati con cellule staminali ematopoietiche mobilizzate dal midollo di donatori parzialmente compatibili (familiari) e depleto di linfociti  $\alpha\beta$  e CD19. Dopo un mese dal trapianto i pazienti vengono trattati con ZOL, i trattamenti vengono ripetuti ogni 28 giorni per un minimo di due trattamenti. I linfociti T $\gamma\delta$  sono stati analizzati in citofluorimetria, spettrometria di massa e degranulazione.

**Risultati.** Da analisi di proteomica risulta che, a partire dalla prima infusione di ZOL, vi è una up-regolazione di proteine coinvolte nella risposta immune e nell'attivazione cellulare, nonché una down-regolazione di proteine coinvolte in processi proliferativi. Tali modulazioni sono ulteriormente accentuate dopo più trattamenti con ZOL. I risultati ottenuti da studi di proteomica sono confermati da studi fenotipici e funzionali che evidenziano un' induzione della differenziazione e della citotossicità delle cellule  $\gamma\delta$  in seguito a trattamento con ZOL. Infine, gli studi di proteomica hanno evidenziato la presenza di una "firma proteica" propria di ogni trattamento con ZOL.

**Conclusioni.** Lo studio dei linfociti T $\gamma\delta$  in pazienti trapiantati evidenzia la capacità dello ZOL di indurre sia il differenziamento che il potenziamento della citotossicità, ma non la proliferazione, di questa popolazione cellulare. L'insieme dei nostri risultati permette di poter affermare che l'utilizzo di ZOL è fortemente raccomandato nelle fasi post trapianto, sia in pazienti affetti da leucemie acute che da altre patologie ematologiche (maligne e non).

#### Co-012

### LA SOVRA-ESPRESSIONE DEL GENE CRLF2 È UN MARKER PROGNOSTICO NEGATIVO NEI BAMBINI CON LEUCEMIA LINFOLASTICA ACUTA A CELLULE T AD ALTO RISCHIO

C. Palmi,<sup>1</sup> A. M. Savino,<sup>1</sup> D. Silvestri,<sup>2,3</sup> I. Bronzini,<sup>4</sup> G. Cario,<sup>5</sup> M. Paganin,<sup>4</sup> B. Buldini,<sup>4</sup> M. Galbiati,<sup>1</sup> M.U. Muckenthaler,<sup>6</sup> E. Barisoni,<sup>7</sup> F. Casale,<sup>8</sup> F. Locatelli,<sup>9</sup> L. Lo Nigro,<sup>10</sup> C. Micalizzi,<sup>11</sup> R. Parasole,<sup>12</sup> A. Pession,<sup>13</sup> M.C. Putti,<sup>4</sup> N. Santoro,<sup>14</sup> A.M. Testi,<sup>15</sup> O. Ziino,<sup>16</sup> A.E. Kulozik,<sup>6</sup> M. Zimmermann,<sup>17</sup> M. Schrappe,<sup>5</sup> C. Bugarin,<sup>1</sup> G. Gaipa,<sup>1</sup> G. Basso,<sup>4</sup> A. Biondi,<sup>3</sup> M.G. Valsecchi,<sup>2</sup> M. Stanulla,<sup>17</sup> V. Conter,<sup>3</sup> G. te Kronnie,<sup>4</sup> G. Cazzaniga,<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Ricerca M. Tettamanti, Clinica

*Pediatria, Università di Milano Bicocca, Fondazione MBBM/Ospedale San Gerardo, Monza, MB Italia;* <sup>2</sup>Center of Biostatistics for Clinical Epidemiology, Department of Health Sciences, University of Milano-Bicocca, Milan, Italy; <sup>3</sup>Clinica Pediatrica, Università di Milano Bicocca, Fondazione MBBM/Ospedale San Gerardo, Monza, Italia; <sup>4</sup>Laboratory of Onco-Hematology, Department SDB, Università di Padova, Italy; <sup>5</sup>Department of Pediatrics, University Hospital Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Kiel, Germany; <sup>6</sup>Department of Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, University of Heidelberg and EMBL/Medical Faculty Molecular Medicine Partnership Unit, Heidelberg, Germany; <sup>7</sup>Pediatric Onco-Hematology, Stem Cell Transplantation and Cellular Therapy Division, Regina Margherita Children's Hospital, Turin, Italy; <sup>8</sup>Pediatric Oncology Service, Pediatric Department of 2<sup>nd</sup> University of Naples, Naples, Italy; <sup>9</sup>Department of Pediatric Hematology/Oncology, IRCCS Ospedale Bambino Gesù, Rome, University of Pavia, Italy; <sup>10</sup>Center of Pediatric Hematology Oncology, Catania, Italy; <sup>11</sup>Hematology/Oncology Unit, G. Gaslini Children's Hospital, Genoa, Italy; <sup>12</sup>Department of Pediatric Hematology/Oncology, Ospedale Pausilipon, Naples, Italy; <sup>13</sup>Department of Pediatrics, "Lalla Seragnoli" Hematology-Oncology Unit, University of Bologna, Bologna, Italy; <sup>14</sup>Department of Pediatrics, Division of Pediatric Hematology-Oncology, Bari, Italy; <sup>15</sup>Division of Hematology, Department of Biotechnologies and Hematology, "Sapienza" University of Rome, Rome, Italy; <sup>16</sup>Pediatric Hematology and Oncology Unit, A.R.N.A.S. Civico, Di Cristina and Benfratelli Hospital, Palermo, Italy; <sup>17</sup>Department of Paediatric Haematology and Oncology, Hannover Medical School, Hannover, Germany

**Scopo.** Nonostante i progressi nella cura, i bambini affetti da Leucemia Linfoblastica Acuta a cellule T (LLA-T) presentano una prognosi inferiore rispetto ai pazienti con LLA a cellule B (LLA-B). Da qui la necessità di identificare nuovi fattori prognostici per una migliore stratificazione terapeutica dei pazienti e una migliore offerta farmacologica. Nella LLA-B è stato di recente scoperto un marcatore di prognosi negativa: la sovra-espressione del gene Cytokine Receptor-like Factor 2 (CRLF2). Nella LLA-T, alterazioni di CRLF2 non sono state ancora riportate, ma di recente, mutazioni nel suo partner IL7R sono state individuate nel 10% dei pazienti. Scopo di questo studio è stato quindi valutare l'incidenza dell'alterazione dell'espressione di CRLF2 e il suo valore prognostico nella LLA-T pediatrica.

**Pazienti e Metodi.** Abbiamo analizzato

l'espressione del gene CRLF2 in 120 pazienti LLA-T, arruolati nel protocollo AIEOP-BFM ALL2000 in centri italiani (AIEOP) dal 2000 al 2005, e, come coorte di validazione, in 92 pazienti trattati con lo stesso protocollo in centri tedeschi (BFM-G).

**Risultati.** Diciassette pazienti AIEOP su 120 (14,2%) presentavano un'espressione di CRLF2 5 volte superiore rispetto agli altri. Tali pazienti avevano una prognosi significativamente inferiore (EFS a 5 anni: 41,2%±11,9 vs 68,9%±4,6, p=0,006 e CIR: 52,9%±12,1 vs 26,3%±4,3, p=0,007). Il valore prognostico della sovra-espressione di CRLF2 è stata confermata nella coorte BFM-G. Inoltre l'analisi delle due coorti insieme tramite modello di Cox, aggiustato per gruppo di rischio, ha mostrato che l'alta espressione di CRLF2 era associata ad un aumento del rischio di recidiva pari a 2.47 volte (p=0,006). È interessante notare che la sovra-espressione di CRLF2 era associata a prognosi sfavorevole nel sottogruppo di pazienti ad alto rischio dove i pazienti sovra-esprimenti CRLF2 erano più spesso assegnati. Dal punto di vista biologico, in blasti con alti livelli di CRLF2 abbiamo trovato la tendenza ad una maggiore attivazione della via JAK2/STAT5 a seguito di stimolazione con il ligando TSLP. Tale attivazione veniva inibita da Ruxolitinib. Inoltre, l'analisi di "gene set enrichment" ha mostrato una correlazione inversa tra l'espressione di CRLF2 e di regolatori del ciclo cellulare.

**Conclusioni.** La sovra-espressione di CRLF2 è un marcatore prognostico negativo che identifica un sottogruppo di pazienti LLA-T ad alto rischio che potrebbero beneficiare di terapie alternative.

### Co-013

#### ATTIVAZIONE EX VIVO DI CELLULE NK "MEMORY-LIKE" COME NUOVO APPROCCIO PER IL CONTROLLO/TRATTAMENTO DELLA RECIDIVA LEUCEMICA DOPO TRAPIANTO ALLOGENICO DI CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE

M. Tanzi,<sup>1</sup> I. Turin,<sup>1</sup> F. Ferulli,<sup>1</sup>  
E. Montini,<sup>1</sup> T. Mina,<sup>3</sup> L. Rubert,<sup>3</sup>  
A. Zorzoli,<sup>2</sup> R. Maccario,<sup>1</sup> M. Zecca,<sup>3</sup>  
I. Airolidi,<sup>2</sup> D. Montagna<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio Immunologia e Trapianti, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia; <sup>2</sup>Laboratorio Oncologia, Istituto Giannina Gaslini, Genova; <sup>3</sup>Unità di Onco-Ematologia Pediatrica, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia

**Scopo dello studio.** Le strategie per produrre cellule NK per immunoterapia anti-tumorale si basano sulla stimolazione con IL-2 o altre citochine, senza pre-attivazione. L'efficacia di questo approccio è limita-

ta dal fatto che cellule così stimolate sono dotate di bassa persistenza *in vivo*. Studi nel modello murino hanno dimostrato che la pre-attivazione *in vitro* con opportune citochine porta alla differenziazione di NK con proprietà "memory-like", in grado di persistere più a lungo *in vivo*. Non vi sono però dati che ne dimostrino la capacità litica contro cellule tumorali e la possibilità di traslare questo approccio nella pratica clinica. Scopo dello studio è stato mettere a punto le condizioni di cultura ottimali per indurre la differenziazione di NK "mem-like", analizzare la loro capacità litica contro blasti leucemici (BL) dei pazienti, la persistenza e attività anti-tumorale in un modello murino.

**Metodi.** Sono state valutate 6 coppie donatore/ricevente. I pazienti erano affetti da LLA (n=3) o LMA (n=3) e hanno ricevuto un trapianto aploidentico da donatore familiare parzialmente compatibile. Le cellule NK, purificate a partire dal sangue periferico del donatore sono state pre-attivate per 16h con differenti concentrazioni di IL-12/IL-15/IL-18, coltivate per 7-10 giorni con IL-2 o IL-15 e riattivate o meno prima della valutazione dell'attività citotossica e della criopreservazione. Le caratteristiche fenotipiche e funzionali delle cellule e il loro recupero cellulare, sono state paragonate a quelle delle cellule NK incubate overnight (ON) con IL-2.

**Risultati.** Alti livelli di citotossicità verso i BL dei pazienti si sono riscontrati in buona parte delle condizioni analizzate di cellule NK "mem-like", rispetto alle cellule NK dopo stimolazione ON con IL-2 (media: 53%, range 26-82; media: 25%, range 12-33 al rapporto E:T 30:1, rispettivamente). Le cellule NK "mem-like" mostrano un aumento dell'espressione di CD94, NKG2A, NKp46 e CD69 paragonate alle cellule NK di controllo. Esperimenti preliminari nel modello murino suggeriscono che le cellule NK "mem-like" persistono più a lungo rispetto alle cellule NK di controllo. Questi dati dovranno essere confermati insieme alla valutazione del mantenimento dell'attività anti-tumorale.

**Conclusioni.** Cellule NK memory-like dotate di attività citotossica nei confronti dei BL e con maggiore persistenza *in vivo* rappresentano un promettente approccio per il trattamento delle recidive leucemiche dopo trapianto allogenico.

### Co-014

#### UN NUOVO RECETTORE CHIMERICO SPECIFICO PER L'ANTIGENE CD19 PER I PROTOCOLLI DI IMMUNOTERAPIA ADOTTIVA IN PAZIENTI AFFETTI DA LEUCEMIA LINFOLASTICA ACUTA A CELLULE B

I. Caruana,<sup>1</sup> B. De Angelis,<sup>1</sup> D. Barbato,<sup>1</sup>  
D. Pagiara,<sup>1</sup> D. Orlando,<sup>1</sup> I. Boffa,<sup>1</sup>

M. Guercio,<sup>1</sup> A. Foster,<sup>4</sup> A. Moseley,<sup>4</sup>  
F. Locatelli,<sup>1,2</sup> C. Quintarelli<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italia; <sup>2</sup>Università di Pavia, Pavia, Italia; <sup>3</sup>Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italia; <sup>4</sup>Bellicum Pharmaceuticals, Houston, TX, USA

**Introduzione.** Un nuovo promettente approccio applicato all'immunoterapia adottiva è rappresentato dall'utilizzo di cellule T linfocitarie ingegnerizzate geneticamente per esprimere recettori chimerici antigene-specifici (CAR). Recenti studi clinici hanno dimostrato una significativa attività clinica di cellule T ingegnerizzate con CAR specifico per l'antigene CD19 nel contesto di pazienti affetti da leucemia linfoblastica acuta (ALL) refrattari o recidivati. Nel presente studio viene valutato l'effetto anti-leucemico prodotto da un CAR di prima generazione (CD19.zeta) e da un CAR in cui viene aggiunta la costimolazione rappresentata da una proteina ibrida MyD88/CD40 (CAR.CD19-MC).

**Metodi.** Il frammento scFv specifico per l'antigene CD19 è stato clonato in frame con il dominio CD3-ζ (CAR.CD19-ζ retrovirale). Inoltre, è stato aggiunto al costrutto il segnale di costimolazione fornito da MyD88/CD40, ottenendo così il vettore retrovirale CAR.CD19-MC. In entrambi i vettori è presente il marcatore CD34 per l'analisi di espressione. Cellule del sangue periferico derivanti da donatori sani sono stati attivati con anticorpi CD3/CD28 e stimolati con IL-2. Le cellule attivate sono state successivamente trasdotte con i vettori retrovirali. L'effetto anti-leucemico prodotto dalle cellule ingegnerizzate è valutato *in vitro* attraverso saggi di citotossicità ed esperimenti di co-culture.

**Risultati.** Linfociti T geneticamente modificati con CAR.CD19- o CAR.CD19-MC mostrano un potenziale proliferativo simile e citochina dipendente, al pari delle cellule T di controllo (NT). Le cellule T modificate geneticamente con i CAR.CD19 mostrano un'elevata attività citotossica verso target CD19+ derivanti da pazienti con B-ALL, mentre non mostrano reattività verso cellule CD19-. In esperimenti di co-cultura con cellule leucemiche CD19+, abbiamo evidenziato una maggiore persistenza delle cellule T CAR.CD19-MC rispetto alle cellule CAR.CD19-ζ (95%±9% vs 0.1±5%, rispettivamente. p<0.0001). Inoltre, abbiamo dimostrato che i linfociti CAR.CD19-MC producono livelli di citochine più elevati rispetto ai linfociti CAR.CD19-ζ quando stimolati con cellule CD19+.

**Discussione.** I nostri risultati dimostrano una marcata attività anti-leucemica dei linfociti T CAR.CD19-MC, e di una loro migliore persistenza rispetto ai vettori di

prima generazione, suggerendo un loro potenziale utilizzo in protocolli clinici di immunoterapia adottiva in pazienti affetti da B-ALL ricaduti o refrattari.

#### Co-015

### ROLE OF THE HISTONE DEACETYLASE INHIBITOR GIVINOSTAT (ITF2357) IN TREATMENT OF CRLF2 REARRANGED ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

A.M. Savino,<sup>1</sup> J.Sarno,<sup>1</sup> L.Trentin,<sup>2</sup> M. Vieri,<sup>1</sup> G. Fazio,<sup>1</sup> M. Bardini,<sup>1</sup> C. Bugarin,<sup>1</sup> G. Fossati,<sup>3</sup> K. Davis,<sup>4</sup> G. Gaipa,<sup>1</sup> L.H. Meyer,<sup>5</sup> G. Te Kronnie,<sup>2</sup> A. Biondi,<sup>1</sup> C. Palmi,<sup>1</sup> G. Cazzaniga<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Ricerca M. Tettamanti, Clinica Pediatrica, Università di Milano Bicocca, Fondazione MBBM/Ospedale San Gerardo, Monza, Italia; <sup>2</sup>Laboratory of Onco-Hematology, Department of Pediatrics, Università di Padova, Italy; <sup>3</sup>Preclinical R&D Department, Italfarmaco S.p.A., Cinisello Balsamo, Milan, Italy; <sup>4</sup>Baxter Laboratory in Stem Cell Biology, Department of Microbiology and Immunology, Stanford University, Stanford, CA, USA; <sup>5</sup>Hematology and Oncology, Department of Pediatrics, Stanford University, Stanford, CA, USA; <sup>5</sup>Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, Ulm University Medical Center, Ulm, Germany

Anomalie dei geni CRLF2 (traslocazione IGH-CRLF2 e fusione P2RY8-CRLF2) e JAK2 (mutazioni aa682-683), identificate nel 10% di pazienti pediatrici con leucemia acuta linfoblastica a precursori B (BCP-ALL) a rischio elevato di ricaduta e nel 20% dei pazienti ALL con Sindrome di Down, causano deregolazione della via di segnale CRLF2/JAK2, potenziale bersaglio farmacologico di inibitori di JAK2. Tuttavia, un'attività antitumorale ad ampio spettro è richiesta per un trattamento più efficace di questi casi.

**Scopo.** Lo studio ha lo scopo di valutare l'efficacia terapeutica di Givinostat (ITF2357), inibitore di istone deacetilasi utilizzato in studi di fase I/II per policitemia vera positiva per JAK2 V617F (localizzata nello stesso dominio pseudochinasi-co di JAK2 R683). La potenziale attività inibitoria di Givinostat in casi candidati di ALL non è ancora stata indagata.

**Risultati.** Givinostat, a concentrazioni di 200 nM, inibisce la proliferazione e induce l'apoptosi nelle linee cellulari MHH-CALL4 e MUTZ5(IGH@CRLF2/JAK2 I682F e R683G rispettivamente) e in blasti di pazienti BCP-ALL con overespressione di CRLF2(P2RY8-CRLF2), attraverso una modulazione negativa dei geni del pathway JAK/STAT e inibizione delle loro molecole effettrici. Infatti, i geni coinvolti

nella via di segnale a valle di CRLF2 (JAK2,STAT5A,cMyc) e gli stessi CRLF2 e IL7R vengono significativamente downmodulati già dopo 6 ore di trattamento. Givinostat inibisce la fosforilazione di Stat5 a livello basale e dopo stimolazione con TSLP (ligando di CRLF2). Inoltre, Givinostat sinergizza, con i chemioterapici già in uso nella pratica clinica per la terapia della BCP-ALL (Asparaginasi, Vincristina e Desametasone), mostrando inibizione della proliferazione e induzione dell'apoptosi nelle linee e in blasti. Studi *in vivo* su modelli di xenotrapianto di BCP-ALL con riarrangiamenti di CRLF2 hanno dimostrato l'efficacia del farmaco nel ridurre l'attecchimento dei blasti nei diversi compartimenti emopoietici del topo. Studi di combinazione *in vivo* sono in corso.

**Conclusioni.** La conferma dell'efficacia del farmaco e del suo effetto sinergico con chemioterapici consentirebbe una terapia combinata, con il risultato di ridurre le dosi e la tossicità associata alla chemioterapia mantenendo l'efficacia terapeutica. Tale schema è di particolare interesse per pazienti con ALL associata a Sindrome di Down, per i quali i maggiori effetti collaterali sono dovuti proprio all'eccesso di tossicità delle dosi chemioterapiche.

#### Co-016

### SUSCETTIBILITÀ GENETICA CONDIVISA TRA NEUROBLASTOMA E MALFORMAZIONI CARDIACHE CONGENITE

A. Cirino,<sup>1,2</sup> V.A. Lasorsa,<sup>1,2</sup> P. Pignataro,<sup>1,2</sup> D. Formicola,<sup>1,2</sup> A. Iolascon,<sup>1,2</sup> M. Capasso<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli; <sup>2</sup>CEIN-GE Biotecnologie Avanzate, Napoli, Italia

**Scopo.** Anomalie della migrazione della cresta neurale possono causare l'insorgenza delle malformazioni cardiache congenite (MCC) e del neuroblastoma (NB). George *et al.* (2003) dimostrarono che i bambini con NB sviluppano anche MCC, mentre Van Engelen *et al.* (2008) non trovarono la stessa associazione tra le due patologie. Questo lavoro vuole far luce sull'associazione tra questi due fenotipi mediante l'identificazione di varianti genetiche di rischio comuni alle due patologie. **Pazienti e Metodi.** Abbiamo utilizzato i genotipi dei dati GWAS (Genome-wide association study) che contengono 479810 SNPs (Single nucleotide polymorphism) ottenuti da 1627 pazienti con NB e 2575 controlli e dati GWAS (514950 SNPs) da 1759 pazienti con MCC e 5159 controlli.

I pazienti con MCC erano composti dai sottogruppi VSD-Ventricular Septal Defect (191), ASD\_PFO-Atrial Septal Defect\_Patent Foramen Ovale (340), TGA-Transposition of Great Arteries (207), Conotruncal (151), Left Heart Malformation (387). Tra i due dataset è stata effettuata una meta-analisi (dopo aver filtrato le varianti con  $P < 0.01$ ) utilizzando il software Metal per identificare le varianti associate sia a NB che MCC.

**Risultati.** Abbiamo identificato varianti genetiche comuni associate sia al NB che alle MCC. Per esempio abbiamo trovato varianti di rischio nel gene CHL1 (rs11714407,  $P = 1.73 \times 10^{-6}$ ), implicato nella crescita del tumore; EPHA3 (rs6782527,  $P = 9.49 \times 10^{-6}$ ), espresso nel cervello e nel tubo neurale ed è coinvolto nello sviluppo del sistema nervoso e del canale atrioventricolare; VWA5A (rs9667893,  $P = 5.43 \times 10^{-5}$ ), espresso nelle creste neurali ed è coinvolto nella genesi del tumore; SEMA3C (rs2040908,  $P = 2.61 \times 10^{-4}$ ), espresso nelle creste neurali e nel cuore ed è coinvolto nello sviluppo embrionale, nella fisiologia cardiovascolare e nella crescita assonale; BARD1, espresso nel cuore e nella ghiandola surrenale, regola la crescita cellulare. Da notare che la variante rs7557557 in BARD1 mostrava "Genome-wide significance" ( $P = 1.26 \times 10^{-8}$ ).

**Conclusioni.** Sebbene non ci sia certezza della correlazione tra i due fenotipi in letteratura, le nostre analisi suggeriscono che, sia a livello genetico che a livello biologico, la corretta migrazione delle creste neurali è necessaria sia per lo sviluppo del cuore che per il differenziamento delle cellule del sistema nervoso periferico. Ipotizziamo quindi che esista una suscettibilità genetica comune allo sviluppo del NB e delle MCC.

#### Co-017

### L'ANALISI TRASCRITTOMICA (RNA-SEQ) HA IDENTIFICATO UN NUOVO MECCANISMO CHE DA ORIGINE A GENI DI FUSIONE IN PAZIENTI PEDIATRICI CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA

G. Fazio,<sup>1</sup> M. Severgnini,<sup>2</sup> I. Cifola,<sup>2</sup> S. Bungaro,<sup>1</sup> A. Biondi,<sup>1</sup> G. De Bellis,<sup>2</sup> G. Cazzaniga<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Ricerca Tettamanti, Clinica Pediatrica, Ospedale S. Gerardo/MBBM, Università di Milano-Bicocca, Monza, MB; <sup>2</sup>Institute for Biomedical Technologies (ITB), National Research Council (CNR), Segrate, MI, Italia

**Scopo.** Scopo del presente studio è quello di identificare le basi molecolari della diversa risposta alla terapia in pazienti pediatrici affetti da Leucemia Linfobla-

stica Acuta (LLA), tramite un approccio di sequenziamento di tutto il trascrittoma (RNA-Seq), in pazienti a basso (SR, Standard Risk) vs pazienti ad alto rischio (HR, High Risk). Nonostante i progressi tecnologici recenti, i tassi di incidenza e di guarigione sono molto variabili, riflettendo le risposte diverse ad uno stesso trattamento farmacologico, che porta alla definizione di diversi gruppi a rischio.

**Pazienti e Metodi.** L'RNA totale è stato estratto da campioni di esordio di leucemia di 10 pazienti pediatrici con LLA (4SR e 6 HR, definiti secondo il monitoraggio della malattia residua minima, MRM), arruolati nel protocollo AIEOP-BFM ALL2000. L'analisi dei profili di DNA è stata eseguita con Affymetrix Cyto2.7M Array, mentre l'analisi di RNA-Seq con una piattaforma Illumina GAIIX. Validazioni sono state eseguite mediante RT-PCR e FISH.

**Risultati.** Abbiamo analizzato il trascrittoma di 10 casi pediatrici, stratificati esclusivamente con MRM in SR vs HR, ma omogenei per tutti gli altri fattori di rischio clinico o genetico. La priorità di analisi è stata data ai trascritti di fusione. Sono stati identificati 127 eventi di fusione, di cui sorprendentemente 123 sono fusioni intra-cromosomiche, 117 delle quali coinvolgono due geni contigui o sovrapposti (definiti "Co-joined Genes", CJs). Abbiamo quindi valutato l'incidenza degli eventi di fusione e CJ su tutti i campioni del nostro dataset, nonché in un dataset privato di pazienti affetti da Melanoma e di controlli normali "CEU", derivati dal progetto dei 1000 Genomi. Abbiamo identificato la presenza di 30 eventi, sia fusioni classiche che CJ, non trovati in melanomi e CEU, ma che possono essere definiti eventi "privati" della leucemia. A supporto dell'interesse potenziale dei CJs nella leucemia, abbiamo esplorato tali eventi anche in dataset pubblici di RNA-Seq di LLA e di LMA (Leucemia Mieloide Acuta).

**Conclusioni.** L'analisi di RNA-Seq rappresenta uno degli approcci più completi per identificare nuovi geni di fusione, originati sia da riarrangiamenti inter o intra-cromosomici, oltre che un numero considerevole di CJs. Ulteriori valutazioni riguarderanno SNP, i cambiamenti di espressione genica e varianti di splicing che possono essere correlati a un rischio diverso di recidiva.

#### Co-018

### IL SILENZIAMENTO EPIGENETICO DELL'UNITÀ TRASCRIZIONALE miR-326/ $\beta$ -ARRESTINI1 COME INIBITORE DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE NEL MEDULLOBLASTOMA

E. Miele,<sup>1,2</sup> A. Po,<sup>1</sup> A. Mastronuzzi,<sup>3</sup>

S. Valente,<sup>4</sup> A. Carai,<sup>5</sup> F. del Bufalo,<sup>3</sup> I. Screpanti,<sup>1</sup> F. Giangaspero,<sup>6,7</sup> M. Levrero,<sup>8</sup> A. Tornesello,<sup>9</sup> C. Laurieri,<sup>3</sup> M.G. Cefalo, R. Messina,<sup>5</sup> C.E. Marras,<sup>5</sup> F. Locatelli,<sup>3,10</sup> E. Ferretti<sup>11</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento Medicina Molecolare, Università di Roma Sapienza, Roma;

<sup>2</sup>Center for Life NanoScience@Sapienza, Istituto Italiano di Tecnologia, Roma;

<sup>3</sup>Dipartimento di Onco-ematologia e Medicina Trasfusionale, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma;

<sup>4</sup>Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco, Università di Roma Sapienza, Roma;

<sup>5</sup>Dipartimento di Neuroscienze e neuroriabilitazione, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma;

<sup>6</sup>Dipartimento di Scienze Radiologiche, Oncologiche e Patologiche, Università di Roma Sapienza, Roma;

<sup>7</sup>Istituto Neuromed, Pozzilli, IS;

<sup>8</sup>Dipartimento di Medicina Interna, DMISM, Università di Roma Sapienza, Roma;

<sup>9</sup>Unità di Onco-Ematologia Ospedale Vito Fazzi, Lecce;

<sup>10</sup>Università degli Studi di Pavia, Pavia;

<sup>11</sup>Dipartimento Medicina Sperimentale, Università di Roma Sapienza, Roma, Italia

**Scopo.** Il medulloblastoma (MB) è tra i tumori cerebrali più frequenti nei bambini. Recentemente sono stati identificati quattro sottogruppi caratterizzati da distinte mutazioni e da de-regolazione di specifiche vie di segnale. Una caratteristica comune a tutti i MB è la presenza di stem-like cells (SLCs), che rappresentano una frazione di cellule neoplastiche, considerabili i "progenitori" da cui ha avuto origine il MB e dotate della capacità di sostenere la proliferazione tumorale. Recenti studi hanno messo in evidenza il ruolo cruciale della de-regolazione delle vie di segnale dei microRNA nel tumore e in precedenti studi abbiamo identificato MB con microRNAs deregolati. In questo studio abbiamo evidenziato che, fra questi, miR-326 è fortemente down-regolato e reprime il pathway di segnale Hedgehog/Gli.

**Materiali e Metodi.** SCLs di MB sia murine che umane sono state ottenute e coltivate come "oncosfere". I livelli di espressione di miR-326 e il suo gene -arrestin1 sono stati studiati sia in MB che in SLCs. Abbiamo esaminato il ruolo delle due molecole nel MB e la regolazione dell'unità trascrizionale miR-326/ -arrestin1 nelle SLCs. Per modulare l'espressione di miR-326/ -arrestin1 nel MB *in vitro* e *in vivo* è stato inoltre utilizzato un approccio farmacologico.

**Risultati.** miR-326 coopera in maniera sinergica con il proprio gene ospite -arrestin1 come onco-soppressore. Tale unità sopprime la via del segnale regolatoria di Hedgehog a più livelli: la -arrestin1 inibisce la via del segnale di Hedgehog attra-

verso la modulazione dell'acetilazione di Gli1-K518 mentre il miR-326 controlla Gli2 e Smo, due molecole attivatorie del pathway di segnale. Analizzando i possibili meccanismi coinvolti nella down-regolazione di -arrestin1/miR-326, abbiamo evidenziato che tale unità trascrizionale è silenziata attraverso meccanismi epigenetici a livello istonico. A conferma di tale riscontro, farmaci epigenetici sono risultati in grado di riattivare l'espressione di miR-326/ -arrestin1 e di inibire la proliferazione cellulare nel MB e nelle SLCs sia *in vitro* che *in vivo*.

**Conclusioni.** Il nostro lavoro evidenzia un nuovo network microRNA/gene ospite nel MB e propone l'unità miR-326/ -arrestin1 quale onco-soppressore che può essere riattivato nei pazienti affetti da MB mediante farmaci epigenetici.

#### Co-019

### PROFILI DI METILAZIONE DEL DNA COME MARCATORI DI RECIDIVA E RISPOSTA ALLA TERAPIA IN LAM CON TRASLOCAZIONE t(8;21)AML1-ETO

M. Zampini,<sup>1,2</sup> C. Tregnago,<sup>2</sup> E. Manara,<sup>1,2</sup> V. Bisio,<sup>2</sup> F. Zonta,<sup>2</sup> K. Polato,<sup>2</sup> F. Locatelli,<sup>3</sup> M. Pigazzi,<sup>2</sup> G. Basso<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Istituto di Ricerca Pediatrica, Città della Speranza, Padova; <sup>2</sup>Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino, Oncoematologia Pediatrica, Università di Padova, Padova; <sup>3</sup>Oncoematologia Pediatrica, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italia

La traslocazione t(8;21)AML1-ETO è presente in circa il 15% delle leucemie mieloidi acute pediatriche (LAM) e stratifica i pazienti secondo il protocollo AIEOP AML 2002/01 nel gruppo a rischio standard. Sfortunatamente quasi il 30% di questi pazienti è incorso in recidiva di malattia e nel 90% dei casi alla morte. Ultimamente, si sta discutendo del peso dell'epigenetica in queste malattie geneticamente simili ma con differente decorso clinico.

**Pazienti e Metodi.** Abbiamo effettuato esperimenti di sequenziamento massivo del DNA metilato in 10 pazienti affetti da LAM t(8;21) riarrangiate all'esordio per identificare le differenze dei profili di metilazione del DNA tra 5 pazienti che nel corso della malattia sono recidivati e 5 no. Inoltre, gli stessi pazienti sono stati confrontati in base ai livelli di malattia residua minima (mrm) molecolare dopo la terapia di induzione, definendoli poor (riduzione<2 log) e good (riduzione>2 log). I dati di metilazione sono stati integrati con profili di espressione genica

effettuati mediante array HTA 2.0 Affymetrix sui medesimi pazienti.

*Risultati.* Sono state identificate 337 e 1321 regioni differenzialmente metilate (DMR) tra i pazienti ricaduti rispetto ai non ricaduti e poor verso good, rispettivamente. Analisi di clustering mostrano come le DMR separino i pazienti ricaduti da quelli non ricaduti così come i poor dai good, come avviene anche con i profili di espressione genica, conferendo alle DMR un potenziale ruolo predittivo fin dalla diagnosi. Solo il 10-15%

delle DMR è localizzato in regioni promotoriali. Analisi bioinformatiche mostrano che le DMR cadono per lo più in regioni introniche ed esoniche di geni coinvolti in pathway di adesione cellulare, in loci genomici trascrizionalmente attivi e arricchiti per siti di legame di fattori di trascrizione ematopoietici. L'integrazione tra profili di metilazione e di espressione mostra una bassa correlazione aprendo nuovi scenari nella regolazione trascrizionale mediata dalla metilazione del DNA.

*Conclusioni.* All'interno del gruppo LAM con t(8;21) esistono quindi pazienti con diversi profili di metilazione e di espressione genica che possono influenzare la risposta alla terapia e l'incidenza di ricaduta. Nuovi circuiti trascrizionali e targets sono in via di validazione per consentire fin dalla diagnosi di identificare i pazienti che potrebbero beneficiare del trattamento destinato a pazienti a più alto rischio o di nuove terapie basate sull'uso di farmaci epigenetici.

## POSTER

P-001

**IDENTIFICAZIONE DI ALTERAZIONI GENETICHE NEL RABDOMIOSARCOMA SCLEROSANTE E A CELLULE FUSATE PEDIATRICO: STUDIO COLLABORATIVO ITALO-AMERICANO**A. Zin,<sup>1</sup> G. Bisogno,<sup>2</sup> G. Basso,<sup>2</sup>  
L. Zhang,<sup>3</sup> C.R. Antonescu,<sup>3</sup> R. Alaggio<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Istituto di Ricerca Pediatrica, Città della Speranza, Padova, Italia; <sup>2</sup>Clinica di Oncematologia Pediatrica, Azienda Ospedaliera-Università di Padova, Padova, Italia; <sup>3</sup>Dipartimento di Patologia, Memorial Sloan Kettering Cancer Center New York, NY, USA; <sup>4</sup>Dipartimento di Anatomia Patologica, Azienda Ospedaliera-Università di Padova, Padova, Italia

**Scopo.** Il rabdomiosarcoma a cellule fusate e lo sclerosante (RMSS) rappresentano rare forme di RMS con caratteristiche cliniche differenti tra pazienti adulti e pediatrici e secondo la recente classificazione WHO essi vengono ora considerati come un'entità patologica distinta dal RMS embrionale. Studi recenti condotti su pazienti affetti da RMSS hanno mostrato la presenza di riarrangiamenti genetici che coinvolgono il gene NCOA2 su alcuni tumori congeniti, e mutazioni nel gene MYOD1, con o senza coesistenti mutazioni di PIK3CA in neoplasie di adolescenti e adulti. Tuttavia, per molti di questi tumori non esistono ancora alterazioni genetiche note. Lo scopo di questo studio collaborativo è quello di identificare la presenza di marcatori molecolari utili per una miglior classificazione dei RMSS, in particolare aumentando la coorte di pazienti pediatrici.

**Pazienti e Metodi.** Abbiamo selezionato 25 RMSS tra pazienti arruolati nei protocolli pediatrici AIEOP centralizzati presso la Clinica di Oncematologia Pediatrica ed il Dipartimento di Anatomia Patologica di Padova e pazienti arruolati al "Memorial Sloan Kettering Cancer Center di New York (USA). Per la caratterizzazione molecolare di queste neoplasie abbiamo utilizzato la tecnica FISH combinata con il sequenziamento su DNA genomico di alcuni geni noti e il sequenziamento massivo del trascrittoma.

**Risultati.** Sei degli 11 RMSS congeniti infantili (55%) hanno mostrato la presenza dei geni di fusione VGLL2-NCOA2(2), TEAD1-NCOA2(2), SRF-NCOA2(1) e VGLL2 con partner non noto(1). Tra questi, quelli con follow-up maggiore risultano liberi da malattia e non hanno sviluppato metastasi. Dei 14 tumori di pazienti

affetti RMSS con età superiore ad 1 anno, 9 (64%) hanno presentato la mutazione L122R del gene MYOD1. La maggior parte di essi hanno avuto una prognosi infausta nonostante un trattamento multi-modale aggressivo. Una morfologia di tipo sclerosante è stata osservata per i 3 casi in cui coesisteva la mutazione del gene MYOD1 e PIK3CA. In 5 casi non è stata osservata nessuna di queste alterazioni genetiche e la correlazione con la localizzazione del tumore a livello addominale o paratesticolare suggerisce un più stretto rapporto con il RMSE.

**Conclusioni.** Il RMSS rappresenta un gruppo di neoplasie eterogenee sia dal punto di vista genetico che clinico. Con il nostro studio abbiamo identificato una serie di alterazioni genetiche caratteristiche per pazienti affetti da RMSS congenito-infantili e quelli dei giovani adulti.

P-002

**L'ESPRESSIONE DELL'RNA NON CODIFICANTE NDM29 INDOTTA DA PEREXILINA MALEATO AUMENTA L'EFFICACIA ANTITUMORALE DEL CISPLATINO NEL NEUROBLASTOMA**S. Vella,<sup>1</sup> I. Penna,<sup>1</sup> L. Longo,<sup>2</sup> T. Florio,<sup>3</sup>  
F. Rossi,<sup>4,5</sup> A. Pagano<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Experimental Medicine (DIMES), University of Genova, Genova, Italy; <sup>2</sup>IRCCS-AOU San Martino-IST, Genova, Italia; <sup>3</sup>Sect. of Pharmacology, Dept. of Internal Medicine (DiMI) and Center of Excellence for Biomedical Research (CEBR), University of Genova, Genova, Italy; <sup>4</sup>The Biomedical Research Centre, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada; <sup>5</sup>Department of Medical Genetics, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada

**Scopo.** Il neuroblastoma (NB) ad alto rischio è una neoplasia pediatrica caratterizzata da un'elevata malignità e da una considerevole eterogeneità cellulare all'interno dei noduli tumorali. In un recente studio abbiamo dimostrato che un aumento dell'espressione dell'RNA non codificante NDM29 induce il differenziamento di cellule di NB, riducendo sensibilmente la loro malignità. Tra i cambiamenti nell'espressione genica, associati al fenotipo differenziato indotto da NDM29, è stata osservata una ridotta espressione dei trasportatori ABC, che sono responsabili per la resistenza a farmaci antitumorali. Con questo studio ci si è quindi proposti di identificare farmaci in grado di indurre NDM29 al fine di sviluppare una possibile nuova strategia per incrementare la risposta delle cellule di NB a farmaci citotossici.

**Pazienti e Metodi.** La selezione dei farmaci candidati è stata eseguita mediante screening, sulla linea SH-SY5Y ingegnerizzata per esprimere luciferasi, della Prestwick Chemical Library, che comprende 1120 farmaci e composti naturali già approvati dalla FDA. L'effetto dei farmaci candidati sulla tumorigenicità di cellule di NB (SKNBE2 e SH-SY5Y) è stato valutato *in vitro* ed *in vivo* su topi NOD-SCID.

**Risultati.** In questo lavoro abbiamo identificato un farmaco a piccola molecola (perhexiline) in grado di indurre l'espressione di NDM29, conferendo alle cellule di NB un forte aumento della sensibilità agli effetti citotossici del cisplatino. Inoltre, abbiamo dimostrato che l'induzione farmacologica dell'espressione di NDM29 mediata da perhexiline incrementa gli effetti antitumorali del cisplatino anche in modelli *in vivo*, agendo specificamente contro la sottopopolazione cellulare delle Tumor Initiating Cells (TIC), le quali sono generalmente refrattarie alle terapie convenzionali e sono responsabili di eventuali recidive del tumore. Nella maggioranza dei topi trattati si è infatti osservato un raddoppio del tempo di sopravvivenza ed un rallentamento significativo della crescita dei noduli tumorali rispetto ai controlli.

**Conclusioni.** I nostri risultati suggeriscono che l'induzione di NDM29 da parte della perhexiline possa rappresentare un nuovo approccio terapeutico, utile nel trattamento di casi di NB particolarmente aggressivi e con prognosi infausta. Questa strategia farmacologica consiste nella promozione del differenziamento di cellule di natura staminale verso cellule tumorali maggiormente suscettibili all'azione di farmaci antitumorali citotossici.

P-003

**L'ESPRESSIONE DELL'RNA NON CODIFICANTE HOTAIR È DEREGLATA NEL RABDOMIOSARCOMA**P.P. Leoncini,<sup>1</sup> B. Conti,<sup>1</sup> J. Roma,<sup>2</sup>  
S. Gallego,<sup>2</sup> R.S. Redis,<sup>3</sup> G. Calin,<sup>3</sup>  
R. Boldrini,<sup>4</sup> A. Inserra,<sup>5</sup> A. Bertaina,<sup>1</sup>  
F. Locatelli,<sup>1</sup> R. Rota<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Oncematologia, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italia; <sup>2</sup>Vall d'Hebron Research Institute and Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>3</sup>The RNA Interference and Non-codingRNA Center, MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA; <sup>4</sup>Anatomia Patologica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italia; <sup>5</sup>Chirurgia, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italia

**Scopo.** Il Rabdomiosarcoma (RMS) è un

sarcoma pediatrico dei tessuti molli e che si caratterizza per l'espressione di markers del tessuto muscolare scheletrico. Include due sottotipi: (a) presenta una traslocazione cromosomica (t(2;13)) che produce l'onco-proteina PAX3-FOXO1, e (b) non presenta alcun riarrangiamento cromosomico. Nel primo caso si parla di RMS positivo per la fusione (FP) mentre l'altro gruppo comprende i cosiddetti negativi per la fusione (FN). Le forme di RMS FP e quelle metastatiche in generale sono considerate ad alto rischio di recidiva. Abbiamo recentemente dimostrato che EZH2, una proteina che regola il differenziamento muscolare, è responsabile della sopravvivenza delle cellule di RMS. Con il presente studio abbiamo verificato se l'RNA non-codificante HOTAIR, situato sul Cromosoma 12(q13) e che lega EZH2 in altri tessuti, è deregolato nell'RMS.

**Pazienti e Metodi.** Sono stati studiati 2 campioni primari e 2 linee cellulari di RMS FP e 5 campioni primari e 2 linee cellulari di RMS FN. L'espressione di HOTAIR e quella del microRNA miR-196a, che si trova in un locus genico vicino, è stata valutata mediante RT-qPCR e paragonata a quella dei rispettivi controlli: tessuto muscolare sano e mioblasti umani. Le linee cellulari RMS FP (RH30 e RH4) sono state trattate con 5-aza-cytidine (5-aza) per verificare la modulazione di HOTAIR. **Risultati.** I risultati mostrano che HOTAIR era sottoespresso nei campioni e linee cellulari RMS FP, mentre, al contrario, era sovraespresso nell'RMS FN rispetto ai controlli. Il miR-196a e i due geni pri-miR-196a-2, co-lineare con HOTAIR, e pri-miR-196a-1 sul Cromosoma 17(q21), che danno origine alla forma matura miR-196a, seguivano lo stesso andamento. L'espressione di HOTAIR e del miR-196a erano associate anche a quella di HOXC10 and HOXC11. È stato interessante notare che le cellule RMS FP trattate con 5-aza mostravano un'induzione di HOTAIR.

**Discussione.** I risultati di questo studio preliminare indicano che l'espressione dei geni nella regione vicina ad HOTAIR sul cromosoma 12 è deregolata nell'RMS. Inoltre, essi suggeriscono che HOTAIR potrebbe essere metilato nell'RMS PAX3-FOXO1. Ulteriori studi sono in corso per definire il ruolo di HOTAIR in questo sarcoma pediatrico.

#### P-004

### MICRORNA CANDIDATI NELLA REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI ALK NEL NEUROBLASTOMA

M. De Mariano,<sup>1</sup> S. Stigliani,<sup>2</sup> S. Moretti,<sup>3</sup> A. Pagano,<sup>4</sup> G.P. Tonini,<sup>5</sup> L. Longo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UOC Bioterapie, IRCCS AOU San Martino-

IST, Genova, Italia; <sup>2</sup>UOS Fisiopatologia della Riproduzione Umana, IRCCS AOU San Martino-IST, Genova, Italia; <sup>3</sup>CNRS UMR7243, Université Paris-Dauphine, Paris, France; <sup>4</sup>Università di Genova & IRCCS AOU San Martino-IST, Genova, Italia; <sup>5</sup>Istituto di Ricerca Pediatrico, Fondazione Città della Speranza, Padova, Italia

**Scopo.** Il gene ALK è recentemente emerso come target terapeutico nel neuroblastoma (NB). Mutazioni missenso e amplificazione di ALK sono state osservate rispettivamente nell'8% e 1% dei pazienti affetti da questo tumore pediatrico. Inoltre, un'elevata espressione di ALK è associata a casi metastatici e con una peggiore prognosi. I miRNA sono RNA non codificanti di circa 22 nucleotidi che regolano l'espressione genica a livello post-trascrizionale. Al fine di individuare miRNA coinvolti nella regolazione di ALK nel NB abbiamo analizzato il loro profilo di espressione in linee cellulari e pazienti, per identificare quelli differenzialmente espressi tra campioni che presentano alti (ALK+) e bassi (ALK-) livelli di espressione di ALK.

**Pazienti e Metodi.** Le analisi sono state eseguite su RNA totale di 16 linee cellulari e 22 campioni di NB. I livelli di mRNA di ALK sono stati valutati mediante qPCR e normalizzati sulla media geometrica di GAPDH, UBC e 18S. Il profilo di espressione dei miRNA è stato eseguito utilizzando i chip "Human microRNA Microarray Release 14", contenenti 866 sonde per miRNA umani. I dati grezzi sono stati estratti utilizzando il software Feature Extraction e successivamente analizzati con R utilizzando il limma package di Bioconductor. L'analisi di espressione differenziale tra i due gruppi (ALK+ e ALK-) è stata eseguita mediante il test t di Student, considerando significativi i miRNA con p-value <0,05.

**Risultati.** La nostra analisi ha evidenziato, nelle linee e nei campioni di NB appartenenti al gruppo ALK-, una più alta espressione, rispettivamente, di 30 e 23 miRNA (p-value <0,05). Tre di questi (miR-424-5p, miR-520e e miR-526b-3p) sono risultati significativi sia nelle linee che nei pazienti. Complessivamente, 21 miRNA nelle linee e 16 nei pazienti hanno mostrato valori di Fold Change >2, tra cui i più interessanti sono: miR21-5p, miR22-3p, miR-29a-3p, miR-29b-3p, miR-424-5p, miR-503-5p nelle linee, e let-7g-5p, let-7i-5p, miR-424-5p, miR-451a nei pazienti.

**Conclusioni.** Questo studio propone una signature di miRNA differenzialmente espressi nei NB ALK+ e ALK-. In particolare, miR-424-5p e miR29a-3p emergono come potenziali candidati nella regolazione di ALK in quanto una loro associazione con questa tirosin-chinasi è già stata

riportata nei linfomi anaplastici a grandi cellule ALK+. Ulteriori studi funzionali per confermare il ruolo di questi miRNA nei NB dipendenti da ALK sono necessari al fine di proporli come nuovi target terapeutici.

#### P-005

### ANALISI DELLO STATO DI METILAZIONE DEL DNA NEL RABDOMIOSARCOMA METASTATICO E NON METASTATICO

E. Poli,<sup>1</sup> A. Zin,<sup>1,2</sup> B. Celegato,<sup>3</sup> P. Martini,<sup>3</sup> C. Romualdi,<sup>3</sup> G. Lanfranchi,<sup>3</sup> G. Bisogno,<sup>1</sup> L. Tombolan<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Clinica di Oncoematologia Pediatrica, Azienda Ospedaliera-Università di Padova, Padova; <sup>2</sup>Istituto di Ricerca Pediatrica, Città della Speranza, Padova; <sup>3</sup>Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Padova, Padova, Italia

**Scopo.** Nel rhabdomyosarcoma (RMS) la presenza di metastasi all'esordio di malattia è considerata un importante fattore di rischio che sottende ad una prognosi infausta. L'obiettivo del nostro studio è capire se lo stato di metilazione di alcuni geni è coinvolto nei processi di metastatizzazione dei RMS.

**Pazienti e Metodi.** Abbiamo valutato il profilo di metilazione di 15 biopsie di pazienti affetti da RMS arruolati nei protocolli AIEOP con una piattaforma Agilent dedicata. I dati sono stati analizzati utilizzando iChip, un approccio statistico bayesiano. La correlazione tra stato di metilazione ed espressione di alcuni geni interessanti è stata verificata mediante quantitative RT-PCR, integrando nell'analisi 18 biopsie e 7 linee cellulari. Abbiamo inoltre confermato che il controllo dell'espressione di certi geni avviene mediante fenomeni epigenetici effettuando trattamenti *in vitro* con 5-aza-2'-deossicitidina (DAC) e tricostatina A (TSA). Per il gene PCDHA4 abbiamo sequenziato la regione prossimale al sito di inizio della trascrizione (TSS) a partire da DNA convertito con bisolfito e valutato gli effetti del silenziamento transiente con siRNA sul ciclo cellulare.

**Risultati.** L'analisi dei profili di metilazione ci ha permesso di individuare 1394 regioni differenzialmente metilate tra RMS metastatici e non, localizzate su 357 geni noti. La Gene Ontology ha mostrato un arricchimento della classe di geni coinvolti nell'adesione cellulare, in particolare per la famiglia delle protocaderine (PCDHs). Abbiamo valutato l'esistenza di una correlazione inversa tra grado di metilazione ed espressione genica in 15 PCDHs. In particolare, PCDHA4 ha mostrato livelli di espressione inversa-

mente correlati al profilo di metilazione sia nei tumori che nelle linee cellulari. Lo stato di metilazione è stato confermato dal sequenziamento della regione prossimale al TSS (+94 + +828) ed il suo coinvolgimento nell'espressione genica è stato dimostrato in seguito a trattamento con DAC e TSA. Studi funzionali hanno dimostrato il suo ruolo nella regolazione della proliferazione cellulare.

**Conclusioni.** Il nostro studio ha dimostrato l'esistenza di un differente profilo di metilazione tra RMS metastatici e non metastatici e il gene PCDHA4 è emerso come il più interessante. La sua implicazione nei processi di proliferazione cellulare pone le basi per un'analisi più approfondita del suo coinvolgimento nel processo di metastasi del RMS.

#### P-006

### COINVOLGIMENTO DI IDO1 NEL MEDULLOBLASTOMA: UNA POSSIBILE INTERAZIONE CON mTOR

V. Folgiero,<sup>1</sup> A. Mastronuzzi,<sup>1</sup> A. Carai,<sup>2</sup> F. Del Bufalo,<sup>1</sup> F. Locatelli<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Onco-ematologia e Medicina Trasfusionale; <sup>2</sup>Dipartimento di Neuroscienze e Neuroriabilitazione, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma; <sup>3</sup>Università degli Studi di Pavia, Pavia, Italia

**Scopo.** Il medulloblastoma (MB) è la neoplasia cerebrale maligna più comune dell'età pediatrica. Nonostante i progressi nei trattamenti, le malattie ad alto rischio sono tuttora caratterizzate da un'elevata mortalità. Indoleammine 2,3-dioxygenase1 (IDO1) è un enzima coinvolto in numerose patologie neoplastiche tra le quali i tumori cerebrali, nella regolazione dell'infiammazione e nella risposta immunitaria mediata da cellule T. IDO1 determina l'espansione di cellule T regolatorie (Tregs), limitando la risposta immunitaria nei confronti del tumore, e regola il metabolismo del triptofano (Trp). Dati recenti indicano che la deplezione del Trp ha un ruolo significativo nel determinare la crescita cellulare *versus* l'autofagia, sotto il controllo del principale regolatore del metabolismo mTOR. L'insieme di questi dati ci ha indotto a investigare la possibile cooperazione tra IDO1 e mTOR in una casistica di bambini con MB.

**Pazienti e Metodi.** Abbiamo testato l'espressione proteica di entrambe le molecole in 12 campioni di MB prelevati da pazienti seguiti presso il nostro Ospedale.

**Risultati.** Nell'83% dei campioni testati è stata evidenziata l'espressione di IDO1, mentre nel 50% dei campioni è stata documentata una espressione di mTOR

nella forma fosforilata. Inoltre nel 50% dei MB è stata evidenziata una doppia positività. Allo scopo di indagare l'interazione tra i due pathway, abbiamo analizzato una linea cellulare immortalizzata di MB (Daoy) *in vitro*. La riduzione di espressione di mTOR tramite trattamento con lo specifico inibitore rapamicina induce una significativa espressione di IDO1, che potrebbe indurre l'espansione di cellule Treg e limitare l'efficacia del trattamento. **Conclusioni.** Questi dati preliminari suggeriscono un nuovo meccanismo potenzialmente coinvolto nella resistenza dei MB ai trattamenti con inibitori di mTOR.

#### P-007

### CTL ANTITUMORALI AUTOLOGHI: UN NUOVO APPROCCIO PER LA TERAPIA CELLULARE ADOTTIVA NEI PAZIENTI AFFETTI DA OSTEOSARCOMA

M. Muraro, F. Sanavio, M. Leone, I. Ferrero, F. Fagioli

Laboratorio Centro Trapianti Cellule Staminali e Terapia Cellulare, Azienda Ospedaliera Città della Salute e della Scienza di Torino, Torino; Presidio Ospedale Infantile Regina Margherita, Torino, Italia

**Scopo.** L'immunoterapia adottiva con le cellule T è una valida opzione per i pazienti oncologici, ma sono necessari sistemi standardizzati per indurre un'efficace effetto antitumorale. Il nostro scopo è proporre una strategia efficace per la generazione e l'espansione *in vitro* di linfociti T citotossici(CTL)sarcoma-specifici generati con cellule tumorali primarie autologhe di pazienti con osteosarcoma e sarcoma di Ewing.

**Pazienti e Metodi.** Le cellule CD8+ sono state coltivate con le cellule dendritiche (DC) e cellule CD8- irradiate in presenza di interleukine IL-7, IL-12 e IL-15. I CTL sono stati espansi in modo antigene-indipendente in presenza di PBMC allogeneici irradiati. Sono stati valutati l'immunofenotipo (CD3+/CD8+) e il potenziale citotossico dei CTL autologhi, *in vitro*, contro le cellule tumorali autologhe. L'attività antitumorale dei CTL è stata valutata anche *in vivo* in topi NOD/ SCID.

**Risultati.** I CTL mostrato una specifica lisi delle cellule tumorali autologhe (circa 40%), paragonabile alla lisi di linee commerciali di osteosarcoma, usate come controllo. La specificità dei CTL è stata sottolineata dalla bassa lisi di PBMC allogeneici, a conferma che gli antigeni riconosciuti dai CTL sono solo gli antigeni tumorali e non gli allo-antigeni. Nessuna differenza significativa in termini di volume del tumore è stata rilevata tra il gruppo di topi trattati e quelli di controllo. Ciò

nonostante è stata registrata una tendenza verso l'inibizione della crescita del tumore. Sezioni di xenotrapianti trattati con i CTL sono stati analizzati in immunostochimica, mostrando un aspetto parzialmente necrotico con ridotta densità cellulare e proliferazione nella zona centrale delle sezioni.

**Conclusioni.** Abbiamo messo a punto un metodo di generazione ed espansione di CTL tumorali-autologhi per futuri protocolli di immunoterapia per i pazienti affetti da sarcoma. Il nostro studio dimostra che i CTL autologhi possono migliorare la reattività immunologica del paziente contro il tumore. Questi risultati preliminari forniscono un razionale per valutare l'efficacia clinica di questo approccio immunoterapico negli studi di fase I.

#### P-008

### DISTINCTIVE GENETIC PROFILE IN A RADIATION-INDUCED ANAPLASTIC ASTROCYTOMA

S. Mascelli,<sup>1</sup> M.L. Garrè,<sup>1</sup> K. Sak,<sup>2</sup> K. Joost,<sup>2</sup> A. Cama,<sup>1</sup> V. Capra,<sup>1</sup> P. Nozza,<sup>1</sup> A. Raso<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Giannina Gaslini, Genova, Italia; <sup>2</sup>Asper Biotechnology, Ltd, Tartu, Estonia

The genetic alterations, which could distinguish radiation-induced tumours from spontaneous ones, are still largely unknown. Herein we report on a more-in depth mutational screening on TP53, KRAS, CTNNB1, EGFR, PTEN, RB1, H3F3A and including the mismatch repair genes (MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2), of a previously reported radiation-induced anaplastic astrocytoma harbouring a IDH1-R132H mutation. As a control group, we extended the genetic analysis on a small series of primary high-grade gliomas (HGGs), which were treated at the Giannina Gaslini Institute, Children's Hospital between 1990 and 2009. We found further concurrent mutations in TP53 and MLH1 genes, which distinguished this case from the HGGs. This pattern of alterations suggests a possible new phenotype, produced by irradiation and driven by IDH1-R132H mutation, which could represent a diagnostic marker and a therapeutic target.

#### P-009

### ANALISI COMPARATIVA DI PROTEINE PLASMATICHE ASSOCIATE ALLA RICADUTA IN SOGGETTI PEDIATRICI AFFETTI DA LINFOMA DI HODGKIN

L. Martina,<sup>1</sup> O. Repetto,<sup>1</sup> L. Mussolin,<sup>2</sup> A. Todesco,<sup>4</sup> M. Pillon,<sup>4</sup> A. Sala,<sup>5</sup> M. Bianchi,<sup>6</sup> P. Bertolini,<sup>7</sup> S. Buffardi,<sup>8</sup> R. Burnelli,<sup>9</sup> R. Caruso,<sup>10</sup> C. Elia,<sup>3</sup>

M. Mascarini,<sup>3</sup> per il GdL AIEOP Linfoma di Hodgkin, V. De Re<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Core FacilityBioproteomica- BIT, CRO Aviano, PN; <sup>2</sup>Istituto di Ricerca Pediatrica-Fondazione Città della Speranza, Padova; <sup>3</sup>SS di Radioterapia Pediatrica CRO Aviano, PN; <sup>4</sup>Clinica di Oncoematologia Pediatrica, Azienda Ospedaliera-Università di Padova, Padova; <sup>5</sup>Unità di Oncoematologia Pediatrica, Dipartimento Pediatrico della Fondazione MBBM, Ospedale S. Gerardo, Monza, MB; <sup>6</sup>Unità di Oncoematologia Pediatrica, Ospedale Regina Margherita, Torino; <sup>7</sup>Unità di Oncoematologia Pediatrica, Azienda Ospedaliera-Universitaria di Parma, Parma; <sup>8</sup>Dipartimento di Oncologia Pediatrica, Ospedale Santobono-Pausillipon, Napoli; <sup>9</sup>Unità di Oncoematologia, Azienda Ospedaliera-Universitaria di Ferrara S. Anna, Ferrara; <sup>10</sup>Ospedale Bambino Gesù di Roma, Italia

Il linfoma di Hodgkin pediatrico (LH) è associato nella maggior parte dei casi ad una remissione completa della malattia a seguito dei trattamenti. In alcuni pazienti, sono noti fenomeni di ricaduta. In tale contesto, c'è un forte interesse nella comprensione delle basi molecolari associate alla risposta favorevole o sfavorevole al trattamento della malattia. La proteomica del plasma ha finora offerto un vantaggioso strumento analitico nella ricerca di potenziali marcatori prognostici in diverse patologie. Lo scopo di questo studio è stato confrontare i profili di espressione proteica ottenuti da plasmidi soggetti affetti da LH alla ricerca di potenziali marcatori prognostici. Tramite un approccio proteomico di tipo comparativo sono stati confrontati i plasmi, raccolti al momento della diagnosi, di 14 pazienti affetti da LH di età compresa tra 10 e 18 anni, selezionati per la presenza (n=8; R) o assenza (n=6; NR) di una ricaduta nell'arco di tempo medio di 3 anni dalla diagnosi. I profili proteici dei gruppi 'recidivati, R' versus 'non-recidivati, NR' sono stati confrontati. In particolare, gli estratti proteici sono stati marcati e separati tramite 'two dimensional difference gel electrophoresis, 2D DIGE', e le immagini dei gel ottenuti sono state analizzate tramite il software Decyder. Una analisi delle proteine differenzialmente espresse nei 2 gruppi in studio è in corso, così come la loro identificazione tramite spettrometria di massa MALDI-TOF. Le proteine saranno quindi valutate nel loro insieme per l'identificazione di vie di segnali alterate in associazione alle caratteristiche cliniche dei soggetti ed in particolare in relazione alla probabilità di ricaduta entro i primi 3 anni di follow-up.

## P-010

### ALLESTIMENTO E CARATTERIZZAZIONE DI LINEE TUMORALI PRIMARIE DI PAZIENTI PEDIATRICI AFFETTI DA TUMORI SOLIDI PER L'APPLICAZIONE DEL TRAPIANTO APOLOIDENTICO DI CSE

M. Comini,<sup>1</sup> F. Bolda,<sup>1</sup> A. Beghin,<sup>1</sup> C. D'Ippolito,<sup>2</sup> L. Ruggeri,<sup>3</sup> D. Alberti,<sup>4</sup> L. Bercich,<sup>5</sup> G. Carella,<sup>6</sup> F. Porta,<sup>2</sup> A. Caruso,<sup>7</sup> A. Lanfranchi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UO Microbiologia e Virologia, Sezione di Ematologia e Coagulazione, Laboratorio Cellule Staminali, Ospedale dei Bambini, Brescia; <sup>2</sup>UO Oncoematologia Pediatrica e Trapianto Midollo Osseo, Ospedale dei Bambini, Brescia; <sup>3</sup>Divisione di Ematologia ed Immunologia Clinica, Dipartimento di Medicina, Università di Perugia, Perugia; <sup>4</sup>UO Chirurgia Pediatrica, Ospedale dei Bambini, Brescia; <sup>5</sup>UO Anatomia e Istologia Patologica, Spedali Civili, Brescia; <sup>6</sup>UO Reumatologia e Immunologia Clinica, Spedali Civili, Brescia; <sup>7</sup>Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Medicina Molecolare e Trasazionale, Università di Brescia, Brescia, Italia

Il trapianto aploidentico di CSE rappresenta un possibile approccio immunologico per pazienti (pz) affetti da tumori solidi non responsivi alle terapie standard. Questo grazie alla reazione GvT mediata dal mismatch tra recettori KIR delle cellule NK del donatore e molecole HLA-I del ricevente. E' stato disegnato uno studio *in vitro* basato sull'allestimento di linee tumorali primarie paziente specifiche e la loro caratterizzazione immunoistochimica e citofluorimetrica. Le linee allestite rappresentano un importante modello citotossico di alloreattività mismatch KIR per testare la capacità di lisi delle cellule NK e per la scelta del miglior donatore alloreattivo. Sono stati arruolati 32 pz, 18M e 14F, con sospetto diagnostico di RMS(8/32), NB (12/32), ES(3/32), WT(6/32) e LH(3/32). I pz sono stati sottoposti a biopsia diagnostica o a chirurgia ablattiva e la diagnosi è stata confermata mediante analisi istologica e immunoistochimica. Sono state allestite 29 linee e valutate per immunoistochimica: 12 sono risultate neoplastiche (Cellule Tumorali >40%) e 17 non (CT <20%). Sono state caratterizzate in citofluorimetria 9 linee neoplastiche, 6 non neoplastiche e 3 immortalizzate (SJRH-RMS, IMR32-NB e SKNEP1-WT). L'analisi si è basata sull'utilizzo di marcatori emopoietici (CD45,34,14,56,HLA-DR) per discriminare tra tumori ematologici e non: l'espressione di CD45 <1% ha permesso di caratterizzare le linee come non ematologiche.

E' stata poi osservata un'elevata espressione di recettori di tipo mesenchimale (CD44,29,73,105,90,HLA-ABC) coinvolti fisiologicamente in processi come la migrazione o l'interazione cellulare, la proliferazione o il differenziamento; in CT esse vengono up-regolate e funzionano da regolatori positivi per la progressione tumorale e i processi di metastatizzazione. Infine sono stati valutati marcatori tumorali caratteristici (CD271,71,MIC-A/B,58,9,99,MYO,112,155) e, ove possibile, diagnostici (CD271,MYO,CD99) per le patologie evidenziando corrispondenza tra valutazione immunoistochimica e citofluorimetrica. La caratterizzazione è stata completata con CD31 marcatore endoteliale e CD133 staminale. I risultati mostrano come la citofluorimetria possa contribuire validamente alla caratterizzazione di linee tumorali *in vitro*. L'utilizzo corretto del modello potrebbe permettere di selezionare il miglior donatore con un'attività antitumorale il più possibile specifica ed efficace nell'ambito del trapianto aploidentico di CSE in pz pediatrici con tumori solidi ad alto e medio rischio.

## P-011

### GENERAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI DUE COLTURE PRIMARIE DI OSTEOSARCOMA E SARCOMA DI EWING'S

M. Muraro, F. Sanavio, S. Castiglia, D. Rustichelli, I. Ferrero, F. Fagioli

Laboratorio Centro Trapianti Cellule Staminali e Terapia Cellulare, Azienda Ospedaliera Città della Salute e della Scienza di Torino, Torino; Presidio Ospedale Infantile Regina Margherita, Torino, Italia

Scopo. Negli ultimi 30 anni la conoscenza clinica e l'esperienza nel trattamento delle neoplasie dell'osso sono cresciute esponenzialmente e l'osteosarcoma è uno dei tumori che maggiormente ha beneficiato di trattamenti integrati, registrando così un aumento della sopravvivenza dal 20% al 60% a cinque anni. La difficoltà nell'ottenere terapie specifiche per i sarcomi si può racchiudere nella perdita di specifici marker molecolari e nella ancora scarsa conoscenza dei meccanismi mediante i quali le cellule mesenchimali (MSC) vengono trasformate in cellule tumorali. Lo scopo principale del nostro studio è stato isolare, espandere e caratterizzare le cellule tumorali primarie di sarcomi a partire da biopsie chirurgiche o resezioni da pazienti pediatrici oncologici.

Pazienti e Metodi. Le cellule ottenute da biopsie o resezioni chirurgiche sono

state isolate mediante distruzione meccanica, coltivate in  $\alpha$ -MEM+10% lisato umano piastrinico. Le cellule primarie di osteosarcoma (OS) e sarcoma di Ewing's (EW) sono state valutate in termini di crescita; capacità differenziativa *in vitro* (in senso osteogenico, adipogenico e condrocitario); potenziale tumorigenico (saggio soft-agar); immunofenotipo (marcatori d'identità delle cellule MSC) e crescita tumorale *in vivo* in xenotrapianti.

**Risultati.** Le colture primarie OS e EW esprimono i marcatori mesenchimali (CD90, CD73, CD44 e CD105) tra il 70% - 99%. Le MSC, usate come cellule di controllo, differenziano in osteociti, adipociti e condrociti; OS mostra un potenziale differenziativo solo in senso osteocitico (presenza di matrice ossea), mentre EW non ha rivelato alcun potenziale differenziativo. La crescita delle cellule primarie è risultata maggiore in OS e EW rispetto alle MSC usate come controllo; la velocità di crescita è caratteristica di ciascuna cellula primaria. OS e EW formato colonie nel saggio soft-agar, mentre le MSC, come atteso, non producono colonie. Le cellule OS e EW sono state iniettate per via sottocutanea in topi NOD/SCID, sviluppando tumore.

**Conclusioni.** Siamo riusciti a stabilire due linee nuove, da due malattie rare, con caratteristiche mesenchimali e potenziale tumorigenico. Questo metodo può essere uno strumento utile per la caratterizzazione tumore-paziente-specifico e la conseguente sperimentazione di nuove terapie, quali i farmaci a bersaglio molecolare e l'immunoterapia.

## P-012

### ANESTESIA E SEDAZIONE IN RADIOTERAPIA ONCOLOGICA PEDIATRICA: ESPERIENZA DELL'AZIENDA OSPEDALIERA SANTOBONO-PAUSILIPON DI NAPOLI E DELL'AZIENDA OSPEDALIERA UNIVERSITARIA DI SALERNO

G. Cinalli,<sup>1</sup> L. Quaglietta,<sup>1</sup> S. Vetrella,<sup>1</sup> M. Capasso,<sup>1</sup> S. Ruotolo,<sup>1</sup> D. Di Gennaro,<sup>2</sup> G. Scimone,<sup>2</sup> B. Curcio,<sup>2</sup> S. Perciato,<sup>2</sup> L. Martucci,<sup>2</sup> D. Sofia,<sup>2</sup> G. De Angelis,<sup>2</sup> R. Albano,<sup>2</sup> P. Vajro<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Azienda Ospedaliera Santobono-Pausilipon di Napoli, Napoli; <sup>2</sup>Azienda Ospedaliera Universitaria di Salerno, Salerno, Italia

In Italia ogni anno si diagnosticano 1600 neoplasie pediatriche (200 in Campania) il 50% delle quali necessita di Radioterapia (RT). Nella nostra Azienda, dopo un accordo espletato con l'Azienda Santobono-Pausilipon si pratica RT in Anestesia a pazienti pediatriche: nel periodo 2009-2015 sono stati trattati 94 pazienti

pediatriche e 13 di essi hanno avuto necessità di anestesi con 226 sedute (media 18). 5 erano maschi ed 8 erano femmine con un'età che variava da 28 mesi a 13 anni. Il tipo istologico era: 2 Wilm's, 1 ALL, 1 Rhabdomyosarcoma, 4 neuroblastoma, 2 glioma, 1 ependimoma, 1 medulloblastoma, 1 melanoma. 5 pazienti hanno ricevuto Radioterapia Stereotassica, per 24 sedute su 7 CTV tumorali. La maggioranza dei centri di Radioterapia Pediatrica usa per l'anestesia il propofol I.V., che in Italia è un farmaco off-label nell'utilizzo pediatrico, e richiede necessariamente la presenza del CVC (Catetere Venoso Centrale), con conseguente rischio di infezioni che possono provocare la sospensione del ciclo radioterapeutico. Per l'anestesia è stato utilizzato un gas, il Sevoflurane USP, erogato alla percentuale del 6%, per l'induzione, e del 2% per il mantenimento, preceduto da una miscela di aria ed ossigeno al 50%. Soltanto 1 paziente (Melanoma leptomeningeo, con disseminazioni spinali multiple) ha sospeso la RT a causa di proressione di malattia, alla IV seduta; gli altri 12 pazienti hanno completato il ciclo senza interruzioni. Il tempo richiesto per le sedute di radioterapia è stato di 15 minuti, ed i bambini hanno ripreso conoscenza in circa 20 minuti dal termine dell'anestesia. La procedura ha richiesto 45-60 minuti. Non sono stati notati effetti collaterali, quali tremori incontrollati o problemi respiratori. A partire dall'Aprile 2013 è stato utilizzato in modo massiccio il TABLET, per assicurare un'adeguata sedazione ai bambini durante le sedute di Radioterapia, con proficui risultati. Infatti nel periodo 2009-2012 sono state praticate 9 procedure anestesiolgiche a 35 pazienti (25%), mentre nel periodo 2013 - 2015 solo 4 procedure a 64 pazienti (6%). Nella nostra esperienza, quindi, un'attento approccio psicologico al paziente oncologico pediatrico ha permesso di praticare in sicurezza e senza anestesi trattamenti anche molto complessi, come quelli di RT Stereotassica, mentre quando indispensabile, l'uso del gas anestetico Sevoflurane, preceduto da inalazione di ossigeno si è dimostrato sicuro, maneggevole, e privo di effetti collaterali.

## P-013

### TERAPIA T-CELLULARE JCV-SPECIFICA PER IL TRATTAMENTO DELLA LEUCOENCEFALOPATIA MULTIFOCALE PROGRESSIVA

G. Quartuccio,<sup>1,2</sup> I. Guido,<sup>1,2</sup> A. Gurrado,<sup>1,2</sup> A. Pellerano,<sup>1</sup> L. Rubert,<sup>1</sup> T. Mina,<sup>1</sup> A. Tolva,<sup>1</sup> E. Bergami,<sup>1</sup> S. Recupero,<sup>1</sup> R. Maccario,<sup>2</sup> M. Zecca,<sup>1</sup> P. Comoli,<sup>1,2</sup> S. Basso<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Pediatric Hematology/Oncology; <sup>2</sup>Cell Factory, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italy

**Introduzione.** La leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML), malattia demielinizzante del sistema nervoso centrale, si sviluppa in ospiti immunocompromessi a seguito di riattivazione del poliomavirus JC (JCV). La terapia antivirale ad oggi ha dimostrato efficacia limitata. Poiché in pz con AIDS la ricostituzione immunologica post-terapia antiretrovirale ha indotto risoluzione di PML, il trasferimento adottivo di cellule T JCV specifiche potrebbe permettere il controllo della malattia.

**Materiali e Metodi.** Abbiamo condotto esperimenti di scale-up per validare una metodica GMP di espansione di cellule T JCV-specifiche (LTC) da 8 donatori di TSCE e da 4 pazienti con PML. Dopo stimolazione di PBMC con un pool di peptidi 15-mer derivanti dalle proteine VP1 e LT, le linee sono state testate per potency in saggi ELISPOT e di citotossicità. Inoltre, sono stati eseguiti analisi fenotipica e saggi di sterilità.

**Risultati.** LTC sono state generate da 3 dei 4 pz e da 7 degli 8 donatori. Le LTC ottenute dai pz presentavano 57% cellule T CD8+ con 25% CD4+ e 7% CD3-CD56+, mentre quelle ottenute dai donatori includevano principalmente cellule T CD4+ (mediana 76%), con 13% CD8+ e 4% CD3-CD56+. Nelle linee erano presenti cellule VP1- e LT-specifiche producenti INFg (frequenza mediana pz: VP1, 1565 FU/106 cellule; LT, 1400 SFU/106 cellule; donatori: VP1, 827 SFU/106 cellule; LT, 718 SFU/106 cellule). Cinque delle 8 linee ottenute da donatori avevano attività citotossica specifica >10% (mediana di lisi 21% al rapporto effetto: target 10:1); solo 1 delle 4 espanso da pz mostrava lisi specifica >10% (25% al rapporto effetto: target 10:1). Le LTC sono risultate sterili. Due LTC (1 da donatore aploidentico e 1 autologa) sono state utilizzate per il trattamento di PML sviluppatasi dopo trattamento con rituximab per NHL e in deficit idiopatico di cellule CD4+ (CVID), rispettivamente. I pz, con malattia in progressione al momento del trattamento, hanno ricevuto infusioni di LTC (0.1 x 10<sup>5</sup> cells/kg per dose). Non sono stati registrati eventi avversi. Entrambi i pz hanno mostrato comparsa di risposte immuni cellulari JCV-specifiche post-trattamento, e clearance delle lesioni con recupero funzionale neurologico ad un follow-up mediano di 12 mesi.

**Conclusioni.** La terapia T cellulare con LTC JCV-specifiche è fattibile, ed *in vivo* ripristina l'immunità cellulare virus-specifica inducendo remissione clinica con ripristino funzionale neurologico in pazienti con PML.

P-014

### CREB BLOCCA IL DIFFERENZIAMENTO MIELOIDE E INDUCE L'INSORGENZA DI LEUCEMIA NELLO ZEBRAFISH ATTRAVERSO C/EBP

C. Tregnago,<sup>1</sup> E. Manara,<sup>2</sup> V. Bisio,<sup>1</sup> M. Zampini,<sup>2</sup> M. Pigazzi,<sup>1</sup> G. Basso<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino, Laboratorio di Onco-Ematologia Pediatrica, Università di Padova, Padova; <sup>2</sup>Istituto di Ricerca Pediatrica, Città della Speranza, Padova, Italia

**Scopo.** Il fattore di trascrizione cAMP response element binding protein (CREB) è un proto-oncogene sovra-espresso nel midollo dei pazienti affetti da leucemia acuta mieloide (LAM) alla diagnosi. Studi *in vitro* hanno dimostrato che la sua sovraespressione alterava i geni target e promuoveva la crescita e la sopravvivenza di cellule di midollo osseo sano, mentre il suo silenziamento in cellule leucemiche ne riduceva la proliferazione e la capacità clonogenica. Inoltre, topi transgenici sovra-esprimenti CREB sviluppavano un disordine mieloproliferativo dopo una latenza di 2 anni. Ad oggi il meccanismo di azione e i suoi principali target sono ancora ignoti. Lo scopo di questo studio è stato creare un modello *in vivo* di zebrafish sovra-esprimente CREB che riproduce la complessità ed il dinamismo del sistema ematopoietico umano per comprendere il ruolo di CREB nella leucemogenesi.

**Metodi.** Sono stati iniettati embrioni unicellulari di zebrafish con un plasmide esprimente CREB sotto il controllo del promotore mieloide pu.1. L'ematopoiesi primitiva è stata valutata mediante whole mount *in situ* hybridization (WISH) mentre nei pesci adulti è stato studiato il rene (organo ematopoietico) attraverso immunostochimica, citometria a flusso e analisi di espressione genica.

**Risultati.** La sovra-espressione di CREB ha indotto una perturbazione dell'ematopoiesi primitiva mediante alterazioni dell'espressione genica di pu.1, gata1 e mpo e dei principali target di CREB (blc2, jun). L'analisi delle cellule del rene nei pesci adulti a partire da 8 mesi ha mostrato un aumento di mielo-monociti a discapito delle altre popolazioni ematopoietiche. Da 9 a 13 mesi i pesci hanno sviluppato un fenotipo malato e sono stati sacrificati. Il 79% di questi (77/98) aveva una leucemia mieloide con infiltrazioni extra-midollari, caratterizzata da una popolazione predominante di monociti maturi e assenza di precursori, indicando un blocco differenziativo. 92 geni target di CREB erano differenzialmente espressi tra i pesci CREB e i controlli ed erano in grado di discriminare le LAM pediatriche. Tra questi C/EBP è stato

dimostrato provocare e sostenere il blocco differenziativo mieloide *in vitro*.

**Conclusioni.** Abbiamo dimostrato che la sola sovra-espressione di CREB è in grado di indurre la LAM *in vivo* tramite l'up-regolazione di C/EBP e il blocco del differenziamento mieloide. La somiglianza alla LAM pediatrica permetterà di sfruttare questo modello per studi di drug screening su larga scala.

P-015

### STUDIO DEL RUOLO DELL'ASSE CHERMERINA/CCRL2 NELLA PATOGENESI DELLA MALATTIA DEL TRAPIANTO VERSO L'OSPITE

D. Bardelli,<sup>1</sup> P. Vinci,<sup>1</sup> V. Fumagalli,<sup>1</sup> A. Del Prete,<sup>2</sup> S. Sozzani,<sup>2</sup> A. Biondi,<sup>1,3</sup> G. D'Amico<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro di Ricerca "M. Tettamanti", Università degli Studi di Milano Bicocca, Monza, MB; <sup>2</sup>Dipartimento di Patologia e Immunologia, Università degli Studi di Brescia, Brescia; <sup>3</sup>Clinica Pediatrica, Ospedale S. Gerardo, Monza, MB, Italia

**Scopo.** La malattia del trapianto verso l'ospite (GvHD) rappresenta una delle principali complicanze del trapianto di cellule staminali ematopoietiche, ad oggi terapia d'elezione per numerose patologie ematologiche e non, ed è caratterizzata da un'attivazione delle cellule T del donatore contro l'ospite. È noto come i leucociti siano richiamati a livello dei siti di infiammazione dalle chemochine, i cui recettori possono rappresentare nuovi target terapeutici. Chemerina è una proteina multifunzionale che lega diversi recettori, tra cui CCRL2. Questo recettore è espresso dall'endotelio e rappresenta un concentratore in grado di creare un gradiente localizzato di Chemerina, presentandola alle cellule infiammatorie. Scopo di questo lavoro è studiare il ruolo dell'asse Chemerina/CCRL2 nella patogenesi della GvHD, identificando un suo possibile coinvolgimento nella stessa.

**Metodi.** È stato messo a punto un modello murino di GvHD trapiantando cellule di midollo osseo e splenociti di topi Balb/C in topi riceventi C57Bl/6 Wild Type (WT) o CCRL2-/- irradiati letalmente. Gli animali sono stati monitorati giornalmente, valutando sopravvivenza, perdita di peso e determinando il grado di GvHD mediante le manifestazioni tipiche di malattia (integrità di pelo e cute, postura, mobilità e scariche diarroidiche).

**Risultati.** In seguito ad induzione della malattia, i topi CCRL2-/- manifestano una sopravvivenza più elevata rispetto al gruppo WT; in particolare la mortalità dei topi WT al giorno +51 è del 43% rispetto alla totale assenza di mortalità dei topi CCRL2-/. Inoltre i topi Knock Out presentano un

grado di malattia significativamente inferiore, con punteggi più bassi per postura, arruffamento del pelo, scariche diarroidiche e danni alla cute. In particolare modo, i topi CCRL2-/- sembrano essere fortemente protetti dalle manifestazioni cutanee della malattia, che risultano invece evidenti e molto severe nei topi WT, affetti da una GvHD più grave, con estesa perdita di pelo e lesioni cutanee.

**Conclusioni.** Questi dati preliminari mostrano che l'asse Chemerina/CCRL2 è coinvolto nello sviluppo della GvHD: l'assenza di CCRL2 sembra proteggere contro le manifestazioni cutanee della malattia. Studi successivi saranno necessari per comprendere il ruolo di questo recettore nella patogenesi della GVHD.

P-016

### L'ELEVATA ESPRESSIONE DI miR-223 È ASSOCIATA A UNA PROGNOSI SFAVOREVOLE NEL LINFOMA LINFOLASTICO T PEDIATRICO

E. Pomari,<sup>1</sup> F. Lovisa,<sup>1</sup> P. Bonvini,<sup>2</sup> E. Carraro,<sup>1</sup> E.S.G. d'Amore,<sup>3</sup> G. Basso,<sup>1</sup> M. Pillon,<sup>1</sup> L. Mussolin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Clinica di Oncoematologia Pediatrica, Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino, Azienda Ospedaliera-Università di Padova, Padova; <sup>2</sup>Istituto di Ricerca Pediatrica Fondazione Città della Speranza, Padova; <sup>3</sup>Dipartimento di Patologia, Ospedale San Bortolo, Vicenza, Italia

**Scopo.** Il linfoma linfoblastico T (LBL-T) rappresenta circa il 30% dei linfomi non-Hodgkin pediatrici e la sua prognosi non è ancora soddisfacente. Negli ultimi anni è stato dimostrato che le mutazioni di NOTCH1, FBXW7 possono rappresentare utili marcatori prognostici. Recentemente abbiamo identificato un profilo di espressione dei microRNA (miRs) specifico per il LBL-T pediatrico, suggerendo che alcuni miRs (tra cui miR-27a e miR-223) svolgano un ruolo importante nella patogenesi di questa neoplasia. Lo scopo di questo studio è stato di analizzare l'espressione di miR-223, miR-27a in una serie di LBL-T pediatrici in relazione allo stato mutazionale di NOTCH1 e alla prognosi.

**Pazienti e Metodi.** Tutti i pazienti sono stati trattati con schemi di terapia BFM (LNH-97 e EuroLB-02). L'espressione dei miR-27a e miR-223 è stata valutata nel tessuto tumorale mediante qRT-PCR; lo stato mutazionale di NOTCH1, FBXW7 è stato analizzato mediante sequenziamento Sanger e l'espressione proteica mediante western blotting. L'analisi statistica è stata eseguita usando il test Chi-quadro per verificare le associazioni e il coefficiente r di Spearman per misurare la correlazione.

**Risultati.** Lo studio è stato condotto su 44 biopsie tumorali di LBL-T. NOTCH1 è risultato mutato nel 43% dei casi (19/44), FBXW7 nel 6% (7/44). La valutazione dell'EFS ha confermato il ruolo prognostico positivo delle mutazioni attivanti di NOTCH1 ( $p < 0.05$ ). MiR-223 e miR-27a sono risultati up-regolati fino a 400 volte rispetto al tessuto timico normale e tra loro altamente correlati ( $r = 0.83$ ,  $p = 0.0001$ ). Abbiamo trovato livelli elevati di miR-223 nei pazienti NOTCH1wt, ossia con prognosi non favorevole ( $p = 0.006$ ). Inoltre, considerando solo il sottogruppo NOTCH1wt, l'espressione di miR-223 riesce a discriminare i casi con prognosi più severa ( $p = 0.02$ ): tutti i pazienti NOTCH1wt recidivati (8/17) presentavano livelli di miR-223 alti e proteina NOTCH1 inattiva, mentre i 9 pazienti NOTCH1wt con bassi livelli di miR-223 non hanno manifestato recidiva e presentavano proteina NOTCH1 attiva.

**Conclusioni.** Nei nuovi studi internazionali si stanno valutando una serie di parametri molecolari (NOTCH1, FBXW7) per la stratificazione dei pazienti per il trattamento del LBL-T. I nostri dati dimostrano che miR-223 potrebbe essere utilizzato per stratificare i pazienti NOTCH1wt.

#### P-017

### CARATTERIZZAZIONE IN VITRO DI UN PANNELLO DI MUTANTI DI AFFINITÀ DEL RECETTORE CHIMERICO ANTI-CD123 QUALE STRATEGIA POTENZIALE PER IL TRATTAMENTO DELLA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA PEDIATRICA

S. Arcangeli,<sup>1</sup> M. Bardelli,<sup>2</sup> S. Tettamanti,<sup>1</sup> M.C. Rotiroli,<sup>1</sup> L. Varani,<sup>2</sup> A. Biondi,<sup>1</sup> E. Biagi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Clinica Pediatrica, Università degli Studi di Milano Bicocca, Centro Ricerca "M. Tettamanti", Monza, MB, Italia; <sup>2</sup>Istituto di Ricerca in Biomedicina, Bellinzona, Università degli Studi della Svizzera Italiana, Lugano, Svizzera

Nell'ambito dell'immunoterapia cellulare adottiva, l'impiego di linfociti T modificati tramite recettori chimerici (CARs), al fine di renderli specifici contro un antigene tumorale, rappresenta una promettente strategia terapeutica per il trattamento della leucemia mieloide acuta (LMA). I CARs sono recettori T artificiali composti nella loro porzione extracellulare da domini di legame derivati da anticorpi, la cui affinità verso l'antigene bersaglio rappresenta una variabile capace di influenzare le risposte effettrici delle cellule T modificate. Nel contesto della LMA, il CD123 (subunità del recettore dell'IL-3) rappresenta un promettente antigene bersaglio, in

quanto overespresso su blasti leucemici e cellule staminali leucemiche, ma anche espresso a bassi livelli da cellule sane, quali monociti e cellule endoteliali. Il riconoscimento di tessuti sani debolmente positivi all'antigene bersaglio, attraverso un effetto noto come "on-target-off-organ", condiziona un impiego sicuro in clinica dei CARs. Abbiamo quindi considerato la modulazione dell'affinità di legame del CAR anti-CD123, al fine di migliorarne il profilo di sicurezza in termini di risparmio delle cellule sane e di mantenimento di un'ottima efficacia antitumorale. Cellule Killer Indotte da Citochine (CIK) sono state geneticamente modificate con tre mutanti di affinità, CAM-1, CAM-2 e CAM-4, generati tramite un'analisi di modellistica molecolare. Il profilo di efficacia/sicurezza delle cellule CIK-CAR+ è stato valutato attraverso saggi *in vitro* di citotossicità, produzione di citochine e proliferazione cellulare, usando come controllo CIK non manipolate. La caratterizzazione funzionale dei CAM ha rivelato la specificità e l'efficacia d'azione delle cellule CIK-CAR+ contro la linea cellulare CD123+ THP-1 e le cellule primarie di paziente. Inoltre, è stato riscontrato un maggiore risparmio della linea cellulare U937, debolmente CD123+, da parte del mutante CAM-2, a minore affinità, rispetto al recettore CAM-1 a più alta affinità. CAM-2 ha inoltre mostrato una diversa sensibilità nei confronti di una minore espressione antigenica, come suggerito dalla sua tendenza ad una ridotta proliferazione e produzione di citochine. Questi primi risultati indicano come la modulazione di affinità del CAR abbia un impatto sulle funzioni effettrici delle cellule ingegnerizzate, soprattutto in un contesto di ridotta densità antigenica, suggerendo un potenziale migliore risparmio dei tessuti normali da parte di CAM-2.

#### P-018

### LA MANCANZA DEL RECETTORE CHEMR23 INDUCE UNA SEVERA GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE (GVHD) INTESTINALE IN UN MODELLO MURINO DI GVHD ACUTA

P. Vinci,<sup>1</sup> C. Recordati,<sup>2</sup> D. Bardelli,<sup>1</sup> C. Cappuzzello,<sup>1</sup> A. Del Prete,<sup>3</sup> E. Dander,<sup>1</sup> S. Sozzani,<sup>3</sup> A. Biondi,<sup>1,4</sup> G. D'Amico,<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro di Ricerca Tettamanti, Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca, Monza, MB; <sup>2</sup>Mouse & Animal Pathology Laboratory, Fondazione Filarete, Milano; <sup>3</sup>Dipartimento di Patologia Generale e Immunologia, Università degli Studi di Brescia, Brescia; <sup>4</sup>Clinica Pediatrica,

Università di Milano-Bicocca, Fondazione MBBM/Ospedale S. Gerardo, Monza, MB, Italia

**Scopo.** La GvHD, rappresenta la maggiore causa di mortalità e morbilità in seguito a trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche. Il recettore accoppiato a proteine G ChemR23, espresso da diversi subset cellulari, è in grado sia di promuovere che di risolvere l'infiammazione. Scopo di questo lavoro è quindi comprendere il ruolo delle cellule ChemR23+ nella patogenesi della GvHD.

**Metodi.** A questo scopo, è stato messo a punto un modello murino di GvHD acuta in cui splenociti e cellule di midollo osseo, ottenute da topi C57BL/6 ChemR23 Knock Out (ChemR23<sup>-/-</sup>) o wild type (WT), sono state trapiantate in topi Balb/C riceventi dopo irradiazione. La GvHD è stata monitorata giornalmente, mentre settimanalmente sono stati espianati gli organi al fine di effettuare una valutazione istologica e molecolare.

**Risultati.** Gli animali trapiantati con cellule ChemR23<sup>-/-</sup> sviluppano una GvHD significativamente più severa rispetto ai topi trapiantati con cellule WT. In particolare, nei topi trapiantati con cellule ChemR23<sup>-/-</sup>, si osserva un significativo aumento nella perdita di peso associato a un drastico aumento del grado di diarrea. Questo risulta inoltre in un tasso di mortalità significativamente più elevato: dopo 28 giorni dal trapianto si osserva una mortalità dell'85% nei topi trapiantati con ChemR23<sup>-/-</sup> rispetto al 25% in quelli trapiantati con cellule WT. Le analisi istologiche condotte sul tratto gastro-enterico dei due gruppi sperimentali indicano che, 20 giorni dopo il trapianto, la sede di GvHD maggiormente coinvolta sia il colon, dove si osserva un forte ispessimento della mucosa delle cripte intestinali associato ad un elevato grado di colite. Mediante l'analisi dell'infiltrato infiammatorio, non si osservano variazioni significative nella quantità di linfociti e monociti infiltranti, mentre si osserva un significativo aumento di neutrofili nel colon dei topi trapiantati con ChemR23<sup>-/-</sup>. Questi risultati sono stati inoltre confermati dall'analisi molecolare dell'espressione di mieloperossidasi, in cui la sua espressione risulta tre volte superiore nel colon dei topi trapiantati con cellule ChemR23<sup>-/-</sup> rispetto ai topi trapiantati con cellule WT.

**Conclusioni.** Questi dati suggeriscono che l'asse Chemerina/ChemR23 sia in grado di regolare l'infiltrato di neutrofili a livello del colon, i quali potrebbero essere i responsabili del danno da GvHD intestinale. Ulteriori studi saranno necessari per comprendere il meccanismo alla base di tale fenomeno.

P-019

### ALTERAZIONI DELL' ESPRESSIONE DI GENI COINVOLTI NELLA REGOLAZIONE DEL CITOSCHELETRO IN PAZIENTI t(8;21) RIARRANGIATI CON PROGNOSI PIÙ SEVERA

E. Manara,<sup>1,2</sup> C. Tregnago,<sup>2</sup> M. Zampini,<sup>1,2</sup> F. Zonta,<sup>2</sup> V. Bisio,<sup>2</sup> F. Locatelli,<sup>3</sup> M. Pigazzi,<sup>2</sup> G. Basso<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Istituto di Ricerca Pediatrica - Città della Speranza, Padova; <sup>2</sup>Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino Oncoematologia Pediatrica, Università di Padova, Padova; <sup>3</sup>Oncoematologia Pediatrica, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italia

**Scopo.** La traslocazione t(8;21)AML1-ETO è una lesione ricorrente nella leucemia mieloide acuta (LMA) e caratterizza, se isolata, pazienti a rischio standard cioè trattati con la sola chemioterapia e considerati a buona prognosi. Dai risultati del protocollo AIEOP AML2002/01 la loro prognosi però è risultata peggiore dell'atteso (EFS=63% e CIR=30%), tanto che identificare nuovi meccanismi/parametri biologici dei pazienti con t(8;21) che hanno presentato un più alto rischio di incorrere in un fallimento della terapia risulta necessario.

**Metodi.** È stata eseguita l'analisi di espressione genica tramite array HTA 2.0 (Affymetrix) di campioni di midollo alla diagnosi con AML1-ETO (N=16), confrontando 1) i pazienti ricaduti (N=8) o non (N=8), e 2) pazienti che rispondono bene (N=7) o male (N=5) alla terapia di induzione valutata come riduzione di malattia residua minima molecolare. Studi funzionali *in vitro* quali silencing, apoptosi, proliferazione e test di migrazione sono stati eseguiti per validare il ruolo dei geni identificati.

**Risultati.** 18 geni differenzialmente espressi sono stati trovati dal confronto 1. Tra questi, i geni FNBP1L, linc00189, IL13RA1, KYNU, RHOB, FKBP5 overespressi nei pazienti recidivati fanno parte di pathway coinvolti nella riorganizzazione del citoscheletro e migrazione cellulare. Il silenziamento di questi geni in linee cellulari t(8;21)-riarrangiate (KASUMI1 e SKNO1) non ha indotto alterazioni significative della proliferazione, clonogenicità e apoptosi. Tuttavia, il silenziamento contemporaneo dei geni overespressi in combinazione con il trattamento con AraC ha aumentato significativamente l'apoptosi. Dal confronto 2 abbiamo identificato 23 geni differenzialmente espressi. Tra questi spicca DUSP1, già descritto avere un ruolo importante nella apoptosi via p38, e RHOB (in comune con il confronto 1), candidato a gene di primaria importanza nelle t(8;21) con probabilità

di non rispondere alla terapia e ricadere. Il silenziamento di RHOB, l'analisi di fosfoproteomica e di migrazione cellulare sono in corso per confermare questi dati. **Conclusioni.** I pazienti con t(8;21) che ricadono rispetto a quelli che rimangono in remissione continuativa hanno mostrato all'esordio un diverso profilo di espressione soprattutto di geni implicati nel riarrangiamento del citoscheletro, lasciando presupporre che le interazioni tra blasti e microambiente possano avere un ruolo chiave per eludere la chemioterapia e dare origine alla ricaduta.

P-020

### CARATTERIZZAZIONE DELLE TRASLOCAZIONI DEL GENE NUP98 NEI PAZIENTI AFFETTI DA LEUCEMIA ACUTA MIELOIDE ARRUOLATI NEL PROTOCOLLO AIEOP LAM-2002/ 01

V. Bisio,<sup>1</sup> M. Zampini,<sup>1,2</sup> E. Manara,<sup>1,2</sup> C. Tregnago,<sup>1</sup> R. Masetti,<sup>3</sup> M. Togni,<sup>3</sup> A. Astolfi,<sup>4</sup> C. Mecucci,<sup>5</sup> V. Zappavigna,<sup>6</sup> V. Salsi,<sup>6</sup> P. Merli,<sup>7</sup> C. Rizzari,<sup>8</sup> F. Fagioli,<sup>9</sup> F. Locatelli,<sup>7</sup> M. Pigazzi,<sup>1</sup> G. Basso<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino Oncoematologia Pediatrica, Università di Padova, Padova; <sup>2</sup>Istituto di Ricerca Pediatrica - Città della Speranza, Padova; <sup>3</sup>Dipartimento di Ematologia, Ospedale Sant'Orsola-Malpighi Oncologia-Ematologia Pediatrica 'Lalla Seragnoli', Bologna; <sup>4</sup>Centro Interdipartimentale per la Ricerca sul Cancro "G. Prodi", Università di Bologna, Bologna; <sup>5</sup>Unità di Ematologia e Trapianto di Midollo Osseo, Perugia; <sup>6</sup>Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena; <sup>7</sup>Oncoematologia Pediatrica, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Università di Pavia, Roma; <sup>8</sup>Dipartimento di Pediatria, Ospedale San Gerardo, Università di Milano-Bicocca, Monza, MB; <sup>9</sup>Oncoematologia Pediatrica, Ospedale Infantile "Regina Margherita", Torino, Italia

NUP98 è un gene noto traslocare nella leucemia mieloide acuta (LAM) con più di 30 partners. Questo studio si propone di identificare la frequenza delle fusioni di NUP98 nella corte di LAM italiana e di caratterizzarne il significato biologico. È stato eseguito uno screening molecolare di alcuni geni partners di NUP98 in 482 pazienti affetti da LAM *de novo* arruolati nel protocollo LAM AIEOP 2002/01. L'analisi di espressione genica (GEP) dei pazienti NUP98 traslocati e di altri pazienti rappresentativi della corte LAM è stata effettuata mediante array HTA 2.0 (Affymetrix). Abbiamo identificato 22/482 (4.6%) pazienti NUP98-traslocati con partners differenti. Questo sottogruppo di

pazienti ha mostrato una EFS significativamente peggiore (n=22, EFS a 8 anni=27%) rispetto al resto dei pazienti LAM (n=462, EFS=56%, p< 0.001). La GEP dei pazienti NUP98-riarrangiati mostra 740 geni differenzialmente espressi rispetto al resto delle LAM. Si distinguono oltre ai geni HOXA e B, geni implicati nel ciclo cellulare, nell'organizzazione della cromatina e dei cromosomi e nel traffico di membrana. L'analisi dei soli pazienti NUP98-riarrangiati ha evidenziato come ciascun partner presenti un tipico profilo di espressione correlato a un diverso andamento clinico. I pazienti NUP98-NSD1 e NUP98-JARID1A mostrano una prognosi molto severa (EFS=16.6% e 33.3% rispettivamente mentre i pazienti NUP98-PHF23 hanno un andamento migliore (EFS=75%, p=0.0357). LA GEP rivela il coinvolgimento di geni ribosomali e di geni implicati in processi di traduzione in pazienti NUP98-NSD1, al contrario i restanti 2 partners JARID1A e PHF23 mostrano, rispettivamente, una deregolazione nei processi legati all'omeostasi o alla risposta allo stress. Analisi per delineare il ruolo funzionale delle chimere di NUP98 ha rivelato la presenza a livello promotoriale di sequenze CRE (cAMP response element binding protein), indispensabili per il legame con il fattore di trascrizione CREB. In seguito è stato dimostrato come il gene NUP98 sia direttamente regolato da questo importante oncogene. In conclusione, abbiamo identificato un nuovo sottogruppo di LAM con frequenza non rara. Le chimere di NUP98 sembrano fortemente coinvolte nella deregolazione della divisione mitotica e nell'organizzazione dei cromosomi. Ulteriori analisi saranno necessarie per confermare il ruolo di CREB come driver di queste chimere al fine di poter individuare una terapia mirata in questo gruppo di pazienti a prognosi infausta.

P-021

### NUOVE OPPORTUNITÀ TERAPEUTICHE PER I PAZIENTI PEDIATRICI AFFETTI DA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA CON RIARRANGIAMENTO t(6;11)

C. Tregnago,<sup>1</sup> E. Manara,<sup>2</sup> F. Zonta,<sup>1</sup> M. Zampini,<sup>2</sup> V. Bisio,<sup>1</sup> M. Pigazzi,<sup>1</sup> G. Basso<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino, Laboratorio di Onco-Ematologia Pediatrica, Università di Padova, Padova; <sup>2</sup>Istituto di Ricerca Pediatrica, Città della Speranza, Padova, Italia

**Scopo.** Nella leucemia mieloide acuta (LAM) il riarrangiamento t(6;11)(q27;q23) MLL-AF6 contraddistingue un sottogruppo di pazienti a prognosi infausta.

Recentemente abbiamo dimostrato che la chimera MLL-AF6 sequestra la proteina citoplasmatica AF6 nel nucleo, comportando l'iperattivazione di RAS. Lo scopo di questo studio è identificare dei nuovi farmaci per questo sottotipo di leucemia attraverso lo screening di una libreria di 1280 composti farmacologicamente attivi (LOPAC library-Sigma Aldrich) comprendente farmaci già approvati dall'FDA, per incrementare la cura e la sopravvivenza di questi pazienti.

**Metodi.** Linee cellulari con traslocazione t(6;11) (ML2 e SHI) e colture primarie sono state trattate con i composti della libreria grazie ad un sistema robotico per massimizzare la riproducibilità ad una concentrazione di 10 M per 72 ore. Alterazioni della proliferazione sono state monitorate attraverso la variazione dei livelli di ATP.

**Risultati.** 186/1280 composti riducevano la proliferazione cellulare della linea cellulare ML-2 di più del 50%. Questi sono stati poi testati su SHI-1 avente la stessa traslocazione, e su linee leucemiche con traslocazioni diverse (THP-1, NOMO1, HL60). I composti efficaci selettivamente nelle due linee t(6;11) sono risultati essere 10/186. Questi 10 composti usati su cellule primarie derivanti dal midollo osseo di pazienti LAM-t(6;11) hanno confermato la loro efficacia nell'inibire la proliferazione cellulare. Due farmaci particolarmente attivi risultavano essere antagonisti dei recettori dopaminergici, aprendo nuovi scenari sulla trasduzione del segnale mediata da tali recettori nelle cellule MLL-AF6 traslocate. Analisi di citometria a flusso hanno poi dimostrato che sia le linee leucemiche, che le cellule primarie t(6;11) possiedono i recettori dopaminergici e la via attiva, confermando il potenziale ruolo di questi farmaci in queste leucemie.

**Conclusioni.** Questo lavoro ha permesso l'identificazione di 10 nuovi composti specifici per le cellule t(6;11) traslocate, che sono in via di valutazione al fine di migliorare la terapia di queste LAM a prognosi molto infausta.

## P-022

### LE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI ESPANSE IN VITRO SONO INDICE PREDITTIVO DI ATTECCIMENTO NEUTROFILO E PIASTRINICO E GRAFT VERSUS HOST DISEASE NEL TRAPIANTO DI MIDOLLO OSSEO IN PAZIENTI PEDIATRICI

K. Mareschi,<sup>1,2</sup> M. Berger,<sup>1</sup> S. Castiglia,<sup>1</sup> F. Sanavio,<sup>1</sup> D. Rustichelli,<sup>1</sup> A. Mandese,<sup>1</sup> F. Fagioli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>SC Oncoematologia Pediatrica, Laboratorio Centro Trapianti Cellule Staminali e

Terapia Cellulare, Azienda universitaria-ospedaliera Città della salute e della Scienza di Torino, Torino; <sup>2</sup>Dipartimento Scienze della Sanità Pubblica e Pediatriche, Università degli Studi di Torino, Torino, Italia

**Scopo.** Al fine di comprendere il ruolo delle Cellule Staminali Mesenchimali (CSM) nel trapianto di midollo osseo (TMO) è stato condotto uno studio retrospettivo mettendo in relazione il contenuto di CSM con l'attecchimento, la Graft vs Host Disease (GvHD), la mortalità trapianto correlata (TRM), l'incidenza di recidiva (RI) e la sopravvivenza globale (OS).

**Pazienti e Metodi.** Lo studio ha coinvolto un totale di 76 pazienti (pz) consecutivi sottoposti a TMO: 38 (50%) da donatore familiare e 38 (50%) da donatore non consanguineo. L'età mediana dei pz era di 9 anni (1-22) e la principale indicazione per il trapianto era la leucemia acuta (48 pz, 63%). 15 pz sono stati sottoposti a TMO per malattie non maligne. Tra i gruppi maligni, solo 17 pz hanno ricevuto trapianto in prima remissione completa (CR1, 28%). 59 pz (78%) hanno ricevuto un regime di condizionamento mieloablativo. Il contenuto di CSM nel BM infuso è stato misurato sulla base delle colonie formanti unità fibroblastiche (CFU-Fs), rapporto fra cellule staccate al primo passaggio e cellule piastrate (rate di crescita) ed espansione delle CSM al secondo passaggio calcolato come cumulative population doubling (cPDp2).

**Risultati.** L'età mediana dei donatori era di 25 anni (3-41) e il 60% (46) era di sesso maschile. Una mediana di 5x10<sup>8</sup> cellule totali nucleate (TNC)/kg (range 1,3-29,1) e 6x10<sup>6</sup> CD34+/kg (range 1,2-25,1) sono stati infusi ai pz. I valori mediani dell'attecchimento neutrofilico (AN) e piastrinico (AP) erano 21 (12-34) e 26 (13-191) giorni, rispettivamente; l'incidenza cumulativa (CI) di GVHD acuta II-IV è stata del 26% (95% CI, 18-38), mentre è stata del 6% (95% CI, 3-15) per GVHD III-IV e il 10% (95% CI, 5-20) per GVHD cronica. La TRM, RI e OS a 3 anni sono stati il 10% (95% CI, 5-20), 22% (95% CI, 15-34) e il 63% (95% CI, 48-78), rispettivamente. Analizzando le CSM espanse *in vitro* (cPDp2), i valori sono stati stratificati in quartili e abbiamo riscontrato una differenza significativa per la conta assoluta dell'AN e AP (P=0.04 e P=0,01 rispettivamente) e per l'incidenza di GvHD acuta di II-IV grado (P=0,02). È stata osservata una TRM inferiore nei pz con valori più elevati di cPDp2 (dati non significativi strettamente).

**Conclusioni.** Il nostro studio dimostra un ruolo significativo dal punto di vista statistico delle CSM espanse a breve termine nell'influire un AN e un AP più veloce e una ridotta incidenza di GvHD acuta di II-IV grado.

## P-023

### SVILUPPO DI UN VETTORE RETROVIRALE PER L'ESPRESSIONE DI UN RECETTORE TCR α-β SPECIFICO PER L'ANTIGENE TUMORALE PRAME

D. Orlando,<sup>1</sup> B. De Angelis,<sup>1</sup> I. Caruana,<sup>1</sup> D. Pagliara,<sup>1</sup> D. Barbato,<sup>1</sup> I. Boffa,<sup>1</sup> M. Guercio,<sup>1</sup> A. Mastronuzzi,<sup>1</sup> F. Locatelli,<sup>1,2</sup> C. Quintarelli<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma; <sup>2</sup>Università di Pavia, Pavia; <sup>3</sup>Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italia

**Introduzione.** Cellule T geneticamente modificate per esprimere uno specifico T cell receptor (TCR) sono un nuovo strumento immunoterapeutico capace di bersagliare e distruggere selettivamente cellule tumorali. Gli antigeni bersaglio per cellule T TCR-modificate sono proteine tumorali citoplasmatiche o di superficie, proteoliticamente degradate e presentate mediante HLA a cellule T specifiche. I Cancer Testis Antigens (CTA) sono proteine citoplasmatiche espresse nei tumori. Tra i vari CTA abbiamo considerato PRAME, la cui espressione è stata descritta in neoplasie solide ed ematologiche. Nel nostro studio abbiamo selezionato un nuovo TCR con alta affinità per PRAME, isolato da un paziente HLA-A2.01 affetto da Leucemia Mieloide Acuta, dopo allo-SCT.

**Scopo.** Ottimizzazione del vettore retrovirale esprime il TCR ab PRAME-specifico per indurre una elevata espressione delle catene e esogene in cellule T umane policlonali.

**Materiali e Metodi.** Abbiamo selezionato due cloni di cellule T aventi alta affinità per il riconoscimento di due peptidi PRAME-derivati (P300 e P425) ed identificato le sequenze delle catene e tramite 5'-RACE PCR. Le sequenze complete sono state modificate tramite ottimizzazione dei codoni e inserzione di un aa-Cys nelle loro regioni costanti, in associazione con una sequenza spacer e di taglio furinico (spacer). Il vettore retrovirale riporta inoltre in frame il gene suicida Caspasi9 inducibile. L'attività antitumorale delle cellule T TCR-modificate è stata valutata tramite saggi *in vitro*.

**Risultati.** Abbiamo esaminato i livelli di trasduzione dei TCR esogeni su linee cellulari SUP-T1 e cellule T geneticamente modificate con P300-TCR, P300-TCR-spacer, P425-TCR e P425-TCR-spacer. Nelle SUP-T1 non abbiamo osservato nessuna differenza statisticamente significativa nell'espressione dei TCR transgenici ma la presenza dello spacer è associata ad un'alta espressione della catena in cellule T OKT3/28 attivate (1.9±0.9volte; p value:0.03) ed un più alto livello di lega-

me tra le catene e del TCR esogeno, come mostrato dall'analisi mediante tetramero ( $2.3 \pm 1.5$  volte;  $p$  value: 0.02).

**Conclusioni.** Abbiamo dimostrato che l'aggiunta di una sequenza con funzione spaziatrice tra le catene e ottimizza l'espressione di TCR esogeni biologicamente attivi. Cellule T modificate mediante tali vettori retrovirali mostrano una efficace attività antitumorale con elevata applicabilità clinica.

#### P-024

### METODI ALTERNATIVI DI ISOLAMENTO DI CELLULE STROMALI MESENCHIMALI MIDOLLARI DA MATERIALE DI SCARTO

D.M. Ingo, A. Aiuti, M.E. Bernardo

*San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (TIGET), Pediatric Immunohematology and Bone Marrow Transplantation Unit, San Raffaele Scientific Institute, Milano, Italy*

**Scopo.** Le cellule stromali mesenchimali (MSCs) sono cellule multipotenti, che possono essere isolate da diversi tessuti. Il midollo osseo (MO) rappresenta la fonte maggiormente usata, anche se il prelievo presenta alcuni limiti, quali l'invivibilità e la ridotta quantità di tessuto prelevabile per un'adeguata espansione. Lo scopo del nostro lavoro è valutare la possibilità di isolare ed espandere MSCs da materiali di scarto, quali la porzione midollare immunodepleta di cellule stromali emopoietiche CD34+ (MO CD34-), e il liquido di lavaggio delle siringhe impiegate durante gli espianti di MO (wash-MO).

**Metodi.** Sono state isolate ed espanse *ex vivo* MSCs da entrambi i materiali di scarto derivanti da MO di donatori sani: 3 campioni di cellule mononucleate del MO dopo deplezione immunomagnetica delle cellule CD34+ (MSCs CD34-) e 2 campioni di wash-MO (wash-MSCs) trattati mediante separazione su gradiente di densità. Le MSCs sono caratterizzate per capacità clonogenica (CFU-F) e proliferativa (Population Doubling, PD), morfologia, immunofenotipo (citofluorimetria a flusso), potenzialità di differenziare *in vitro* in adipociti e osteoblasti, capacità immunomodulanti (inibizione della proliferazione linfocitaria indotta da PHA), capacità di supportare *in vitro* l'emopoiesi e senescenza. I risultati sono confrontati con MSCs ottenute da MO di donatori sani (HD-MSCs) isolate mediante separazione su ficoll dalle cellule mononucleate totali. **Risultati.** Siamo riusciti ad isolare MSCs da tutti e 5 i campioni. Le MSCs CD34- e le wash-MSCs risultano simili alle HD-MSCs per morfologia e immunofenotipo.

Nessuna differenza significativa è stata riscontrata nella capacità di differenziare *in vitro* in adipociti e osteoblasti. Mostrano invece un numero di CFU-F inferiore rispetto alle HD-MSCs (media $\pm$ DS/cellule mononucleate piastrate: wash-MSCs  $0.3 \pm 0.014/106$ , MSCs CD34-  $0.1 \pm 0.01/106$  e HD-MSCs  $0.84 \pm 0.007/106$ ). In termini di capacità proliferativa, impiegano un tempo maggiore a raggiungere la confluenza rispetto alle HD-MSCs. La valutazione della capacità di immunomodulare, di supportare l'emopoiesi e di entrare in senescenza sono in corso.

**Conclusioni.** Questi dati preliminari mostrano la possibilità di isolare ed espandere MSCs midollari da materiali di scarto. Tuttavia sono necessari ulteriori approfondimenti per comprendere se la ridotta capacità proliferativa e clonogenica di tali MSCs possa alterare o meno le loro proprietà funzionali rispetto alle HD-MSCs.

#### P-025

### L'ESPOSIZIONE A STRESS FISICI/CHIMICI NON ALTERA LE PROPRIETÀ FENOTIPICHE, FUNZIONALI E GENETICHE DELLE CELLULE MESENCHIMALI STROMALI ISOLATE DA MIDOLLO OSSEO DI DONATORI SANI

A. Conforti, S. Biagini, N. Starc, A. Pitisci, L. Tomao, M. Algeri, M.E. Bernardo, F. Locatelli

*Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italy*

**Scopo.** Le cellule mesenchimali stromali (MSCs) sono cellule multipotenti localizzate in vari tessuti umani, incluso il midollo osseo, in cui sostengono crescita e funzioni dei precursori emopoietici. È ormai dimostrato che l'esposizione del midollo osseo a radiazioni ionizzanti provoca la rapida deplezione dei progenitori emopoietici, ma ad oggi non sono ancora stati chiariti gli effetti dell'irradiazione sulla componente stromale del midollo. Inoltre, pur essendo stati pubblicati alcuni studi sulla capacità proliferativa delle MSCs in condizioni di carenza nutritiva, ad oggi non è stato ancora investigato il comportamento delle MSCs sottoposte a tale stress. Nel presente studio abbiamo esaminato il fenotipo, il potenziale differenziativo, le proprietà immunomodulatorie ed il profilo genetico delle MSCs sottoposte a stress fisico/chimico.

**Metodi.** Le MSCs sono state isolate da midollo osseo di 20 donatori sani (età media: 16 anni; range: 5-34) ed espanse in presenza di lisato piastrinico al 5% fino al passaggio 2. Successivamente le cellule sono state sottoposte sia a dosi crescenti di irradiazione (30, 100 e 200 Gy) sia a condizioni di carenza nutritiva

(terreno con lisato piastrinico all'1% anziché al 5%).

**Risultati.** La morfologia e la capacità proliferativa delle MSCs irradiate e poi sottoposte a carenza di fattori di crescita risultano modificate dall'induzione di stress fisici o chimici. In particolare, a dosi crescenti di irradiazione corrispondono un aumento della sofferenza cellulare ed un rallentamento/arresto della crescita cellulare. Tuttavia abbiamo osservato che, in presenza di lisato piastrinico all'1%, pur riscontrando lo stesso effetto, esso risulta meno accentuato, suggerendo che la carenza di fattori di crescita possa rallentare il processo di senescenza delle MSCs sottoposte a irradiazione. Le MSCs sottoposte a stress mantengono stessi immunofenotipo, capacità differenziativa in senso osteogenico ed adipogenico, e proprietà immunomodulanti delle MSCs non trattate. Infine, mediante array-CGH e cariotipo, non sono state rilevate traslocazioni né alterazioni nel corredo cromosomico.

**Conclusioni.** Questo lavoro dimostra che le MSCs umane isolate da midollo osseo e sottoposte a radiazioni ionizzanti e condizioni di carenza nutritiva, pur mostrando una morfologia alterata ed un rallentamento/arresto nella capacità proliferativa, mantengono fenotipo, proprietà funzionali e profilo genetico tipici delle MSCs non sottoposte a stress fisico/chimico.

#### P-026

### CARATTERIZZAZIONE BIOLOGICA E FUNZIONALE DELLE CELLULE MESENCHIMALI STROMALI ISOLATE DA MIDOLLO OSSEO DI PAZIENTI PEDIATRICI AFFETTI DA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA

L. Tomao, M. Algeri, N. Starc, S. Biagini, A. Pitisci, A. Conforti, M.E. Bernardo, F. Locatelli

*Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italy*

**Scopo.** Le cellule mesenchimali stromali (MSC) giocano un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi del microambiente midollare; ad oggi comunque non è noto se anomalie a carico di queste cellule possono o meno contribuire alla patogenesi della leucemia mieloide acuta (AML) in età pediatrica. Mediante questo studio sono state caratterizzate le MSC isolate da pazienti pediatriche affette da AML (AML-MSC) al momento della diagnosi, remissione e/o recidiva.

**Pazienti e Metodi.** Le MSC sono state isolate dal midollo osseo di 12 pazienti pediatriche affette da AML (età media: 9 anni; range: 1-15), alla diagnosi e/o al momento di un eventuale remissione o recidiva della patologia. A seguito di espansione *ex vivo*, sono stati analizzati la morfologia, la

capacità proliferativa, il profilo immunofenotipico, il potenziale differenziativo e le capacità immunomodulanti delle AML-MSc per confrontarli con quelli di MSc isolate da 10 donatori sani (HD-MSc; età media: 21 anni; range: 5-34).

**Risultati.** Mentre non sono state osservate differenze per quanto riguarda la morfologia, la capacità proliferativa ed il profilo immunofenotipico, le AML-MSc risultavano avere una maggior capacità di differenziare in senso adipogenico rispetto alle HD-MSc ( $p=0.05$ ). Le proprietà immunomodulanti delle MSc (attivate o meno con  $INF-\gamma$  e  $TNF-\alpha$ ) sono state valutate in un contesto allogenico (AML-MSc/HD-PBMC), misurando la proliferazione dei linfociti T indotta dalla PHA e quella dei linfociti B indotta dal CpG. Le AML-MSc non attivate sono state in grado di ridurre la proliferazione dei linfociti T dell' $85\pm 10\%$  (rapporto MSc/PBMC di 1:2) e del  $69\pm 15\%$  (MSc/PBMC 1:10), mentre per le HD-MSc la riduzione è stata rispettivamente del  $90\pm 3\%$  e dell' $81\pm 7\%$ . A seguito dell'attivazione delle MSc i tassi di inibizione sono risultati ancor più robusti, essendo dell' $88\pm 10\%$  e del  $77\pm 13\%$  per le AML-MSc e dell' $89\pm 12\%$  e dell' $84\pm 13\%$  per le HD-MSc (rapporto MSc/PBMC di 1:2 e 1:10 rispettivamente). L'inibizione della proliferazione dei linfociti B, invece, è stata ottenuta esclusivamente dopo l'attivazione delle MSc, ottenendo un tasso di inibizione dell' $87\pm 10\%$  per le AML-MSc e del  $90\pm 8\%$  per le HD-MSc.

**Conclusioni.** I nostri risultati dimostrano che, nonostante mostrino un aumentato potenziale adipogenico, le AML-MSc mantengono la morfologia, la capacità proliferativa, il profilo immunofenotipico e le proprietà immunomodulanti tipiche delle HD-MSc.

## P-027

### CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA E FUNZIONALE DI CELLULE MESENCHIMALI STROMALI ISOLATE DA MIDOLLO OSSEO DI PAZIENTI PEDIATRICI AFFETTI DA SINDROME NEFROSICA

N. Starc, A. Conforti, S. Biagini, L. Tomao, A. Pitisci, M. Algeri, M. Vivarelli, ME. Bernardo, F. Locatelli

Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italy

**Scopo.** Le cellule mesenchimali stromali (MSc) sono cellule multipotenti capaci di differenziare nei diversi stipi cellulari di origine mesodermica. Diversi studi hanno dimostrato che le MSc possiedono spiccate proprietà immunomodulatorie *in vitro*. Studi *in vivo* hanno dimostrato che la somministrazione di MSc determina un effetto anti-infiammatorio in diver-

se patologie, compresi modelli animali di patologie renali. Obiettivo di questo studio è valutare le proprietà biologiche e funzionali delle MSc isolate da midollo osseo di pazienti con sindrome nefrosica in vista di un potenziale futuro impiego terapeutico di MSc autologhe nei casi non responsivi alle terapie convenzionali. **Metodi.** Le MSc sono state isolate ed espanse *ex vivo* da 5 pazienti (SN-MSc, range 11-16 anni) affetti da sindrome nefrosica (2 cortico-resistente, 3 cortico-dipendente) e da 8 donatori sani (HD-MSc, range 5-40 anni). Morfologia, capacità proliferativa, immunofenotipo e capacità differenziativa in senso osteogenico ed adipogenico sono state analizzate. Le proprietà immunomodulanti sono state studiate in seguito a co-cultura di MSc con cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) isolate da soggetti sani (setting allogenico) e dai pazienti (setting autologo), stimolate con PHA e CpG al fine di valutare il loro effetto verso i linfociti T e B, rispettivamente.

**Risultati.** Le SN-MSc mantengono morfologia ed immunofenotipo tipici delle HD-MSc, sebbene abbiamo mostrato una ridotta capacità proliferativa rispetto alle HD-MSc. Le SN-MSc mantengono la capacità di inibire la proliferazione dei linfociti T, con una percentuale di inibizione del  $73\%$  ( $SD\pm 11$ ) (ratio MSc:PBMC 1:2) e del  $66\%$  ( $SD\pm 14$ ) (ratio 1:10) nel setting allogenico rispetto al  $78\%$  ( $SD\pm 15$ ) e  $68\%$  ( $SD\pm 9$ ) delle HD-MSc, mentre nel setting autologo l'inibizione è pari all' $83\%$  e  $73\%$  (SN-MSc/HD-PBMC 1:2 e 1:10 rispettivamente). Le SN-MSc mantengono la capacità di inibire la proliferazione dei linfociti B e il loro differenziamento in plasmacellule in maniera paragonabile alle HD-MSc. Le SN-MSc mostrano una diminuzione della capacità di differenziare in senso adipogenico ed in senso osteogenico rispetto alle HD-MSc.

**Conclusioni.** I nostri risultati dimostrano che le MSc isolate da pazienti con sindrome nefrosica mantengono sostanzialmente le stesse caratteristiche morfologiche e funzionali delle MSc isolate da soggetti sani, fatta eccezione per la loro capacità proliferativa e differenziativa che risulta essere ridotta.

## P-028

### STR-PCR COME METODO DI ELEZIONE PER L'ANALISI DEL CHIMERISMO POST TRAPIANTO ALLOGENICO DI CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE: L'ESPERIENZA DI UN CENTRO PEDIATRICO

D. Di Martino,<sup>1</sup> M. Di Duca,<sup>2</sup> M.P. Terranova,<sup>3</sup> M. Faraci,<sup>4</sup> S. Giardino,<sup>4</sup> G. Morreale,<sup>4</sup> E. Lanino<sup>4</sup>

<sup>1</sup>UOC Laboratorio Cellule Staminali Post Natali e Terapie Cellulari; <sup>2</sup>UOC Nefrologia, Dialisi e Trapianto; <sup>3</sup>UOC Oncologia, Ematologia e Trapianto di Midollo; <sup>4</sup>UOSD Centro Trapianto di Midollo Osseo, IRCCS Gaslini, Genova, Italia

**Scopo.** Il termine Chimerismo Completo (CC) indica la presenza dopo trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (TCSE), di cellule del sangue periferico e midollare solo di origine del donatore mentre per Chimerismo Misto (CM) si intende la presenza in proporzioni diverse di cellule del donatore e del paziente. I nostri scopi sono: 1) confermare che l'analisi del chimerismo è utile per accertare l'attecchimento del TCSE, per valutare i primi segnali di rigetto o di ricaduta di malattia e per monitorare la malattia residua minima; 2) dimostrare che l' STR-PCR è un valido e affidabile metodo.

**Pazienti e Metodi.** Il chimerismo di 221 bambini sottoposti a TCSE presso il nostro Centro Trapianto, è stato monitorato all'attecchimento, 30, 60, 100, 180 e 365 giorni. Per 27/115 bambini che presentavano un CM è stato studiato il chimerismo delle sottopopolazioni ematologiche T,NK,B e monociti. L'analisi genetica di 9 loci short tandem repeats (STRs) del DNA è stata effettuata mediante multiplex PCR, utilizzando l'AmpFISTR Profiler Plus Kit (Applied Biosystems) mentre per la separazione delle sottopopolazioni cellulari è stato utilizzato il sistema con colonne MACS (Miltenyibiotec.com).

**Risultati.** 106/221(48%) pazienti presentano un CC, mentre 115/221(52%) presentano un CM su prelievo di sangue periferico e midollare. Dei 115 bambini con CM post trapianto, 68(59%) mostrano un Chimerismo Misto Transitorio (CMT), 19(17%) un Chimerismo Misto Stabile (CMS) e 28(24%) un Chimerismo Misto Progressivo (CMP). 68/120 pazienti trapiantati per malattie neoplastiche presentano un CC, normalmente associato a un aumentato rischio di Graft versus Host Disease (GvHD) anche per i 38/101 pazienti trapiantati per malattie non neoplastiche. Mentre il CMT è associato a un buon outcome e riduce il rischio di GvHD, il CMP è associato ad aumentato rischio di ricaduta nelle malattie neoplastiche e di rigetto nelle non neoplastiche. Il CMS è presente nelle patologie non neoplastiche e normalmente è associato a un buon outcome. Studi statistici sono in programma.

**Conclusioni.** Lo studio del chimerismo può quindi evidenziare lo stato di attecchimento del trapianto, l'eventuale rigetto del trapianto stesso o una ricaduta di malattia. E' quindi in grado di fornire informazioni importanti sul buon esito della procedura, supportando la scelta di

interventi terapeutici post trapianto. Il metodo STR-PCR rimane un valido metodo di studio nel monitoraggio del chimerismo post TCSE allogenico.

#### P-029

### CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE ED IMPLICAZIONI CLINICHE DELLE MUTAZIONI NEL GENE ABCB6 NELLA PSEUDOIPERKALEMIA FAMILIARE

I. Andolfo,<sup>1,2</sup> R. Russo,<sup>1,2</sup> S.L. Alper,<sup>3</sup>  
F. Manna,<sup>1,2</sup> M. L. Salve,<sup>1,2</sup>  
L. De Franceschi,<sup>4</sup> A. Iolascon<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli "Federico II" Napoli, Napoli, Italia; <sup>2</sup>CEINGE, Biotecnologie Avanzate, Napoli, Italia; <sup>3</sup>Division of Nephrology, Beth Israel Deaconess Medical Center; Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston, MA, USA; <sup>4</sup>Department of Medicine, University of Verona, Verona, Italia

**Scopo.** La Pseudoiperkalemia familiare isolata (FP) è un difetto ereditario della permeabilità di membrana del globulo rosso. Si caratterizza per un flusso passivo del K<sup>+</sup> all'esterno del globulo rosso. I pazienti mostrano alterazioni dell'MCV ed aumento della concentrazione plasmatica del K<sup>+</sup> quando il prelievo di sangue viene posto a temperature inferiori a quella corporea (Stewart GW, et al., 1979). Recentemente, è stato identificato il gene causativo, ABCB6, che codifica per un trasportatore della famiglia ABC (Andolfo I. et al., 2013). In questo lavoro abbiamo analizzato tre nuove famiglie caratterizzandone per la prima volta il meccanismo patogenetico e studiandone le possibili implicazioni sulle trasfusioni di sangue.

**Pazienti e Metodi.** La ricerca delle mutazioni è stata effettuata tramite sequenziamento diretto del gene ABCB6. Il cDNA di ABCB6 è stato clonato nel vettore di espressione pcDNA3.1 inserendo in seguito, tramite mutagenesi sito-diretta, le nuove mutazioni identificate nei pazienti analizzati. I costrutti sono stati poi trasfettati nella linea HEK-293 e dopo 72h le cellule sono state incubate in un mezzo di efflusso contenente rubidio come tracciante del K<sup>+</sup>. Il Rubidio è stato poi determinato nel lisato cellulare ed il K<sup>+</sup> nel mezzo extracellulare tramite spettrometria di assorbimento atomico.

**Risultati.** Nei pazienti analizzati abbiamo identificato le seguenti mutazioni: nel paziente Bolivian c.1361T>C, p.V454A in stato di omozigosi; nel paziente Cardiff c.826G>T, p. R276W e c.2168G>A, p.R723Q in trans; nei pazienti Ireland c.826G>T, p. R276W in stato di eterozigosi. Tutte queste mutazioni sono annotate in database

di varianti di singolo nucleotide, suggerendo che questi pazienti possono essere presenti nella popolazione di donatori di sangue. Tutte le mutazioni identificate finora: V454A, R276W, R723Q, R375Q e R375W sono state espresse nella linea cellulare HEK-293. Lo studio del flusso cationico ha mostrato un maggiore efflusso di potassio nelle cellule esprimenti ABCB6 mutato rispetto a quelle esprimenti ABCB6 WT. In particolare, le mutazioni bialleliche R276W/R723Q hanno mostrato un maggiore efflusso di potassio rispetto agli altri mutanti.

**Conclusioni.** Mutazioni missenso in ABCB6 causano efflusso di potassio come esibito dai pazienti con FP. La prevalenza di tale patologia potrebbe essere sottostimata poiché i pazienti con FP sono asintomatici e potrebbero, inoltre, essere presenti nella popolazione di donatori di sangue.

#### P-030

### STUDIO DELLA MIELOPOIESI NELLA NEUTROPENIA CRONICA AUTOIMMUNE IN ETÀ PEDIATRICA

F. Timeus,<sup>1</sup> N. Crescenzo,<sup>2</sup> A. Doria,<sup>2</sup>  
L. Foglia,<sup>2</sup> S. Pagliano,<sup>2</sup> M. G. Stillitano,<sup>2</sup>  
E. Garelli,<sup>2</sup> L. Vivalda,<sup>2</sup> R. Mazzone,<sup>3</sup>  
S. Vallero,<sup>1</sup> L. Farinasso,<sup>2</sup> U. Ramenghi,<sup>2</sup>  
P. Saracco<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Onco-Ematologia Pediatrica; <sup>2</sup>Ematologia Pediatrica; <sup>3</sup>Patologia Clinica Pediatrica, Città della Salute e della Scienza, Presidio O.I.R.M., -Torino, Italia

**Scopo del lavoro.** Valutazione della mielopoiesi in pazienti pediatriche con neutropenia cronica autoimmune.

**Pazienti e Metodi.** 66 pazienti (36 maschi, 30 femmine). Alla diagnosi: età mediana 11 mesi (3-192), conta mediana dei neutrofili 419/1 (10-990). Follow up mediana 29 mesi (7-180). Morfologia e test clonogenici su aspirato midollare in 41 pazienti. Colorazione con May Grunwald-Giemsa, esaminate almeno 1000 cellule nucleate. CFU-GM e CFU-G: stimolo standard con GM-CSF 20 ng/ml e IL-3 10 ng/ml; G-CSF 10 ng/ml. Conta e indice apoptotico dei progenitori emopoietici CD34<sup>+</sup> circolanti in 55 pazienti: analisi citofluorimetrica in tripla fluorescenza per CD34, CD45, Annessina V. Analisi statistica: Pearson 2, curve Kaplan-Meier.

**Risultati.** Remissione spontanea in 47 pazienti (mediana 29 mesi, range 7-120). Infezioni severe durante il follow up in 22 pazienti (33%). Trattamento con G-CSF saltuario in 11 casi, continuativo in 3 a causa di infezioni ricorrenti. Citopenia refrattaria senza alterazioni citogenetiche in un paziente 11 anni dopo la diagnosi. Midollo ipocellulare e/o con arresto maturativo in 14 pazienti (34%).

Modesti segni di displasia mieloide in 5 pazienti (12%). Riduzione delle CFU-GM in 27/37 pazienti (73%) e delle CFU-G in 26/37 (70%). In 36 pazienti (65%) conta assoluta delle CD34<sup>+</sup> ridotta, con aumento dell'indice apoptotico in 28 (51%). In tutti i casi trattati con G-CSF incremento dei neutrofili, mentre le CD34<sup>+</sup> circolanti aumentano solo nel 50%. Tutti i pazienti con ridotte CFU-G presentano normale risposta al G-CSF *in vivo*. L'incidenza di infezioni severe correla significativamente sia con la presenza di segni di displasia (Pearson 2, p=0.007) che con la riduzione dei progenitori CD34<sup>+</sup> circolanti e con l'aumento dell'indice apoptotico (Pearson 2, p=0.039). I pazienti con displasia midollare evidenziano (sebbene ai limiti della significatività statistica) una minor probabilità di risoluzione della neutropenia (Kaplan Meier, p=0.07).

**Conclusioni.** A differenza da quanto riportato in letteratura, un significativo numero di pazienti presenta una mielopoiesi difettiva o alterata, associata a una maggiore incidenza di infezioni severe. Di rilievo il riscontro di una mobilitazione delle CD34<sup>+</sup> ridotta nei pazienti trattati con G-CSF. Una possibile spiegazione è l'ipotesi di un danno immuno-mediato a carico dei precursori mieloidi. La possibilità di evoluzione mielodisplastica, suggerisce l'importanza di un'attenta sorveglianza in tali pazienti.

#### P-031

### TRATTAMENTO DELLE LEUCEMIE ACUTE MEDIATO DA LINFOCITI INGEGNERIZZATI CON I RECETTORI CHIMERICI TRAMITE IL SISTEMA TRASPOSONE SLEEPING BEAUTY

C.F. Magnani,<sup>1</sup> N. Turazzi,<sup>1</sup>  
F. Benedicenti,<sup>2</sup> A. Calabria,<sup>2</sup>  
E. Tenderini,<sup>2</sup> S. Tettamanti,<sup>1</sup>  
G.M.P. Giordano Attianese,<sup>1,3</sup>  
L.J.N. Cooper,<sup>3</sup> A. Aiuti,<sup>2</sup> E. Montini,<sup>2</sup>  
A. Biondi,<sup>1</sup> E. Biagi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Ricerca Tettamanti, Clinica Pediatrica, Università Milano Bicocca, Osp. San Gerardo, Fondazione MBBM, Monza, MB, Italia; <sup>2</sup>San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (HSR-TIGET), San Raffaele Scientific Institute, Milano, Italia; <sup>3</sup>University of Texas, MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA

**Scopo.** L'immunoterapia adottiva mediata da cellule T effettrici ingegnerizzate con recettori chimerici (CAR) risulta essere un'opzione terapeutica emergente nel contesto delle malattie oncologiche. Tuttavia, il successo terapeutico di tali cellule ingegnerizzate con i CAR dipende strettamente dall'ottimizzazione di diver-

si parametri critici relativi agli aspetti di produzione e di terapia genica. In questo contesto, l'uso ex-vivo del sistema di trasferimento genico trasposone-mediato Sleeping Beauty (SB) rappresenta una valida alternativa ai vettori virali per la terapia genica nell'ambito della sperimentazione clinica.

**Pazienti e Metodi.** Allo scopo di sviluppare un protocollo di terapia genica facilmente trasferibile in clinica, abbiamo utilizzato nucleofezione del sistema SB e un protocollo di stimolazione ottimizzato per generare cellule killer indotte da citochine (CIK) ingegnerizzate per esprimere i CAR di 3° generazione per la leucemia mieloide acuta (LAM) CD123+ e per la leucemia linfoblastica acuta (LLA) CD19+. Il protocollo di differenziamento prevede una singola stimolazione ed è stato prodotto in accordo con quanto previsto per la produzione di prodotti cellulari utilizzati in protocolli clinici (GMP, Good Manufacturing Practices).

**Risultati.** Abbiamo ottenuto un'espressione media del CAR a fine differenziamento pari a 58.1%±2.7 (n=13) e 59.7%±5.1 (n=9), per il CD123.CAR e il CD19.CAR, rispettivamente. Tale protocollo di stimolazione accoppiato alla nucleofezione influenza in modo minimo il fenotipo a fine differenziamento, preservando le popolazioni memoria, e risulta in un'espansione di cellule T, efficiente abbastanza per supportare l'applicazione clinica. Le cellule CIK modificate lisano efficacemente le cellule bersaglio di LAM e LLA e mostrano secrezione di citochine e proliferazione CAR-specifica. Il trasferimento adottivo di cellule CIK CD123.CAR o CD19.CAR determina una risposta antitumorale efficace contro modelli di xenotrapianto di LAM e LLA in topi NSG. Inoltre, non si riscontra alcuna prova di arricchimento di integrazioni vicino a geni legati al cancro e di espressione dell'enzima trasposasi al termine del processo di differenziamento.

**Conclusioni.** In conclusione, i nostri risultati descrivono un metodo non-virale per la produzione di cellule CIK ingegnerizzate con i CAR che potrebbe ampliare la possibilità di applicazione di approcci di immunoterapia per la cura delle forme più aggressive di LMA e LLA infantile.

### P-032

#### ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DI CELLULE MESENCHIMALI STROMALI DA PAZIENTI PEDIATRICI CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA DI TIPO B

F. Portale,<sup>1</sup> L. Beneforti,<sup>1</sup> C. Palmi,<sup>1</sup> G. Cazzaniga,<sup>1</sup> A. Biondi,<sup>1,2</sup> E. Dander,<sup>1\*</sup> G. D'Amico<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro Ricerca "M. Tettamanti", Clinica

*Pediatrica, Università di Milano-Bicocca, Monza, MB; <sup>2</sup>Fondazione MBBM, Ospedale San Gerardo, Monza, MB, Italia*  
\*co-last authors

**Scopo.** Studi recenti dimostrano l'importanza del microambiente nello sviluppo e progressione delle neoplasie ematologiche. L'identificazione di fattori chiave, coinvolti nel cross-talk fra cellule leucemiche e cellule stromali mesenchimali midollari (MSC), rappresenta un passo fondamentale per interferire con l'ambiente protettivo della nicchia midollare. A tal fine, linee di MSC sono state isolate da pazienti pediatrici alla diagnosi di Leucemia Linfoblastica Acuta di tipo B (B-ALL) e caratterizzate fenotipicamente e funzionalmente.

**Pazienti e Metodi.** Le MSC sono state isolate a partire dalle cellule mononucleate midollari di 10 pazienti pediatrici con B-ALL (5 non-traslocati, alto rischio; 5 t(12;21)) e da 6 donatori sani (HD). Al quarto passaggio di coltura in DMEM low glucose 10% FCS, le MSC sono state caratterizzate a livello fenotipico (analisi FACS) e funzionale (potenziale di differenziamento adipogenico ed osteogenico). Il rilascio proteico è invece stato valutato mediante array.

**Risultati.** Le linee di MSC ottenute da HD e da pazienti con B-ALL, sono apparse morfologicamente paragonabili. A livello di immunofenotipo, sono risultate tutte positive per i marcatori mesenchimali CD73, CD90 e CD105, e negative per quelli ematopoietici quali CD14, CD34, CD45 e MHC-II. Le MSC da HD e da pazienti B-ALL sono state inoltre in grado di differenziare, dopo l'esposizione ad opportuni stimoli, in senso adipogenico ed osteogenico, come evidenziato mediante marcatura con il colorante lipofilico Oil Red O e mediante colorazione con Alizarin Red dei depositi di calcio. L'analisi funzionale a livello del secretoma ha invece evidenziato delle differenze in termini di rilascio proteico da parte delle MSC di pazienti B-ALL, attualmente in corso di validazione.

**Conclusioni.** Recenti evidenze supportano il ruolo centrale delle MSC a livello della nicchia midollare, sia nel sostegno dell'ematopoiesi fisiologica, sia in quello delle cellule leucemiche. MSC isolate all'esordio di malattia da pazienti con B-ALL sono risultate comparabili a livello morfologico, fenotipico ed in termini di potenziale differenziativo. Tuttavia, analisi preliminari evidenziano delle alterazioni in termini di secrezione proteica, attualmente in corso di validazione. La caratterizzazione delle MSC dal punto di vista del rilascio proteico è un passaggio essenziale per l'identificazione di pathways cellulari alterati, sfruttabili per lo sviluppo di terapie mirate a colpire la nicchia leucemica.

### P-033

#### LE MUTAZIONI IN BCR-ABL1 NON SONO IL MECCANISMO PRINCIPALE DI RESISTENZA A IMATINIB NEI PAZIENTI PEDIATRICI AFFETTI DA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA PHILADELPHIA POSITIVA

V. Cazzaniga,<sup>1,2\*</sup> P. De Lorenzo,<sup>3</sup> F. Mottadelli,<sup>1</sup> G. Fazio,<sup>1</sup> M. B. Mansur,<sup>2</sup> V. Rossi,<sup>1</sup> M. Zecca,<sup>4</sup> E. Barisone,<sup>5</sup> F. Locatelli,<sup>6</sup> G. Basso,<sup>7</sup> M.G. Valsecchi,<sup>3</sup> M.F. Greaves,<sup>2</sup> A. Biondi,<sup>1</sup> A. Ford,<sup>2</sup> G. Cazzaniga<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Ricerca Tettamanti, Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca, Fondazione MBBM/Ospedale S. Gerardo, Monza, MB, Italia; <sup>2</sup>The Institute of Cancer Research, Centre for Evolution and Cancer, Division of Molecular Pathology, London, UK; <sup>3</sup>Centro Operativo di Ricerca Statistica, Dipartimento di Scienze della Salute, Università di Milano-Bicocca, Monza, MB, Italia; <sup>4</sup>Oncoematologia Pediatrica, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia; <sup>5</sup>Emato-Oncologia Pediatrica, Ospedale Infantile Regina Margherita, Torino, Italia; <sup>6</sup>Emato-Oncologia Pediatrica, IRCCS Ospedale Bambino Gesù, Roma, Italia; <sup>7</sup>Dipartimento della Salute della Donna e il Bambino, Università di Padova, Padova

\*current address

**Introduzione.** La leucemia linfoblastica acuta Philadelphia positiva (LLA Ph+) è caratterizzata dalla traslocazione t(9;22), che porta alla formazione del gene di fusione BCR-ABL1. Rappresenta il 2-3% di tutte le LLA pediatriche ed è associata a prognosi sfavorevole. Nonostante l'introduzione di inibitori delle tirosin chinasi (TKI), quali Imatinib, abbia notevolmente migliorato l'outcome, ancora un numero considerevole di pazienti ricade mostrando resistenza a tali inibitori. Negli adulti, mutazioni del dominio tirosin chinasi (TKD) di BCR-ABL1 sono associate a più del 70% di ricadute durante la terapia con TKI.

**Scopo.** Per comprendere lo sviluppo di resistenza ad Imatinib, abbiamo analizzato la presenza di mutazioni di ABL1 alla ricaduta di malattia. Inoltre, abbiamo indagato la presenza di alterazioni genomiche secondarie e il loro contributo all'evoluzione clonale.

**Pazienti e Metodi.** La coorte analizzata è composta da pazienti ricaduti durante trattamento con Imatinib (n=10) e arruolati in Italia dal 2004 al 2014 nel trial clinico EsPhALL. Il materiale raccolto da aspirato midollare è stato analizzato per mutazioni in BCR-ABL1; la tecnica MLPA è stata utilizzata per indagare variazioni di numero di copie del DNA.

**Risultati.** Il sequenziamento del TKD di ABL1 alla ricaduta/e è risultato essere

non-mutato in 9 pazienti su 10. In un solo paziente è stata riscontrata la mutazione Y243F sia in prima che in seconda ricaduta ma non alla diagnosi, a dimostrare l'emergere di un clone resistente, minoritario alla diagnosi, in seguito a trattamento con TKI. Inoltre, l'analisi MLPA in 6 pazienti ha mostrato uno scenario di evoluzione clonale eterogeneo. In 3 pazienti il clone della ricaduta condivideva solo una limitata identità genetica con il clone predominante alla diagnosi e non era direttamente evoluto da questo ultimo. In un caso il clone della ricaduta era identico a quello della diagnosi, mentre nei restanti 2 casi il clone predominante della ricaduta era frutto dell'evoluzione clonale diretta del clone maggioritario alla diagnosi.

**Conclusioni.** Questo studio ha dimostrato che, al contrario dei pazienti adulti, la resistenza ad Imatinib nelle LLA Ph+ pediatriche non è strettamente dipendente da mutazioni in ABL1. Inoltre, i risultati di MLPA contribuiscono alla descrizione dell'eterogeneità clonale delle LLA Ph+, spiegando in parte la diversa risposta alla terapia di questi pazienti.

#### P-034

### STUDIO DELL'ATTIVITÀ DI ANTICORPI MONOCLONALI DIRETTI CONTRO IL RECEPTORE TSLPR NELLA LEUCEMIA LINFLOBLASTICA ACUTA A PRECURSORI DI TIPO B (pB-LLA) CON ALTERAZIONI DEL GENE CRLF2

J. Sarno,<sup>1</sup> K.L. Davis,<sup>2</sup> A.M. Savino,<sup>1</sup> C. Bugarin,<sup>1</sup> C. Buracchi,<sup>1</sup> S. Pinto,<sup>1</sup> G. Ganduscio,<sup>1</sup> C. Palmi,<sup>1</sup> M.J. Dyer,<sup>3</sup> A. Biondi,<sup>1,4</sup> G. Cazzaniga,<sup>1</sup> G. Gaipa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Ricerca Tettamanti, Università Milano-Bicocca, Azienda Ospedaliera San Gerardo, Monza, MB, Italia; <sup>2</sup>Baxter Laboratory in Stem Cell Biology, Department of Microbiology and Immunology, Stanford University, Stanford, USA; <sup>3</sup>Ernest and Helen Scott Haematological Research Institute, University of Leicester, Leicester, UK; <sup>4</sup>Dipartimento di Pediatria, Azienda Ospedaliera San Gerardo/Fondazione MBBM, Monza, MB, Italia

Riarrangiamenti del gene CRLF2 sono presenti nel 6-10% dei casi di Leucemia Linfoblastica Acuta a precursori di tipo B (pB-LLA) e sono associati a una over-espressione del recettore TSLPR, iperattivazione dei pathways JAK/STAT e PI3K/AKT e prognosi sfavorevole. In questo lavoro è stata valutata la capacità di binding e di inibizione del signaling da parte di 5 differenti cloni di anticorpi monoclonali (MoAb) diretti contro il recettore TSLPR. Al fine di verificare il bin-

ding, sono state utilizzate sia linee cellulari umane di pB-LLA CRLF2 riarrangiate (MUTZ5 e MHH-CALL4), sia cellule primarie di pazienti con CRLF2 riarrangiato. Tutti i cloni si sono dimostrati in grado di legare il recettore TSLPR in maniera stabile fino a 72h dal trattamento mostrando, inoltre, una internalizzazione media di circa il 60% dopo 4h di trattamento. E' stata poi valutata mediante tecnica di phosphoflow la capacità di 2 MoAb (130A10 e 127A11) di inibire l'attivazione TSLP-mediata di pSTAT5 e pS6 mediante la competizione con il ligando TSLP al recettore TSLPR/IL7R. Nelle linee cellulari MUTZ5 abbiamo osservato una diminuzione della risposta al TSLP del 43% con il clone 130A10 e del 34.2% con il clone 127A11 per quanto riguarda pSTAT5 e rispettivamente del 35.4% e 34.5% per pS6. Analoga inibizione è stata osservata nella linea MHH-CALL4, con una inibizione del segnale fino a 72h dal trattamento. L'attività di inibizione del segnale è stata inoltre valutata, mediante citometria di massa (CyTOF), in cellule primarie di pazienti CRLF2 riarrangiati (n 6) e comparata con cellule di pazienti CRLF2 wild-type (n 6). Nei pazienti riarrangiati abbiamo osservato, dopo stimolazione con il TSLP, una iperattivazione di pSTAT5 e pS6 (già precedentemente descritte in letteratura), ma anche delle fosfoproteine pERK e pCREB. A seguito del trattamento con il clone 130A10 abbiamo osservato un'inibizione dell'attivazione TSLP-mediata delle proteine pSTAT5, pS6 e pERK del 56%, 100% e del 72% rispettivamente. Sono attualmente in corso studi volti alla verifica dell'efficacia anti-proliferativa e pro-apoptica *in vitro* dei cloni anti-TSLPR. I nostri risultati dimostrano che almeno uno dei cloni anti-TSLPR è in grado di esercitare una efficace azione di inibizione del segnale TSLP mediato. Tale evidenza, se supportata anche da un effetto funzionale *in vitro*, potrebbe rappresentare una interessante base per lo sviluppo di strategie di targeted therapy nei pazienti con (pB-LLA) e CRLF2 riarrangiato.

#### P-035

### L'INIBIZIONE FARMACOLOGICA DI LCK SENSIBILIZZA LE CELLULE DI T-ALL RESISTENTI ALL'AZIONE DEI GLUCOCORTICOIDI

V. Serafin, B. Accordi, G. Capuzzo, S. Bresolin, R. Bortolozzi, G. Basso

Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino, SDB, Università degli Studi di Padova, Padova, Italia

Nonostante negli ultimi anni siano stati fatti grossi progressi nel trattamento della Leucemia Linfoblastica Acuta (ALL), persiste ancora circa un 20% di pazienti che

ricade in seguito a trattamento con terapia standard. Uno dei parametri utilizzati per la stratificazione dei pazienti si basa sulla conta dei blasti nel sangue periferico al giorno +8 dall'inizio della terapia. I pazienti vengono così classificati come "Prednisone Good Responders" (PGR, Event Free Survival a 6 anni 82%) o "Prednisone Poor Responders" (PPR, 34%). Allo scopo di identificare nuovi bersagli terapeutici per questi pazienti, abbiamo analizzato mediante Reverse Phase Protein Array gli aspirati midollari all'esordio di 94 pazienti pediatrici affetti da T-ALL, e valutato lo stato di fosforilazione di 87 proteine appartenenti alle vie TCR/LCK, AKT/mTOR, JAK/STAT, RAS/MAPKs. Dal confronto PGR vs PPR è emersa un'aumentata fosforilazione di LCK nel suo sito inibitorio Y505 nel gruppo di pazienti PGR rispetto al gruppo PPR (p=0.007), accompagnata da un'aumentata fosforilazione di SRC in Y416, comunemente accettato come sito attivatorio di LCK, nei pazienti PPR rispetto ai PGR (p=0.01). La forma totale della proteina LCK, così come l'mRNA, non sono risultati invece diversi tra i due gruppi di pazienti. Questi risultati evidenziano quindi un'aumentata attivazione di LCK nei pazienti PPR, e questo potrebbe avere un ruolo nella resistenza ai glucocorticoidi. Per valutare se LCK potesse rappresentare un nuovo target terapeutico, abbiamo selezionato le linee cellulari ALL-SIL, T-ALL1 e CEM, resistenti al desametasone (Dex) e con bassi livelli di fosforilazione di LCK Y505, e le abbiamo trattate con gli inibitori di LCK Dasatinib, Bosutinib, Nintedanib e WH-4023 in singolo e in combinazione con Dex. Dai risultati ottenuti mediante saggio MTT, è risultata una significativa riduzione della proliferazione in tutte e tre le linee in seguito sia a trattamento con i singoli inibitori che a trattamento combinato con il Dex. In particolare, tutti e quattro gli inibitori hanno mostrato un'ottima sinergia con il Dex, sensibilizzando quindi queste linee al trattamento con glucocorticoidi. Sebbene necessitino di ulteriori conferme, questi risultati mostrano dunque un ruolo chiave di LCK nella resistenza alle fasi iniziali della terapia. Inibitori di LCK già utilizzati in clinica come Dasatinib, Bosutinib o Nintedanib potrebbero in futuro rappresentare nuovi approcci terapeutici per i pazienti resistenti.

#### P-036

### CARATTERIZZAZIONE GENETICA DI PAZIENTI AD ALTO RISCHIO CON PROFILO DI ESPRESSIONE 'Ph-like' IN PAZIENTI PEDIATRICI AFFETTI DA LEUCEMIA ACUTA LINFLOBLASTICA A FENOTIPO B

G. Fazio, D. Silvestri, E. Vendramini,

A. Grioni,<sup>1,2</sup> S. Songia,<sup>1</sup> M. Galbiati,<sup>1</sup>  
C. Borga,<sup>3</sup> N. Darzentas,<sup>2</sup> F. Locatelli,<sup>4</sup>  
V. Conter,<sup>5</sup> M.G. Valsecchi,<sup>6</sup> G. Basso,<sup>3</sup>  
A. Biondi,<sup>1,5</sup> G. te Kronnie,<sup>3</sup> G. Cazzaniga<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Ricerca Tettamanti, Clinica Pediatrica, Osp. San Gerardo/Fondazione MBBM, Università di Milano Bicocca, Monza, MB, Italia; <sup>2</sup>CEITEC MU, Masarykova University, Brno, Czech Republic; <sup>3</sup>Laboratorio di Onco-Ematologia Pediatrica, Università di Padova, Padova, Italia; <sup>4</sup>Departimento di Emato-Oncologia Pediatrica, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italia; <sup>5</sup>Clinica Pediatrica, Università di Milano Bicocca, Osp. San Gerardo, Fondazione MBBM, Monza, MB, Italia; <sup>6</sup>Centro Operativo di Ricerca Statistica, Università Milano-Bicocca, Monza, MB, Italia

**Scopo.** Scopo del presente studio è l'identificazione retrospettiva e la caratterizzazione delle anomalie genetiche dei casi Philadelphia-like (Ph-like) nella coorte italiana AIEOP. Recentemente, è stato caratterizzato un nuovo sottogruppo con elevata incidenza di ricaduta e cattiva prognosi, denominato Ph-like, poiché presentano un profilo di espressione genica simile ai pazienti con il cromosoma Philadelphia pur non avendo la traslocazione t(9;22).

**Pazienti e Metodi.** È stata condotta l'analisi dei profili di espressione (Array Affymetrix) di 400 casi italiani pediatrici affetti da BCP-ALL, arruolati nel protocollo AIEOP-BFM ALL2000/R2006. Su un numero più ristretto di casi, sono state fatte le analisi di profili di espressione genica e di alterazione di numero di copie di geni (SNParray, Affymetrix e MLPA, MRC Holland). Pannello di Next Generation Sequencing su DNA è stato messo a punto con approccio Custom Nextera Rapid Capture (Illumina).

**Risultati.** Tra i 400 casi retrospettivi, 143 sono risultati negativi per le alterazioni più comuni - t(4;11), t(12;21), t(1;19), t(9;22), iperdiploidia, denominati 'B-others'. In particolare, 43/143 (circa il 10% della coorte totale) hanno presentato un profilo di espressione da 'Ph-like'. La loro EFS a 5 anni è di 54,8% vs 83,1% dei pazienti B-others non Ph-like (p<0,001), soprattutto a causa della maggiore incidenza cumulativa di recidiva (CIR: 33.9% vs 14.9%, p=0.009). La prognosi rimane negativa anche escludendo i pazienti già HR per altre ragioni (CIR: 32.1% vs 10.2%, p=0.005). L'analisi di 14 geni candidati ha rivelato la presenza di delezioni di PAX5 e CDKN2A-2B (64% dei pazienti), di IKZF1 (26%) e P2RY8-CRLF2 (24%). Meno ricorrenti sono le anomalie di JAK2, VpreB, BTLA/CD200, BTG1 e ABL. In 2 casi è stata riscontrata la presenza di una delezione sul cromosoma 5 associata

alla fusione EBF1/PDGFRB, che risponde a inibitori di tirosin-chinasi. Inoltre abbiamo disegnato un pannello diagnostico per identificare i pazienti Ph-like tramite Next Generation Sequencing su DNA, che ci consente di identificare nuove fusioni e le analisi sono in corso. **Conclusioni.** In conclusione, abbiamo identificato il sottogruppo Ph-like nella coorte italiana pediatrica con BCP-ALL, con più lesioni contemporanee e ricorrenti e confermato la prognosi sfavorevole. È in corso di preparazione un assay per riconoscere lesioni in geni frequentemente alterati. I pazienti con alterazioni associate a tirosin-chinasi potranno essere arruolati in protocolli che prevedano inibitori specifici.

### P-037

#### TEL/AML1 E BCR/ABL1 INSIEME IN UN PAZIENTE PEDIATRICO DI LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA: UN CASO ESEMPLARE DI ORIGINE PRENATALE ED EVOLUZIONE CLONALE DELLA LEUCEMIA.

G. Fazio,<sup>1</sup> G. Giudici,<sup>1</sup> G. Sammarelli,<sup>2</sup>  
F. Colnaghi,<sup>1</sup> M. Galbiati,<sup>1</sup> A. Grioni,<sup>1</sup>  
V. Rossi,<sup>1</sup> A. Ford,<sup>3</sup> V. Cazzaniga,<sup>1,3</sup>  
A. Balduzzi,<sup>4</sup> A. Barone,<sup>2</sup> P. Bertolini,<sup>2</sup>  
V. Conter,<sup>4</sup> A. Biondi,<sup>1,4</sup> G. Cazzaniga<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Ricerca Tettamanti, Clinica Pediatrica, Ospedale San Gerardo, Fondazione MBBM, Università di Milano Bicocca, Monza, MB, Italia; <sup>2</sup>Dipartimento di Pediatria ed Onco-Ematologia, Ospedale Universitario di Parma, Parma, Italia; <sup>3</sup>Institute of Cancer Research, Sutton, London, UK; <sup>4</sup>Clinica Pediatrica, Università di Milano Bicocca, Ospedale San Gerardo, Fondazione MBBM, Monza, MB, Italia

**Scopo.** Scopo del presente studio è la caratterizzazione di un paziente pediatrico affetto da Leucemia Linfoblastica Acuta a fenotipo B, positivo sia per la traslocazione t(9;22) che la traslocazione t(12;21) contemporaneamente: quale evento si è manifestato prima? Inoltre i due eventi genetici sono presenti nella stessa cellula o appartengono a due cloni diversi?

**Pazienti e Metodi.** Il paziente è arruolato nel protocollo AIEOP-BFM ALL2000/R2006 ed è stato caratterizzato per citogenetica convenzionale e FISH, nonché analisi di RT-PCR per le traslocazioni t(9;22), t(4;11), t(12;21). Sono state eseguite analisi di biologia molecolare avanzate quali di Copy Number Variation (Affymetrix Cyto2.7M Array) e di Next Generation Sequencing (Miseq, Illumina, Custom Nextera Rapid Capture) per clonare il breakpoint genomico di geni di fusione.

**Risultati.** L'analisi delle traslocazioni alla diagnosi del paziente ha evidenziato

positività contemporanea per BCR/ABL1 e TEL/AML1 in RT-PCR, confermata sia in multiplex e in singole PCR, nel campione di BM di esordio con bande di forte intensità, nonché nel campione di PB del giorno +8, bande di ridotta intensità. L'analisi FISH condotta con la sonda per TEL/AML1 ha rivelato positività alla traslocazione nell'80% dei nuclei con duplicazione del gene di fusione; ibridizzando poi la sonda per la t(9;22) sugli stessi nuclei/metafasi è stato osservato un 12% di cellule (positive per la 12;21) con pattern di ibridazione compatibile con inserzione di BCR in ABL1. Inoltre, l'analisi mediante cytoscan HD Array ha confermato la duplicazione delle regioni coinvolte nella traslocazione t(12;21) e ha evidenziato la presenza di altre anomalie coinvolgenti i cromosomi 11,19 e X. Infine tramite un pannello di NGS targettato su DNA disponibile nel nostro laboratorio, abbiamo identificato il breakpoint genomico per entrambe le fusioni e disegnato primers specifici per RT-PCR, che tramite Sanger ci hanno permesso di clonare la sequenza genomica paziente specifica.

**Conclusioni.** Data l'eccezionalità del caso e l'interesse per l'origine prenatale ed evoluzione clonale della leucemia, sarà fondamentale proseguire nella caratterizzazione dei due breakpoints genomici nelle Guthrie cards del paziente, per verificare l'origine prenatale dei due riarrangiamenti. Sarà molto interessante completare lo studio dell'evoluzione clonale per dimostrare se le due anomalie risiedono nella stessa cellula.

### P-038

#### ANALISI CITOFUORIMETRICA DEL LIQUIDO CEFALORACHIDIANO IN PAZIENTI CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA ALL'ESORDIO E IN RECIDIVA

M. Gabelli, B. Buldini, S. Disarò,  
A. Zangrando, P. Scarparo,  
B. Michielotto, E. Bortoloso,  
S. Francescato, M.C. Putti, G. Basso

Clinica di Oncoematologia Pediatrica, Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino, Università degli Studi di Padova, Padova, Italia

Il coinvolgimento del sistema nervoso centrale (SNC) da parte della leucemia linfoblastica acuta (LLA) è definito da segni clinici o radiologici o dalla presenza di >5 cell/μL su liquor con morfologia positiva. L'analisi morfologica del citocentrifugato è gravata da bassa sensibilità e specificità. La citofluorimetria (CF) permetterebbe di identificare le cellule liquorali con maggiore specificità e sensibilità. Scopo del lavoro è valutare prospetticamente la fattibilità ed il

significato prognostico della citofluorimetria su liquor in bambini con LLA. Dal 12.09.2013 al 11.05.2015 sono stati inclusi i bambini in terapia presso l'Oncoematologia Pediatrica di Padova per esordio e recidiva di LLA di cui disponiamo del consenso. I campioni di liquor sono stati sottoposti a conta cellulare e analisi morfologica dopo citocentrifugato e, entro 24 ore, a citofluorimetria a 8 colori (linea B o T). Un cluster di eventi con immunofenotipo sovrapponibile all'esordio definisce la positività del campione (CF+). Sono stati analizzati 453 campioni di liquor di 52 esordi di LLA e 74 campioni di 10 recidive midollari isolate di LLA con un follow-up mediano di 10,5 mesi (range 1-20). Alla diagnosi 3 pazienti (6%) presentavano meningosi leucemica (SNC3) con liquor CF+, altri 3 sono risultati SNC2 (come da protocollo AIEOP BFM LLA 2009), dei quali 2 CF+ e 1 CF-. 16 pazienti (31%) presentavano blasti solo in citofluorimetria (SNC1/CF+). La citofluorimetria è rimasta positiva al giorno +15 in 6 pazienti (3 SNC3, 1 SNC2/CF+ e 2 SNC1/CF+) e in 1 al giorno +33 (SNC1/CF+ alla diagnosi). Ai successivi time points: 1 paziente SNC2/CF+ all'esordio e al +15 ha presentato un liquor CF+ in consolidamento, 2 pazienti SNC1/CF+ all'esordio sono risultati CF+ in un campione dell'induzione Ib e 2 SNC1/CF- hanno presentato un campione CF+ in consolidamento. I successivi controlli erano negativi. Un paziente ad alto rischio SNC1/CF- è deceduto per infezione. Tra i 10 pazienti con recidiva midollare isolata, 7 avevano alla recidiva liquor CF+: tra questi 4 hanno presentato una seconda recidiva (2 SNC isolate CF+, di cui una deceduta, 2 midollari delle quali 1CF+ e 1 CF-). I 3 pazienti CF- non hanno avuto ulteriori recidive; 1 è deceduto per complicanze da trattamento. L'analisi del liquor in citofluorimetria è una metodica veloce e poco costosa che fornisce informazioni precise sulle cellule presenti. Un follow-up più prolungato ne stabilirà l'impatto clinico e prognostico nei bambini con LLA.

### P-039

#### **INDUZIONE DI DC CON IFN $\alpha$ 2B: UNO STRUMENTO PER LA GENERAZIONE DI LINFOCITI T CITOTOSSICI DI ORIGINE DEL DONATORE CON ALTA CAPACITÀ CITOTOSSICA VERSO BLASTI DI LEUCEMIA ACUTA**

I. Turin,<sup>1</sup> E. Montini,<sup>1</sup> F. Ferulli,<sup>1</sup> M. Tanzi,<sup>1</sup> D. Lisini,<sup>3</sup> L. Rubert,<sup>1</sup> T. Mina,<sup>1</sup> R. Maccario,<sup>1</sup> M. Zecca,<sup>1</sup> D. Montagna<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia; <sup>2</sup>Università degli Studi di Pavia;

<sup>3</sup>Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano, Italia

**Scopo.** IFN $\alpha$ 2b induce una rapida differenziazione di monociti umani in cellule dendritiche (DC) altamente specializzate, denominate DC-IFN, in grado di mediare efficientemente il "cross-priming" dei linfociti CD8+. In questo studio abbiamo valutato se l'impiego di DC-IFN pulsate con blasti leucemici (BL) apoptotici o con peptidi WT1 inducesse la generazione *in vitro* di CTL di origine del donatore anti-leucemia altamente citotossici verso i BL dei pazienti.

**Metodi.** Sono state allestite 14 linee di CTL, con diverse condizioni di coltura, a partire da 5 coppie donatore-ricevente (3 LLA, 2 LMA). Le DC sono state generate coltivando cellule CD14+ in presenza di GM-CSF con aggiunta di IL-4 (DC-IL4) oppure IFN $\alpha$ 2b (DC-IFN). Il priming degli effettori, linfociti CD8-arricchiti oppure PBMC, è stato effettuato in presenza di IL-7 e IL-12+ IFN $\alpha$ 2b.

**Risultati.** DC-IFN avevano una morfologia "monocito-like" e mostravano una up-regolazione del CD80 e CD86 rispetto a DC-IL4. Dati preliminari del profiling genetico (RT-PCR) delle DC-IFN e DC-IL4 mostravano differenti pattern di espressione dei geni codificanti per recettori e ligandi delle citochine infiammatorie. DC-IFN hanno indotto CTL dotati di maggiore capacità citotossica verso i BL rispetto a DC-IL4 (% lisi CTLDC-IFN: media 48%, range 32-61; CTLDC-IL4: media 31%, range 27-39 al rapporto E:T 25:1). I risultati si riferiscono agli esperimenti condotti utilizzando DC pulsate con BL apoptotici per stimolare linfociti CD8-arricchiti. Il dato è stato confermato anche nell'induzione di CTL WT1-specifici, in grado di lisare efficientemente i BL dei pazienti, a partire da PBMC totali del donatore. L'aggiunta di IFN $\alpha$ 2b nella fase di priming ha mostrato un'ulteriore aumento dell'attività citotossica (CTLDC-IL4: 41%, CTLDC-IFN: 52%, CTLDC-IFN + priming IFN: 72% di lisi al rapporto E:T 25:1, dati di un esperimento rappresentativo). I CTLDC-IFN non mostravano un aumento dei livelli di alloreattività verso cellule non maligne dei pazienti. CTLDC-IFN sono risultati per la maggior parte effector memory, TEM, rispetto ai CTLDC-IL4 (88% $\pm$ 3; 68% $\pm$ 12, rispettivamente), con una riduzione degli effettori terminali TEMRA (3% $\pm$ 2; 23% $\pm$ 14, rispettivamente).

**Conclusioni.** IFN $\alpha$ 2b, impiegato sia nella fase di maturazione delle DC che nella fase di priming dei CTL, risulta essere un ottimo strumento per l'induzione di CTL dotati di alta specificità verso i BL da impiegarsi in approcci di immunoterapia per il controllo della recidiva dopo trapianto di CSE.

### P-040

#### **IPERATTIVAZIONE DI MTOR E STAT3 IN PAZIENTI PEDIATRICI AFFETTI DA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA ETP**

V. Serafin,<sup>1</sup> B. Accordi,<sup>1</sup> V. Lissandron,<sup>1</sup> S. Bresolin,<sup>1</sup> M. Paganin,<sup>1</sup> F. Grillo,<sup>1</sup> B. Buldini,<sup>1</sup> G. Cazzaniga,<sup>2</sup> M. Pigazzi,<sup>1</sup> G. Basso<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino, SDB, Università degli Studi di Padova, Padova; <sup>2</sup>Centro Ricerca Tettamanti, Università di Milano-Bicocca, Monza, MB, Italia

La Leucemia Linfoblastica Acuta ETP (Early T-cell Precursor) rappresenta il 15% delle T-ALL ed è caratterizzata da prognosi infausta. I blasti ETP sono bloccati ad uno stadio differenziale precoce, mancano di alcuni marcatori tipici delle cellule T tra cui CD1a e CD8 ed esprimono marcatori delle cellule mieloidi e delle cellule staminali emopoietiche come CD13, CD33 e CD34. L'elevato rischio di fallimento della terapia in questi pazienti mostra l'esigenza di identificare nuovi e più efficaci approcci terapeutici. A questo scopo abbiamo analizzato mediante Reverse Phase Protein Array gli aspirati midollari all'esordio di 60 pazienti pediatrici affetti da ETP-ALL (n=11), non-ETP T-ALL (n=14 Early-T, n=15 T-ALL Intermedie e Mature) e Leucemia Acuta Mieloide (LAM, n=20), valutando lo stato di attivazione di 38 proteine parte di vie di trasduzione del segnale tra cui MAPK, JAK/STAT e AKT/mTOR. Abbiamo inoltre valutato la presenza di mutazioni in geni noti per essere frequentemente mutati nelle ETP-ALL tra cui FLT-3, IL-7R, PTEN, B-RAF, N-RAS e K-RAS, e correlato il profilo di attivazione proteica all'eventuale presenza di mutazioni. Il confronto tra ETP-ALL e LAM ha evidenziato il 71% di proteine differenzialmente attivate tra questi due gruppi, sottolineando una netta diversità dal punto di vista di attivazione proteica. Le ETP-ALL sono risultate diverse anche dalle Early-T, nonostante mostrino un immunofenotipo simile e un tempo venissero considerate come un unico sottotipo. Le ETP-ALL sono caratterizzate rispetto alle Early-T da un'iperattivazione della via delle MAPK (Global test, p=0.005), di AKT/mTOR (p=0.002) e di JAK/STAT (p=0.004). Inoltre, le proteine che risultano maggiormente attivate nei pazienti ETP-ALL rispetto a tutti gli altri sono mTOR S2448 (Mann-Whitney test, ETP-ALL vs T-ALL p=0.005, ETP-ALL vs LAM p=0.008) e STAT3 S727 (ETP-ALL vs T-ALL p=0.0003, ETP-ALL vs LAM p=0.0008). In letteratura è noto come mTOR S2448 sia in grado di fosforilare STAT3 in specifico in S727, e come l'atti-

vazione di questa via sia fondamentale per la proliferazione e la sopravvivenza di cellule di neuroblastoma e tumore al seno. E' stata inoltre notata l'iperfosforilazione di STAT5 Y694 e B-RAF S445 nei pazienti ETP-ALL caratterizzati dalla presenza dello SNP T2441. Abbiamo quindi identificato una via di trasduzione del segnale iperattivata, possibile bersaglio di specifici inibitori, che potrebbe contribuire alla sopravvivenza e alla proliferazione delle ETP-ALL.

#### P-041

### SIGNIFICATO PROGNOSTICO DELLA MALATTIA RESIDUA MINIMA PRIMA E DOPO IL TRAPIANTO DI CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE NELLA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA PEDIATRICA

B. Rossi,<sup>1</sup> M. Campeggio,<sup>1</sup> E. Magrin,<sup>1</sup> M. Zecca,<sup>2</sup> L. Rubert,<sup>2</sup> F. Fagioli,<sup>3</sup> P. Quarello,<sup>3</sup> F. Lovisa,<sup>1</sup> G. Basso<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Clinica di Oncoematologia Pediatrica, Dipartimento Salute Donna e Bambino, Università di Padova, Padova; <sup>2</sup>Oncoematologia Pediatrica, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia; <sup>3</sup>Ospedale Infantile Regina Margherita, Torino, Italia

**Scopo.** Lo studio si è proposto di valutare in modo retrospettivo il ruolo della Malattia Residua Minima (MRD) in pazienti pediatriche affetti da leucemia linfoblastica acuta (LLA) nel Trapianto di Cellule Staminali Ematopoietiche (TCSE). **Pazienti e Metodi.** Sono stati analizzati 64 pazienti pediatriche affetti da LLA sottoposti a TCSE, 22/64 in prima remissione (1RC) e 42/64 in seconda remissione (2RC). La MRD è stata analizzata mediante real-time PCR quantitativa basata sui riarrangiamenti delle immunoglobuline e del T-cell receptor, secondo le linee guida del gruppo di studio EuroMRD. I campioni di DNA midollare sono stati raccolti prima del TCSE (pre-TCSE) e nel 1° e 3° trimestre dopo il TCSE (post-TCSE1 e post-TCSE3). L'associazione tra MRD e sopravvivenza è stata valutata con il test chi-quadrato.

**Risultati.** Nei 64 pazienti sottoposti a TCSE, 26/64 presentavano MRD negativa e 38/64 MRD positiva, 17/38 con valori di MRD  $\geq 1 \times 10^{-3}$ , 21/38  $< 1 \times 10^{-3}$ . Valori alti o bassi di MRD non sono risultati significativamente diversi quando correlati con la prognosi dei pazienti ( $p=0.73$ ). La presenza di MRD pre-TCSE è risultata significativamente associata a una prognosi sfavorevole: infatti 10/38 pazienti con MRD positiva sono vivi in RC, mentre lo sono 22/26 con MRD negativa ( $p<0.001$ ). Considerando i 42 pazienti in 2RC, 14/42 avevano MRD pre-TCSE negativa, 28/42

positiva. L'assenza di MRD è risultata significativamente associata a una prognosi favorevole: 13/14 pazienti con MRD negativa sono vivi in RC, mentre solo 5/28 con MRD positiva ( $p<0.001$ ). La MRD post-TCSE1 è stata valutata per 53 pazienti: 17/53 sono risultati positivi e 36/53 negativi. La prognosi è significativamente diversa: sono vivi in RC 26/36 pazienti con MRD post-TCSE1 negativa, mentre di quelli con MRD positiva solo 3/17 ( $p<0.001$ ). La MRD post-TCSE3 è stata valutata per 41 pazienti: 19/41 presentavano MRD positiva. Anche a questo time-point, la presenza di MRD è associata a una prognosi sfavorevole ( $p=0.001$ ).

**Conclusioni.** I risultati confermano che la valutazione della MRD ha un ruolo clinico sia prima sia dopo il TCSE. La MRD negativa è fortemente associata a una prognosi favorevole, in particolare nei pazienti in 2RC. Poiché la persistenza di MRD post-TCSE, anche bassa, si associa a una minore probabilità di sopravvivenza, questi pazienti potrebbero trarre vantaggio da una precoce sospensione della terapia immunosoppressiva, da approcci di immunoterapia adottiva o dall'utilizzo di nuovi farmaci disponibili.

#### P-042

### SVILUPPO DI STRATEGIE FARMACOLOGICHE PER LA PERSONALIZZAZIONE DEL TRATTAMENTO DELLA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA IN PAZIENTI PEDIATRICI

R. Franca,<sup>1</sup> D. Favretto,<sup>1</sup> A. Colombini,<sup>2</sup> E. Brivio,<sup>2</sup> E. Barisone,<sup>3</sup> I. Bini,<sup>3</sup> A. Mandese,<sup>3</sup> L. Vinti,<sup>4</sup> G. Stocco,<sup>5</sup> G. Decorti,<sup>5</sup> M. Rabusin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>IRCCS Ospedale Pediatrico Burlo Garofolo, UO Oncoematologia Pediatrica, Trieste; <sup>2</sup>Dipartimento di Pediatria, Ospedale S. Gerardo, Università degli Studi di Milano-Bicocca, Fondazione MBBM, Monza, MB; <sup>3</sup>Divisione di Oncoematologia Pediatrica e Centro Trapianti Cellule Staminali, Ospedale Pediatrico Regina Margherita (OIRM), Torino; <sup>4</sup>Dipartimento di Ematologia ed Oncologia Pediatrica, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma; <sup>5</sup>Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste, Trieste

I protocolli AIEOP curano con successo l'85% dei bambini con leucemia linfoblastica acuta (LLA); una migliore personalizzazione del trattamento potrebbe migliorare l'esito della terapia e limitare gli effetti avversi. A tale scopo, è stato avviato uno studio prospettico multicentrico volto ad avvalorare l'uso di strategie farmacologiche per l'ottimizzazione del protocollo AIEOP-BFM LLA 2009. In particolare, si vuole valutare se

l'efficacia e la tossicità da 6-mercaptopurina (6MP) in consolidamento e mantenimento sia prevedibile sulla base di parametri farmacocinetici (metaboliti attivi tioguaninici (TGN), metaboliti secondari metilati (MMPN) e attività degli enzimi TPMT e ITPA coinvolti nel metabolismo del farmaco, quantificazione in HPLC) e farmacogenetici (polimorfismi rs1142345, rs1800462, rs1800460 nel gene TPMT; rs1127354, rs7270101, rs6051702 in ITPA; rs2413739 in PACSIN2, tecnologia TaqMan). I metaboliti TGN e MMPN sono stati quantificati in 48 pazienti in consolidamento (TGN: mediana 287,8 pmol/8x10<sup>8</sup> eritrociti, range: 205,6–450,6; MMPN: 1731,5 pmol/8x10<sup>8</sup>, 948,1–9640,7) e in 44 pazienti in mantenimento (TGN: 462,6 pmol/8x10<sup>8</sup>, 305,0–667,0; MMPN: 6502,7 pmol/8x10<sup>8</sup>, 2754,4–11916,2), rivelando l'atteso effetto di incremento dei TGN e riduzione dei MMPN per i genotipi varianti di TPMT ( $p<0,02$ ). L'attività di TPMT è stata valutata in 21 pazienti in mantenimento (mediana: 456,3 mol 6Metil-MP/g(Hb)/h, range: 375,3–544,1), quella di ITPA in 24 pazienti (mediana: 163,5 mol inosinammonofosfato/g(Hb)/h, range: 49,2–525,3). Le attività enzimatiche di TPMT e ITPA correlano con l'età (più elevate negli adolescenti,  $p=0,044$  e  $p=0,012$  rispettivamente) e con i genotipi (minori nei soggetti varianti; per TPMT rs1142345 e rs1800460,  $p=0,021$ ; per ITPA rs1127354,  $p=0,032$ ; rs7270101,  $p=0,017$  e rs6051702  $p=0,0027$ ); è stata riscontrata inoltre una riduzione significativa dell'attività di TPMT nei pazienti con l'allele variante T nel rs2413739 di PACSIN2 ( $p=0,023$ ). Attualmente la dose di 6MP viene ridotta solo nel caso di mutazione in omozigosi per i polimorfismi del gene TPMT: questi risultati suggeriscono la possibilità di modulare la dose anche sulla base dell'età del paziente e di altre varianti geniche tra quelle coinvolte nel metabolismo del farmaco. La casistica va integrata con i dati clinici dei pazienti, attualmente ancora in terapia, per valutarne correttamente l'impatto sul trattamento.

#### P-043

### EZH2 È IPERESPRESSO NELLA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA PEDIATRICA: POSSIBILE TARGET IN ASSOCIAZIONE A CHEMIOTERAPICI CONVENZIONALI

M. Ramaglia,<sup>1</sup> V. D'Angelo,<sup>1</sup> A. Iannotta,<sup>1</sup> A. Lombardi,<sup>2</sup> M. Varchetta,<sup>1</sup> M. Di Martino,<sup>1</sup> M. Caraglia,<sup>2</sup> F. Casale<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento della Donna, del Bambino e di Chirurgia Generale e Specialistica della Seconda Università di Napoli, Napoli;

<sup>2</sup>Dipartimento di Biochimica, Biofisica e Patologia Generale della Seconda Università di Napoli, Napoli, Italia

**Background.** Numerosi studi hanno dimostrato che il Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) svolge attraverso EZH2, un ruolo critico nella determinazione del destino cellulare durante il differenziamento in generale e della linea ematopoietica in particolare. E' stato dimostrato che EZH2 stabilizza la struttura della cromatina e mantiene il potenziale di auto-rinnovamento delle cellule staminali emopoietiche disattivando i geni pro-differenziamento. Nella cellula staminale leucemica, EZH2 contribuisce alla tumorigenesi sopprimendo i geni del differenziamento indirizzando in tal modo le cellule verso uno stato di cellula staminale cancerosa (CSC). Questo rende l'espressione aberrante di EZH2 un target epigenetico interessante poichè la sua inibizione ha il potenziale di esaurire il pool di CSC determinando lo sviluppo di inibitori di EZH2 come possibili agenti adiuvanti dei chemioterapici convenzionali. Uno tra i primi inibitori studiati è DZNep che agisce indirettamente bloccando in maniera competitiva la S-adenosilomocisteina idrolasi con un accumulo del substrato enzimatico che determina l'inibizione dell'attività metiltransferasi, inducendo la degradazione del complesso PRC2 e quindi ridotti livelli di EZH2. Inoltre due interessanti molecole, EPZ005687 e GSK126, selettive per EZH2, sono già inseriti in studi preclinici per leucemie acute e linfomi.

**Pazienti e Metodi.** Sono stati analizzati 51 pazienti affetti da Leucemia Linfoblastica Acuta, diagnosticati e trattati presso il Servizio di Oncologia Pediatrica della SUN. Abbiamo valutato i livelli di espressione di EZH2 mediante Real time PCR e Western Blot. Sono poi state valutate sulle linee cellulari Jurkat e SUP-B15 trattate con DZNep, Daunoblastina e in associazione la vitalità cellulare, l'apoptosi ed il ciclo cellulare per testare una possibile inibizione farmacologica dell'inibitore sulla crescita delle cellule leucemiche. **Risultati.** I nostri dati preliminari hanno dimostrato che EZH2 è iperespresso nei campioni analizzati e nelle linee cellulari testate. Il trattamento con DZNep ha indotto a 48h un incremento delle cellule in fase S dal 25% al 60% nelle Jurkat e un incremento dell'apoptosi dell'80% nelle Jurkat e del 50% nelle SUP-B15.

**Conclusioni.** Dai nostri dati, preliminari, il targeting farmacologico di EZH2 sembra rappresentare un approccio potenzialmente valido nella terapia combinata con chemioterapici convenzionali anche nelle leucemie linfoblastiche acute dell'età pediatrica.

#### P-044

### L'ESPRESSIONE DI p27KIP1 E PKC IDENTIFICA SOTTOGRUPPI LINEAGE-SPECIFICI DI LEUCEMIA ACUTA CON RIARRANGIAMENTO DEL GENE MLL

P. Bonaccorso, N. Andriano, V. Iachelli, D. Bottino, E. Mirabile, M. La Rosa, L. Lo Nigro

Centro di Riferimento Regionale di Ematologia ed Oncologia Pediatrica, Azienda Policlinico - OVE, Catania, Italia

**Background.** Il gene MLL è riarrangiato nel 3% delle Leucemie Linfoblastiche Acute (LLA) e nel 10% delle Leucemie Mieloidi Acute (LMA) del bambino. La prognosi di questi pazienti è sfavorevole e più del 50% dei casi presenta una recidiva di malattia o una resistenza alle terapie di seconda linea. La proteina di fusione del gene MLL partecipa attivamente alla trasformazione leucemica dei normali progenitori cellulari, ma i meccanismi che stanno alla base di questa trasformazione non sono completamente noti. Numerosi pathways cellulari che coinvolgono la metilazione del DNA, o le chinasi, sono coinvolti nella trasformazione neoplastica in questo sottogruppo di leucemie acute con riarrangiamento di MLL. Obiettivo. Identificare nuovi biomarkers che possano essere utili nella determinazione della prognosi e nella caratterizzazione di potenziali targets per terapie paziente-specifiche.

**Materiali e Metodi.** Abbiamo studiato il profilo proteomico di 18 leucemie acute MLL-riarrangiate: 8 casi di LLA (6 MLL-AF4; 1 MLL-ENL; 1 MLL-AF9) e 10 casi di LAM (3 MLL-AF9; 3 MLL-AF10; 2 MLL-AF6; 1 MLL-ENL; 1 MLL-SEPT7). Abbiamo verificato l'espressione delle seguenti proteine: GSK3, p27Kip1, PKC, AKT (T308) utilizzando il Western Blot. Abbiamo utilizzato come controlli positivi due linee cellulari: le HELA Pervanadato (per AKT-T308 e PKC) e le NIH/3T3 (per p27Kip1). **Risultati.** Negli 8 casi LLA MLL-r abbiamo osservato l'over-espressione di p27Kip1 e di AKT (T308). Nei 10 casi di LAM MLL-r, invece, abbiamo osservato l'over-espressione di PKC. Sorprendentemente abbiamo verificato che l'over-espressione sia di p27Kip1 e di AKT (T308) nelle LLA che di PKC nelle LAM è risultata lineage-specifica. Infine i nostri dati confermano che GSK3 è over-espresso sia nelle LLA che nelle LAM con riarrangiamento di MLL.

**Conclusioni.** I nostri dati, insieme ad altre esperienze, supportano il razionale utilizzo di potenziali inibitori di GSK3 e di PKC (solo per le LAM) in uno specifico subset di pazienti affetti da Leucemie Acute MLL-r. Questi dati preliminari dovranno essere sviluppati per meglio definire il

ruolo di p27Kip1 nel pathway di GSK3 soprattutto nelle LLA come potenziale target prognostico ed il ruolo di PKC nelle LAM.

#### P-045

### IMPATTO DELLE MUTAZIONI DI PTEN SUL PATHWAY PI3K/AKT/PTEN/mTOR NELLE LEUCEMIE LINFOBLASTICHE ACUTE PEDIATRICHE T-LINEAGE: CARATTERIZZAZIONE PROTEOMICA E MOLECOLARE

P. Bonaccorso,<sup>1,2</sup> C. Bugarin,<sup>1</sup> C. Buracchi,<sup>1</sup> G. Fazio,<sup>1</sup> A. Biondi,<sup>1,3</sup> L. Lo Nigro,<sup>2</sup> G. Gaipa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>M. Tettamanti Research Center, University of Milano Bicocca, San Gerardo Hospital, Monza; <sup>2</sup>Center of Pediatric Hematology Oncology, Azienda Policlinico-OVE, University of Catania, Catania; <sup>3</sup>Pediatric Clinic, University of Milano Bicocca, Fondazione MBBM/Ospedale San Gerardo, Monza, MB, Italy

**Background.** La maggior parte delle T-ALL pediatriche è caratterizzata da una iperattivazione del pathway PI3K/Akt/mTOR. Mutazioni di PTEN (risultanti in una perdita della proteina) sono state identificate a livello dell'esone7 e riportate nel 17% delle T-ALL. Western Blot (WB) e Citofluorimetria (FC) rappresentano due validi metodi di riferimento per gli studi proteomici del signaling delle T-ALL pediatriche.

**Scopo.** Obiettivo di questo studio è validare l'uso della metodica della Phosphoflow per l'analisi del signaling profiling delle T-ALL, lo studio del pathway PI3K/Akt/mTOR e la sua correlazione con le principali alterazioni con notevole impatto prognostico sulle T-ALL.

**Pazienti and Metodi.** Le mutazioni di PTEN Exon7 sono state valutate mediante PCR e successivo sequenziamento con Sequenziatore Abi Prism-3130. L'espressione delle proteine PTEN ed mTOR è stata analizzata in 9 T-ALL pediatriche arruolate nei protocolli AIEOP ALL2000/R2006. Lo stato basale di AKT-S473, AKT-T308, mTOR, PTEN, pS6, p4EBP1 è stato studiato mediante la metodica della Phosphoflow. L'espressione di PTEN ed mTOR è stata poi confermata con l'analisi del WB.

**Risultati.** Per ogni campione abbiamo analizzato sia cellule leucemiche che cellule T-normali. Tutti i campioni mostravano livelli non rilevabili di p-AKT-S473 in entrambe le popolazioni cellulari. L'espressione basale di mTOR era più alta nel residuo T-normale rispetto ai blasti; di contro, l'espressione di PTEN era significativamente più alta nelle cellule leucemiche rispetto al residuo T-norma-

le. Abbiamo ottenuto una concordanza assoluta dei risultati mediante l'uso in parallelo del WB. Tre dei 9 pazienti analizzati con Phosphoflow erano mutati per PTEN Exon7 e la proteina risultava assente (dato confermato da entrambe le metodiche). Inoltre abbiamo osservato che i blasti PTEN Exon7 mutati mostravano livelli di p-S6 significativamente più bassi rispetto ai blasti wild-type.

**Conclusioni.** La disregolazione del pathway PI3K/Akt/mTOR è correlata alla prognosi sfavorevole delle T-ALL pediatriche: questo richiederebbe una metodica più sensibile per la valutazione del loro profilo proteomico. I nostri dati hanno mostrato una differente espressione basale di PTEN ed mTOR nei blasti e nelle cellule normali T e la proteina PTEN era assente nei pazienti PTEN Exon7 mutati. Infine, i pazienti mutati mostravano livelli di p-S6 significativamente più bassi rispetto ai non mutati; questo dato meriterebbe ulteriori approfondimenti in quanto p-S6 potrebbe rappresentare un marker prognostico per la stratificazione dei pazienti pediatrici affetti da T-ALL

#### P-046

### PROFILO PROTEOMICO DELLA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA T-LINEAGE (LLA-T) DEL BAMBINO: DALL'ESPRESSIONE DI PTEN ALLA $\beta$ -CATENINA E c-MYC

P. Bonaccorso, N. Andriano, V. Iachelli, D. Bottino, M. La Rosa, L. Lo Nigro

Centro di Riferimento Regionale di Ematologia ed Oncologia Pediatrica, Azienda Policlinico OVE, Catania, Italia

**Background.** Il 25% dei bambini con LLA-T è soggetto a recidiva con una prognosi infausta. E' dimostrato che numerosi pathway hanno un ruolo chiave nell'insorgenza della malattia e probabilmente interagiscono tra di loro: Wnt/ $\beta$ -catenin, PI3K/AKT/mTORC1, Ras/MEK/ERK, NOTCH, p53 e c-MYC.

**Obiettivo.** Caratterizzare il profilo di espressione dei principali geni coinvolti nei pathway della LLA-T.

**Pazienti e Metodi.** Abbiamo studiato CK2 $\alpha$ , CK2 $\beta$ ,  $\beta$ -Catenina e c-Myc in 34 LLA-T pediatriche mediante una Sybr-Green-Real-time-PCR. I dati ottenuti sono stati analizzati mediante il metodo del 2-DDCt considerando come valore di riferimento la mediana dei Dct di una coorte di 11 donatori sani. Di 21 dei 34 pazienti analizzati, era stato caratterizzato il profilo proteomico del pathway PI3K/AKT/mTORC1 mediante Western Blot. E' stata eseguita un'analisi mutazionale di alcuni sottogruppi: PTEN-Exon7, GSK3 $\beta$ , TP53, RPS6 e AKT-Exon4. Il sequenziamento è stato eseguito presso il BMR Genomics (Padova).

**Risultati.** Confrontando i due gruppi di soggetti sani e di LLA-T abbiamo osservato che CK2 $\alpha$  e CK2 $\beta$  mostravano medie e mediane di espressione sovrapponibili tra i due gruppi;  $\beta$ -Catenina mostrava un'espressione notevolmente più bassa nelle LLA-T (mediana 0.279 e media 0.360) rispetto ai donatori sani (mediana 1.000 e media 1.161); c-MYC presentava una media di espressione nelle LLA-T più alta rispetto ai donatori sani (2.591 vs 0.944). Nonostante l'eterogenea espressione di c-MYC, abbiamo osservato che 6 degli 11 pazienti con down-regolazione di p70S6K e mTOR mostravano una più alta espressione di c-MYC (media 4.100). L'analisi mutazionale per GSK3 $\beta$  e AKT-Exon4 negli 11 pazienti down-regolati ha mostrato solo sequenze wild type. Inoltre abbiamo eseguito l'analisi mutazionale di RPS6 ma nessun paziente degli 11 analizzati mostrava mutazioni. Nei casi con over-espressione di c-MYC (14 dei 34) abbiamo eseguito uno screening mutazionale per TP53 senza riscontrare alcuna mutazione. L'analisi mutazionale di PTEN-Exon7 sui 21 pazienti studiati in proteomica ha mostrato la presenza di 3 mutazioni (2 frameshift ed 1 variante codificante di sequenza).

**Conclusioni.** I nostri dati preliminari dimostrano la presenza di un cross-talking tra i vari pathway coinvolti nell'insorgenza e nello sviluppo della LLA-T del bambino. Studi prospettici e su larga scala chiariranno il ruolo di Wnt/ $\beta$ -catenin, c-MYC e GSK3 $\beta$  sia come marker che come potenziali target terapeutici.

#### P-047

### LA MUTAZIONE DI K-RAS PRECEDE IL RIARRANGIAMENTO MLL-AF6 IN UN CASO CLINICO CON LEUCEMIA MIELOMONOCITICA ACUTA

N. Andriano, P. Bonaccorso, V. Iachelli, D. Bottino, E. Mirabile, M. La Rosa, L. Lo Nigro

Centro di Riferimento Regionale di Ematologia ed Oncologia Pediatrica, Azienda Policlinico OVE, Catania, Italia

**Background.** Le mutazioni del gene RAS rappresentano una delle più comuni alterazioni nella leucemia mieloide acuta (LMA). I riarrangiamenti del gene MLL e le aberrazioni del pathway KRAS-MAPK sono frequentemente associati nell'AMML. Queste ultime sono considerate come mutazioni passengers ovvero secondarie alle traslocazioni. Recentemente in casi di LLA sono state dimostrate mutazioni di RAS come drivers analizzando le Guthrie-cards. Nella LMA non è stato ancora studiato questo fenomeno.

**Obiettivo.** Identificare la presenza delle

alterazioni di RAS e di MLL nella Guthrie-card di un caso di AMML.

**Metodi.** Abbiamo studiato il caso di un bambino di 18 mesi affetto da AMML. Abbiamo analizzato il DNA della Guthrie-card, dopo estrazione con metodo fenolo-cloroformio, e della diagnosi. Abbiamo caratterizzato la fusione del gene MLL-AF6 e AF6-MLL, applicando LDI-PCR. Abbiamo eseguito un esperimento di diluizioni seriali di DNA della diagnosi per dimostrare la specificità e sensibilità del metodo per l'identificazione dei riarrangiamenti MLL. Allo scopo d'identificare le mutazioni di KRAS e PTPN11, abbiamo utilizzato due protocolli modificati di PCR. Il sequenziamento è avvenuto presso la BMR Genomics (Padova).

**Risultati.** Il cariotipo alla diagnosi era 47,XY,+Y,t(6;11)(q27;q23)(6)/50,idem,+8,+13,+19[12]. Abbiamo ottenuto sequenze alla diagnosi di MLL-AF6, AF6-MLL e disegnato primers specifici. Il frammento genomico AF6-MLL è stato identificato in diluizioni seriali fino a 10-3 mentre MLL-AF6 fino a 10-2. La ricerca di MLL-AF6 e AF6-MLL nel DNA della Guthrie-card è risultata negativa. Alla diagnosi era stata identificata una mutazione di KRAS missenso G38A (esone 2). L'analisi del DNA della Guthrie-card ha sorprendentemente mostrato la presenza della stessa mutazione identificata alla diagnosi. Questa mutazione in KRAS è stata poi persa alla recidiva, dove abbiamo trovato mutazioni di PTPN11 esone 3. Il sequenziamento ha mostrato sequenze germline di PTPN11 nel DNA della Guthrie-card.

**Conclusioni.** Abbiamo dimostrato che in questo caso il riarrangiamento di MLL non sia avvenuto in utero, mentre la presenza della mutazione del gene KRAS dimostrerebbe il ruolo di "driver" rispetto a MLL. Abbiamo anche confermato che la mutazione di PTPN11, appartenente al pathway di RAS, avviene solo alla recidiva. Il nostro caso conferma ulteriormente che il pathway KRAS-MAPK deve essere considerato come target terapeutico in questo sottotipo di LMA.

#### P-048

### L'INIBIZIONE DI BRD4 COMBINATA CON IL TRATTAMENTO CON ACIDO RETINOICO HA UN EFFETTO SINERGICO SUL BLOCCO DEL CICLO PROLIFERATIVO DI LINEE CELLULARI DI LAM PEDIATRICA

P.P. Leoncini,<sup>1</sup> K. D'Ovidio,<sup>1</sup> R. Rota,<sup>1</sup> F. Locatelli,<sup>1,2</sup> A. Bertaina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Oncoematologia, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma; <sup>2</sup>Università degli Studi di Pavia, Pavia, Italia

**Scopo.** 1) Validare microRNA (miRNA) la cui espressione è modificata in pazienti

pediatriche con leucemia mieloide acuta (LAM); 2) Valutare l'effetto dell'inibitore farmacologico di BRD4, JQ1, sull'espressione dei miRNA; 3) Verificare l'effetto del trattamento combinato con JQ1 e acido retinoico (RA).

**Pazienti e Metodi.** Sono stati studiati blasti primari ottenuti da 15 pazienti pediatriche con LAM e 5 donatori sani. Dai leucociti è stato estratto l'RNA per valutare l'espressione di alcuni miRNA mediante RT-qPCR. È stato valutato l'effetto di JQ1 e dell'RA come agenti singoli e in combinazione sull'espressione del miR-26a e sulle capacità di proliferazione e sopravvivenza in linee cellulari di LAM pediatrica: THP-1 (MLL-AF9) e MV4-11 (MLL-AF4 e FLT3-ITD) e sulla linea promielocitica di controllo HL-60.

**Risultati.** I blasti primari presentavano una diminuzione significativa dei livelli del miR-26a ed un aumento del miR-155. È stato studiato il miR-26a poiché viene represso da MYC ed è un soppressore tumorale nella LAM. Il trattamento con JQ1 (250nM) riduce significativamente l'espressione di MYC nelle linee cellulari tumorali, confermando l'efficacia dell'inibitore. L'RA (500nM) ha un effetto simile nelle HL-60 ma minore nelle THP-1 e MV4-11. Il miR26a è indotto nelle 3 linee cellulari di circa 2 volte già a 48h sia con JQ1 che con RA, rispetto ai campioni trattati con il veicolo. Il ciclo cellulare è rallentato a 96h sia dal trattamento con JQ1 (+45% di cellule nella fase G1 e -65% nella fase S per le THP-1; +20% in G1 e -40% in S per le MV4-11 e le HL-60) che con quello con RA (+40% di cellule nella fase G1 e -50% nella fase S per le THP-1; +30% in G1 e -50% in S per le MV4-11 e le HL-60). In parallelo, circa il 20% di cellule diventa positivo per l'Annexin V (AnnV), indicatore di apoptosi, con entrambi i trattamenti per le THP-1 e le MV4-11. Il trattamento combinato JQ1/RA sulle 3 linee cellulari, rispetto ai trattamenti con gli agenti singoli, alza i livelli del miR-26a di circa 5 volte; aumenta del 30% le cellule in G1 diminuendo del 40% la fase S; ed aumenta la positività per l'AnnV di 4 volte.

**Conclusioni.** I risultati del nostro studio (i) mostrano che l'espressione di diversi miRNA è deregolata nei pazienti pediatriche con LAM e (ii) indicano che l'uso combinato di un composto utilizzato nella terapia delle LAP con un inibitore di BRD4 ha un effetto sinergico sulle caratteristiche tumorali delle cellule di LAM ed è in grado di amplificare la re-induzione di miRNA oncosoppressori.

#### P-049

### CARATTERIZZAZIONE GENOMICA DELL'ATTIVITÀ ONCOGENICA DELLA CHINASI ALK NEL LINFOMA ANAPLASTICO A GRANDI CELLULE PEDIATRICO

L. Mussolin,<sup>1,2</sup> P. Bonvini,<sup>2</sup> E. Pomari,<sup>1</sup>

F. Lovisa,<sup>1</sup> S. Bresolin,<sup>1</sup> C. Frasson,<sup>2</sup> G. Viola,<sup>1</sup> E. Carraro,<sup>1</sup> M. Pillon,<sup>1</sup> G. Basso<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Clinica di Oncoematologia Pediatrica, Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino, Università di Padova, Padova; <sup>2</sup>Istituto di Ricerca Pediatrico Fondazione Città della Speranza, Padova, Italia

**Scopo.** Il linfoma anaplastico a grandi cellule (ALCL) è caratterizzato dalla traslocazione cromosomica t(2;5)(p23;q35) che porta alla formazione della proteina chimerica NPM-ALK. Con gli attuali schemi terapeutici l'overall survival dei pazienti che recidivano è circa del 40%. Lo scopo principale di questo studio è stato di valutare l'espressione genica in una serie di biopsie tumorali di ALCL ALK+, al fine di comprendere meglio le caratteristiche genetiche e biologiche di questa neoplasia.

**Pazienti e Metodi.** I profili di espressione genica sono stati generati usando piattaforma Affymetrix. Gli algoritmi utilizzati e gli strumenti di analisi bio-informatica sono stati ottenuti da siti web pubblici. Saggi TaqMan (Applied Biosystems) sono stati utilizzati per convalidare i dati di espressione ottenuti. L'espressione di ALK e pALK, è stata valutata a livello proteico mediante Western blotting. L'effetto del trattamento delle linee cellulari di ALCL ALK+ con inibitori specifici per le Aurora chinasi è stata valutata con test MTT e analisi del ciclo cellulare.

**Risultati.** L'analisi unsupervised dei profili di espressione generati da 23 biopsie tumorali di ALCL, 12 linfonodi reattivi e 5 linee cellulari di ALCL, ha messo in evidenza che ciascun fenotipo presenta un distinto profilo di espressione genica. Abbiamo identificato due distinti profili, associati a differente espressione di NPM-ALK (bassa espressione, ALKlow; alta espressione ALKhigh) e diversa prognosi (7/8 pazienti recidivati appartengono al gruppo ALKhigh). I dati, validati ulteriormente in una coorte esterna di pazienti, dimostrano una riduzione di espressione ed attività di NPM-ALK nel gruppo ALKlow, associata alla up-regolazione dei geni della famiglia dell'interleuchina (IL-2,-15 e -21). I pazienti ALKhigh mostrano invece iper-espressione dei geni coinvolti nella proliferazione e nel ciclo cellulare, come Aurora chinasi A e B. Come atteso, l'inibizione di queste chinasi causa inibizione della proliferazione cellulare, blocco in fase G2-M e tetraploidia nelle cellule che esprimono NPM-ALK, in maniera direttamente proporzionale alla durata di somministrazione dei farmaci.

**Conclusioni.** I nostri dati dimostrano che il livello di espressione di NPM-ALK (ALKlow e ALKhigh) sembra condizionare fortemente i profili di espressione geni-

ca a la diversa prognosi dei pazienti con ALCL. Da questi stessi profili, nuovi target terapeutici, come le Aurora chinasi, possono essere identificati e studiati.

#### P-050

### IDENTIFICAZIONE DI MICRORNA DEREGLATI IN PAZIENTI PEDIATRICI AFFETTI DA JMML

A. Bertaina,<sup>1</sup> P.P. Leoncini,<sup>1</sup> G. Nigita,<sup>2</sup> C. Niemeyer,<sup>3</sup> D. Veneziano,<sup>2</sup> C. Flotho,<sup>3</sup> R. Rota,<sup>1</sup> S. Bresolin,<sup>4</sup> G. Basso,<sup>4</sup> R. Masetti,<sup>5</sup> C.M. Croce,<sup>2</sup> R. Garzon<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatric Hematology-Oncology, IRCCS Ospedale Bambino Gesù, Roma, Italia; <sup>2</sup>Department of Molecular Virology, Immunology and Medical Genetics, The Ohio State University, Columbus, OH, USA; <sup>3</sup>Division of Pediatric Hematology-Oncology, Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, University Medical Center, Freiburg, Germany German Cancer Consortium (DKTK), Heidelberg, Germany; <sup>4</sup>Department of Women's and Children's Health, University of Padova, Padova, Italia; <sup>5</sup>Department of Pediatrics, "Lalla Seragnoli" Hematology-Oncology Unit, University of Bologna, Bologna, Italia; <sup>6</sup>Division of Hematology, Comprehensive Cancer Center, The Ohio State University, Columbus, OH, USA

**Scopo.** Identificare microRNA (miRNA) deregolati nella Leucemia Mielomonocitica Giovanile (JMML) e valutarne il ruolo nella patogenesi della malattia.

**Pazienti e Metodi.** Sono stati studiati 40 pazienti con JMML e 8 controlli sani. La piattaforma Nanostring è stata utilizzata per analizzare il profilo di espressione dei miRNA in cellule derivate da midollo osseo. I risultati sono stati validati mediante RT-qPCR. Sono state realizzate analisi per la previsione di bersagli molecolari dei miRNA differenzialmente espressi nei due gruppi.

**Risultati.** L'analisi del profilo di espressione mediante Nanostring ha evidenziato una diminuzione in scala logaritmica (log2) dei livelli dei miR-150-5p (-2.4), miR-148a-3p (-1.2), miR-26a-5p (-1) e miR-29b-3p (-0.96), mentre i miR-23a-3p, miR-575 e miR-630 risultavano aumentati (0.7, 1.4 e 2.3, rispettivamente). La validazione mediante RT-qPCR ha confermato i dati per il miR-150 e il miR-23a-3p. Al contrario, le modulazioni dei miR-148a-3p e miR-630 non sono risultate significative. L'analisi con il metodo del Clustering gerarchico non ha fornito indicazioni significative sull'espressione differenziale dei miRNA nei diversi gruppi di pazienti con mutazione dei geni PTPN-11, N/K-RAS, CBL o NF1, tipiche della JMML. Lo studio in silico dei bersagli molecolari

putativi di tali miRNA ha permesso l'identificazione di alcuni fattori correlati alla tumorigenesi in generale, quali MYB, FLT3 e STAT5 per il miR-150-5p e MEIS1/2 per il miR23a-3p.

*Discussione.* Il nostro studio identifica per la prima volta alcuni miRNA, quali il miR-150-5p ed il miR-23a-3p, espressi in modo significativamente differente nei pazienti con JMM. I nostri risultati aprono la via a

ulteriori approfondimenti sul ruolo di tali miRNA nella patologia e alla validazione dei loro bersagli molecolari che potrebbero fornire indicazioni per un potenziale approccio terapeutico.