

PROGETTO DI RICERCA

Diagnosi di precisione nelle LAL-T dell'adulto e del bambino da sottoporre a trapianto di midollo osseo

Responsabile del Progetto: Prof.ssa Cristina Mecucci

Struttura Semplice di Medicina Molecolare, Sezione di Ematologia e Immunologia Clinica, Dip. Medicina Clinica e Chirurgia, Università degli Studi di Perugia, A.O. di Perugia,.

INTRODUZIONE

I risultati degli studi citogenetico-molecolari, applicati alle emopatie maligne, hanno profondamente cambiato le concezioni classificative e diagnostiche delle neoplasie ematologiche e recentemente, la proposta classificativa della World Health Organization ([WHO 2016](#)) ha formalizzato lo stato dell'arte sulla diagnostica genetica delle neoplasie sia linfo- che mielo-proliferative. L'esigenza della diagnosi genetica precisa ha assunto particolare rilievo anche in relazione all'applicazione clinica di molecole disegnate contro le lesioni molecolari con l'ottenimento di significativi successi terapeutici in numerose leucemie. Tali informazioni, se disponibili, guidano le scelte terapeutiche, inclusa la valutazione di un programma trapiantologico, in ogni singolo paziente, personalizzando al massimo il trattamento.

Negli ultimi anni, grazie alla introduzione di nuovi approcci di analisi citogenetico-molecolare (Ibridazione in situ a fluorescenza –FISH-, SNP array, sequenziamento Sanger e sequenziamento di nuova generazione, profilo di espressione genica-GEP-), abbiamo assistito a un profondo cambiamento delle nostre conoscenze sul profilo genetico delle LAL-T ([Belver L and Ferrando A, Nat Can Rev 2016](#); [Girardi T, et al. Blood 2017](#); [Gianni F, et. CSH 2019](#)). Inoltre l'utilizzo di approcci di studio integrati, ha permesso di iniziare a comprendere il processo "multi-step" con cui si giunge all'insorgenza della LAL-T. Tale processo è caratterizzato dall'acquisizione di molteplici anomalie, a carico di geni che regolano processi metabolici cruciali per la cellula. In particolare, i processi cellulari tipicamente alterati nelle LAL-T, sono il ciclo cellulare (CDKN2A, CDKN2B, RB1, TP53); la differenziazione cellulare (geni *HOXA*, *KMT2A*, *TLX1*, *TLX3*, , *LYL1*, *TAL1/2*, e *LMO1/2*); la proliferazione e/o sopravvivenza (*LCK*, *ABL1*, *PTPN2*, *JAK2*); e la capacità di auto-mantenimento (*NOTCH1*) ([Gianni F, et. CSH 2019](#)). Le molteplici anomalie che sono alla base della trasformazione leucemica consentono di classificare le LAL-T in gruppi e sottogruppi genetici. In questo senso, gli studi di GEP, si sono rivelati estremamente utili per definire specifici gruppi di LAL-T ([Ferrando et al., Cell 2002](#); [Soulier JP, Blood 2005](#); [Homminga I et al, Cancer Cell 2011](#)), identificando specifiche entità citogenetico-molecolari, che sono definite dalla iper-espressione di fattori di trascrizione T-linfoidi (*TAL1/2*, *LMO1/LMO2*, *HOXA*, *TLX1*, *TLX3*, *MEF2C*, e *NKX2.1*), in maniera mutualmente esclusiva. Gli stessi studi, seppur in maniera preliminare, hanno anche suggerito un potenziale impatto clinico della classificazione genetica con il gruppo di LAL-T con iper-espressione di *TLX1* associate a una prognosi relativamente favorevole ([Ferrando et al., Cell 2002](#)) e le forme più immature con iper-espressione di *HOXA* ad una prognosi peggiore ([Bond J et al., Haematologica 2016](#)).

Un altro aspetto da sottolineare è che lesioni genetiche diverse possono convergere su una classe di oncogene/i causandone l'espressione aberrante (Belver L and Ferrando A, Nat Can Rev 2016). Conseguentemente, diversi geni e meccanismi molecolari possono provocare la de-regolazione degli stessi processi cellulari e/o vie di trasduzione del segnale (De Smedt R, et al. Blood 2020). Una diagnosi genetica di precisione, volta a analizzare geni e meccanismi di de-regolazione genica, nonché a identificare le basi della trasformazione leucemica, sono di estrema rilevanza clinica per l'identificazione di bersagli molecolari e per il disegno di percorsi terapeutici personalizzati (Ferrando A, BPRCH 2018; Follini E et al., Int J Mol Can 2019; Shirazi PT et al., BJC 2019; Cordò V et al., BCD 2020).

Un ulteriore aspetto cruciale nell'impianto di una diagnostica molecolare avanzata delle LAL-T, è la determinazione della malattia minima residua (MRD) con metodica molecolare, che rappresenta, ad oggi, l'approccio più sensibile e specifico, per la rilevazione di piccole quantità di cellule leucemiche (10^{-5}), che possono persistere durante il trattamento o al termine della terapia. La persistenza di una MRD positiva rappresenta un criterio importante per le decisioni terapeutiche, anche in relazione alle procedure trapiantologiche (Flohr T et al., Leukemia 2008; Cazzaniga G et al., BJH 2011).

METODOLOGIA APPLICATA

L'attuazione del progetto richiederà l'integrazione delle tecnologie per lo studio dei riarrangiamenti genomici con metodiche che consentono di studiare le mutazioni geniche.

Ibridazione in situ fluorescenza. Si utilizzerà un approccio di mutiplex FISH, la cosiddetta CI-FISH (La Starza R et al., JMD 2019), disegnata, messa a punto e validata dal nostro laboratorio. Con questa metodica si studiano simultaneamente 50 oncogeni e oncosoppressori che sono ricorrentemente alterati nelle LAL-T. Tale approccio di studio sarà utilizzato in tutte le nuove diagnosi di LAL-T, del nostro Centro, dell'Onco-ematologia pediatrica dell'A.O. di Perugia, e nei casi afferenti dalle Ematologie italiane che fanno parte della rete nazionale GIMEMA (Gruppo Italiano per lo studio delle Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto).

SNP array. La metodica di SNParray consente di studiare, partendo dal DNA delle cellule leucemiche, sbilanciamenti genomici (delezioni, monosomie, trisomie, amplificazioni) e la perdita di LOH. Nel nostro laboratorio si utilizza la piattaforma Affymetrix/ThermoFisher (Cytoscan HD). Si sottoporranno a studio di SNParray tutti i casi in cui la CI-FISH non ha fornito informazioni citogenetico-molecolari sufficienti per la caratterizzazione della leucemia.

DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography): metodica ideale per l'identificazione di mutazioni come sostituzioni di singole basi nucleotidiche, piccole inserzioni o delezioni, con una sensibilità e specificità superiore al 97%. L'analisi è eseguita con il software Wavemaker™ (Wave™ System, MD Transgenomic Inc., Omaha, Nebraska, USA) e un programma di melting per DHPLC Melt Program (<http://insertion.stanford.edu/melt.html>). Il DNA dei campioni che risulteranno alterati dall'analisi DHPLC verrà sequenziato tramite sequenziatore 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Sequenziamento di nuova generazione di geni “target”. Sarà utilizzata una card disegnata in collaborazione con Sophia Genetics per lo studio di mutazioni hot-spot o dell'intera sequenza codificante di 60 oncogeni e oncosoppressori ricorrentemente mutati nelle LAL-T (Myseq, Illumina). Lo studio mutazionale sarà eseguito in tutte le nuove diagnosi di LAL-T.

Studio del profilo di espressione genica (GEP). Il GEP verrà utilizzato come primo approccio di classificazione genetica in tutti i casi di linfoma linfoblastico T, che hanno una piccola quota di infiltrato leucemico midollare, e nei casi in cui non sia stata possibile la classificazione genetica sulla base della CI-FISH. Lo studio sarà eseguito con la piattaforma Affymetrix/ThermoFisher (Clariom S Human).

Studio della Malattia Minima Residua (MRD). La malattia residua minima si valuterà mediante reazione quantitativa a catena della polimerasi in tempo reale (RQ - PCR) su aspirati di midollo osseo (Flohr et al, *Leukemia* 2008; Cazzaniga et al, *BJH* 2011). I bersagli molecolari sono riarrangiamenti clonali delle immunoglobuline (Ig), catene pesanti (IGH), e catena leggera IGK, e i geni della catena β , δ e γ del recettore delle cellule T (TR) (TRB, TRD, TRG). La ricerca dei riarrangiamenti IG/TR specifici, per ogni singola leucemia, viene eseguita nel campione diagnostico, prima dell'inizio della terapia. Il monitoraggio della MRD sarà eseguita anche dopo eventuale trapianto di cellule staminali ematopoietiche, per continuare il monitoraggio molecolare.

RISULTATI ATTESI

La prospettiva traslazionale dello studio è quella di:

DIAGNOSI: ottenere una precisa caratterizzazione genomica delle LAL-T, con particolare riferimento alla identificazione del sottogruppo genetico di appartenenza e dei molteplici eventi che concorrono al processo di leucemogenesi, in ogni singolo paziente. La presenza dei marcatori bio-molecolari sarà utilizzata per una **valutazione di rischio del paziente**. Informazioni, alla diagnosi, sulle caratteristiche di aggressività della malattia e di predittività di risposta ai trattamenti convenzionali, rappresenta un criterio utile per la selezione dei pazienti candidati al trapianto, consentendo di attivare il **programma trapiantologico** con le procedure di ricerca e selezione dei donatori sia familiari che da registro.

DURANTE LA TERAPIA: monitorare, con l'approccio molecolare, la MRD, per affinare la **stratificazione prognostica del paziente**, per **guidare la scelta chemioterapia vs trapianto di cellule staminale ematopoietiche**, per valutare la risposta ai trattamenti,

POST-TRATTAMENTO: monitorare la malattia con approccio molecolare al fine di identificare eventuali recidive precoci, precliniche e in pazienti ancora asintomatici, per riuscire ad intervenire precocemente alla ricomparsa di piccoli cloni leucemici, anche con **terapie sperimentali, innovative e personalizzate**.

BIBLIOGRAFIA:

Belver L, Ferrando A. The genetics and mechanisms of T cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2016 Jul 25;16(8):494-507.

Bond J, et al. An early thymic precursor phenotype predicts outcome exclusively in HOXA-overexpressing adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: a Group for Research in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia study. *Haematologica*. 2016 Jun;101(6):732-40.

Cazzaniga, G., et al. Defining the correct role of minimal residual disease tests in the management of acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology* 2011, 155, 45–52.

Cordò V et al., T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia: A Roadmap to Targeted Therapies. *Blood Can Discov* 2021, prepublished

Targeting cytokine- and therapy-induced PIM1 activation in preclinical models of T-cell acute lymphoblastic leukemia and lymphoma.

De Smedt R, et al. *Blood*. 2020 May 7;135(19):1685-1695

Ferrando A. Can one target T-cell ALL? *Best Pract Res Clin Haematol*. 2018 Dec;31(4):361-366.

Flohr, T., et al. Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2008, 22, 771–782.

Follini E, et al. Strategies to Overcome Resistance Mechanisms in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci*. 2019 Jun 20;20(12):3021.

Gianni F, et al. The Genetics and Mechanisms of T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2020 Mar 2;10(3).

Homminga I, et al. Integrated transcript and genome analyses reveal NKX2-1 and MEF2C as potential oncogenes in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*. 2011 Apr 12;19(4):484-97.

Jean Soulier, et al. HOXA genes are included in genetic and biologic networks defining human acute T-cell leukemia (T-ALL). *Blood* 2005 Jul 1;106(1):274-86. doi: 10.1182/blood-2004-10-3900.

La Starza R, et al. Design of a Comprehensive Fluorescence in Situ Hybridization Assay for Genetic Classification of T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Mol Diagn*. 2020 May;22(5):629-639.

Shirazi PT et al. The effect of co-occurring lesions on leukaemogenesis and drug response in T-ALL and ETP-ALL. *BJC* 2020, 122:455–464.