

Sesta edizione di

AIEOP...

...in Lab

NH Catania Centro – Catania, 26 e 27 Maggio 2023



Sesta edizione di

AIEOP.. ...in Lab



Indice

Comunicazioni orali..... 1-22

Poster..... 22-49

Sesta edizione di

AIEOP.. ...in Lab



Abs C01 4. Cancer Predisposition

VARIANTI COSTITUZIONALI RARE E RISCHIO DI LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA

F. Bonfiglio^{1,2}, L. Bettini^{3,4}, V. Lasorsa^{1,2}, V. Aievola^{1,2}, G. D'alterio^{2,5}, G. Fazio⁴, A. Iolascon^{1,2}, G. Cazzaniga^{4,6}, M. Capasso^{1,2}.

1. Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli "Federico II"; 2. Ceinge Biotecnologie avanzate Franco Salvatore; 3. Scuola di dottorato DIMET, Università di Milano Bicocca; 4. Centro Tettamanti, IRCCS San Gerardo dei Tintori; 5. Scuola Europea di Medicina Molecolare Università di Milano; 6. Genetica Medica, Dip. Medicina e Chirurgia, Università di Milano Bicocca;

Introduzione. Storicamente, per la maggior parte dei tumori pediatrici, compresa la leucemia linfoblastica acuta (LLA), non si è ipotizzata una base ereditaria. Studi recenti su DNA germinale hanno mostrato che il 5-10% dei bambini con cancro sviluppa la neoplasia a causa di una predisposizione genetica. Lo scopo del nostro studio è stato quello di identificare varianti rare patogenetiche in geni di predisposizione al cancro (GPC) associate a LLA.

Metodi. Abbiamo analizzato dati derivanti dal sequenziamento dell'esoma di 1,038 casi di LLA, da due coorti italiane (199 casi consecutivi del centro di Monza) e americane, e di 6,743 controlli. Le varianti sono state chiamate in modalità joint utilizzando GATK. In seguito ad una stringente procedura di armonizzazione sono stati selezionati un totale di 5,395 individui di etnia europea (624 casi e 4,771 controlli) e ottenute 1,156,869 varianti. È stato effettuato un test di *gene collapsing* utilizzando regressione logistica con correzione di Firth per identificare il contributo aggregato di varianti rare in 565 GPC selezionati. Le varianti indicate come "patogenetica" o "probabile patogenetica" (P/LP) in ClinVar e con una frequenza < 0.1% in banche dati di popolazione sono state utilizzate per l'analisi. I risultati delle due coorti sono stati combinati attraverso meta-analisi e l'analisi di arricchimento in pathway effettuata con WebGestalt.

Risultati. Abbiamo riscontrato varianti P/LP nell' 8.6% dei casi LLA. In particolare, i pazienti sono risultati arricchiti, rispetto ai controlli, di varianti germinali in oncosoppressori e geni con ereditarietà di tipo autosomico dominante ($P=6.5E-4$ and $P=0.016$, rispettivamente). Sono state identificate varianti in 30 GPC, principalmente coinvolti nei pathway della ricombinazione omologa e della risposta al danno al DNA ($P<0.01$). Un totale di 8 GPC (*CHEK2*, *PALB2*, *TP53*, *WRN*, *FANCC*, *RAB27A*, *BARD1* e *ATM*) hanno mostrato una frequenza significativamente più elevata di varianti P/LP rispetto ai controlli, con *CHEK2* risultato il più significativo ($OR=7.36$, $P=0.002$). Non sono state identificate varianti P/LP dei geni *PAX5*, *ETV6* o *IKZF1*, già identificati in famiglie con ricorrenza di LLA.

Conclusioni. Il nostro studio ha evidenziato che varianti rare ereditate in GPC contribuiscono alla predisposizione alla LLA. Questi risultati suggeriscono che il sequenziamento del DNA costituzionale potrebbe essere eseguito per tutti i pazienti con LLA alla diagnosi per stabilire un'eventuale consulenza genetica. Ulteriori studi del DNA germinale ed analisi funzionali saranno necessari per chiarire il contributo di queste varianti alla tumorigenesi della LLA e al beneficio di una loro precoce individuazione.

Sesta edizione di

**AIEOP..
...in Lab**



Abs C02 4. Cancer Predisposition

VARIANTI GERMLINE NEI GENI DI RIPARO AL DNA CORRELANO CON UN FENOTIPO DI INSTABILITÀ CROMOSOMICA IN PAZIENTI DI NEUROBLASTOMA

G. D'alterio^{1,2}, V. Lasorsa², F. Bonfiglio^{2,3}, V. Aievola³, M. Fischer⁴, F. Westermann^{5,6}, S. Diskin⁷, A. Iolascon^{2,3}, M. Capasso^{2,3}.

1. Scuola Europea di Medicina Molecolare, Università di Milano, Milano, Italia; 2. CEINGE Biotecnologie Avanzate s.c.ar.l., Napoli, Italia; 3. Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Napoli, Italia; 4. Dipartimento di Pediatria Oncologica Sperimentale, Università di Colonia, Colonia, Germania;

5. Centro Oncologico Pediatrico "Hopp", Heidelberg, Germania; 6. Divisione di Genomica del Neuroblastoma, Centro di Ricerca Tedesco per il Cancro, Heidelberg, Germania; 7. Ospedale Pediatrico di Philadelphia, Philadelphia, USA.

Contesto

È noto che le varianti genetiche costitutive (o germline), ereditate o de novo, possono predisporre allo sviluppo di più tipi di tumori, generalmente alterando la funzionalità di geni che controllano la crescita e la proliferazione cellulare. Tuttavia, oltre ad una semplice predisposizione, studi in letteratura suggeriscono che la presenza di tali varianti può portare attivamente allo sviluppo di specifici fenotipi tumorali, secondo una teoria nota come correlazione germline-to-somatic (GxM).

Scopo

Lo scopo di tale studio è quello di valutare la correlazione GxM in pazienti affetti da Neuroblastoma, un tumore pediatrico del sistema nervoso centrale. Secondo la nostra ipotesi, varianti germline predette come patogenetiche da tool bioinformatici in geni che controllano l'integrità del genoma possono contribuire allo sviluppo di un fenotipo di instabilità cromosomica (CIN) a livello tumorale, tipico dei sottotipi tumorali ad alto rischio clinico.

Metodi

In questo studio sono stati impiegati dati di Whole Genome Sequencing (WGS) di pazienti affetti da Neuroblastoma, ottenuti sia dal sangue periferico che dal tumore, provenienti da due coorti pubbliche (N=316). Dopo aver caratterizzato il genoma dei tumori per varianti strutturali e alterazioni numeriche, abbiamo calcolato 5 score riflessivi di CIN come descritto in letteratura. Dopo aver applicato filtri di controllo qualità, abbiamo selezionato varianti predette come patogenetiche in un set di 276 geni, divisi in 10 ulteriori pathway, coinvolti nel riparo al DNA. Infine, abbiamo valutato l'arricchimento di tali varianti in campioni con differente CIN score attraverso un test di carico mutazionale basato sui pathway.

Risultati

Score di CIN indicativi di stato di aneuploidia (score di aneuploidia e frazione di basi alterate) si associavano ad una migliore prognosi, contrariamente a quanto osservato per gli score di CIN riflessivi di varianti strutturali e alterazioni numeriche segmentali (numero di segmenti, passaggi di stato di numero di copie e burden di varianti strutturali), i quali erano maggiori nei pazienti ad alto rischio. Per quanto riguarda la correlazione GxM, è stato osservato un arricchimento di varianti predette come patogenetiche nei geni appartenenti al pathway del Non-Homologous End-Joining (NHEJ) nei tumori con un elevato numero di segmenti.

Conclusioni

Tali risultati evidenziano innanzitutto un'associazione fra i diversi score di CIN e i marker clinici nel Neuroblastoma, e suggeriscono che varianti germline nel pathway del NHEJ (noto per essere alterato in vari tumori caratterizzati da un fenotipo CIN) sono associate allo sviluppo di un alto numero di varianti strutturali nel tessuto tumorale.

Abs C03 4. Cancer Predisposition

LA CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE DEL LOCUS DI RISCHIO 11P11.2 IDENTIFICA *HSD17B12* COME UN GENE DI SUSCETTIBILITÀ AL NEUROBLASTOMA COINVOLTO NEL METABOLISMO LIPIDICO

T. Maiorino^{1,2}, M. Avitabile^{1,2}, V. A. Lasorsa², S. Cantalupo^{1,2}, M. Tirelli^{2,3}, A. Montella^{1,2}, M. Morini⁴, M. Ardito⁴, A. Eva⁴, M. Caterino², M. Ruoppolo², J. M. Maris⁵, S. J. Diskin⁵, A. Iolascon^{1,2}, M. Capasso^{1,2}.

1. Università degli studi di Napoli Federico II; 2. CEINGE Biotechnologie Avanzate Franco Salvatore; 3. Scuola Europea di Medicina Molecolare - Università degli studi di Milano; 4. IRCCS Istituto G. Gaslini - Laboratorio di Biologia Molecolare; 5. The Children Hospital of Philadelphia - University of Pennsylvania

Introduzione

Gli studi di associazione sull'intero genoma (GWAS) hanno contribuito allo studio della genetica del neuroblastoma identificando varianti di rischio comuni che attivano processi biologici correlati al cancro. Questo studio mira a caratterizzare funzionalmente il locus di predisposizione al neuroblastoma 11p11.2 emerso da un nostro precedente studio GWAS (Nguyễn, *Plos Genetics* 2011), valutando come la variante regolatoria di questo locus e il suo gene bersaglio possano influenzare lo sviluppo del neuroblastoma.

Metodi e risultati

Abbiamo annotato 72 varianti mappate nel locus 11p11.2 con dati funzionali da database pubblici (ATAC-seq, DNase HS, H3K27ac ChIP-seq e altri) su linee cellulari di neuroblastoma, e abbiamo identificato lo SNP rs2863002T>C, localizzato nel primo introne di *HSD17B12*, come la variante candidata funzionale del locus. L'analisi della sequenza genetica e di dati pubblici di Chip-seq su linee di neuroblastoma hanno mostrato che rs2863002 cade in un motivo di legame per il fattore trascrizionale GATA3 e, attraverso esperimenti di Chip-qPCR *in vitro*, abbiamo dimostrato che l'allele C della variante è associato a una minore affinità di legame verso questo fattore trascrizionale. L'analisi dei dati pubblici di espressione (eQTL) e dell'interazione cromatinica (Hi-C) hanno confermato che *HSD17B12* rappresenta il gene target del locus 11p11.2. In particolare, l'allele C di rs2863002 ha mostrato una maggiore attività trascrizionale in saggi di luciferasi *in vitro* e risulta associato a un maggiore livello di espressione di *HSD17B12* nella ghiandola surrenalica e in linee cellulari di neuroblastoma. Inoltre, abbiamo confermato l'associazione genetica di rs2863002 con il rischio di neuroblastoma genotipizzando 670 pazienti e 2032 controlli italiani mediante saggio TaqMann, dimostrando che l'allele C dello SNP è associato a un maggiore rischio di sviluppare questo tumore. Per valutare il ruolo di *HSD17B12* nel neuroblastoma abbiamo osservato il suo andamento analizzando i dati di RNA-seq da 498 campioni tumorali e abbiamo visto che più alti livelli di espressione di *HSD17B12* sono correlati a cattiva prognosi e bassa sopravvivenza. Coerentemente, il silenziamento del gene in cellule di neuroblastoma ha ridotto significativamente le loro capacità proliferative e invasive. Infine, mediante esperimenti di Lipidomica, abbiamo dimostrato che il silenziamento di *HSD17B12* nelle cellule di neuroblastoma altera il metabolismo lipidico, portando a una riduzione di molecole lipidiche con funzione energetica e a cambiamenti nelle caratteristiche chimico-fisiche delle membrane.

Conclusione

Questo studio evidenzia l'importanza della caratterizzazione funzionale post-GWAS dei loci di rischio per identificare nuovi geni di suscettibilità e nuovi meccanismi biologici alla base della predisposizione al neuroblastoma.

Sesta edizione di

**AIEOP..
...in Lab**



Abs C04 4. Cancer Predisposition

LA NICCHIA PRE-LEUCEMICA *ETV6::RUNX1*: RUOLO DELLE INFEZIONI E DEL MICROAMBIENTE MIDOLLARE NELLO SVILUPPO DELLA LEUCEMIA

M. Bertagna¹, D. Acunzo¹, A. Casado-garcia², C. Vicente-dueñas², I. Sanchez-garcia², G. Cazzaniga^{1,3}, C. Palmi¹.

1. Centro Ricerca Tettamanti, Fondazione IRCCS San Gerardo dei Tintori; 2. Institute for Biomedical Research of Salamanca (IBSAL); 3. Genetica Medica, Scuola di Medicina e Chirurgia, Università di Milano Bicocca

Il gene di fusione *ETV6::RUNX1* (E/R), generato durante la vita fetale dalla t(12;21), è l'alterazione più frequente nella leucemia linfoblastica acuta infantile (LLA). Tuttavia, E/R non è sufficiente per determinare l'insorgenza della malattia, ma ulteriori mutazioni sono necessarie per causare la leucemia nell'1% dei casi. Si ritiene che la causa della malattia sia da attribuire ad una risposta infiammatoria e immunitaria aberrante nei confronti di patogeni comuni, la quale può guidare la trasformazione maligna delle cellule pre-leucemiche *E/R*⁺, tramite l'acquisizione di mutazioni secondarie. Pertanto, l'obiettivo di questo lavoro è stato quello di meglio comprendere il ruolo delle infezioni/inflammazioni, nel contesto della nicchia ematopoietica, nella patogenesi della malattia. Per fare ciò, ci siamo avvalsi dell'utilizzo del topo transgenico Sca1-*ETV6*-*RUNX1*. Questi topi spostati da uno stabulario specific-pathogen-free (SPF) a uno convenzionale (CF) sviluppano la B-ALL a bassa penetranza, simulando così la condizione umana (Rodríguez-Hernandez G. et al. 2017). Al fine di studiare l'impatto dell'infezione a breve e lungo termine sul compartimento ematopoietico progenitore (Lin⁻Sca1⁺c-Kit⁺ (LSK)) e staminale (LSK CD48⁻CD150⁺) abbiamo determinato la frequenza di queste cellule nel midollo osseo (BM) dei topi stabulati per 4 e 12 settimane nella CF. In seguito a spostamento dei topi nella CF, abbiamo osservato che mentre l'esposizione a breve termine non influenza il numero delle cellule progenitrici e staminali, l'esposizione a lungo termine porta a una forte espansione del solo compartimento staminale, esclusivamente nei topi Sca1-*ETV6*-*RUNX1*. Tale espansione era preceduta da un aumento di cellule progenitrici *E/R*⁺ nel sangue periferico (PB) con un picco tra 4 e 8 settimane di stabulazione nella CF. Le cellule mobilizzate, specialmente quelle pre-leucemiche, avevano livelli di ROS maggiori rispetto a quelle residenti nel BM, che possono renderle più suscettibili a sviluppare altre mutazioni. Inoltre, le cellule *E/R*⁺ hanno mostrato una risposta chemiotattica ridotta verso CXCL12, chemochina importante nella ritenzione delle cellule nel BM. Infine, è stato valutato il profilo citochinico del BM e PB dei topi stabulati nella SPF e nella CF. Abbiamo osservato l'up-regolazione di alcune citochine pro-infiammatorie (IL9, G-CSF e IL6) solo nel siero dei topi WT stabulati nella CF, mentre nel BM non è stata riscontrata alcuna differenza tra i topi suggerendo che il topo pre-leucemico non sviluppi una risposta immunitaria anomala o esacerbata alle infezioni. I risultati ottenuti mostrano come l'infezione/inflammation modifichi il comportamento delle cellule pre-leucemiche *E/R*⁺ rendendole più attive e più prone all'acquisizione di ulteriori mutazioni. Ulteriori studi saranno necessari per elucidare questi meccanismi.

Abs C05 4. Cancer Predisposition

DNA REPAIR E LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA B-LINEAGE NELL'INFANZIA: RUOLO DEI GENI *NBS1*, *FANCD2*, *PALB2* E DELL'ESPRESSIONE DI *BRCA1* E *BRCA2*.

D. La Cognata¹, N. Andriano², E. Cannata³, M. La Rosa⁴, F. Bellia³, G. Pulvirenti¹, N. Li Volsi³, M. Arrabito³, G. Russo¹⁻⁴, L. Lo Nigro^{3,4}.

1. Scuola di Specializzazione in Pediatria, Università di Catania, Catania; 2. Dottorato di Ricerca in Medicina Traslazionale, Università di Catania, Catania; 3. U.O.C. di Ematologia ed Oncologia Pediatrica, Azienda Policlinico di Catania, Catania; 4. Laboratorio di Citogenetica-Citofluorimetria-Biologia Molecolare dell'U.O.C. di Ematologia ed Oncologia Pediatrica, Azienda Policlinico di Catania, Catania; 5. Scuola di Specializzazione in Genetica Medica, Università di Catania, Catania.

Introduzione. Il ruolo dei geni del DNA-Repair nella Leucemia Linfoblastica Acuta (LLA) pediatrica è ancora poco conosciuto. Abbiamo indagato le aberrazioni genetiche a carico di *NBS1*, *FANCD2* e *PALB2* e l'espressione di *BRCA1-BRCA2* in una popolazione di pazienti affetti da B-LLA e ne abbiamo valutato la possibile relazione con la recidiva di malattia e con l'insorgenza di tossicità grave (III-IV grado, secondo CTCAE) durante il trattamento chemioterapico.

Materiali e metodi. Abbiamo analizzato campioni di sangue midollare (diagnosi e remissione) di 111 pazienti con B-LLA così suddivisi: 16 con t(1;19), 48 con t(12;21), 9 con t(9;22)/Ph+, 5 con KMT2A-MLLpos e 33 "B-Others". I dati sono stati ottenuti mediante sequenziamento diretto per *NBS1*; MLPA per *FANCD2* e *PALB2*; Real-Time PCR per *BRCA1-BRCA2*, la cui espressione è stata definita come alta (high-H) o bassa (low-L) utilizzando come cut-off la Media e la Mediana dei Fold Change (FC).

Risultati. 54 pazienti su 111 hanno presentato ≥ 1 tossicità grave in chemioterapia; 21 su 111 sono andati incontro a recidiva. Il polimorfismo di *NBS1* (rs1805794 SNP_G>C), riscontrato nel 28% dei pazienti arruolati nello studio, presenta un ruolo protettivo nei confronti della tossicità grave ($p < 0,05$): infatti solo 10 pazienti su 54 presentavano tale polimorfismo; questo effetto protettivo è stato confermato nel sottogruppo t(12;21) ($p < 0,05$). Non sono emerse relazioni statisticamente significative tra *NBS1* e recidiva né tra *FANCD2/PALB2* e tossicità/recidiva di B-LLA. Alla diagnosi, il quadro di *BRCA1-H/BRCA2-H* è correlato ad una maggiore incidenza di tossicità grave: 17 pazienti con tossicità grave su 27 casi *BRCA1-H/BRCA2-H* vs 10 su 28 *BRCA1-L/BRCA2-L* ($p < 0,05$ in Mediana). Alla remissione, l'alta espressione di *BRCA1* (*BRCA1-H*) sembra esser correlata a un maggiore rischio di recidiva, seppur in maniera statisticamente non significativa ($p = 0,17$). *BRCA2-H*, invece, è associata ad una maggiore incidenza di recidiva rispetto a *BRCA2-L* ($p < 0,03$ in Media): 8 recidive su 22 pazienti (*BRCA2-H*) vs 13 su 88 (*BRCA2-L*). Di contro abbiamo osservato che i casi con *BRCA1-H/BRCA2-H* sono associati in maniera statisticamente significativa alla recidiva: 3 recidive su 6 pazienti *BRCA1-H/BRCA2-H* vs 8 recidive su 65 *BRCA1-L/BRCA2-L* ($p < 0,02$).

Conclusioni. Il nostro studio dimostra che il polimorfismo del gene *NBS1* e l'alta espressione alla diagnosi di *BRCA1-BRCA2*, così come l'alta espressione alla remissione di *BRCA1-BRCA2* potrebbero essere utilizzati come potenziali marker molecolari predittivi rispettivamente di elevato rischio di tossicità grave nei primi due casi e di recidiva di malattia nell'ultimo. Risulta pertanto necessario uno studio prospettico con una popolazione più numerosa.

Sesta edizione di

**AIEOP..
...in Lab**



Abs C06 5. Altro

MUTAZIONI IN REGIONI REGOLATORIE IMPLICATE NEI CIRCUITI DI REGOLAZIONE ADRENERGICO E MESENCHIMALE SONO ALLA BASE DELL'INSORGENZA DEL NEUROBLASTOMA

V. Aievola^{1,2}, V.a. Lasorsa², A. Montella^{2,3}, F. Bonfiglio^{2,3}, M. Tirelli^{2,4}, G. D'alterio^{2,4}, M. Fischer⁵, F. Westermann^{6,7,8}, A. Iolascon^{2,3}, M. Capasso^{2,3}.

1. Dipartimento di Ingegneria Elettrica e delle Tecnologie dell'Informazione, Università di Napoli Federico II, 2. CEINGE Biotecnologie Avanzate Franco Salvatore s.c.ar.l., 3. Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli Federico II, 4. Università Di Milano, 5. Experimental Pediatric Oncology, Children's Hospital and Center for Molecular Medicine, Medical Faculty, University of Cologne, 6. Hopp-Children's Cancer Center at the NCT Heidelberg (KITZ), 7. Division of Neuroblastoma Genomics, German Cancer Research Center (DKFZ), 8. German Cancer Consortium (DKTK)

Introduzione:

Il neuroblastoma è un tumore pediatrico del sistema nervoso simpatico che origina dalle cellule della cresta neurale. L'eterogeneità alla base del neuroblastoma si riflette in due diverse identità cellulari: adrenergica e mesenchimale. Tali differenti identità risultano dall'espressione di geni regolati da due set di fattori di trascrizione costituenti i circuiti centrali di regolazione (CCR) adrenergico e mesenchimale.

Obiettivi:

La nostra ipotesi è che varianti somatiche a singolo nucleotide (VSSN), alterando i siti di legame di fattori di trascrizione (FT) implicati nei CCR, influenzano il differenziamento cellulare promuovendo l'insorgenza tumorale. Il nostro obiettivo è quello di investigare l'insieme di tali regioni regolatorie al fine di identificare e caratterizzare funzionalmente putative varianti tumorigeniche.

Metodi:

Esperimenti di ChIP-seq e ATAC-seq condotti in linee adrenergiche di neuroblastoma (SKNBE2C e Kelly) sono stati integrati per identificare i siti di legame trascrizionalmente attivi di FT costituenti il CCR adrenergico. Le VSSN ottenute dal sequenziamento del genoma di 317 pazienti sono state mappate e, tramite test di Fisher, è stato valutato il loro arricchimento a livello dei siti precedentemente identificati. VSSN potenzialmente tumorigeniche sono state selezionate attraverso CADD, FuncSeq2 e motifbreakR e testate funzionalmente tramite saggi di luciferasi. Esperimenti di HiC nella linea adrenergica SKNBE2 sono stati condotti per identificare putativi geni interagenti con i siti di legame mutati. L'espressione di tali geni è stata valutata tramite esperimenti di RNA-seq in 89 dei 317 pazienti precedentemente menzionati ed è stata correlata con dati clinici e di sopravvivenza.

Risultati:

Integrando le VSSN di 151 pazienti con 6 ChIP-seq e un ATAC-seq condotte in SKNBE2C, sono stati identificati i siti di legame per PHOX2B, TBX2 e ISL1 significativamente arricchiti in mutazioni (FDR<0.05). In particolare, chr7:126481446:A>C è stata predetta diminuire l'affinità per PHOX2B e causare la riduzione dell'attività trascrizionale del sito di legame mutato. Una minore espressione dei geni interagenti con PHOX2B (GRM8 e PAX4) è stata osservata in pazienti portatori di chr7:126481446:A>C (P<0.05) e in tessuti tumorali di pazienti con prognosi peggiore (P<0.01). Estendendo l'analisi a un set di dati più ampio (317 pazienti, 19 ChIP-seq e 6 ATAC-seq condotte in SKNBE2C e Kelly), è stato osservato un arricchimento di mutazioni nei siti di legame di PHOX2B, TBX2 e ISL1 (FDR<0.05) comune in entrambe le linee cellulari, suggerendo un profilo mutazionale simile.

Conclusioni:

Questi risultati dimostrano che varianti somatiche in regioni regolatorie possono influenzare l'attività dei CCR promuovendo l'insorgenza del neuroblastoma.

Abs C07 5. Altro

UNA NUOVA STRATEGIA FARMACOLOGICA PER TRATTARE LA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA CON RIARRANGIAMENTO T(6;11)KMT2A::AFDN

C. Tregnago^{1,2}, A. Da Ros¹, M. Benetton¹, G. Longo¹, G. Borella¹, J. Sabatino³, G. Di Salvo³, F. Locatelli⁴, M. Pigazzi^{1,2}

1. Unità di Oncoematologia Pediatrica, Università-Ospedale degli Studi di Padova; 2. Fondazione Istituto Ricerca Pediatrica (IRP); 3. Unità di Cardiologia Congenita Pediatrica, Università-Ospedale degli Studi di Padova; 4. Dipartimento di Onco-Ematologia Pediatrica, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Università Cattolica; del Sacro Cuore di Roma

La leucemia mieloide acuta (LMA) pediatrica con riarrangiamento t(6;11)KMT2A::AFDN presenta una prognosi infausta con una percentuale di sopravvivenza inferiore a 25% mediata da una peculiare espressione genica, da iper-attivazione del signaling delle MAPK e da una marcata adesività cellulare. Grazie a uno screening di farmaci su larga scala abbiamo identificato che la t(6;11)-LMA risultava particolarmente responsiva alla tioridazina (TDZ) e che il meccanismo di morte delle cellule avveniva attraverso il rimodellamento citoscheletrico e la deregolazione dell'omeostasi del Ca²⁺. L'uso della TDZ risulta tuttavia limitato dal passaggio del farmaco attraverso la barriera ematoencefalica e dalla cardiotoxicità indotta dal prolungamento dell'intervallo QTc, come dimostrato in un trial clinico su LMA degli adulti.

Per superare questi effetti tossici, abbiamo sintetizzato un analogo, TDZ6, modificando la molecola per aumentarne la ramificazione e la polarità. TDZ6 ha mantenuto l'attività citotossica su linee cellulari e colture ex-vivo di LMA-PDX t(6;11)-riarrangiate, con un IC₅₀ <10 μM. Considerando il suo meccanismo d'azione, l'abbiamo testato in combinazione con venetoclax 0.2-1 μM, farmaco che agisce indirettamente sul mitocondrio. Tale combinazione ha dimostrato infatti una forte sinergia nel ridurre la vitalità cellulare (ZIP-synergy score 22.2; Combination Index 0.83) in campioni con riarrangiamento t(6;11), attraverso una massiva depolarizzazione mitocondriale e l'annullamento della capacità clonogenica. La sinergia è stata confermata in un modello tridimensionale (3D) in cui i blasti sono stati seminati in uno scaffold con cellule mesenchimali stromali. In vivo, TDZ6 è risultata efficace già a basse dosi (8 mg/kg i.p.) su topi immunodeficienti con iniezione sottocutanea di una linea cellulare t(6;11), tuttavia non ha mostrato efficacia alle stesse dosi in LMA-PDX-t(6;11). Attraverso uno studio dose-risposta effettuato su questi ultimi modelli, abbiamo identificato che la diminuzione del bulk leucemico è stata ottenuta utilizzando TDZ6 a 70 mg/kg i.p. (<46% su sangue periferico). Mediante misurazioni ripetute dell'intervallo QT effettuate con l'elettrocardiogramma su LMA-PDXs abbiamo verificato che tale dose non era cardiotossica, mentre il composto di riferimento TDZ lo era già a 12 mg/kg (p<0.00006, QTc ctr: 77.9 msec, TDZ6: 75.7 msec, TDZ: 93.7 msec).

Infine, questo studio ha dimostrato che l'analogo TDZ6 riduce la crescita della leucemia t(6;11) in vitro e in vivo senza provocare gli effetti cardiotoxici della molecola di riferimento. La combinazione TDZ6+venetoclax ha mostrato sinergia in vitro, e la sua valutazione su modelli LMA-PDX è in corso. Questo studio dimostra inoltre la necessità di avere un modello affidabile per ottenere delle predizioni di efficacia farmacologica che tengano conto del microambiente tumorale.

Sesta edizione di

**AIEOP..
...in Lab**



Abs C08 5. Altro

EGR1 POTENZIA L'ATTIVITÀ DI SUPPORTO DELLE CELLULE MESENCHIMALI STROMALI ALLE CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE

Ludovica Santi¹, M. Bertì¹, S. Beretta¹, G. Alberti¹, G. De Ponti¹, M. Mancino¹, S. Ferrari¹, I. Merelli¹, L. Naldini^{1,2}, Me. Bernardo^{1,2,3}, S. Crippa¹.

1: San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (SR-TIGET); 2: "Vita Salute" San Raffaele University; 3: Pediatric Immunohematology and Bone Marrow Transplantation Unit, San Raffaele Scientific Institute;

Le cellule mesenchimali stromali (MSCs) regolano l'omeostasi della nicchia midollare (BM), modulando i livelli di infiammazione in caso di stress e regolando la funzione delle cellule staminali ematopoietiche (HSPCs) per contatto diretto e/o attraverso rilascio di fattori paracrini. Nel nostro laboratorio abbiamo recentemente dimostrato che le MSCs producono diversi fattori di supporto e citochine antinfiammatorie in grado di ridurre gli effetti collaterali dell'editing genomico sulle HSPCs (GE-HSPC), che si traduce in un migliore attecchimento e ricostituzione ematologica rispetto ai protocolli standard di GE (Crippa et al., Mol Ther. 2022). Tuttavia, diversi lavori hanno dimostrato che le caratteristiche funzionali delle MSCs sono alterate dall'espansione in vitro che è necessaria a causa della ridotta frequenza delle MSCs nel BM.

Per sfruttare appieno il potenziale clinico delle MSCs abbiamo confrontato il trascrittoma delle MSCs isolate fresche dal BM con quello delle controparti espanse in vitro per identificare quei geni che possono essere modulati nelle MSCs in coltura, al fine di migliorare la loro capacità di supporto. Abbiamo identificato più di 4000 geni diversamente espressi, principalmente coinvolti nella produzione di citochine e nel supporto alle HSPCs. A conferma di questi dati in-silico, nelle MSCs espanse in vitro abbiamo osservato una ridotta espressione di geni coinvolti nel supporto ematopoietico (CXCL12, ANG1, VEGF) e di EGR1, un fattore di trascrizione che regola l'attività paracrina delle MSCs.

Per questo motivo abbiamo generato un vettore lentivirale per ripristinare l'espressione di EGR1 nelle MSCs umane (EGR1-MSCs), che upregolano l'espressione di EGR1 e dei geni regolati da EGR1 quando trasdotte con MOI 10 (mean VCN=5.5). Abbiamo quindi utilizzato le EGR1-MSCs a supporto delle GE-HSPCs. Abbiamo contato un numero maggiore di GE-HSPCs e una maggior percentuale di HSPCs primitive edite in presenza di EGR1-MSCs, rispetto alle GE-HSPCs manipolate in presenza delle MSCs non trasdotte o in assenza di cellule feeder. Abbiamo anche osservato una riduzione dell'espressione di IL1A e IL8 nelle GE-HSPCs + EGR1-MSCs. Abbiamo inoltre testato la risposta antinfiammatoria delle EGR1-MSCs trattate per 24 ore con stimoli infiammatori e dimostrato una maggiore espressione di geni antinfiammatori (IL10, PGE2, IDO) nelle EGR1-MSCs. I nostri dati preliminari mostrano che EGR1 potenzia le proprietà antinfiammatorie e di supporto alle HSPCs delle MSCs in vitro. Valuteremo il rilascio di citochine dopo co-cultura con GE-HSPCs e dopo stimoli infiammatori, e studieremo il potenziale antinfiammatorio delle EGR1-MSCs in modelli animali di infiammazione acuta e cronica e in protocolli di co-infusione nel contesto dei trapianti allogenici.

Abs C09 5. Altro

VESCICOLE EXTRACELLULARI DERIVATE DA CELLULE STROMALI MESENCHIMALI CARICATE CON FENRETINIDE COME NUOVO FARMACO CONTRO LE LINEE CELLULARI DI NEUROBLASTOMA

A. Zorzoli¹, G. Zuccari³, c. Brignole², c. Cocco¹, f. Morandi¹, f. Sabatini¹, i. Airoidi¹, m. Podestà¹, d. Marimpietri¹

¹ IRCSS Istituto Giannina Gaslini, Cell Factory; ² IRCSS istituto Giannina Gaslini, Laboratory of Experimental Therapies in Oncology; ³ University of Genoa, Department of Pharmacy

Il Neuroblastoma (NB) è il tumore solido più comune in età pediatrica. La prognosi infausta nel ~50% dei pazienti con NB ad alto rischio, ha reso necessarie nuove strategie di trattamento.

La Fenretinide (4-HPR) è un retinoide sintetico che ha mostrato attività citotossica contro diversi tumori solidi, presentando bassa tossicità sistemica e buona tollerabilità in studi clinici su pazienti con NB. La limitazione di questa molecola è la sua scarsa solubilità e biodisponibilità, con una conseguente limitata efficacia terapeutica.

Il nostro obiettivo è proporre una nuova strategia basata sull'uso di vescicole extracellulari (EV) derivate da cellule stromali mesenchimali (MSC) come vettori in grado di trasportare la Fenretinide alle cellule di NB, migliorandone la biodisponibilità.

Al fine di produrre EV cariche di 4-HPR, abbiamo trattato le MSC isolate dal funicolo cordonale umano (hUC) con 20 μM di 4-HPR per 48 ore. Le particelle, isolate mediante ultracentrifugazione, sono state caratterizzate tramite NTA dimostrando che le EV derivate da MSC (MSC-EV) e le vescicole extracellulari derivate da MSC caricate con Fenretinide (4-HPR-MSC-EV) avevano rispettivamente una concentrazione di $1,25 \times 10^{11}$ e $1,53 \times 10^{11}$ particelle/ml, ed una dimensione compresa tra 70 e 150 μm . Risultati simili sono stati ottenuti tramite il DLS, con un Potenziale Zeta negativo compreso tra -10 e -15 mV. L'analisi in HPLC ha permesso di quantificare la concentrazione di 4-HPR caricata nelle MSC-EV (5,90 μM).

Un pannello di linee cellulari umane di NB (IMR-32, HTLA-230, SK-N-AS, SH-SY5Y) è stata trattata con 4-HPR in forma libera e con una concentrazione di 4-HPR-MSC-EV contenente 1,77 μM di Fenretinide. Confrontando l'attività citotossica e antiproliferativa si è mostrata un'inibizione dose e tempo dipendente più efficace con il trattamento di Fenretinide incapsulata nelle EV; risultati confermati anche trattando sferoidi di cellule di NB.

Inoltre, l'analisi citofluorimetrica, ha osservato un maggior effetto apoptotico sulle cellule di NB trattate con 4-HPR-MSC-EV rispetto a quelle trattate con 4-HPR libero.

Al microscopio a fluorescenza si è osservato l'uptake delle 4-HPR-MSC-EV sulle cellule di NB, tramite marcatura fluorescente dei lipidi delle EV, localizzandole a livello della membrana cellulare delle cellule NB trattate con le vescicole extracellulari.

Presi insieme, i risultati ottenuti hanno dimostrato una maggiore efficacia delle 4-HPR-MSC-EV rispetto alla Fenretinide libera su cellule di NB umane *in vitro*, indicando come la strategia proposta possa migliorare la biodisponibilità del farmaco e quindi l'effetto terapeutico nel trattamento *in vivo* del neuroblastoma.

Sesta edizione di

AIEOP..
...in Lab



Abs C10 3. Biomarcatori in oncoematologia

MIR-146A-5P È ARRICCHITO NELLE VESCICOLE EXTRACELLULARI DEI PAZIENTI PEDIATRICI AFFETTI DA ALCL CON PROGNOSI INFAUSTA E HA UN RUOLO NELLA POLARIZZAZIONE DEI MACROFAGI

A. Garbin^{1,2}, C.c. Damanti^{1,2}, F. Lovisa^{1,2}, E. Gaffo³, L. Ferrone^{1,2}, A. Tosato^{1,2}, G. Contarini^{1,2}, E. Carraro¹, M. Pillon¹, S. Bortoluzzi³, A. Biffi¹, L. Mussolin^{1,2}.

1 Clinica di Onco-Ematologia Pediatrica, Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino, Università di Padova; 2 Istituto di Ricerca Pediatrica Città della Speranza; 3 Dipartimento di Medicina Molecolare, Università degli studi di Padova;

Background:

Il linfoma anaplastico a grandi cellule (ALCL) è caratterizzato dalla sovraespressione di CD30 e nella maggior parte dei casi pediatrici, dalla traslocazione t(2;5)(p23;q35). Anche se le strategie terapeutiche raggiungono un overall survival superiore all'80%, i pazienti recidivati/resistenti hanno ancora un prognosi infausta. L'infiltrazione macrofagica è stata associata ad una prognosi negativa in molti tumori ma il loro ruolo nell'ALCL è ancora poco chiaro. E' stato dimostrato che miR-146a-5p è in grado di polarizzare i macrofagi verso un fenotipo M2 con caratteristiche di supporto alla crescita tumorale.

Obiettivi:

L'identificazione di markers nelle vescicole extracellulari (s-EVs) che possano contribuire ad individuare i pazienti ad alto rischio e che permettano di chiarire i meccanismi molecolari e biologici alla base del processo metastatico.

Metodi:

Le s-EVs sono state isolate dal plasma di 14 pazienti che hanno raggiunto la completa remissione (CR) e 6 pazienti ricaduti (REL) alla diagnosi. Dalle vescicole è stato estratto l'RNA e processato per il sequenziamento su piattaforma Illumina. I dati sono stati analizzati con i software miR&more e DESeq2. Le validazioni sono state condotte su 69 pazienti (CR=47, REL=22) per miRNA selezionati tramite qRT-PCR. L'origine tumorale delle vescicole è stata confermata usando un anticorpo anti-CD30 biotilato. Per gli esperimenti funzionali sono state utilizzate le linee cellulari THP-1, Karpas-299 e SUPM2. Specifici markers sono stati valutati tramite immunoblotting, qRT-PCR e citofluorimetria.

Risultati:

Tre miRNA sono risultati essere significativamente arricchiti nelle vescicole dei REL rispetto ai CR (miR-146a-5p, miR-378a-3p, let-7g-5p). Questi presentano un elevato valore prognostico sia se considerati da soli, sia in combinazione, permettendo la suddivisione dei pazienti in 4 categorie di rischio. MiR-146a-5p è risultato avere il più alto valore prognostico (PFS 50%, SE+ 5% vs. 90%, SE+9% rispettivamente, p-value 0.0006, ROC curve p-value 0.007, AUC 0.7). Abbiamo dimostrato l'arricchimento di miR-146a-5p nelle vescicole CD30+ confermando la sua origine tumorale. Trasfettando le cellule THP-1 con miR-146a-5p abbiamo osservato un aumento dei marker M2 CD163 e Arginase -1. Inoltre, la presenza di macrofagi M2 o trattati con questo miRNA è in grado di aumentare l'aggressività delle cellule tumorali.

Conclusioni:

L'analisi di RNA-seq ha permesso di individuare uno specifico arricchimento di miRNAs nei pazienti REL rispetto ai CR alla diagnosi. In particolare, miR-146a-5p, rilasciato dalle cellule tumorali, può contribuire a facilitare la stratificazione dei pazienti alla diagnosi, contribuire alla polarizzazione dei macrofagi ed in questo modo concorrere all'aggressività tumorale.

Abs C11 3. Biomarcatori in oncoematologia

L'ANALISI TRASCRIPTOMICA (RNA-SEQ) NELLA ROUTINE DIAGNOSTICA: CARATTERIZZAZIONE GENETICA DEI PAZIENTI ARRUOLATI AL PROTOCOLLO AIEOP-BFM ALL2017.

C. Saitta,¹ F. Colnaghi,¹ A. Colombo,¹ C. Martino,¹ D. Silvestri,² B. Buldini,³ M.g. Valsecchi,^{2,4} A. Biondi,^{1,5} G. Fazio,¹ E.G. Cazzaniga,^{1,6}

¹ Centro Tettamanti, Fondazione IRCCS San Gerardo dei Tintori, Monza; ² Centro Operativo di Ricerca Statistica, Fondazione Tettamanti, Monza; ³ Dipartimento di salute della donna e del bambino, Università di Padova; ⁴ Statistica Medica, Università di Milano Bicocca, Monza; ⁵ Clinica Pediatrica, Università di Milano Bicocca, Monza; ⁶ Genetica Medica, Università di Milano Bicocca, Monza.

L'identificazione dei geni di fusione nella Leucemia Linfoblastica Acuta pediatrica (LLA) è cruciale per la stratificazione in classi di rischio e per il riconoscimento di potenziali target per terapie mirate. Ad esempio, l'identificazione dei trascritti di fusione che caratterizzano il sottogruppo 'ABL-class' consente di arruolare pazienti al protocollo EsPhALL2017/COGAALL1631, con l'utilizzo di inibitori di tirosin-chinasi. La caratterizzazione del trascritto *TCF3::HLF*, associato a prognosi infausta, consente di indirizzare i pazienti a immunoterapia o farmaci efficaci alternativi.

Per identificare trascritti di fusione non individuabili con metodiche convenzionali (RT-PCR), è stata effettuata un'analisi trascrittomico tramite Next Generation Sequencing (RNA-seq) su 371 diagnosi consecutive di LLA pediatrica arruolate in Italia nel protocollo AIEOP-BFM ALL 2017 dal 12/2021 al 12/2022. Di questi, 309 LLA-B (83.3%), 58 LLA-T (15.7%); 2 MPAL (Mixed-Phenotype Acute Leukemia-0.5%) 2 AUL (Acute Undifferentiated Leukemia-0.5%). Complessivamente, sono state ottenute librerie a RNA di qualità ottimale (per coverage, duplicati di PCR e reads>Q30) in 298/309 LLA-B (96.4%), 54/58 T (93.1%), 2/2 MPAL e 1/2 AUL. Nei 355 pazienti analizzati sono stati identificati 163 geni di fusione: 141/298 nei pazienti LLA-B (11 casi con 2 fusioni) e 22/54 T (3 casi con 2 fusioni).

Lo screening convenzionale con multiplex RT-PCR eseguito in parallelo ha evidenziato una concordanza del 97.7% (discordanti: 1 *BCR::ABL1* identificata in RNA-seq e 1 *ETV6::RUNX1* in RT-PCR).

In totale abbiamo identificato 77/163 (47.2%) fusioni non rilevabili con metodica tradizionale, tra cui la totalità delle fusioni dei pazienti LLA-T. Delle 55 fusioni identificate in LLA-B, 13/55 (23.6%) coinvolgono il gene *PAX5*; altri trascritti di fusione coinvolgono geni la cui alterazione è associata all'attivazione di pathways specifici (es. *JAK/STAT* per le fusioni di *CRLF2e JAK2*) e potenziali futuri target terapeutici, oppure geni il cui significato prognostico potrà essere dimostrato su casistiche retrospettive e prospettiche.

Le 22 fusioni identificate nelle LLA-T sono così classificabili: 5 ABL-class, 6 *MLL/MLLT10*, 3 CDK6-class, 2 *ETV6*-class, 2 *ZEB1::GNAS*, 1 *SET::NUP214*, 1 *HOXA10::TRB*, 1 *NPM1::ALK1*, 1 *STIL::TAL*. L'identificazione di un numero rilevante di ABL-class in LLA-T contribuirà alla valutazione internazionale della possibilità di definire un percorso terapeutico specifico con utilizzo di inibitori di tirosin-chinasi, come per le LLA-B.

Abbiamo dunque dimostrato che la metodica NGS su RNA è più efficace della metodologia gold standard nell'identificazione dei geni di fusione.

Abbiamo altresì confermato la fattibilità dell'applicazione di RNA-seq nella routine diagnostica, che verrà migliorata implementando l'automazione delle fasi preparative e analitiche (validazione bioinformatica dei risultati), con riduzione dei tempi di refertazione per una più tempestiva applicazione clinica dei risultati.

Sesta edizione di

AIEOP.. ...in Lab



Abs C12 3. Biomarcatori in oncoematologia

IL MONITORAGGIO DELLE SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO PERMETTE DI IDENTIFICARE LE CELLULE STAMINALI LEUCEMICHE

M. Benetton¹, A. Da Ros¹, G. Borella¹, G. Longo¹, A. Peloso¹, S. Bresolin¹, C. Tregnago^{1,2}, F. Locatelli³, M. Pigazzi^{1,2}.

1. Unità di Oncoematologia Pediatrica, Università-Ospedale degli Studi di Padova; 2. Fondazione Istituto Ricerca Pediatrica (IRP); 3. Dipartimento di Onco-Ematologia Pediatrica, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma

I bambini affetti da leucemia mieloide acuta (LMA) vengono curati con la chemioterapia che colpisce le cellule attivamente proliferanti, tuttavia è noto le cellule staminali leucemiche (LSCs), poco proliferanti e dormienti, persistono provocando una recidiva in circa il 30% dei casi.

Attualmente, identifichiamo le LSCs mediante la positività al CD34 riconoscendone la frazione più staminale come quella negativa al CD38, tuttavia la loro identificazione è ancora un argomento dibattuto. Recentemente, si è attribuito alle LSCs un metabolismo peculiare. A tal proposito, abbiamo isolato, a partire dal bulk leucemico, il 20% di blasti con più bassi o alti livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS_{low}-RL e ROS_{high}-RH) in campioni primari di LMA alla diagnosi. Abbiamo caratterizzato queste due popolazioni osservando che le RL possiedono una maggior capacità clonogenica ($n=7$, $p<0.01$). Le RL e RH impiantate in topi NSG hanno generato LMA al primo inoculo, ma solo quella generata da RL ha attecchito in un secondo e terzo topo ricevente, mostrando che le RH avevano esaurito questa capacità. Abbiamo inoltre impiantato scaffolds tridimensionali (3D) in topi NSG seminando cellule RL e RH con mesenchimali stromali; dopo 3 mesi gli scaffolds sono stati sezionati mostrando che le cellule RL si localizzano più lontane dai vasi rispetto alle RH ($p<0.0001$) mediante immunofluorescenza. Queste caratteristiche supportano che la frazione cellulare RL è maggiormente arricchita di LSCs. Abbiamo eseguito l'RNAseq delle RL e RH ($n=5$) trovando 417 geni differenzialmente espressi appartenenti a vie del segnale legate a ciclo cellulare, adesione e metabolismo. La validazione in vitro ha mostrato che le RL sono perlopiù dormienti, essendo prevalentemente in fase G0/G1 (85%), e proliferano più lentamente rispetto alle cellule RH (mediante CFSE). Le cellule RL possiedono un basso potenziale di membrana mitocondriale (mediante TMRE $p<0.0001$), minori ROS mitocondriali (mitoSOX $p=0.003$) e massa mitocondriale (Mitotracker $p=0.01$), unitamente a una minor produzione di ATP ($p<0.0001$), suggerendo funzioni mitocondriali ridotte. A conferma, l'inibitore mitocondriale IACS-010759 si è dimostrato efficace nell'indurre morte cellulare nelle cellule RL, ma non nelle RH ($p=0.02$). Infine, le RL si sono dimostrate più resistenti alla citarabina rispetto alle cellule RH solamente quando coltivate in adesione su fibronectina o in 3D ($p=0.05$) grazie a una incrementata produzione di fibre da stress.

In conclusione, con questa strategia abbiamo estratto dal bulk leucemico una nuova frazione altamente arricchita di LSCs. La sua caratterizzazione rivela che per garantire l'identificazione di farmaci che eliminino le LSCs l'uso di modelli 3D è imprescindibile.

Sesta edizione di

**AIEOP..
...in Lab**



Abs C13 3. Biomarcatori in oncoematologia

SPINK2: STUDIO BIOCHIMICO DI UN POTENZIALE BIOMARCATORE DI CHEMIO-RESISTENZA NELLA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA PEDIATRICA.

V. Di Bella¹, V. Barresi¹, L. Lo Nigro^{2,3}, A. P. Privitera¹, C. Scuderi¹, P. Bonaccorso³, D.f. Condorelli¹

¹ Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologiche, Sezione di Biochimica Medica, Università degli Studi di Catania; ² Centro di Onco-ematologia pediatrica, Azienda Policlinico di Catania; ³ Laboratorio di Citogenetica - Citofluorimetria - Biologia Molecolare – Centro di Onco-ematologia pediatrica, Azienda Policlinico di Catania.

Background. Il 10-15 % dei pazienti pediatrici affetti da Leucemia Mieloide Acuta (LAM) non risponde alla terapia di induzione primaria con Idarubicina, Citarabina, Etoposide (ICE). Questa forma di chemioresistenza primaria viene indicata come “Primary Induction Failure” (PIF).
Materiali e Metodi. Utilizzando dati di RNA-seq e microarray, appartenenti a tre differenti coorti di pazienti pediatrici (AIEOP-AML-2002/01, TARGET AML, coorte locale), abbiamo identificato i geni differenzialmente espressi (DEGs) sia in soggetti con riarrangiamenti NUP98, spesso presenti nella condizione PIF-LAM, sia nei pazienti PIF. **Risultati.** Tra i geni identificati, SPINK2 rappresenta il trascritto maggiormente espresso nei soggetti PIF-LAM in confronto ai pazienti PIR (Primary Induction Responsive)¹. Questo gene codifica per un inibitore di serin-proteasi tripsina-simili, appartenente alla famiglia SPINK (Serine Protease Inhibitor Kazal-type). SPINK2 è stato originariamente descritto come inibitore dell’attivazione prematura dell’acrosina, una serin-proteasi espressa negli spermatozoi, ma di cui non è ancora noto il ruolo nella ematopoiesi normale e/o patologica. La nostra analisi di dati di single-cell RNA-seq ha rivelato la presenza di alti livelli del trascritto SPINK2 nelle cellule emopoietiche CD34+ normali del midollo osseo. Abbiamo confermato l’espressione di SPINK2, tramite qRT-PCR e western blot, in cellule CD34+, raccolte da sangue periferico umano dopo trattamento mobilizzante e arricchite mediante biglie immunomagnetiche. Inoltre, combinando modelli matematici e risultati sperimentali di cinetica enzimatica è stato possibile determinare le costanti cinetiche dell’inibizione temporanea in un sistema modello composto dalla proteina ricombinante umana SPINK2 e da tripsina resistente all’auto-degradazione. **Conclusioni.** Questi dati hanno consentito di proporre un ruolo fisiologico per SPINK2 nell’ematopoiesi normale e una nuova ipotesi sul suo coinvolgimento nel meccanismo della chemioresistenza primaria dei blasti della LAM.

¹Barresi, V., et al (2021). NUP-98 Rearrangements Led to the Identification of Candidate Biomarkers for Primary Induction Failure in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. International journal of molecular sciences, 22(9), 4575. <https://doi.org/10.3390/ijms22094575>

Abs C14 2. Disease modeling

LE VARIANTI SOMATICHE IN REGIONI NON CODIFICANTI DEL GENOMA GUIDANO LA TRASFORMAZIONE MALIGNA NEL NEUROBLASTOMA

A. Montella^{1,2}, M. Tirelli^{1,3}, V.a. Lasorsa¹, A. Iolascon^{1,2}, M. Capasso^{1,2}.

1. CEINGE-Biotecnologie Avanzate Franco Salvatore; 2. Università degli Studi di Napoli Federico II; 3. Scuola Europea di Medicina Molecolare - Università degli studi di Milano

Introduzione

Il neuroblastoma rappresenta circa il 7-10% dei tumori nei bambini di età compresa tra 0 e 5 anni con una sopravvivenza a lungo termine per i pazienti ad alto rischio oggi inferiore al 50%. Come la maggior parte dei tumori pediatrici, poche sono le mutazioni somatiche nella porzione codificante del genoma che guidano la trasformazione maligna. A tal proposito, sempre più d'interesse appare la porzione non codificante per l'identificazione di mutazioni causative dell'insorgenza di tale malattia.

Dati preliminari

Un nostro recente studio di sequenziamento dell'intero genoma in 152 tumori primari di neuroblastoma ha evidenziato un arricchimento di varianti somatiche in elementi regolatori tessuto-specifici in prossimità dei geni *CTTNBP2* (*CTTNBP2_Variante_1* e *CTTNBP2_Variante_2*) e *MCF2L* (*MCF2L_Variante_1* e *MCF2L_Variante_2*). Tali varianti, alterando i legami a specifici fattori di trascrizione (FT) coinvolti nella tumorigenesi del neuroblastoma, ne influenzano l'espressione.

Metodi

Per verificare l'impatto delle varianti sugli elementi regolatori e sul legame ai FT, saggi di luciferasi, da soli e in combinazione con il silenziamento dei FT il cui motivo di legame è stato predetto alterato attraverso "motifbreaker", ed esperimenti di ChIP-qPCR sono stati condotti in LAN2, SHSY5Y, CHP212 e SKNBE2. Il silenziamento dei FT è stato eseguito per dimostrare la correlazione tra l'espressione di questi e i geni *CTTNBP2* e *MCF2L*. L'editing genomico mediante CRISPR/Cas9 è stato eseguito in HEK293 per mimare l'effetto di *CTTNBP2_Variante_1* sull'espressione di *CTTNBP2*. Saggi di proliferazione e invasività cellulare sono stati effettuati sui cloni isogenici e sulle linee di neuroblastoma silenziate per *CTTNBP2* e *MCF2L*.

Risultati

È stato osservato che le varianti *CTTNBP2_Variante_1*, *MCF2L_Variante_1* e *MCF2L_Variante_2*, diminuiscono l'attività dell'elemento regolatorio, compromettendone il legame con STAT3; mentre *CTTNBP2_Variante_2* aumenta l'attività regolatoria dell'elemento diminuendone il legame con SIN3A nelle SHSY5Y, mentre nelle LAN2 ne riduce l'attività indipendentemente dal legame con SIN3A. A conferma di tali risultati, il silenziamento di *STAT3* incrementa i livelli di *CTTNBP2* e *MCF2L*, mentre, il silenziamento di *SIN3A* determina un incremento dei livelli di *CTTNBP2* solo nelle SHSY5Y.

Nella linea isogenica, *CTTNBP2_Variante_1* diminuisce l'espressione di *CTTNBP2* incrementando la proliferazione e l'invasività cellulare, suggerendo un possibile ruolo di questo gene come oncosoppressore, in accordo con i risultati ottenuti tramite il silenziamento di *CTTNBP2* nelle LAN2. Analogamente il silenziamento di *MCF2L* determina un fenotipo cellulare più aggressivo in SKNBE2 e CHP212.

Conclusioni

Questi risultati evidenziano che le varianti somatiche non codificanti possono avere un ruolo sull'insorgenza del neuroblastoma e potrebbero rappresentare nuovi biomarcatori prognostici, diagnostici e terapeutici.

Sesta edizione di

**AIEOP..
...in Lab**



Abs C15 2. Disease modeling

IL MIR-122-5P EPATICO CIRCOLANTE PROMUOVE L'AGGRESSIVITÀ DEL LINFOMA ANAPLASTICO A GRANDI CELLULE DEL BAMBINO

Cc Damanti^{1,2}, Ferrone Lavinia^{1,2}, E Gaffo³, A Garbin^{1,2}, A Tosato^{1,2}, G Contarini^{1,2}, I Galligani Ilaria^{1,2}, R Angioni Roberta 2-4, B Molon 2-4, G Borile², E Carraro¹, M Pillon¹, F Scarmozzino 5, Ap Dei Tos 5, M Pizzi, F Ciscato⁴, A Rasola⁴, A Biffi^{1,2}, S Bortoluzzi³, F Lovisa^{1,2}, And L Mussolin^{1,2}

1. Dipartimento della Salute della Donna e del Bambino, Università degli studi di Padova; 2. Istituto di Ricerca Pediatrica Città della Speranza; 3. Dipartimento di Medicina Molecolare, Università degli studi di Padova; 4. Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli studi di Padova; 5. Dipartimento di Medicina – DMED, Università degli studi di Padova; ;

Background

Il linfoma anaplastico a grandi cellule (ALCL) del bambino è un linfoma aggressivo a cellule T, CD30 positivo. La sopravvivenza dei pazienti raggiunge attualmente il 70%, ma i casi che incontrano ricaduta hanno una prognosi ancora infausta. In questo contesto la biopsia liquida ha il potenziale di aiutare ad individuare precocemente e con poca invasività i pazienti che andranno incontro a prognosi peggiore. Gli esosomi plasmatici sono stati recentemente caratterizzati per il loro importante ruolo di biomarcatori di malattia e di messaggeri intercellulari, contribuendo attivamente alla formazione e diffusione del tumore.

Metodi e risultati

In questo studio, tramite small-RNA sequencing, abbiamo caratterizzato il profilo di microRNA (miRNAs) contenuto negli esosomi plasmatici in una coorte dei di ALCL (n=20) e di controlli sani (n=5). Da analisi bioinformatiche si è evidenziato un profilo distinto dei pazienti rispetto ai controlli. Abbiamo poi riscontrato tramite qRT-PCR, in una più ampia coorte di validazione di 66 ALCL e 19 controlli, la significativa maggiore abbondanza del miR-122-5p negli esosomi plasmatici dei pazienti. Elevati livelli di questo miRNA correlano con elevate transaminasi nel plasma dei pazienti alla diagnosi indicando quindi una possibile correlazione con danno epatico. Infatti il miR-122-5p è il miRNA più abbondante ritrovato nel tessuto epatico e non è espresso nella biopsia del tumore primario dei pazienti, né si trova espresso nelle linee cellulari di ALCL. Questi dati suggeriscono un'origine non tumorale degli esosomi arricchiti di miR-122-5p. Elevati livelli di miR-122-5p esosomiali, correlano anche con alti stadi di malattia, suggerendo un possibile coinvolgimento del miRNA con la diffusione del tumore. In questo lavoro abbiamo infatti dimostrato come il miR-122-5p, tramite l'inibizione dei suoi target possa inibire la glicolisi nelle cellule stromali della nicchia premetastatica, lasciando più glucosio libero nell'ambiente. Le linee cellulari di ALCL trattate con i mezzi condizionati con maggiore presenza di glucosio, derivati da cellule stromali over-esprimenti il miR-122-5p, mostrano una maggiore aggressività in vitro. Infine, topi trattati con dosi multiple di esosomi ricchi di miR-122-5p presentano una maggiore disseminazione del tumore rispetto a topi trattati con esosomi di controllo.

Conclusione

In conclusione, con questo studio abbiamo identificato un nuovo meccanismo molecolare mediato da esosomi non tumorali arricchiti di miR-122-5p che promuove l'aggressività e la disseminazione delle cellule tumorali nell'ALCL. Questi risultati suggeriscono possibili risvolti per l'utilizzo clinico di antagonisti del miR-122-5p nei pazienti affetti da ALCL al fine di migliorare il loro esito clinico.

Sesta edizione di

AIEOP.. ...in Lab



Abs C16 2. Disease modeling

LO SVILUPPO DI MODELLI ANIMALI DERIVATI DA PAZIENTI AFFETTI DA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA E IL SEQUENZIAMENTO MASSIVO SONO STRUMENTI INDISPENSABILI PER RIVELARE L'EVOLUZIONE CLONALE E NUOVI TARGET FARMACOLOGICI.

A. Da Ros¹, V. Indio², A. Peloso¹, G. Borella¹, M. Benetton¹, G. Longo¹, B. Michielotto¹, S. Bresolin^{1,3}, C. Tregnago^{1,3}, B. Buldini^{1,3}, A. Pession⁴, F. Locatelli⁵, M. Pigazzi^{1,3}

1. Unità di Oncoematologia Pediatrica, Università-Ospedale degli Studi di Padova; 2. Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna; 3. Fondazione Istituto Ricerca Pediatrica (IRP); 4. Unità di Pediatria, IRCCS Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna; 5. Dipartimento di Onco-Ematologia Pediatrica, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma

Nell'ultimo decennio l'*outcome* dei pazienti pediatrici affetti da Leucemia Mieloide Acuta (LMA) è migliorato anche grazie all'ampia caratterizzazione genetica-molecolare, la quale tuttavia non ha ancora portato all'utilizzo di farmaci mirati al profilo mutazionale nel trattamento delle LMA. Per identificare bersagli molecolari e nuovi farmaci è fondamentale eseguire studi preclinici su modelli di malattia che garantiscano risultati applicabili, con successo poi, nei trials clinici. A oggi i modelli cellulari o animali generati con cellule primarie derivate dal tumore del paziente sono considerati i più robusti per raggiungere questo scopo.

Abbiamo inoculato 64 campioni di LMA primarie in topi NSG per generare modelli derivati da paziente (*patient derived xenograft*, PDX-P0) ottenendo l'attecchimento nel 40% dei casi, in un tempo medio di 5 mesi (31-484 giorni). Utilizzando i PDX-P0 abbiamo generato i PDX-P1 e P2, con attecchimento nell'87% dei casi (tempo medio 3 mesi). Abbiamo ottenuto 26 modelli completi che rispecchiano 14 diversi sottogruppi genetici, con una cospicua rappresentazione di LMA *KMT2A*-riarrangiate (n=13/26). Si è osservata una significativa correlazione tra le LMA attecchite in vivo e la sopravvivenza dei pazienti. La caratterizzazione della LMA murina per immunfenotipo, genetica e trascrittomica ha mostrato una forte similarità a quella originale. Il sequenziamento di esoma e trascrittoma ha evidenziato lievi cambiamenti dalla LMA originale al primo passaggio in vivo (PDX-P0). La stabilità è pressoché del 100% tra P0, P1 e P2, garantendo la riproducibilità dei modelli quando espansi per eseguire test farmacologici. Dai dati di Whole Exome Sequencing (WES) si conferma un'elevata eterogeneità genomica: per ogni modello sono state identificate un numero di varianti di predetta patogenicità tra 23 e 67, con frequenza allelica (AF) variabile e nessuna ricorrenza. Mediante lo studio delle AF di ciascuna variante dalla LMA originale ai PDXs si evidenzia un'evoluzione nella composizione clonale in ciascun modello: tutti presentano un clone "founder" comune tra LMA originale e P0-P1-P2 (composto in media da 25 varianti, AF=50%) caratterizzato da almeno una variante in geni *driver* noti; ci sono poi ulteriori cloni espansi (AF incrementata), o di nuova identificazione nei PDXs. In due modelli abbiamo osservato la perdita di cloni presenti nella LMA originale, caratterizzati tuttavia da varianti in noti geni *driver* (*KRAS*, *MYCN*, *SETD2*).

Questi risultati evidenziano come lo studio dell'evoluzione clonale possa aiutare a delucidare aspetti della leucemogenesi, ma soprattutto sia necessario per identificare le lesioni genetiche coinvolte nella progressione della malattia, che quindi costituiscono i target farmacologici più promettenti.

Abs C17 3. Biomarcatori in oncoematologia**GENERAZIONE DI UN MODELLO DI KNOCK DOWN COSTITUTIVO DI MUSASHI-2 IN CELLULE DI PAZIENTI AFFETTI DA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA CON RIARRANGIAMENTO DEL GENE KMT2A**

L. Valsecchi¹, S. Procopio¹, S. Naso¹, F. Klein², M. Carlet², I. Jeremias², A. Biondi^{3,4}, G. Cazzaniga^{4,5}, M. Bardini¹.

1. Centro Tettamanti, Fondazione IRCCS San Gerardo dei Tintori; 2. Research Unit Apoptosis in Hematopoietic Stem Cells, Helmholtz Center Munich, German Center for Environmental Health (HMGU); 3. Centro Tettamanti, Pediatria, Fondazione IRCCS San Gerardo dei Tintori; 4. Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi Milano-Bicocca; 5. Centro Tettamanti, Genetica Medica, Fondazione IRCCS San Gerardo dei Tintori.

La Leucemia Linfoblastica Acuta a insorgenza entro il primo anno di età con riarrangiamento del gene KMT2A/MLL (infant LLA MLLr) è una forma rara ma molto aggressiva, associata a prognosi infausta e alto rischio di ricaduta. La patogenesi della infant LLA MLLr e i meccanismi di resistenza ai farmaci non sono completamente conosciuti, perciò l'identificazione di nuovi geni target è importante per sviluppare nuovi approcci terapeutici. Un nostro studio precedente ha identificato l'RNA-binding protein Musashi-2 (MSI2) come potenziale marcatore e target terapeutico nella LLA MLLr.

Per avvalorare il ruolo funzionale di MSI2 nei blasti primari di pazienti infant LLA MLLr, abbiamo studiato un modello di RNA-interferenza (RNAi) in campioni di patient-derived xenograft (PDX) utilizzando un sistema di vettori lentivirali contenenti uno short hairpin RNA (shRNA) anti-MSI2 (Fig.1A). L'uso di PDXs MSI2 knock-down (KD) consente una più fedele rappresentazione della complessità in vivo.

Otto diversi costrutti shRNA anti-MSI2 sono stati testati per selezionare i migliori tre. La linea cellulare umana SEM (da LLA positiva per MLL::AF4) è stata co-infettata con due plasmidi: il primo contenente il costrutto dsRED/miR30 shRNA anti-MSI2 (Fig.1B) e il secondo contenente la sequenza codificante luciferasi (Fig.1C, eFFly/eGFP). Parallelamente, le stesse cellule sono state co-infettate con un plasmide di controllo dsRED/miR30 shRNA CNTRL (contenente una sequenza aspecifica, Fig.1B) insieme a un plasmide luciferasi (Fig.1C, Gluc/mtagBFP). Questo sistema consente di discriminare le cellule MSI2 KD (sdRED/eGFP) dalle cellule CNTRL (sdRED/mtagBFP) tramite analisi citofluorimetrica e bioluminescenza in vivo.

Gli esperimenti di validazione hanno dimostrato che nelle cellule SEM MSI2 KD l'espressione di MSI2 è ridotta (sia mRNA che proteina). In un saggio di competizione clonale a lungo termine in vitro in cui abbiamo co-coltivato le cellule MSI2 KD e CNTRL (ratio 50:50), le cellule MSI2 KD diminuiscono progressivamente, mentre le CNTRL prendono il sopravvento. Inoltre, l'aggiunta di Desametasone alla co-coltura favorisce una selezione più rapida delle cellule CNTRL, a discapito delle MSI2 KD che si estinguono. Questi dati dimostrano che MSI2 è fondamentale per sostenere la crescita delle cellule MLLr LLA in vitro e che il suo silenziamento rende le cellule più sensibili all'effetto citotossico dei Glucocorticoidi.

Campioni di PDXs shRNA MSI2 KD e CNTRL sono stati generati da tre pazienti infant LLA MLLr. Sono in corso esperimenti di competizione clonale in vivo per confermare il ruolo di MSI2 nel sostenere la capacità leucemogena della infant LLA MLLr in vivo e il suo coinvolgimento nella resistenza ai farmaci.

Abs C18 3. Biomarcatori in oncoematologia

IL SECRETOMA DELLE CELLULE MESENCHIMALI STROMALI RALLENTA L'EMATOPOIESI E FAVORISCE LA PRODUZIONE DI MACROFAGI NELLA NICCHIA MIDOLLARE DELLA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA

C. Tregnago^{1,2}, G. Longo¹, G. Borella¹, A. Da Ros¹, M. Benetton¹, S. N. Bertuccio³, R. Masetti³, F. Locatelli⁴, M. Pigazzi^{1,2}

1. Unità di Oncoematologia Pediatrica, Università-Ospedale degli Studi di Padova; 2. Fondazione Istituto Ricerca Pediatrica (IRP); 3. Unità di Pediatria, IRCCS Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna; 4. Dipartimento di Onco-Ematologia Pediatrica, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma

La nicchia midollare, all'insorgere della leucemia mieloide acuta (LMA), subisce un rimodellamento che compromette molte delle sue funzioni, tra tutte il controllo dell'ematopoiesi, per favorire la crescita tumorale. Abbiamo caratterizzato le cellule mesenchimali stromali (MSCs) isolate da midollo di pazienti alla diagnosi di LMA (LMA-MSCs), da donatori sani (hMSCs) e da hMSC co-coltivate con blasti LMA (dette indotte, i-LMA-MSCs) mediante analisi di trascrittoma e secretoma (Bioplex immunoassay) osservando un arricchimento di geni e fattori solubili pro-infiammatori nella nicchia leucemica.

Coltivando blasti di LMA o CD34+ sane con il secretoma prodotto da LMA-MSCs la proliferazione dei blasti aumentava a discapito di quella delle CD34+ (blasti ATP>46%, Ki67+>28%; CD34+ Ki67+<32%) che conservavano anche un fenotipo più immaturo. Gli stessi risultati si sono ottenuti in presenza di un inserto-Transwell, suggerendo un ruolo diretto del secretoma. Abbiamo studiato il secretoma prodotto de novo in co-culture di 7, 14 e 21 giorni in un modello tridimensionale (3D) identificando mediante mass-spect che durante la co-cultura di LMA-MSCs e hMSCs + blasti si producevano 15 fattori solubili. I fattori erano tutti coinvolti in vie relative a infiammazione, angiogenesi e tumorigenesi. Attraverso saggi ELISA abbiamo determinato i livelli di ciascun fattore in co-culture di AML-MSCs e cellule AML ex-vivo, individuando che SERPINE1, CHI3L1 e PTX3 erano i 3 fattori maggiormente secreti. I 3 fattori sono stati aggiunti nel medium di co-cultura di hMSCs e CD34+ sane mediando una ridotta proliferazione delle CD34+, un prolungato mantenimento dell'espressione del CD34 (+66%), e un più alto numero di colonie (+85%), suggerendo che i 3 fattori rallentano il differenziamento delle CD34+. Abbiamo differenziato delle cellule pluripotenti indotte (iPSC) in presenza dei 3 fattori osservando la stessa capacità di mantenere una più elevata quota di cellule immature (CD34-/CD33-; CD34+) e più clonogeniche, ma anche di indurre l'attivazione di una quota di monociti a macrofagi (CD14+). Infine, i 3 fattori usati per coltivare una linea di monociti sani hanno indotto la formazione di cellule giganti multinucleate CD163+ suggerendo una polarizzazione dei macrofagi a fenotipo M2.

In conclusione, abbiamo identificato che le LMA-MSCs producono molti fattori pro-infiammatori tra cui elevate quantità di SERPINE1, CHI3L1 e PTX3 che contribuiscono fortemente alla deregolazione del differenziamento delle cellule ematopoietiche residenti, supportando l'instaurarsi di una nicchia leucemica infiammata e pro-tumorale grazie anche all'attivazione di macrofagi M2. I meccanismi che sottendono a queste funzioni potranno essere colpiti per trattare più efficacemente la LMA.

Sesta edizione di

AIEOP.. ...in Lab



Abs C19 1. Nuovi approcci di immunoterapia

CTL ANTI-LEUCEMIA DI ORIGINE DEL DONATORE PER IL CONTROLLO DELLA RECIDIVA LEUCEMICA IN PAZIENTI PEDIATRICI AD ALTO RISCHIO DOPO TRAPIANTO APOLOIDENTICO.

M. Tanzj^{1,2}, E. Montini^{1,2,3}, A. Rumolo^{4,5}, G. Taurino^{3,5}, P. Comolì^{1,2}, A. Moretta^{1,2,3}, G. Acquafredda^{1,2,3}, J. Rotella^{1,2}, F. Compagno¹, T. Mina¹, M. Zecca¹, D. Montagna^{2,3,4}.

1. Oncoematologia Pediatrica, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo.; 2. Cell Factory, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo.; 3. Laboratorio di Immunologia e dei Trapianti, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo.; 4. Dipartimento di Scienze Clinico Chirurgiche, Diagnostiche e Pediatriche, Università di Pavia.; 5. Clinica Pediatrica, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo.;

La terapia cellulare adottiva basata sull'infusione di CTL del donatore in grado di riconoscere i blasti leucemici (BL) dei pazienti rappresenta un approccio promettente per prevenire o controllare la recidiva leucemica dopo trapianto allogenico. Utilizzando una metodica ottimizzata negli anni dal nostro gruppo di ricerca sono stati prodotti nella Cell Factory del Policlinico San Matteo, in accordo con le norme di buona fabbricazione (GMP), 51 lotti di CTL anti-leucemia per 20 pazienti pediatriche affetti da leucemia acuta alto rischio, sottoposti a trapianto aploidentico da donatore familiare parzialmente compatibile. Sono state prodotte quantità variabili di CTL a seconda del peso dei pazienti e del numero di infusioni che hanno ricevuto. I controlli di qualità (CQ) microbiologici hanno dimostrato che tutti i lotti erano sterili, privi di micoplasma e con livelli di endotossina conformi alle specifiche richieste. I CQ biologici, inclusa la vitalità cellulare, l'identità, il fenotipo e la capacità citotossica erano conformi alle specifiche definite. I CTL hanno mostrato alta e omogenea capacità di espansione, con percentuali elevate di vitalità cellulare a fresco (media: $89\% \pm 6\%$) e dopo scongelamento (media $83\% \pm 2\%$). La maggior parte delle cellule effettrici erano CD3+/CD8+ e la valutazione funzionale ha dimostrato che i lotti erano in grado di lisare efficacemente i BL (range 19-74% di lisi al rapporto effetttore:target di 25:1) mentre la lisi verso le cellule non-maligne dei pazienti pre-trapianto era molto più bassa (range 9-28%). I CTL erano inoltre in grado di secernere quantità considerevoli di IFN gamma e TNF alfa in risposta ai BL. Finora, sono stati trattati sei pazienti su base compassionevole con alte dosi di CTL (range $10^7/\text{kg}$ - $4 \times 10^7/\text{kg}$), per recidiva molecolare o ematologica post-trapianto, mentre sei pazienti sono stati arruolati in uno studio di fase I/II basato sull'infusione di dosi crescenti di CTL (da $5 \times 10^4/\text{kg}$ fino a $8 \times 10^6/\text{kg}$) ogni tre settimane, per la prevenzione della recidiva leucemica. Durante il follow-up di tutti i pazienti trattati non sono state registrate reazioni avverse gravi e nessuna tossicità di grado 2-4, inclusa la comparsa di GVHD severa.

I risultati finora ottenuti hanno dimostrato che: i) il protocollo di produzione è altamente riproducibile e consente la generazione di un gran numero di CTL anti-leucemia dotati di un alto profilo di sicurezza microbiologica ed immunologica, ii) i CTL anti-leucemia hanno un ruolo sia nella prevenzione che nel trattamento delle recidive post trapianto aploidentico, portando anche a remissione a lungo termine.

Sesta edizione di

AIEOP.. ...in Lab



Abs C21 1. Nuovi approcci di immunoterapia

IL TARGETING DELLA NICCHIA MIDOLLARE MEDIANTE IL BLOCCO DI ATTIVINA AUMENTA L'EFFICACIA DELLA CHEMIOTERAPIA IN UN MODELLO MURINO DI LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA A CELLULE B (LLA-B)

A. Fallati¹, R. Starace¹, A. Giussani¹, M. Mauri², C. Rizzari³, A. Biondi^{1,2,4}, R. G. Piazza², E. Dander^{1*}, G. D'amico^{1*}.
*ed And Gd'a Contributed Equally To This Work

1 Tettamanti Center, Fondazione IRCCS San Gerardo dei Tintori; 2 School of Medicine and Surgery, University of Milano-Bicocca; 3 Pediatric Hematology- Oncology Unit, Fondazione IRCCS San Gerardo dei Tintori; 4 Pediatrics, Fondazione IRCCS San Gerardo dei Tintori;

Introduzione: Nonostante i progressi compiuti nel trattamento della leucemia linfoblastica acuta di tipo B (LLA-B) pediatrica, la prognosi per i pazienti recidivanti e refrattari al trattamento rimane infausta. Studi recenti suggeriscono che il fallimento terapeutico possa essere correlato alla creazione di un microambiente protettivo all'interno della nicchia midollare. Recentemente, il nostro gruppo di ricerca ha identificato AttivinaA come fattore chiave del microambiente leucemico, e ha dimostrato la sua importanza nel promuovere la migrazione e l'invasività delle cellule leucemiche (Portale et al. 2019 Haematologica).

Scopo: L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di bersagliare la nicchia leucemica attraverso l'inibizione di AttivinaA in un modello murino di LLA-B.

Risultati: A tale scopo abbiamo innanzitutto creato un modello di leucemia umana in topi immunodeficienti, usando la linea cellulare NALM-6. In tale modello, i livelli di AttivinaA nel sangue sono risultati direttamente correlati con la percentuale di cellule leucemiche infiltranti il midollo. La somministrazione di una trappola molecolare per AttivinaA è stata in grado di prolungare significativamente la sopravvivenza dei topi leucemici, riducendo in maniera drastica l'infiltrato leucemico nel midollo ed in organi extramidollari quali la milza, dove la malattia è stata quasi completamente eradicata. Infatti, nel gruppo controllo l'infiltrato leucemico nella milza è risultato al giorno 21±1 pari al 64.5% (sd=16%), mentre nel gruppo trattato con il bloccante di AttivinaA le cellule leucemiche rappresentavano solo lo 0.6% (sd=1%, p<0.001, Mann-Whitney test). Inoltre, abbiamo osservato che il blocco di AttivinaA era in grado di aumentare significativamente l'efficacia del desametasone, un chemioterapico impiegato nel trattamento di prima linea della LLA-B pediatrica. La combinazione del bloccante di AttivinaA e desametasone ha infatti prodotto un notevole prolungamento della sopravvivenza dei topi leucemici, aumentata da 23 giorni del gruppo controllo a 37 giorni (p<0.0001, log-rank Mantle-Cox test). Inoltre, i due farmaci hanno mostrato un effetto sinergico nel ridurre l'infiltrato leucemico a livello di meningi e midollo. Infine, in studi *in vitro* abbiamo dimostrato che, oltre all'aumento della migrazione precedentemente osservato, AttivinaA è in grado di esercitare un effetto anti-apoptotico su alcuni sottogruppi di LLA-B, modulando l'espressione di BCL-2, BAX e BAK, e riducendo la produzione di specie reattive dell'ossigeno in risposta al desametasone.

Conclusione: In conclusione, il targeting della nicchia midollare leucemica mediante il sequestro farmacologico di AttivinaA potrebbe essere una strategia promettente per migliorare i tassi di cura dei pazienti pediatrici con LLA-B, refrattari alla chemioterapia tradizionale.

Sesta edizione di

AIEOP.. ...in Lab



Abs C22 1. Nuovi approcci di immunoterapia

PRODUZIONE DI CELLULE NK ESPANSE PER IL TRATTAMENTO DI PAZIENTI AFFETTI DA NEUROBLASTOMA AD ALTO RISCHIO

F.morandi¹, I.airoldi¹

1) UOSD Cell Factory, IRCCS Giannina Gaslini

Il Neuroblastoma (NB) è il più comune tumore solido extracranico dell'età pediatrica. I pazienti affetti da NB ad alto rischio hanno prognosi infausta, con 50% circa di sopravvivenza a 5 anni. Nell'ottica di sviluppare nuove strategie terapeutiche efficaci, abbiamo avviato un protocollo clinico di fase I basato su trapianto di staminali da donatore aploidentico TCR $\alpha\beta$ /CD19 depleto, seguito da 5 cicli di immunoterapia con anticorpo anti-GD2 (dinutuximab). Il protocollo prevede inoltre l'infusione di cellule NK isolate dallo stesso donatore (non manipolate) prima del dinutuximab (dal ciclo 2 al 4). Il rationale di tale trattamento è basato sull'osservazione che i) il graft TCR $\alpha\beta$ /CD19 depleto contiene cellule NK, che hanno dimostrato attività citotossica anti-tumorale post-trapianto, ii) la sola infusione del graft non ha migliorato in modo significativo la sopravvivenza dei pazienti e iii) le cellule NK tramite antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity possono potenziare l'effetto terapeutico del dinutuximab. Siccome sono necessarie più infusioni di cellule NK non manipolate per ogni paziente, ed il numero ottenuto con la sola selezione è spesso non sufficiente, lo scopo dello studio è di validare il processo di produzione di un prodotto di terapia cellulare (PTC) basato su cellule NK purificate ed espanse.

In questo studio, le cellule NK sono state purificate da 3 buffy-coat di donatori sani tramite selezione immuno-magnetica (deplezione di linfociti T CD3⁺/arricchimento di cellule CD56⁺) ed espanse per 14 giorni in terreno contenente IL-2 e IL-15, con cambio di terreno fresco ogni 4 giorni. Tutti i reagenti sono analoghi a quelli GMP-graded che saranno utilizzati in Cell Factory. Il prodotto ottenuto conteneva cellule NK pure (96.5-97.3 %) e vitali (98.8-99.2%), con una espansione tra 10.2 e 27 volte. Il prodotto è stato poi congelato, e dopo scongelamento è stata analizzata la stabilità, in termini di purezza (93.3-94.6%) e vitalità (94-95.7%). E' stata inoltre valutata la potency, espressa come rilascio di granuli citotossici da parte delle cellule NK coltivate da sole (15.72-18.49%) o in presenza della linea di leucemia mieloide K562 (21.7-27.5%) o di linee di NB (37.4-45.9%). Alla luce di questi risultati, il protocollo validato consente di ottenere un PTC caratterizzato da cellule NK pure, vitali e citotossiche, anche dopo congelamento. Il processo sarà quindi traslato in Cell Factory per eseguire n=3 run di convalida necessari per l'autorizzazione alla produzione da parte dell'ente regolatorio (AIFA). Verrà inoltre redatto un nuovo protocollo clinico di fase I che prevedrà l'infusione di cellule NK espanse anziché non manipolate.

Abs C23 1. Nuovi approcci di immunoterapia

TERAPIA T-CELLULARE MIRATA A MR-1 IN ONCOLOGIA PEDIATRICA: UNA PROMETTENTE IMMUNOTERAPIA HLA-INDIPENDENTE VERSO I TUMORI NON-EMBRIONALI

M. Arrabito^{1,3}, S. Nierkens², C. Lindemans², A. Cornel², L. Lo Nigro^{1,3}.

1. U.O.C. di Ematologia ed Oncologia Pediatrica, Azienda Policlinico di Catania, Catania; 2. Princess M \grave{a} xima Center, Utrecht, NE ; 3. Laboratorio di Citogenetica, Citofluorimetria, Biologia Molecolare dell'U.O.C di Ematologia ed Oncologia Pediatrica, Azienda Policlinico di Catania, Catania.

Background. Negli ultimi anni sono state studiate nuove forme di immunoterapia. Nel contesto della terapia T-cellulare, è stato scoperto uno specifico clone di cellule T (MC.7.G5) in grado di riconoscere le cellule neoplastiche mediante un antigene, di natura ancora non nota, legato alla proteina MR1 (MHC-I related protein). Nonostante negli adulti siano stati ottenuti risultati promettenti, non sono ancora stati effettuati studi in ambito pediatrico.

Obiettivo. Il nostro scopo è stato quello di valutare il potenziale citotossico di tali cellule nei confronti dei tumori pediatrici. Precedenti studi non ancora pubblicati dal gruppo del Princess M \grave{a} xima hanno messo in evidenza come i tumori di origine embrionale siano poco riconosciuti dalle T-cellule MC.7.G5 TCR+, motivo per cui è stata studiata la potenzialità di tali cellule nel contesto dei tumori pediatrici non embrionali come leucemie, gliomi ed epatocarcinomi.

Materiali e metodi. Le T-cellule sono state ingegnerizzate inserendo al loro interno lo specifico TCR mediante trasduzione lentivirale e sono state poste in co-cultura con varie linee cellulari tumorali pediatriche, valutando la citotossicità delle cellule T MC.7.G5 associata all'espressione di MR1 sulle cellule tumorali.

Risultati. I nostri dati hanno mostrato un significativo potenziale citotossico correlato ad un'elevata concentrazione di MR1 ma associato a bassi livelli di citochine citolitiche secrete (IFN γ and TNF α). Abbiamo inoltre investigato il meccanismo citolitico di tale clone cellulare evidenziando la sua indipendenza dall'MHC-I e l'importanza del contatto tra le cellule effettrici e le cellule target per il riconoscimento e l'eliminazione delle suddette cellule tumorali.

Conclusione. Tali dati mostrano il grande potenziale in vitro delle cellule T MC.7.G5 contro i tumori pediatrici non embrionali. Data la natura monomorfa della proteina MR1, si aprirebbe la possibilità di usare lo stesso clone T-cellulare in una varietà di neoplasie pediatriche non embrionali, indipendentemente dall'aplotipo HLA, configurandola come una terapia pan-cancerosa, HLA-indipendente. Sono in fase di attuazione ulteriori studi per comprendere meglio il meccanismo di riconoscimento di MR1 e la natura dell'antigene ad esso legato in modo da poter iniziare ad utilizzare tale approccio terapeutico in trials clinici.

Sesta edizione di

AIEOP.. ...in Lab



Abs P01 (23 di 49) 1. Nuovi approcci di immunoterapia

PRODUZIONE DI LINFOCITI T REGOLATORI ESPANSI PER USO CLINICO

F.morandi¹, I.airoldi¹

1) UOSD Cell Factory, IRCCS Giannina Gaslini

I linfociti T regolatori (Treg) originano da linfociti T CD4⁺ naive e modulano la risposta immunitaria verso antigeni "self" e "non-self". Sono definiti a livello fenotipico come CD4⁺CD25^{hi}CD127^{neg} ed esprimono il fattore di trascrizione FoxP3, che attiva geni specifici per la funzione immuno-regolatoria. In condizioni fisiologiche i Treg modulano la risposta immunitaria per prevenire reazioni autoimmuni, ma possono espandersi in condizioni patologiche (per indurre tolleranza post-trapianto, o come meccanismo di escape di cellule neoplastiche).

Le Treg sono utilizzate come prodotto di terapia cellulare (PTC) in quasi 200 trials clinici per pazienti soggetti a trapianto d'organo (per promuovere tolleranza immunologica) o di midollo osseo (per trattare la GvHD), o per trattare malattie autoimmuni.

Nel nostro Istituto i pazienti che vanno incontro a trapianto da donatore allo-identico CD19 depleto hanno un'alta percentuale di rigetto. Al contrario, i pazienti trattati con ciclofosfamide post-trapianto di midollo aploidentico hanno una percentuale quasi nulla di rigetto, ma un'alta incidenza di GvHD. E' stato dimostrato come un'alta percentuale di Treg nel graft sia correlata a migliore sopravvivenza dei pazienti e minore incidenza di GvHD, e che la ciclofosfamide possa indurre l'espansione di Treg post-trapianto. Ciò suggerisce che i Treg possano avere un ruolo nel prevenire sia il rigetto che la GvHD nei pazienti trapiantati.

Lo scopo del progetto è quindi di convalidare il processo di produzione di un PTC basato su Treg espansi per il trattamento post-trapianto di pazienti a rischio di rigetto o GvHD. I Treg sono stati purificati da buffy-coat di donatori sani tramite deplezione immuno-magnetica di cellule CD19⁺, CD8⁺ e CD127⁺, seguita da un arricchimento delle cellule CD25⁺, utilizzando reagenti analoghi a quelli GMP-graded che verranno utilizzati in Cell Factory. Questa popolazione cellulare, arricchita in Treg (range 88.8-97.5%) è stata successivamente stimolata con biglie coniugate con anticorpi anti-CD3/CD28 (TransAct, Miltenyi) in presenza di 20 U/ml di IL-2 per 2-3 giorni, e successivamente coltivata in presenza di 20 U/ml IL-2 per ulteriori 11-12 giorni. Il prodotto finale, contenente Treg espanse (purezza 96.4-97.5%, fold increase 4-12.5), è stato quindi congelato in attesa di effettuare i test di potency (inibizione della proliferazione di linfociti T autologhi) e stabilità (fenotipo e vitalità post-scongelo). Con i dati ottenuti in questa fase il processo verrà traslato in Cell factory per realizzare n=3 run di convalida, necessari per poter ottenere l'autorizzazione alla produzione da parte dell'ente regolatorio (AIFA). In parallelo, verrà redatto un protocollo clinico di fase I.

Abs P02 (24 di 49) 2. Disease modeling

MESSA A PUNTO DI UNA STRATEGIA PRE-CLINICA PER IDENTIFICARE NUOVI BERSAGLI TERAPEUTICI E TRATTAMENTI PERSONALIZZATI PER LA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA.

A. Da Ros¹, V. Indio², A. Peloso¹, G. Borella¹, M. Benetton¹, G. Longo¹, B. Michielotto¹, S. Bresolin^{1,3}, C. Tregnago^{1,3}, B. Buldini¹⁻³, A. Pession⁴, F. Locatelli⁵, M. Pigazzi^{1,3}

1. Unità di Oncematologia Pediatrica, Università-Ospedale degli Studi di Padova; 2. Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie-Università di Bologna; 3. Fondazione Istituto Ricerca Pediatrica; (IRP); 4. Unità di Pediatria, IRCCS Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna; 5. Dipartimento di Onco-Ematologia Pediatrica, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma

Nella Leucemia Mieloide Acuta (LMA) pediatrica permane una forte necessità di proporre terapie innovative per migliorare l'*outcome* dei pazienti che ad oggi vanno incontro a recidiva. E' noto che un'alta percentuale di nuovi farmaci, nonostante promettenti risultati preclinici, falliscono durante gli studi clinici di fase I-II, evidenziando una scarsa performance dei modelli preclinici attualmente utilizzati. Generare e ottimizzare nuovi modelli al fine di facilitare la progressione di risultati clinicamente rilevanti è un obiettivo primario in ambito pediatrico.

A questo scopo abbiamo inoculato campioni primari di LMA pediatrica all'esordio o alla ricaduta in topi NSG, generando modelli *Patient Derived Xenografts* (PDXs), che hanno sviluppato una malattia simile alla LMA originale per immunofenotipo e genomica, indicandoli modelli ideali per eseguire screening terapeutici altamente predittivi. Analisi dell'espressione genica differenziale hanno mostrato un'aberrante espressione di geni legati alla forforilazione ossidativa, al metabolismo mitocondriale e dei trasportatori dei soluti transmembrana. Inoltre, analisi di *deconvolution* mostrano che la LMA in vivo si arricchisce di cloni immaturi esprimenti pathways di staminalità. A tal proposito, abbiamo identificato farmaci con predetta azione su queste vie aberranti (IACS-010759, Asparaginase, Disulfiram, Gallein, Thioridazine, SNDX-5613, Trametinib) e abbiamo verificato l'efficacia in una serie di cellule ex vivo derivate da LMA-PDXs (n=10). Abbiamo poi testato questi farmaci in combinazione con Venetoclax (VEN) su scaffolds tridimensionali con cellule mesenchimali derivate da pazienti LMA insieme ai blasti (p<0.001; n=4). Le combo più efficaci sono risultate VEN con il farmaco IACS-010759, inibitore dell'OXPPOS mitocondriale, e con l'Asparaginasi (ASPN), farmaco già in uso per la cura delle leucemie linfoblastiche. Abbiamo quindi espanso 6 modelli PDXs per testare i nuovi farmaci e le combo. Il trattamento con VEN usato singolarmente a basse dosi (25mg/kg) ha mostrato che 3/6 PDXs non hanno ridotto la malattia dopo 4 settimane di trattamento (da 17% a 55% di blasti su sangue periferico), mentre VEN in combo con IACS o ASPN ha portato 6/6 PDXs in remissione completa (blasti<5%). Al giorno +15 dallo stop della terapia 6/6 PDXs trattati con VEN, mentre solamente 1 PDX-VEN-IACS e 1 PDX-VEN-ASP presentavano una progressione di malattia; 4/6 modelli trattati con le nuove combo non hanno mostrato segni di malattia a 45 giorni dalla fine del trattamento.

In conclusione, questo studio mostra come l'uso dei modelli PDXs rappresenti una prospettiva concreta per testare l'efficacia di nuovi farmaci, permettendo di ottenere importanti risposte sull'efficacia, e quindi indicazioni predittive, sull'utilizzo di farmaci in modo personalizzato.

Sesta edizione di

**AIEOP..
...in Lab**



Abs P03 (25 di 49) 2. Disease modeling

MODELLO 3D DELLA NICCHIA METASTATICA OSSEA DEL NEUROBLASTOMA

S.aveic^{1,2}, D.corallo¹, M.pantile¹, H.fischer², A.biffi³.

1 Laboratorio Neuroblastoma, Fondazione Istituto di Ricerca Pediatrica Città della Speranza, 35127, Padova, Italia ; 2 Dipartimento di Materiali Dentali e Ricerca sui Biomateriali, Ospedale Universitario RWTH Aquisgrana, 52074 Aquisgrana, Germania; 3 Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino, Università di Padova, 35128 Padova, Italia

La malattia metastatica rimane una delle principali cause di morte per cancro. I siti metastatici sono frequentemente riscontrati nei casi di neuroblastoma pediatrico (NB), un tumore del sistema nervoso simpatico in via di sviluppo. Particolarmente allarmanti sono le invasioni di cellule neoplastiche nel midollo osseo e nelle ossa, che sono fortemente correlate con l'aggressività del tumore e la prognosi sfavorevole. Per migliorare la nostra attuale comprensione della biologia del NB metastatico e migliorare il successo del trattamento, abbiamo bisogno di modelli appropriati *in vitro* e *in vivo* che si avvicinino maggiormente alla nicchia metastatica nativa.

In questo studio, abbiamo esaminato come la microstruttura di un osso artificiale, composto da β -fosfato tricalcico (β -TCP) contenente microcanali interconnessi, influisca sull'interazione delle cellule tumorali e stromali con la matrice extracellulare. Abbiamo confermato che il microambiente tumorale è modellato dinamicamente dallo stroma, che supporta la crescita delle cellule NB all'interno della nicchia metastatica. Rispetto alle loro controparti 2D, le strutture 3D β -TCP producono un maggior numero di citochine con carattere proinfiammatorio e immunomodulante e definiscono la localizzazione intracellulare della Connexina 43. Inoltre, i nostri dati confermano che le condizioni di crescita in 3D sono decisive per il tipo di risposta delle cellule tumorali ai farmaci chemioterapici convenzionali. Infine, abbiamo confermato che sia la geometria che la chimica sono importanti per definire le vie molecolari attive nelle cellule NB metastatiche. A loro volta, le condizioni 3D della nicchia metastatica aiutano le cellule tumorali a mantenere le caratteristiche staminali.

Abs P04 (26 di 49) 3. Biomarcatori in oncoematologia

PAZIENTI PEDIATRICI AFFETTI DA LAL-B PRESENTANO UN PROFILO DI ESPRESSIONE ALTERATO DEI GENI FERRO-CORRELATI

M.m. Capelletti¹, S. Pelucchi¹, G. Fazio², M. Villa¹, M. D'angiò⁴, A. Piperno³ e G. Cazzaniga^{1,2}.

1. Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università di Milano Bicocca; 2. Centro Ricerca Tettamanti; 3. Centro Malattie Rare e Disordini del Metabolismo del Ferro, IRCCS-San Gerardo dei Tintori; 4. Dipartimento Oncologia e Medicina Molecolare, ISS.

Studi recenti hanno evidenziato un possibile collegamento fra un'alterata omeostasi del ferro e neoplasie ematologiche. Obiettivi principali del progetto sono i. analisi preliminare del profilo di espressione di geni correlati con il ferro in una coorte di pazienti pediatrici affetti da leucemia acuta linfoblastica a precursori di linfociti B (LAL-B) e ii. caratterizzazione del metabolismo del ferro in linee cellulari di LAL-B, dopo induzione di sovraccarico di ferro.

La coorte considerata comprende campioni di midollo osseo alla diagnosi di 93 pazienti con LAL-B e 8 controlli sani (donatori di cellule staminali per trapianto).

I pazienti sono stati classificati secondo la presenza delle traslocazioni cromosomiche ricorrenti t(1;19), t(12;21), t(9;22) e t(4;11), e per livelli di malattia minima residua: rischio alto (HR), medio (MR) e standard (SR). Tramite qRT-PCR sono stati analizzati i livelli di espressione dei geni *FTL* (L-Ferritina), *TFRC* (Recettore per la transferrina di tipo 1), *HAMP* (Epcidina), *SLC40A1* (Ferroportina-1) e *CP* (Ceruloplasmina).

È stata osservata una ridotta espressione dei geni *TFRC* e *FTL* in MR e SR e un'elevata espressione di *TFRC* in HR. Non vi sono cambiamenti nell'espressione di *HAMP*, mentre *SLC40A1* e *CP* risultano significativamente overespressi negli HR rispetto a MR, SR e ai campioni controllo. Inoltre, *CP* risulta significativamente upregolato in pazienti con t(9;22) rispetto ai controlli e alla classe t(1;19).

La proliferazione cellulare è stata misurata tramite MTT assay a 24h dopo aver somministrato ferro a concentrazioni crescenti (100-200-400 µM). Delle varie linee analizzate, RS4;11 ha mostrato un tasso di proliferazione aumentato ad elevate concentrazioni.

Studi in vitro sono stati condotti sulle linee cellulari SEM e RS4;11, aventi la medesima traslocazione, ma sensibilità differente agli steroidi.

In condizione di sovraccarico, si riscontra un aumento di ferro rispetto al non trattato nelle SEM ma non nelle RS4;11. FPN1 (Ferroportina -1) risulta upregolata, mentre *TFRC* downregolato in entrambe le linee cellulari, con livelli differenti.

I dati preliminari suggeriscono un diverso profilo d'espressione genica dei geni del ferro per il gruppo HR; ciò potrebbe aprire nuovi scenari nel trattamento della LAL-B, ponendo il metabolismo del ferro al centro di future ricerche.

I dati in vitro indicano una potenziale alterazione del metabolismo del ferro nelle due linee cellulari, che presentano un differente pattern di risposta.

Ulteriori studi saranno necessari per poter comprendere i meccanismi molecolari che stanno alla base di questa eterogeneità.

Abs P05 (27 di 49) 3. Biomarcatori in oncoematologia

IL RUOLO DEL CARGO ESOSOMIALE NELLA PROGRESSIONE TUMORALE DELLA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA

Canì A^{1,2*}, Cc. Damanti^{1,2*}, F. Lovisa^{1,2}, E. Gaffo³, G. Borile², S. Bortoluzzi², A. Biffi¹, C. Rizzari⁴, B. Buldini¹, L. Mussolin^{1,2#}, S. Bresolin^{1,2#}.

1. Divisione di Ematologia Pediatrica, Oncologia e Trapianto di Cellule Staminali, Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino, Università e Ospedale di Padova, Padova, Italia; 2. Istituto di Ricerca Pediatrica - Città della Speranza, Oncoematologia, Trapianto di cellule staminali e Terapia Genica, Padova, Italia; 3. Dipartimento di Medicina Molecolare, Università di Padova, Padova, Italia; 4. Università Milano-Bicocca, Fondazione MBBM, Monza, Italia.; * e # equally contributed

La leucemia linfoblastica acuta a cellule B (BCP-ALL) è la neoplasia infantile più comune. Nonostante la sopravvivenza a cinque anni superi il 90% dei tassi di guarigione, i pazienti refrattari che vanno incontro a recidiva e che sono caratterizzati da una prognosi infausta hanno un'esigenza clinica di nuove strategie terapeutiche alternative per migliorare l'efficacia del trattamento farmacologico.

Gli esosomi sono nanovesicole cruciali della comunicazione intercellulare, in grado di modulare le cellule riceventi attraverso il rilascio al loro interno di piccole molecole biologiche (DNA, RNA, proteine). È noto che le cellule leucemiche siano in grado di comunicare con l'ambiente circostante e modularlo attraverso il rilascio di queste vescicole extracellulari. Il loro ruolo nel processo leucemogenico e nella modulazione del blasto leucemico nei confronti delle cellule circostanti, nonché l'effetto sulla terapia non sono ancora del tutto chiari.

In questo studio abbiamo valutato il cargo esosomiale e il suo trasferimento all'interno delle cellule che risiedono nel midollo osseo, nonché il crosstalk tra le cellule leucemiche e il microambiente midollare, al fine di promuovere la sopravvivenza e la progressione della leucemia.

Nello specifico, abbiamo analizzato il profilo degli smallRNAs contenuti negli esosomi plasmatici di pazienti alla diagnosi di BCP-ALL e donatori sani, mediante small RNA-sequencing. I dati analizzati con la pipeline miR&moRe hanno identificato un cargo caratteristico negli esosomi plasmatici leucemici, rivelando 15 miRNA differenzialmente espressi. Abbiamo validato l'upregolazione di 4 miRNA, sia in linee cellulari di riferimento, che in un'ampia coorte di pazienti alla diagnosi e abbiamo investigato la cinetica della risposta molecolare alla chemioterapia durante il follow-up, mediante qRT-PCR. I dati small-RNA-seq sono stati quindi integrati con profili di espressione genica di blasti leucemici da midollo osseo.

L'analisi di predizione dei geni target ha evidenziato l'alterazione di networks specifici correlati a sopravvivenza cellulare, migrazione e differenziamento cellulare.

Inoltre, abbiamo dimostrato la comunicazione mediante il rilascio di esosomi tra le cellule leucemiche e del microambiente midollare e come questi abbiano un ruolo cruciale nella modulazione e nel supporto di componenti del microambiente del midollo osseo.

In conclusione, questo studio ha permesso di identificare possibili nuovi biomarcatori di malattia e di esaminare il loro potenziale ruolo nella modulazione della nicchia del midollo osseo aprendo nuove prospettive sulla chemioresistenza.

Abs P06 (28 di 49) 3. Biomarcatori in oncoematologia

IL RUOLO DEI FATTORI DI TRASCRIZIONE NFATC1 E NFATC2 NELLA RESISTENZA AI GLUCOCORTICOIDI NELLE CELLULE DI LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA PEDIATRICA

G. Veltri¹, A. Peloso¹, A. Cani¹, G. Borile¹, L. Russo², K. Simon¹, G. Santinon¹, C. Frasson¹, S.a. Minuzzo³, S. Indraccolo³, A. Biffi¹, B. Buldini¹, S. Bresolin¹, P. Ntziachristos⁴, V. Serafin^{3,5}

1. Laboratorio di Oncoematologia Pediatrica, Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino, Azienda Ospedaliera Università degli Studi di Padova e Istituto di Ricerca Pediatrica Città della Speranza; 2. Dipartimento di Medicina Molecolare, Università degli Studi di Padova; 3. Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Oncologiche e Gastroenterologiche, Università degli Studi di Padova; 4. Dipartimento di Medicina Biomolecolare, Università di Ghent; 5. Istituto di Ricerca Pediatrica Città della Speranza, Padova e Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Oncologiche e Gastroenterologiche, Università degli Studi di Padova.

La resistenza ai glucocorticoidi (GC) rappresenta ad oggi il più grande ostacolo nel trattamento terapeutico dei pazienti pediatrici affetti da Leucemia Linfoblastica Acuta a cellule T (LLA-T). Infatti, circa il 25% dei pazienti pediatrici LLA-T mostra resistenza ai GC ed ha maggior probabilità di andare incontro ad una prognosi infausta. A tal proposito, la scoperta di nuovi meccanismi responsabili della resistenza ai GC potrebbe portare all'identificazione di nuovi bersagli terapeutici e, come conseguenza, all'individuazione di strategie terapeutiche alternative che potrebbero migliorare la prognosi di questi pazienti. In un precedente lavoro abbiamo dimostrato che l'iperattivazione della proteina chinasi LCK contribuisce alla resistenza ai GC e che la sua inibizione sia in vitro che in vivo sensibilizza le cellule LLA-T all'azione pro-apoptotica dei GC. Inoltre, recentemente abbiamo dimostrato il coinvolgimento della famiglia dei fattori di trascrizione NFAT, a valle di LCK, nella resistenza ai GC nelle cellule LLA-T. Nello specifico, abbiamo osservato che i fattori di trascrizione NFATc1 e NFATc2 sono più espressi nei pazienti pediatrici LLA-T resistenti ai GC alla diagnosi e che il loro silenziamento genico in linee cellulari LLA-T GC resistenti, ripristina la risposta al desametasone ristabilendo l'attività trascrizionale del recettore dei GC. Al contrario, la loro over-espressione in cellule LLA-T murine GC sensibili, conferisce resistenza al trattamento con desametasone. Inoltre, il silenziamento di NFATc1 diminuisce i livelli di colesterolo intracellulare e, di conseguenza, l'abbondanza delle zattere lipidiche di membrana, nonché l'espressione/attivazione della chinasi LCK ivi ancorata. In linea, il supplemento di colesterolo esogeno in cellule LLA-T NFATc1 silenziate, ripristina la resistenza ai GC. Diversamente, il silenziamento genico di NFATc2 riduce la via di segnalazione Wnt/ β -catenina e l'espressione di marcatori legati alla staminalità, aumentando il differenziamento delle cellule LLA-T resistenti ai GC. Infine, l'inibizione in vitro della biosintesi del colesterolo attraverso la simvastatina o della via Wnt/ β -catenina mediante l'inibitore ICG-001, sensibilizza all'azione dei GC le cellule LLA-T resistenti. Complessivamente, questi risultati ci suggeriscono che i fattori di trascrizione NFATc1 e NFATc2 nelle cellule LLA-T GC resistenti, controllano processi biologici differenti come la deregolazione della biosintesi del colesterolo ed il mantenimento di un fenotipo più staminale, entrambi processi noti per essere coinvolti nella resistenza ai chemioterapici. Pertanto, l'inibizione farmacologica di queste vie di segnalazione potrebbe portare a nuove opzioni terapeutiche per i pazienti pediatrici LLA-T GC resistenti, per i quali ad oggi non sono disponibili approcci terapeutici alternativi.

Abs P07 (29 di 49) 3. Biomarcatori in oncoematologia

ELEVATA ESPRESSIONE DEL CXCR7 COME FATTORE PROGNOSTICO NEGATIVO NELLA B-CELL PRECURSOR LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA (BCP-LLA) DEL BAMBINO: RISULTATI PRELIMINARI

M. Arrabito¹, P. Bonaccorso², V. Iachelli³, M. La Rosa⁴, E. Cannata¹, G. Pulvirenti⁵, G. Russo^{1,5}, L. Lo Nigro^{1,4}.

1. Centro di Riferimento Regionale di Emato-Oncologia Pediatrica, Azienda Policlinico di Catania, Catania. ; 2. Dottorato di Ricerca in Medicina Traslazionale, Università di Catania, Catania.; 3. Istituto Oncologico del Mediterraneo, Viagrande (CT), Catania.; 4. Laboratorio di Citogenetica-Citofluorimetria-Biologia Molecolare dell'U.O.C. di Emato-Oncologia Pediatrica, Azienda Policlinico di Catania, Catania. ; 5. Scuola di Specializzazione in Pediatria, Università di Catania, Catania.;;

Background. Recenti studi hanno mostrato come il microambiente midollare fornisce condizioni favorevoli per la sopravvivenza delle cellule leucemiche. In particolare, l'asse CXCL12/CXCR4/CXCR7 gioca un ruolo fondamentale nel regolare la migrazione e proliferazione delle cellule tumorali e la loro over-espressione è stata associata ad una peggiore prognosi e maggior rischio di recidiva. Negli ultimi anni è stata posta attenzione sul CXCR4 come target therapy, mentre pochi studi sono stati condotti sul ruolo del CXCR7, il quale potenzierebbe l'attività del CXCR4, contribuendo al mantenimento delle cellule leucemiche nella nicchia midollare.

Obiettivo. L'obiettivo del nostro lavoro è quello di dimostrare la correlazione tra l'espressione dei due recettori nel microambiente leucemico e la prognosi/outcome dei nostri pazienti.

Materiali e metodi. Sono stati analizzati campioni di sangue midollare di 21 pazienti affetti da Leucemia Linfoblastica acuta (LLA) B-lineage, diagnosticata presso l'Unità Operativa di Emato-Oncologia Pediatrica del Policlinico di Catania. Di questi pazienti: 12 si trovano in remissione continua completa (RCC), 7 hanno presentato una recidiva e 5 sono deceduti (3 dopo recidiva; 1 in Induzione; 1 in RC). L'espressione di CXCR4 e di CXCR7 è stata valutata sulle cellule blastiche e sul compartimento non leucemico (linfociti B e T) mediante citofluorimetria. I valori ottenuti sono stati espressi in percentuale e in MFI (Mean Fluorescence Intensity). Come controllo positivo abbiamo valutato l'espressione dei due recettori sulle seguenti linee cellulari: REH e CALL4.

Risultati. L'analisi citofluorimetrica dei blasti ha dimostrato che la media del MFI di CXCR4 e di CXCR7 nei 21 pazienti è rispettivamente di 1486 e di 323; mentre il valore percentuale medio di espressione è rispettivamente dell'81% e del 30%. L'espressione di CXCR4 è risultata omogeneamente elevata ma non significativamente correlata ad una scarsa prognosi o morte per eventi avversi. Di contro, l'elevata espressione di CXCR7 (range 80-95%) sembrerebbe essere correlata ad una cattiva prognosi, come riscontrato in 6 (2 deceduti) dei 7 pazienti recidivati e in entrambi i pazienti deceduti per tossicità (1 Induzione e 1 in Re-induzione).

Conclusioni. I nostri dati preliminari, generati su una casistica ridotta, identificano un sottogruppo di pazienti con elevata espressione del CXCR7, caratterizzati da un elevato rischio di recidiva. Tale correlazione dovrà esser verificata in uno studio prospettico su una popolazione più ampia. Inoltre, il CXCR7 si propone come futuro potenziale target terapeutico, alla stessa stregua del CXCR4.

Abs P08 (30 di 49) 3. Biomarcatori in oncoematologia

PRIMA IDENTIFICAZIONE DI TRASCRITTI DI FUSIONE DI GENI DEL COMPLESSO DELLE COESINE IN PAZIENTI PEDIATRICI AFFETTI DA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA

S. Rebellato,¹ C. Saitta,¹ F. Colnaghi,¹ A. Colombo,¹ D. Silvestri,² O. Spinelli,³ A. Biondi,^{1,4} G. Fazio,¹ E G. Cazzaniga^{1,5}

¹ Centro Tettamanti, Fondazione IRCCS San Gerardo dei Tintori, Monza; ² Centro Operativo di Ricerca Statistica, Monza; ³ Unità di Ematologia e Trapianto di Midollo Osseo, ASST-Papa Giovanni XXIII, Bergamo; ⁴ Clinica Pediatrica, Università di Milano Bicocca, Monza; ⁵ Genetica Medica, Università di Milano Bicocca, Monza.

I meccanismi molecolari alla base della leucemia non sono ancora completamente compresi; tuttavia, recenti studi suggeriscono che mutazioni o l'espressione aberrante dei geni del complesso delle coesine possano contribuire alla sua patogenesi alterando l'accessibilità della cromatina e provocando instabilità cromosomica. Per questi geni vengono infatti definiti un ruolo "canonico" nella formazione dell'anello proteico che lega il DNA e uno "non canonico" nella regolazione dell'espressione genica.

Mutazioni somatiche nelle coesine sono note nella Sindrome Mielodisplastica (MDS) e nella Leucemia Mieloide Acuta (LMA), nonché in alcuni tumori solidi [Jann2021, Solomon2013]. Recentemente, sono state descritte anche in bambini con LLA [Brady2022]. Invece, mutazioni germinali causano sindromi genetiche chiamate Coesinopatie, come la sindrome di Cornelia de Lange (CdL) [Pichè2019]. Abbiamo recentemente descritto il primo caso di paziente affetto da CdL e Leucemia Linfoblastica Acuta (LLA), ipotizzando una possibile correlazione [Fazio2019]. Inoltre, abbiamo identificato 11 mutazioni germinali nelle coesine in uno studio (in corso), su 120 diagnosi consecutive pediatriche di LLA.

Per la prima volta, dimostriamo che i geni delle coesine possono essere coinvolti in geni di fusione in LLA. Abbiamo identificato tre pazienti con trascritti di fusione dei geni *STAG2*, *RAD21* e *STAG1*, noti per il loro ruolo canonico, dall'analisi trascrittomico di 371 diagnosi consecutive e 65 ricadute di LLA pediatrica (dall'01/12/2021 al 31/12/2022).

Il primo paziente, di sesso femminile e classificato come IZKF1plus per delezioni in *IZKF1* e *CDKN2A/B*, presenta all'esordio di malattia la traslocazione non bilanciata tra *GNPAT* (chr1) e *STAG2* (chrX), oltre alla variante Y179Ter in *PAX5* (novel, "potenzialmente patogena").

Gli altri due casi sono stati arruolati nel protocollo di prima linea AIEOP-BFM ALL2017 con classificazione "rischio intermedio". Dopo completa remissione a seguito del trattamento con steroidi, sono entrambi andati incontro a ricaduta di malattia dopo 38 e 36 mesi dall'esordio, rispettivamente. Il primo (maschio, 14 anni all'esordio, immunofenotipo BII) mostra la fusione non bilanciata *RAD21::EIF3H*, conseguenza di una delezione sul cromosoma 8. L'altro paziente (femmina, 3 anni all'esordio, immunofenotipo BII) presenta invece due eventi di ricombinazione non bilanciata: *ETV6::RUNX1* (chr12-chr21), con punti di rottura diversi rispetto alla traslocazione ricorrente t(12;21), e *RUNX1::STAG1* (chr3-chr12) in cui *RUNX1* mantiene solo l'esone 1. Tutti i riarrangiamenti sono stati validati tramite RT-PCR con primers specifici sia all'esordio che in fase di recidiva.

Studi di espressione genica differenziale in questo sottogruppo specifico sono in corso con l'obiettivo di definire una nuova sottocategoria di LLA e di studiare il ruolo non canonico delle coesine nella leucemia.

Abs P09 (31 di 49) 3. Biomarcatori in oncoematologia

TRANSCRIPTOMIC CHARACTERIZATION OF SWITCHING B-CELL PRECURSOR ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA IN CHILDHOOD

G. Gomiero¹, E. Varotto¹, A. Peloso¹, S. Disarò¹, G. Cazzaniga², G. Fazio², A. Biffi^{1,3}, V. Conter⁴, M.n. Dworzak⁵, B. Buldini^{1,3} and S. Bresolin^{1,3}.

1. Pediatric Hematology Oncology and Stem Cell Division, Women's and Children's Health Department, Padua University; ; 2. Centro Ricerca Tettamanti, Pediatrics, University of Milano-Bicocca, Centro Maria Letizia Verga, Fondazione MBBM; 3. Pediatric Hematology, Oncology and Hematopoietic Cell&Gene Therapy Laboratory, Pediatric Research Institute; 4. Department of Pediatrics, Pediatric Hematology-Oncology Unit, Fondazione MBBM/San Gerardo Hospital; 5. Department of Pediatric Hematology and Oncology, St. Anna Children's Hospital, Medical University of Vienna

The recent advances in multi-omics and multiparametric flow cytometry (MFC) allowed distinguishing different pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL) subtypes based on chromosomal rearrangements, ploidy level, mutations, transcriptome, immunophenotype at diagnosis, and response to therapy. The accurate identification of ALL subgroups is mandatory for a precision medicine approach since they are associated with specific outcomes.

We previously identified a pediatric B-cell precursor (BCP) ALL subtype showing a transient immunophenotypic switch towards the myelomonocytic lineage (mm-SW). The mm-SW was detected by MFC on Day15 of Induction therapy and characterized by the presence of two populations of blasts, one keeping the diagnosis immunophenotype and the second showing CD19 downregulation, CD45 upregulation, high expression of CD34, and SSC increase.

Thus, we aim to characterize the mm-SW-positive (mm-SW^{pos}) BCP-ALLs transcriptome and potentially define the biological mechanism underlying mm-SW.

We performed transcriptomic analysis on 264 bone marrow (BM) samples from pediatric BCP-ALLs at diagnosis and enrolled in AIEOP-LAL-2000 and AIEOP-BFM 2009 ALL trials. We excluded 122 specimens showing KMT2A rearrangements, ETV6::RUNX1, TCF3::PBX1, or BCR::ABL1 translocation signatures by the Diagnostic Classifier model and known to harbor the translocation. Seventy-seven of the remaining 142 BCP-ALLs (50.7%) had an available BM sample on Day15 of Induction therapy to evaluate the presence of mm-SW by MFC: 19 samples (24.6%) were mm-SW^{pos} and 58 (75.4%) mm-SW-negative (mm-SW^{neg}).

In our cohort, most of mm-SW^{pos} patients clustered on ERG-related subtype, one was HHD-like, one ZNF384r, one KMT2A-like, and one ETV6::RUNX1-like, based on an unsupervised analysis of top 1000 variables genes. *CLEC12A*, a c-type lectin receptor usually expressed on myelomonocytic cells, appeared as one of the most differentially expressed genes in mm-SW^{pos} group. Notably, these patients showed a high expression of genes commonly found in CD34+ hematopoietic stem cells. Moreover, the interferon pathway, activated in myeloid cells in response to infection, was one of the most prevalent in mm-SW^{pos} group, together with enrichment in genes typically regulated by myeloid transcription factors as *CTNBN1*, *GATA2*, and *MYB*. Furthermore, preliminary data on single cell analysis of cell surface markers and whole transcriptome revealed a different maturative block of these patients.

Pediatric mm-SW^{pos} BCP-ALLs showed a homogeneous transcriptome, different from that of mm-SW^{neg} BCP-ALLs. Transient mm-SW may rely on a biological plasticity linked to the aberrant myeloid and immaturity features. Nonetheless, further studies are necessary to correlate our findings with transient mm-SW during the first phase of Induction therapy.

Sesta edizione di

**AIEOP..
...in Lab**



Abs P10 (32 di 49) 3. Biomarcatori in oncoematologia

L'ANTIGENE ANTI-TUMORALE CD72 È ASSOCIATO ALLE LEUCEMIE ACUTE PEDIATRICHE

B. Buldin¹, G. Faggin¹, E. Porcù¹, P. Scarparo¹, K. Polato¹, C. Tregnago¹, E. Varotto¹, P. Rizzardi², C. Rizzari³, F. Locatelli⁴, A. Biffi¹, M. Pigazzi¹

1: Pediatric Hematology-Oncology Clinic and Laboratory, Women's and Children's Health Department, University-Hospital of Padova; 2: Altheia Sciences, Milan; 3: Pediatric Hematology-Oncology Unit, Department of Pediatrics, MBBM Foundation, ASST Monza, University of Milano-Bicocca; 4: Department of Hematology, Oncology and of Cell and Gene Therapy, IRCCS Bambino Gesù Children's Hospital, Catholic University of the Sacred Heart, Rome

Negli ultimi anni, le immunoterapie hanno rivoluzionato il trattamento delle neoplasie dei pazienti adulti e pediatrici. L'identificazione di target terapeutici è un processo laborioso e arduo, poiché questi devono essere espressi preferenzialmente dalle cellule neoplastiche e non dare effetti off-target. In questo lavoro proponiamo il CD72 come nuovo marcatore pan-leucemico, espresso dalle leucemie linfoblastiche acute a precursori B (BCP-ALL) e dalle leucemie mieloidi acute (AML) pediatriche. Abbiamo definito il pattern di espressione dell'antigene in una serie di tessuti sani e campioni primari, inclusi campioni di sangue midollare (SM). Il CD72, inoltre, è stato testato su una serie di linee cellulari patologiche, includendo neoplasie di sia di origine ematopoietiche che non. Abbiamo confermato che il CD72 non fosse espresso dalle cellule staminali e precursori ematopoietici (HSPC) in campioni di sangue periferico mobilizzato e di SM in rigenerazione. Il CD72 è stato testato in 289 campioni di SM di pazienti all'esordio di malattia: 105 BCP-ALL; 41 T-ALL; 80 AML; 6 sindromi mielodisplastiche; campioni di SM infiltrati da linfomi linfoblastici di linea T (3), di linea B (8) o da tumori solidi di origine non ematopoietica (14). Nella corte di pazienti da noi studiata, il CD72 è espresso nel 98% dei casi di BCP-ALL e 65% di AML, alla diagnosi o ricaduta. Il CD72 è espresso anche nei casi di BCP-ALL negative per CD19, sia in seguito ad immunoterapia anti-CD19, sia nei rari casi di esordi BCP-ALL CD19 negativi. Questi dati forniscono una proof-of-concept per lo sviluppo di immunoterapie per le leucemie linfoblastiche e mieloidi, oltre a rappresentare un antigene interessante nella valutazione diagnostica delle leucemie acute pediatriche.

Abs P11 (33 di 49) 3. Biomarcatori in oncoematologia

LA DEPOLARIZZAZIONE DELLA MEMBRANA DELLE CELLULE STROMALI MESENCHIMALI INDOTTA DA BLASTI MIELOIDI TRASFORMA IL MICROAMBIENTE MIDOLLARE IN NICCHIA LEUCEMICA

G. Borella¹, M. Benetton¹, A. Da Ros¹, G. Longo¹, G. Borile², D. Lopez-pigozzi^{3,4}, M. Bortolozzi^{3,4}, C. Tregnago^{1,2}, F. Locatelli⁵, M. Pigazzi^{1,2}

1. Unità di Oncoematologia Pediatrica, Università-Ospedale degli Studi di Padova; 2. Fondazione; Istituto Ricerca Pediatrica (IRP); 3. Dipartimento di Fisica e Astronomia "G. Galilei", Università degli studi di Padova; 4. Istituto Veneto di Medicina Molecolare (VIMM); 5. Dipartimento di Onco-Ematologia Pediatrica, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma;

Abbiamo recentemente caratterizzato le cellule stromali mesenchimali (MSCs) della nicchia del midollo osseo (BM), scoprendo che le MSCs isolate da pazienti alla diagnosi di leucemia mieloide acuta (LMA) (dette LMA-MSCs) risultavano diverse da quelle isolate da donatori sani (dette hMSCs), sia a livello di espressione genica che funzionale. Abbiamo dimostrato che le LMA-MSCs supportano la crescita della leucemia in vitro e che, co-coltivando dei blasti LMA su uno strato di h-MSCs, queste ultime si trasformano in LMA-MSCs (dette indotte, iLMA-MSCs). Mediante uno screening farmacologico abbiamo identificato che la lercanidipina, un inibitore dei canali Ca^{2+} -voltage-dipendenti ($CaV1.2$), presentava un forte effetto nel ridurre la proliferazione delle LMA-MSCs, agendo in sinergia per ridurre anche la progressione tumorale in vivo. Abbiamo documentato una ridotta espressione di mRNA e proteina $CaV1.2$ nelle LMA-MSCs che si è dimostrata mediare un ridotto afflusso di Ca^{2+} , e delle oscillazioni spontanee di Ca^{2+} più frequenti e ampie rispetto alle h-MSCs. Abbiamo quindi ipotizzato che lo stato di polarizzazione della membrana cellulare (V_{mem}) potesse costituire un meccanismo importante per la trasformazione delle h-MSCs in LMA-MSCs. La misurazione del V_{mem} mediante patch clamp e sonde fluorescenti ha rivelato che le cellule LMA-MSCs sono più depolarizzate rispetto alle h-MSCs ($V_{mem} = -14,7$ mV, $n=10$ vs $-30,5$ mV, $n=10$, rispettivamente). La depolarizzazione è nota caratterizzare le cellule tumorali perché in grado di cambiare l'espressione genica e la metilazione, per consentire un aumento della proliferazione cellulare e mediare caratteristiche più staminali, senza il requisito della mutazione genomica. Abbiamo dimostrato che le iLMA-MSCs presentavano uno stato depolarizzato come le LMA-MSCs ($V_{mem} = -11,8$ mV, $n=9$), e un'alterata espressione genica, inclusa la diminuzione dei livelli di $CaV1.2$. Utilizzando agenti farmacologici depolarizzanti (ouabaine potassio gluconato) o iperpolarizzanti (lubiprostone e ivermectina) abbiamo modificato il fenotipo delle cellule h- o LMA-MSCs, rispettivamente, dimostrando che il cambiamento del V_{mem} nelle hMSCs induce attività fondamentali a supporto della leucemia. Inoltre, inducendo una sovraespressione stabile del canale $CaV1.2$, abbiamo documentato il ripristino dell'attività dei canali ionici del Ca^{2+} e l'omeostasi nelle LMA-MSCs. Infine, abbiamo osservato che la comunicazione intercellulare ha mediato una propagazione dello stato bioelettrico tra le MSCs contigue supportando l'instaurarsi di un campo elettrico aberrante nella nicchia midollare. Questi risultati dimostrano che esiste un codice bioelettrico stromale che governa lo stato della nicchia midollare, e suggeriscono che nuove terapie di inversione del potenziale potrebbero svantaggiare la progressione della LMA, ma anche avvantaggiare l'attecchimento di un midollo sano.

Sesta edizione di

AIEOP..
...in Lab



Abs P12 (34 di 49) 3. Biomarcatori in oncoematologia

TRAP1, UN PONTE TRA METABOLISMO E REGOLAZIONE GENICA NEL DLBCL

L. Ferrone^{1,2}, A. Tosato (1), I. Galligani (1), F. Lovisa (1), E. Carraro (1), M. Pillon (1), M. Pizzi (3), A. Rasola (2), L. Mussolin (1)

¹Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino, Università di Padova; ²Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Padova; ³Dipartimento di Medicina, Università di Padova;

Il linfoma diffuso a grandi cellule (DLBCL) origina nei centri germinativi (CG) dei linfonodi secondari, dove i linfociti B normalmente differenziano. Nel CG, i linfociti B neoplastici vanno incontro a cambiamenti causati dalla deregolazione di fattori di rimodellamento della cromatina e dell'espressione genica. La combinazione della repressione dei geni coinvolti nel programma di differenziamento da una parte, combinata alla repressione di geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare dall'altra, favorisce il processo di linfomagenesi. Questo processo richiede la trimetilazione della lisina 27 sull'istone 3 (H3K27me3) da parte della metiltrasferasi EZH2, caratteristica del DLBCL. La demetilazione, invece, è catalizzata dalle demetilasi, regolati allostericamente da metaboliti intermedi del ciclo di Krebs, tra cui il succinato che ne inibisce l'attività. Lo chaperone mitocondriale TRAP1 è uno degli attori chiave nella bioenergetica delle cellule tumorali. In particolare, è stato dimostrato che TRAP1 nei tumori inibisce uno degli enzimi del ciclo di Krebs, la succinato deidrogenasi (SDH), che non venendo ossidato a fumarato si accumula agendo da oncometabolita e favorendo la stabilizzazione di programmi pro-neoplastici. È stato infatti osservato che TRAP1 promuove la progressione di diversi modelli tumorali. Un coinvolgimento di TRAP1 nella riprogrammazione epigenetica, nella linfomagenesi non è finora mai stato studiato. L'obiettivo di questo studio è analizzare i cambiamenti del panorama epigenetico delle cellule di DLBCL che avvengono a valle della riprogrammazione metabolica orchestrata da TRAP1. I nostri dati preliminari supportano la nostra ipotesi. L'analisi di una coorte di 385 pazienti DLBCL mostra che quelli con più alti livelli di TRAP1 hanno una più bassa sopravvivenza e appartengono ai sottotipi di DLBCL con peggiori prognosi. Su linee cellulari di DLBCL abbiamo visto che l'assenza di TRAP1 o la sua inibizione con specifici inibitori che abbiamo recentemente sintetizzato, porta ad un aumento dell'attività di SDH, in linea con la letteratura. Inoltre abbiamo osservato che l'assenza di TRAP1 o la sua inibizione comporta un decremento dei livelli di H3K27me3 e un incremento dei livelli di espressione di BLIMP1, un marker di differenziamento dei linfociti B. Trattando le cellule con succinato o con un inibitore di SDH, vediamo che i livelli di metilazione sono dipendenti dal succinato poiché nelle cellule KO per TRAP1 trattate, la metilazione incrementa. Inoltre abbiamo osservato che TRAP1 aumenta il tasso del ciclo cellulare nel DLBCL. Questi dati rappresentano un punto di partenza per la definizione di un nuovo marker prognostico e il futuro utilizzo di inibitori di TRAP1 recentemente sintetizzati.

Sesta edizione di

AIEOP.. ...in Lab



Abs P13 (35 di 49) 3. Biomarcatori in oncoematologia

VALIDAZIONE DI UNA FIRMA GENICA BASATA SULLA COMPOSIZIONE DEL MICROAMBIENTE TUMORALE PER LA STRATIFICAZIONE DEL RISCHIO DEI PAZIENTI PEDIATRICI CON LINFOMA DI HODGKIN CLASSICO.

Rosa Angarano¹, P.muggeo¹, M.grassi¹, g. Gargano², M.c. Vegliante², S. Ciavarella², A. Pappagallo², A. Guarini² E N. Santoro¹

¹: U.O.C. di Oncoematologia Pediatrica, Policlinico; ²: U.O. Ematologia, laboratorio di diagnostica ematologica e terapia cellulare, IRCCS Istituto Tumori "G. Paolo II"

Il linfoma di Hodgkin (LH) classico in età pediatrica richiede trattamenti non scevri da tossicità a lungo termine. La necessità di strumenti in grado di stratificare il rischio dei pazienti al momento della diagnosi rappresenta pertanto un sentito obiettivo di ricerca. Uno studio recente ha dimostrato aspetti molecolari peculiari dei LH pediatrici, come la prevalenza di espressione di geni correlati a macrofagi e cellule stromali, identificando un pannello di 111 trascritti genici con dimostrata capacità prognostica. Tale approccio, tuttavia, richiede ulteriori validazioni su coorti indipendenti e una consistente dimostrazione di riproducibilità per un'appropriata traslazione alla pratica clinica.

Nel presente studio, sono stati raccolti 31 campioni bioptici di LH classico alla diagnosi, fissati in formalina ed inclusi in paraffina, relativi a pazienti di età compresa tra 5-17 anni (media 13,3 anni), omogeneamente trattati con chemioterapia secondo Protocollo AIEOP-LH-2004. I campioni sono stati sottoposti a estrazione di RNA e profilazione mediante piattaforma nCounter (NanoString Technology) per la misurazione digitale di 111 trascritti in grado di riflettere la composizione del microambiente tumorale, con referenziato valore prognostico. Il valore assoluto di espressione di ciascun trascritto è stato sottoposto a opportuna normalizzazione per la generazione di una matrice di espressione utile per le successive analisi prognostiche, con la event free survival (EFS) a 5 anni come endpoint primario.

La casistica includeva 10 casi in stadio IIA, 6 in IIB, 2 in IIA, 5 in IIB, 3 in IVA e 4 in IVB. In particolare, sono risultati rischio intermedio (GT2) 10 casi. Gli indici di qualità dell'RNA estratto da ciascun caso sono risultati idonei per la successiva profilazione NanoString dei 111 geni relativi a 9 citotipi microambientali ad elevato valore prognostico (linfociti T CD8+, Linfociti Th1, Th2, Treg, mastociti, cellule mieloidi soppressorie, cellule follicolari dendritiche, linfociti B, cellule di Reed Sternberg). Le analisi di correlazione tra espressione genica e dati di outcome, ancora in corso, orientano per una capacità prognostica della suddetta firma molecolare.

Sebbene su una piccola casistica, i risultati del presente progetto fornirebbero la validazione indipendente di uno strumento prognostico molecolare innovativo e ne irrobustirebbero l'applicabilità clinica. Infatti, la crescente disponibilità di tecnologie per la misurazione genica digitale, come Nanostring, faciliterebbe l'utilizzo routinario di questo strumento a supporto dei classici prognosticatori clinici. Infine, lo studio proposto potrebbe rappresentare un modello metodologico applicabile in futuro per la stratificazione di sottogruppi di pazienti pediatrici sottoposti a nuovi regimi terapeutici.

Abs P15

ANALISI GENOMICHE INTEGRATIVE IDENTIFICANO GENI DI RISCHIO PER IL NEUROBLASTOMA COINVOLTI NEL DIFFERENZIAMENTO NEURONALE

M. Tirelli^{1,2}, F. Bonfiglio^{2,3}, S. Cantalupo^{2,3}, A. Montella^{2,3}, M. Avitabile^{2,3}, t. Maiorino^{2,3}, A. Iolascon^{2,3}, M. Capasso^{2,3}.

1. Scuola Europea di Medicina Molecolare, Università degli Studi di Milano; 2. CEINGE Biotecnologie Avanzate Franco Salvatore; 3. Università degli studi di Napoli Federico II

Introduzione

L'applicazione di studi di associazione genome-wide (genome-wide association studies, GWAS) negli ultimi anni è risultata determinante per l'identificazione di varianti genetiche (single-nucleotide polymorphisms, SNPs) funzionalmente implicati nella predisposizione al tumore e nello studio di fattori eziologici alla base di patologie come il neuroblastoma, un tumore pediatrico che origina da cellule immature del sistema nervoso simpatico in via di sviluppo. Poiché la maggior parte degli SNPs individuati da studi GWAS si localizzano in regioni non codificanti, è possibile che queste contribuiscano alla patogenesi agendo sulla modulazione di network regolatori e geni target, i quali tuttavia rimangono poco noti.

Metodi

Dati statistici (P-values e Odds Ratio) di 8,232,821 SNPs sono stati ottenuti mediante uno studio GWAS su 2101 pazienti con neuroblastoma e 4202 controlli. Da 175 campioni di surrene, tessuto dove il neuroblastoma preferenzialmente insorge, sono stati ricavati dati di expression quantitative trait loci (eQTL). Questi dati sono stati integrati e analizzati tramite la strategia "Sherlock" che permette di identificare i geni regolati dagli SNPs predisponenti al neuroblastoma. Il ruolo funzionale dei geni individuati è stato investigato tramite dati pubblici di espressione genica su singola cellula e su tessuto intero di neuroblastoma, creste neurali e surrene, e confermato mediante trattamenti *in vitro* con acido retinoico (24h, 48h, 72h, 5g) e BDNF (3g) in linee cellulari di neuroblastoma.

Risultati

Utilizzando il metodo di inferenza statistica bayesiana "Sherlock" per abbinare la signature dei geni dall'eQTL del surrene con i modelli di associazione in GWAS, abbiamo identificato cinque geni (*ZMYM1*, *CBL*, *GSKIP*, *SH3BGR* e *WDR81*) di suscettibilità al neuroblastoma il cui livello di espressione può influenzare il rischio di sviluppare questo tumore ($P < 0.05$). Dati di espressione hanno evidenziato che tre geni (*ZMYM1*, *CBL*, *GSKIP*) presentavano maggiori livelli nelle cellule immature della cresta neurale e in tumori primari di neuroblastoma rispetto al tessuto differenziato finale (surrene), suggerendo che la loro espressione differenziale possa essere correlata ad un loro potenziale ruolo durante il processo differenziativo. L'espressione di *WDR81*, invece, presentava un andamento opposto. Esperimenti di differenziamento con acido retinoico e BDNF hanno confermato una riduzione dell'espressione di *ZMYM1* e *CBL* durante il differenziamento in SHSY5Y e SKNBE2, mentre *GSKIP* e *WDR81* mostrano rispettivamente una riduzione e un aumento osservabili nei tempi differenziativi più avanzati.

Conclusioni

L'approccio multi-omico integrato qui proposto risulta utile nell'individuare nuovi geni target associati alla predisposizione di malattie tumorali che potrebbero determinare un notevole contributo nell'oncologia preventiva.

Abs P16 (37 di 49) 4. Cancer Predisposition

LA SENESCENZA INDOTTA DA ONCOGENE NELLA PRE-LEUCEMIA *ETV6::RUNX1**

D. Acunzo¹, M. Bertagna¹, L. Beneforti¹, G. Cazzaniga^{1,2}, C. Palmi¹.

1. Centro Tettamanti, Fondazione IRCCS San Gerardo dei Tintori; 2. Genetica Medica, scuola di medicina e chirurgia, università di Milano-Bicocca;

La più frequente traslocazione cromosomica nella leucemia linfoblastica acuta pediatrica a precursori B è la t(12;21)(p13;q22). Da questa alterazione si origina il gene di fusione *ETV6::RUNX1* (*E::R*), che codifica per un fattore trascrizionale aberrante, la cui espressione porta alla formazione di un progenitore pre-leucemico clinicamente silente (Wiemels J et al., 1999).

È stato dimostrato come l'espressione di *E::R* nelle cellule pro-B causi il rallentamento del ciclo cellulare (Ford A.M et al., 2009), caratteristica principale della Senescenza Indotta da Oncogene (OIS).

Negli ultimi anni stanno emergendo evidenze secondo cui la senescenza cellulare potrebbe promuovere la trasformazione maligna delle cellule pre-tumorali (Davalos A.R et al., 2010).

Scopo di questo studio è comprendere se la OIS sia un meccanismo coinvolto nel mantenimento della fase pre-leucemica *E::R*⁺ e nella sua successiva trasformazione tumorale.

Utilizzando un modello in vitro inducibile di pre-leucemia *E::R*⁺, sviluppato introducendo il gene di fusione nella linea cellulare murina pro-B Ba/F3, abbiamo dimostrato che le cellule *E::R*⁺ presentano altri marcatori di senescenza, quali una morfologia alterata, una maggiore attività della β-galattosidasi, una sovrapproduzione delle specie reattive dell'ossigeno e un aumento del livello di γH2AX, marcatore di danno al DNA. Inoltre, queste cellule secernano diverse molecole che appartengono al Fenotipo Secretorio Associato alla Senescenza (SASP) come PAI-1, CCL2 e CXCL1.

Nelle cellule pre-leucemiche abbiamo inoltre rilevato un accumulo della proteina p53 e l'inibizione della fosforilazione del residuo S392, modifica post-traduzionale che modula la sua traslocazione nel mitocondrio e l'attivazione dell'apoptosi. In linea con questo dato abbiamo osservato una maggiore resistenza all'apoptosi delle cellule *E::R*⁺ rispetto alla controparte normale in presenza di stimoli che inducono il danno al DNA (quali Etoposide e raggi X), pur non misurando una loro diversa abilità di riparo.

Abbiamo inoltre osservato che il trattamento in vitro con il composto senolitico SSK1, un pro-farmaco che viene attivato specificatamente dalla βgalattosidasi, induca selettivamente la morte cellulare delle cellule *E::R*⁺ e non delle cellule di controllo.

Questi risultati suggeriscono che l'oncogene *E::R* sia in grado di indurre uno stato di senescenza cellulare nel nostro modello e pongono le basi per ulteriori studi con lo scopo di sviluppare terapie mirate a eradicare le cellule pre-leucemiche, per evitare così possibili ricadute di malattie e pensare un domani di poter prevenire lo sviluppo della leucemia stessa.

Sesta edizione di

AIEOP.. ...in Lab



Abs P17 (38 di 49) 4. Cancer Predisposition

ANALISI MOLECOLARE DI PAZIENTI PEDIATRICI CON SOSPETTA SINDROME MIELODISPLASTICA/MIELOPROLIFERATIVA: SINTESI DI 4 ANNI DI CENTRALIZZAZIONE

L. Pedace¹, K. Girardi¹, S. Pizzi², R. De Vito³, F. Baccelli⁴, C. Nardini¹, V. Monteferrì¹, L. Strocchio¹, S. Patrizi¹, D. Pagliara¹, L. Vinti¹, E. Miele¹, R. Masetti⁴, M. Tartaglia², F. Locatelli¹, *Per Conto Del Gruppo Di Lavoro Mds Dell'aeop.*

1 Dipartimento di Oncoematologia, Terapia Cellulare, Terapie Geniche e Trapianto Emopoietico, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, IRCCS; 2 Genetica Molecolare e Genomica Funzionale, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, IRCCS.; 3 Unità di Patologia, Dipartimento di Laboratorio, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, IRCCS.; 4 Unità di Oncologia ed Ematologia Pediatrica "Lalla Seràgnoli", IRCCS Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna;

Le sindromi mielodisplastiche (MDS) comprendono un gruppo eterogeneo di disordini clonali ematopoietici, caratterizzati da un'anomala proliferazione, differenziazione e maturazione delle tre linee cellulare emopoietiche e da una aumentata apoptosi midollare. A differenza di quanto osservato nell'adulto, in età pediatrica la presenza di condizioni genetiche predisponenti è riconoscibile ad oggi in una porzione importante di pazienti che sviluppano MDS. Queste condizioni includono le sindromi ereditarie da insufficienza midollare (IBMF) e patologie costituzionali che predispongono allo sviluppo di MDS.

Il gruppo di lavoro MDS dell'AIEOP ha pubblicato le raccomandazioni sulla diagnosi molecolare delle MDS e delle condizioni predisponenti ai disturbi mieloproliferativi (MPD) nell'infanzia. Queste raccomandazioni mirano ad aiutare il clinico nella valutazione dei pazienti pediatrici affetti da sindromi genetiche predisponenti allo sviluppo di MDS ed all'identificazione di familiari portatori della mutazione in fase pre-clinica. Le analisi molecolari sono state eseguite con approccio di sequenziamento massivo parallelo mediante l'utilizzo di un pannello di 250 geni OMIM associati a disturbi mieloidi, kit Roche e piattaforma Illumina.

Da gennaio 2019 a dicembre 2022 sono stati centralizzati 250 campioni di pazienti pediatrici provenienti da 26 diversi centri italiani. La coorte è composta da 44 pazienti con Citopenia Refrattaria del bambino (RCC), 138 con MDS (di cui 38 istologicamente non confermati), 30 pazienti con Anemia Aplastica Severa (AAS), 18 con Leucemia Mieloide Acuta (LAM), infine 16 pazienti con MPD e 4 pazienti con Leucemia Mielomonocitica Giovanile (JMML).

Complessivamente, sono state identificate varianti con chiaro impatto funzionale nei seguenti pazienti: 10% (3/30) dei pazienti con AAS, 9% (4/44) pazienti con RCC, 37% (37/100) pazienti con MDS, 39% (7/18) pazienti con LAM, 25% (4/16) pazienti con MPD, 100% (4/4) pazienti con JMML. In 17 casi, il quadro istologico di MDS/MPD era parte di un complesso fenotipo clinico in cui l'analisi molecolare ha contribuito a porre diagnosi differenziale di anemia di Fanconi (11 pazienti), discheratosi congenita (4 pazienti), sindrome di Noonan (2 pazienti). Nel 27% dei pazienti (69/250) sono state identificate varianti di incerto significato (VUS).

Le analisi molecolari si confermano uno strumento utile per la definizione della diagnosi e per l'identificazione di fenotipi clinici complessi, malgrado questo, l'interpretazione del dato molecolare rimane ancora oggi una grande sfida dato l'alto numero di VUS. Infine, il processo di centralizzazione rappresenta un valido strumento di conferma diagnostica nella pratica clinica quotidiana per migliorare la precisione diagnostica e la selezione della terapia specifica per i pazienti con sindromi MDS/MPD.

Abs P18 (39 di 49) 4. Cancer Predisposition

DESCRIZIONE DEL PRIMO CASO DI UNA VARIANTE GERMINALE FRAMESHIFT DI PAX5 IN DUE FRATELLI AFFETTI DA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA

L. Bettini^{1,2}, G. Fazio² C. Saitta² S. Palamini² C. Buracchi² S. Rebellato² N. Santoro³ C. Simone⁴ A. Biondi¹, G. Cazzaniga^{2,5}

1. Pediatria, Fondazione IRCCS San Gerardo dei Tintori, Monza; 2. Centro Tettamanti, Fondazione IRCCS San Gerardo dei Tintori, Monza; 3. Unità Operativa Complessa di Pediatria ad Indirizzo Oncoematologico Ospedaliera - A.O. Universitaria "Policlinico Consorziale" Bari ; 4. Genetica Medica IRCCS 'S. de Bellis' Research Hospital, Castellana Grotte, Bari, 5. Genetica Medica, Dip. Di Medicina e Chirurgia, Università di Milano Bicocca, Monza

Le mutazioni somatiche di PAX5 sono frequentemente identificate in pazienti con LLA-B sporadica, ma solo di recente sono stati descritti casi di varianti germinale di PAX5 in famiglie con ricorrenza di LLA-B.

Descriviamo il caso di due fratelli, entrambi affetti da LLA-B, con evidenza di una nuova variante germinale di PAX5. Il probando, maschio di 13 anni, era arruolato nel protocollo AIEOP-BFM-ALL2009 e stratificato come Medio Rischio (MR) in base ai livelli di malattia residua minima. Otto anni dopo, a sua sorella di 14 anni, è stata posta diagnosi di LLA-B MR, trattata secondo protocollo AIEOP-BFM-ALL2017. I due pazienti erano altrimenti sani, nati da genitori sani, non consanguinei e senza storia familiare di malattie emato-oncologiche.

L'analisi di Next Generation Sequencing(NGS) dell'intero esoma su campioni di midollo osseo dell'esordio di malattia e della fase di remissione ha permesso di identificare una variante novel germinale ed eterozigote di PAX5 (c.548delG, p.Gly183AlafsTer84), presente in entrambi i fratelli. I campioni di malattia di entrambi i pazienti presentavano una variante somatica aggiuntiva di PAX5(c.239C>G, p. Pro80Arg). L'analisi digital-MLPA di un pannello di 55 geni hotspot di LLA ha escluso la presenza di alterazioni condivise del numero di copie(CNV) e, in particolare, non ha identificato alterazioni di CNV del locus PAX5. La segregazione familiare ha mostrato un'origine paterna della variante germinale PAX5(c.548delG, p.Gly183AlafsTer84), che è stata trovata nel padre e nella nonna paterna, entrambi senza storia di malattie emato-oncologiche.

Per investigare una compromissione della funzione di PAX5 nello sviluppo della linea B-cellulare, abbiamo valutato nei carriers il repertoire dei linfociti B mediante analisi FACS; in entrambi i carriers (padre e nonna paterna) è stata osservata una riduzione di cellule B mature rispetto ai controlli sani.

Contrariamente ai casi di PAX5 germinale già descritti, che hanno varianti missenso, i nostri pazienti presentano una variante frameshift, che ha un impatto verosimilmente più distruttivo sull'attività di PAX5. Come negli altri casi segnalati, i nostri pazienti hanno un evento somatico aggiuntivo su PAX5 che porta all'instaurarsi del clone leucemico, ma non alterazioni citogenetiche evidenti della regione 9p. In modo sorprendente per rarità e diversamente dalla letteratura, i due pazienti condividono la stessa variante somatica PAX5 p.Pro80Arg, nota come variante patogenetica che promuove la leucemogenesi.

L'identificazione di varianti germinali di PAX5 è di grande importanza nel contesto della predisposizione alla leucemia, per il contributo alla comprensione della patogenesi della LLA e per le implicazioni cliniche in termini di consulenza genetica familiare.

Abs P19 (40 di 49) 5. Altro

PROTEOMICA COMPARATIVA DEL PLASMA PER IDENTIFICARE CANDIDATI MARCATORI PRECOCI DI RICADUTA NEL LINFOMA DI HODGKIN IN BAMBINI/ADOLESCENTI

O. Repetto¹, C. Elia², L. Mussolin^{3,4}, S. Buffardi⁵, M. Pillon⁶, P. Muggeo⁷, T. Casini⁸, A. Steffan¹, M. Mascarini², V. De Re¹.

1. Facility of Bio-Proteomics, Immunopathology and Cancer Biomarkers, CRO, IRCCS; 2. AYA Oncology and Pediatric Radiotherapy Unit, CRO, IRCCS; 3. Istituto di Ricerca Pediatrica Città della Speranza; 4. Maternal and Child Health Department, Padova University; 5. Department of Pediatric Hemato-Oncology, Santobono-Pausilipon Children's Hospital; 6. Pediatric Hematology, Oncology and Stem Cell Transplant Division, Padova University Hospital; 7. Department of Pediatric Hemato-Oncology, A.O.U.C. Policlinico; 8. Division of Pediatric Oncology/Hematology, Meyer University Children's Hospital

Il linfoma di Hodgkin pediatrico (LH) è una malattia rara. I regimi terapeutici per la sua gestione possono essere ottimizzati stabilendo precocemente la risposta alla terapia. L'obiettivo di questo studio è stata l'identificazione di marcatori proteici plasmatici di ricaduta in bambini/adolescenti affetti da LH e trattati nel trial pediatrico EuroNet-PHL-C2. In 42 pazienti affetti da LH nodulare sclerosante, il profilo proteico del plasma alla diagnosi specificatamente associato alla ricaduta è stato analizzato tramite un approccio di proteomica semiquantitativa basata sulla spettrometria di massa untargeted accoppiata alla cromatografia liquida. In entrambe le coorti esplorativa e di validazione, 6 proteine (apolipoproteina E, catena α della proteina legante C4b, clasterina, catena γ del fibrinogeno, protrombina e vitronectina) sono risultate più abbondanti nel plasma di soggetti HL con ricaduta ($|\text{fold change}| \geq 1.2$, $p < 0.05$, Student's t-test). In base a modelli di predizione funzionale, le proteine associate alla ricaduta erano incluse in 4 processi biologici di Gene Ontology. Tra questi marcatori candidati, due proteine—catena α della proteina legante C4b e clasterina—legate alla funzione di risposta immunitaria innata (GO:0045087) sono state validate tramite immunoblotting e saggi al Luminex. Questo studio ha identificato la catena α della proteina legante C4b e la clasterina quali candidati marcatori proteici precoci di ricaduta alla terapia nel LH, ed ha contribuito a decifrare parte dello scenario molecolare associato alla risposta immunitaria in pazienti trattati nel trial EuroNet-PHL-C2.

Abs P20 (41 di 49) 5. Altro

STUDIO DEL DIFETTO ANGIOGENICO E DEL METABOLISMO DI CELLULE STROMALI MESENCHIMALI DERIVANTI DA PAZIENTI AFFETTI DA SINDROME DI SHWACHMAN-DIAMOND E NUOVE STRATEGIE TERAPEUTICHE

C. Gervasoni¹, A.m. Giussani¹, N. Bertola², E. Dander¹, A. Biondi^{3,4}, P. Corti³, P. Farruggia⁵, G. Menna⁶, M. Cipolli⁷, V. Bezzerri⁸, A. Pegoraro⁷, S. Cesaro⁸, C. Dufour⁹, E. Cappell⁹, S. Ravera², G. D'amico¹.

1. Centro Tettamanti, Fondazione IRCCS San Gerardo dei Tintori; 2. Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università di Genova; 3. Pediatria, Fondazione IRCCS San Gerardo dei Tintori; 4. Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi Milano-Bicocca; 5. Unità di Ematologia e Oncologia Pediatrica, Dipartimento di Oncologia, A.R.N.A.S. Ospedale Civico Di Cristina e Benfratelli; 6. Unità di Ematologia e Oncologia Pediatrica, Azienda Ospedaliera di Rilievo Nazionale Santobono Pausilipon; 7. Centro Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata; 8. Unità di Ematologia e Oncologia Pediatrica, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata; 9. Unità di Ematologia, IRCCS Istituto Giannina Gaslini.

La sindrome di Shwachman-Diamond (SDS) è una malattia rara caratterizzata da insufficienza midollare. Il nostro gruppo ha dimostrato come le cellule stromali mesenchimali (MSC) derivanti da midollo osseo (BM) di pazienti SDS abbiano un difetto angiogenico *in vitro* e *in vivo*.

È noto come un'angiogenesi patologica sia spesso accompagnata da alterazioni metaboliche e che possa essere corretta dall'uso di antiossidanti. Lo scopo di questo studio è quello di caratterizzare il metabolismo delle SDS-MSC e indagare l'uso di antiossidanti come strategia terapeutica per ripristinare l'incapacità angiogenica delle SDS-MSC.

Abbiamo analizzato la fosforilazione ossidativa, in particolare le vie dei complessi I-III-IV e II-III-IV. Osserviamo che le SDS-MSC consumano il 60% in meno dell'ossigeno e sintetizzano il 60% in meno di ATP rispetto alle HD-MSC ($p=0.002, n=6$). Tale difetto mitocondriale è dovuto in particolare ad una riduzione del 61% dell'attività del complesso IV ($p=0.002, n=6$). Inoltre, il rapporto ATP/AMP intracellulare è significativamente inferiore negli SDS rispetto agli HD (media=1.1, intervallo=0.8-1.6 vs media=3.6, intervallo=3.1-4.0; $p=0.002, n=6$) e correla ad un aumento dell'attività della lattato deidrogenasi (LDH) (media=0,4mU/mg, intervallo=0,4-0,6mU/mg vs media=0,3mU/mg, intervallo=0,27-0,32mU/mg; $p=0.002, n=6$). Infine, abbiamo anche dimostrato che la quantità di ROS nelle SDS-MSC è superiore del 27% rispetto agli HD ($n=5$) e che il livello di perossidazione lipidica è il doppio rispetto ai controlli ($p=0.002, n=6$).

Abbiamo quindi stimolato le MSC per 48h con 0.05% di dimetilsolfossido (DMSO), molecola che a basse concentrazioni agisce come antiossidante riducendo in particolare i livelli di perossidazione lipidica.

Sorprendentemente, le SDS-MSC stimolate recuperano significativamente la capacità di formare strutture simil-capillari su Matrigel ($n=7$). In aggiunta, la reversione angiogenica delle SDS-MSC è accompagnata da un ripristino metabolico ($n=6$). Le SDS-MSC stimolate aumentano infatti il consumo di ossigeno e la sintesi di ATP in entrambe le vie mitocondriali, oltre che ripristinare l'attività del complesso IV. Inoltre, il DMSO riporta il rapporto ATP/AMP e l'attività della LDH al livello dei controlli e riduce significativamente lo stress ossidativo delle SDS-MSC.

Al fine di confermare che l'effetto del DMSO sia dovuto specificatamente alle sue proprietà antiossidanti, abbiamo trattato le SDS-MSC per 48h con N-acetilcisteina (NAC) ($n=5$), noto antiossidante. Le SDS-MSC ripristinano il proprio difetto metabolico e recuperano il potenziale angiogenico in modo paragonabile al trattamento con il DMSO.

In conclusione, abbiamo dimostrato come l'alterato metabolismo potrebbe essere alla base del difetto angiogenico osservato nelle SDS-MSC. Inoltre, l'uso di antiossidanti è in grado di ripristinare il quadro metabolico e l'incapacità angiogenica delle SDS-MSC, aprendo così la strada a nuove strategie terapeutiche.

Abs P21 (42 di 49) 5. Altro

CARATTERIZZAZIONE METABOLICA A SINGOLA CELLULA E TARGETING DI FUSIONI DI PAX5 E JAK2 NELLA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA PEDIATRICA

M. Quadri¹, J. Sarno², K.I. Davis², G. Cazzaniga^{1,3}, G. Fazio¹.

1. Fondazione M. Tettamanti, Fondazione IRCCS San Gerardo dei Tintori; 2. Dipartimento di Pediatria, Bass Center per il Cancro Infantile, Università di Stanford; 3. Genetica Medica, Scuola di Medicina e Chirurgia, Università di Milano-Bicocca

Il protocollo di trattamento basato sul rischio è curativo per l'85% dei bambini affetti da leucemia linfoblastica acuta a precursori a cellule B (B-LLA), tuttavia la recidiva rimane una delle principali cause di morte, con solo il 20-45% di tasso di guarigione, indicando la necessità di nuove terapie molecolari mirate. PAX5, fattore trascrizionale fondamentale per lo sviluppo delle cellule B, è riarrangiato nel 30% dei casi di B-LLA, avendo diversi geni partner tra cui JAK2, una tirosin-chinasi non recettoriale, riarrangiata invece nel 5% dei pazienti Philadelphia-like. PAX5 è inoltre considerato un regolatore metabolico, abbassando glicolisi e produzione di ATP nelle cellule B. Non è invece noto se le alterazioni di JAK2 possano contribuire alla regolazione metabolica delle cellule B. Scopo del presente progetto è lo studio del metabolismo cellulare in presenza di fusioni di PAX5 e JAK2 in B-LLA. A tale scopo, abbiamo allestito xenotrapianti murini di blasti primari di pazienti pediatrici di B-LLA con riarrangiamenti di PAX5 e JAK2, per espanderli ed utilizzarli in esperimenti ex-vivo. Mediante tecnologia CyTOF, abbiamo quindi applicato un pannello metabolico specifico per rilevare simultaneamente l'espressione di molteplici proteine metaboliche e marcatori di superficie e intracellulari a livello di singola cellula. Per prima cosa abbiamo dimostrato un blocco significativo della maturazione dei blasti leucemici negli stadi pre-pro-B, pro-BII e pre-BII rispetto alle cellule B immature e mature, a causa della presenza dei geni di fusione di PAX5 e JAK2. Inizialmente abbiamo valutato un'espressione differenziale delle proteine metaboliche nelle sottopopolazioni pro-BII e pre-BII. In seguito, abbiamo osservato che le fusioni di PAX5 e JAK2 nei blasti portano ad un aumento della glicolisi verso la produzione di lattato (effetto Warburg) rispetto al controllo sano, evidenziato da un'alta espressione di GLUT1, MCT1 e LDHA tra le altre proteine. Inoltre abbiamo osservato un'espressione alterata delle proteine correlate ai mitocondri, come OPA1 e BCL2, risultate fortemente aumentate. Considerata l'elevata espressione di BCL2 nei blasti pro-BII e pre-BII, abbiamo trattato per 72h le cellule di 3 pazienti con fusioni di PAX5 (di cui una PAX5::JAK2) con venetoclax, osservando sia una significativa inibizione metabolica tramite CellTiterGlo sia una significativa apoptosi tramite AnnexinV/TAAD. In conclusione, possiamo affermare che le fusioni di PAX5 e JAK2 portano ad una deregolazione del metabolismo nelle cellule leucemiche che sostiene la loro sopravvivenza e che il targeting delle loro alterazioni metaboliche rappresenta un approccio alternativo efficace per i pazienti pediatrici portatori di fusioni di PAX5 e JAK2.

Abs P22 (43 di 49) 5. Altro

ANALISI METILOMICA E TRASCRIPTOMICA DI CASI DI RABDOMIOSARCOMA ALVEOLARE DEL DISTRETTO TESTA/COLLO IN ETÀ INFANTILE E ADOLESCENZIALE

S. Patrizi¹, S. Barresi², S. Vallese², I. Giovannoni², L. Pedace¹, C. Antonacci¹, L. Abballe¹, C. Nardini¹, V. Monteferrri¹, I. Russo¹, A. Di Giannatale¹, A. Ciolffi³, M. Tartaglia³, F. Locatelli¹, R. Alaggio², G. M. Milano¹, E. Miele¹.

¹ Dipartimento di Oncoematologia, Terapia Cellulare, Terapie Geniche e Trapianto Emopoietico, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, IRCCS; ² Dipartimento di Patologia, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, IRCCS; ³ Area di ricerca di Genetica e Malattie Rare, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, IRCCS

Introduzione: Il rhabdomiosarcoma alveolare (RMSA) è una neoplasia estremamente aggressiva principalmente diagnosticata durante la prima decade di vita, ma che può presentarsi anche durante l'adolescenza con una prognosi migliore rispetto ai pazienti più giovani. Lo scopo di questo studio è l'identificazione di geni differenzialmente metilati o espressi che possano spiegare la peggiore prognosi dei casi di RMSA in pazienti di età inferiore a 1 anno ed essere sfruttati come bersagli farmacologici, in modo da ampliare la gamma di trattamenti disponibili per i casi di RMSA in età infantile.

Materiali e metodi: Sono stati selezionati 9 casi di RMSA testa/collo (4 pazienti di età inferiore a 1 anno e 5 di età superiore a 10 anni) di cui è stato analizzato sia il metiloma che il trascrittoma. In ambiente R sono state calcolate le regioni differenzialmente metilate del genoma (DMR) e i geni differenzialmente espressi (DEG) tra i pazienti di età inferiore a 1 anno e quelli di età superiore a 10 anni. Il database Genomics of Drug Sensitivity in Cancer (GDSC) è stato consultato per identificare potenziali bersagli farmacologici tra i DEG.

Risultati: Nel confronto tra i due gruppi sono emerse 49 DMR e 3140 DEG significativi ($p < 0.05$). Questi due gruppi di geni non presentavano sovrapposizioni, ma diversi processi biologici erano arricchiti in entrambi (ad esempio la segregazione dei cromatidi fratelli, le vie di Notch e Wnt, la regolazione di p53, la mitosi, la migrazione cellulare). Tra i DEG, 14 erano inclusi nel database GDSC. Tra questi, 5 (AKT1, CDK9, FEN1, HDAC11, KDM3A) erano iperespressi nei pazienti di età inferiore a 1 anno, mentre 9 (BRDT, BTK, EGFR, ESR1, ESR2, LCK, NTRK2, PIM2, PLK2) risultavano ipoespressi.

Conclusioni: I RMSA in pazienti in età infantile presentano differenze nella metilazione del DNA e nell'espressione genica in diversi processi biologici correlati al cancro rispetto ai RMSA in pazienti adolescenti. Queste differenze potrebbero spiegare la maggiore aggressività della malattia e la prognosi peggiore, ma potrebbero anche essere utilizzate come bersagli terapeutici. Sono necessari studi funzionali per confermare i nostri risultati e spiegare la loro correlazione con la prognosi dei pazienti.

Abs P23 (44 di 49) 5. Altro

STUDIO DEI PROFILI DI METILAZIONE DEL DNA IN UNA POPOLAZIONE PEDIATRICA E GIOVANILE CON TUMORE MALIGNO DELLE GUAINE NERVOSE PERIFERICHE (MPNST) O ENTITÀ MPNST-LIKE

E. Miele¹, S. Patrizi¹, L. Falcone², S. Vallese², S. Rossi², S. Barresi², I. Giovannoni², R. De Vito², A. Cacchione¹, I. Russo¹, A. Di Giannatale¹, L. Pedace¹, C. Antonacci¹, L. Abballe¹, C. Nardini¹, V. Monteferrì¹, G. Bisogno⁴, A. Ciolfi³, M. Tartaglia³, G. M. Milano¹, R. Alaggio², F. Locatelli¹.

¹ Dipartimento di Oncoematologia, Terapia Cellulare, Terapie Geniche e Trapianto Emopoietico, Ospedale pediatrico Bambino Gesù, IRCCS; ² Dipartimento di Patologia, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, IRCCS; ³ Area di ricerca di Genetica e Malattie Rare, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, IRCCS; ⁴ Clinica di Oncoematologia Pediatrica, Università di Padova

Introduzione: Oltre il 50% dei casi di tumore maligno delle guaine nervose periferiche (MPNST) insorge in pazienti affetti da neurofibromatosi di tipo 1 (NF1). La diagnosi di MPNST sporadico può essere difficile a causa dell'assenza di marcatori immunohistochimici specifici, ad eccezione della perdita di H3K27me3. I MPNST, però, presentano un profilo di metilazione del DNA (PMD) specifico. Di recente lo studio del PMD ha consentito l'identificazione di un'altra categoria, definita come MPNST-like, che mantiene l'espressione di H3K27me3 e ha caratteristiche cliniche e istologiche ancora poco conosciute. Lo studio mira a valutare l'utilità diagnostica del PMD nei MPNST pediatrici e del giovane adulto.

Materiali e metodi: Lo studio comprende 3 gruppi di neoplasie, insorte in pazienti di età inferiore a 25 anni, per cui è stata analizzato il PMD. Gruppo 1: Neoplasie con diagnosi istologica di MPNST selezionate dal database di patologia dell'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù (OPBG). Gruppo 2: Neoplasie con diagnosi istologica di neurofibroma atipico. Gruppo 3: Neoplasie con PMD di MPNST e MPNST-like secondo il classificatore dei sarcomi, indipendentemente dalla diagnosi istologica, ed escludendo i campioni dei gruppi 1 e 2. Sono state raccolte le informazioni clinico/istologiche e genetico/molecolari e quando necessario sono stati eseguiti ulteriori test immunohistochimici e/o molecolari.

Risultati: Gruppo 1: L'analisi del PMD in 23 MPNST (età 0,2-24 anni) ha confermato la diagnosi originale di MPNST in 10 casi. Cinque casi sono stati classificati nella categoria MPNST-like, i restanti 9 come schwannoma (2), osteosarcoma di alto grado (1), sarcoma BCOR (1), rhabdomyosarcoma MYOD1-mutato (RMS-MYOD1mut) (1), o in nessuna classe (3). Ulteriori analisi molecolari e revisioni istologiche hanno confermato le diagnosi di sarcoma BCOR e RMS-MYOD1mut. Gruppo 2: su 5 neurofibromi atipici, 1 è stato classificato come MPNST, 2 come Schwannoma e 2 non mostravano nessuna corrispondenza. Gruppo 3: 8 sarcomi tra quelli con PMD disponibile, escludendo quelli dei gruppi 1 e 2, presentavano un PMD MPNST-like. Questa categoria eterogenea comprendeva due gruppi: sarcomi indifferenziati ad alto grado/MPNST (n=3) e neoplasie mesenchimali a basso grado (n=5) di cui 4 con fusioni geniche di tirosin-chinasi.

Conclusioni: Il PMD si è dimostrato utile nella diagnosi di MPNST in pazienti affetti da NF1 e nella discriminazione di neoplasie morfologicamente simili, che venivano classificate come MPNST prima dell'avvento dei test molecolari (ad esempio il sarcoma BCOR o il RMS-MYOD1mut). La categoria MPNST-like rappresenta un gruppo "ibrido" in ambito pediatrico, e necessita di studi più approfonditi.

Sesta edizione di

**AIEOP..
...in Lab**



Abs P24 (45 di 49) 5. Altro

MICROAMBIENTE MIDOLLARE NELLA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA NPM1 MUTATA: ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DELLE CELLULE STROMALI MESENCHIMALI

C.valsecchi¹, L.calabretta², E.lenta¹, M.rossi², P.zappasodi², M.zecca¹, P.comoli¹, M.a. Avanzini¹, S.croce¹.

1: U.O.C. Ematologia-Oncoematologia Pediatrica/Cell Factory, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia; 2: U.O.C. Ematologia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Il microambiente midollare, costituito in gran parte da Cellule Stromali Mesenchimali (MSCs), contribuisce a regolare i processi di proliferazione, differenziazione e auto-rinnovamento delle cellule staminali leucemiche (LSCs). Allo stesso tempo, è stato osservato che le LSCs possono modulare la funzionalità delle MSCs in un processo di auto-alimentazione della leucemogenesi.

Sono state infatti osservate alterazioni funzionali a livello delle MSCs midollari di pazienti affetti da leucemia mieloide acuta (AML). Tuttavia non è ancora stato dimostrato in che modo tali alterazioni siano correlate alla patogenesi della malattia, nonostante sia noto il ruolo chiave del microambiente midollare nel favorire la chemioresistenza delle cellule leucemiche.

Per comprendere i meccanismi che a livello della nicchia midollare favoriscono la resistenza alla terapia e l'insorgenza di recidive, abbiamo valutato le MSCs espanse da MO di pazienti affetti da AML con mutazione del gene NPM1 (AML-NPM1mut).

Questo sottogruppo di leucemie è definito a basso rischio, anche se l'outcome clinico è estremamente eterogeneo con percentuale di recidive del 50%.

Fino ad ora abbiamo espanso le MSCs da MO di 6 pazienti affetti da AML-NPM1mut, valutandone la morfologia, la capacità proliferativa, l'efficienza clonogenica, l'espressione di antigeni di superficie, la senescenza, e la capacità di differenziare "in vitro" in adipociti e osteociti. Inoltre abbiamo valutato i livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS), come indice di stress ossidativo.

I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti da MSCs espanse da MO di 6 donatori di cellule staminali emopoietiche (HD-MSCs).

Dai dati preliminari abbiamo osservato una minore capacità differenziativa, una precoce senescenza e maggiori livelli di ROS nelle AML-NPM1mut MSCs rispetto a quanto osservato nelle HD-MSCs.

Questi risultati supportano l'ipotesi che in AML-NPM1mut sussista un microambiente midollare modificato in cui le cellule leucemiche determinano alterazioni funzionali delle MSCs che a loro volta favorirebbero la sopravvivenza delle LSCs stesse portando ad un maggiore tasso di recidiva.

Le nostre osservazioni potrebbero fornire indicazioni utili ad identificare i pazienti che presentano un maggior rischio di ricaduta, allo scopo di sviluppare strategie terapeutiche personalizzate.

Sesta edizione di

**AIEOP..
...in Lab**



Abs P25

PROFILO DI METILAZIONE GLOBALE DEL DNA: UNA POTENTE STRATEGIA PER RICAPITOLARE L'ETEROGENEITÀ DEI TUMORI CEREBRALI PEDIATRICI NELLE LINEE CELLULARI PRIMARIE

C.antonacci¹, L.pedace¹, L.abballe¹, S.pizzi², C.nardini¹, V.monteferri¹, M.vinci¹, S.patrizi¹, F.del Bufalo¹, S.rossi³, G.pericoli¹, F.gianno⁴, Z.m. besharat⁵, L.tiberi⁶, A.mastronuzzi¹, E.ferretti⁵, M.tartaglia², F.locatelli¹, A.ciolfi² And E.miele¹

¹ Dipartimento di Oncoematologia Pediatrica e Terapia Cellulare e Genica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, IRCCS; ² Genetica Molecolare e Genomica Funzionale, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, IRCCS; ³ Unità di Patologia, Dipartimento dei Laboratori, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, IRCCS; ⁴ Dipartimento di Scienze Radiologiche, Oncologiche e Anatomico-patologiche, Università "La Sapienza"; ⁵ Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università "La Sapienza"; ⁶ Armenise-Harvard Laboratorio di Disordini e Tumori Cerebrali, Dipartimento di Biologia Cellulare, Computazionale e Integrata (CIBio), Università di Trento

I modelli cellulari di tumori cerebrali pediatrici (TCP) sono utilizzati come strumento *in vitro* per riprodurre le caratteristiche del tumore originario. Il nostro studio si basa sull'analisi combinata del profilo di metilazione del DNA (DNAm) e della variazione del numero di copie (CNV) in campioni tissutali (n=155) di TCP e di colture cellulari primarie (n=86) derivate dagli stessi, al fine di valutarne le differenze. La coorte dei campioni tissutali analizzati comprende: 61 medulloblastomi; 81 tumori gliali (45 di basso grado e 36 di alto grado); 9 ependimomi e 4 meningiomi. La coorte delle colture cellulari comprende: 58 colture cellulari accoppiate ai tessuti corrispondenti, 14 colture non accoppiate, 9 organoidi e 5 linee cellulari commerciali. Sono state considerate tre principali condizioni di coltura: mezzo (presenza o assenza di siero), tempo (tardive o precoci) e dimensionalità (2D o 3D). Le analisi sono state eseguite mediante piattaforma Illumina iScan microarray con utilizzo del kit Infinium Human Methylation EPIC BeadChip arrays ed i raw-data sono stati analizzati utilizzando il classificatore dei tumori cerebrali (v12.5). Le analisi delle colture cellulari nel tempo mostrano che la classe di metilazione risulta essere coerente a quella del tumore originario nel 51% delle colture precoci (rispetto al 34% delle colture tardive), nel 58% delle colture mantenute in mezzo senza siero (rispetto al 21% delle colture con siero) e nel 57% delle colture 3D (rispetto al 40% delle colture 2D). Inoltre, abbiamo osservato profili CNV coerenti al tumore originario nel 55% delle colture cellulari mantenute in mezzo privo di siero rispetto al 39% delle colture cellulari con siero, nel 55% delle colture 3D rispetto al 47% delle colture 2D, nel 64% delle colture cellulari precoci rispetto al 39% delle colture cellulari tardive. Nel complesso, questi risultati indicano che i passaggi tardivi, la presenza di siero e la coltura 2D innescano processi che portano le cellule a divergere dal tumore originario. Infine, è stata eseguita una classificazione t-SNE che ha mostrato un clustering differente delle linee cellulari dipendente sia dal mezzo di coltura che dal tempo. Tutte le cellule divergenti hanno clusterizzato insieme acquisendo un profilo DNAm comune che suggerisce una pressione selettiva condivisa. I risultati ottenuti dal nostro studio dimostrano come la valutazione del DNAm e delle CNV rappresentano uno strumento utile che può essere impiegato per valutare la fedeltà delle colture cellulari primarie al tumore originario.

Sesta edizione di

AIEOP.. ...in Lab



Abs P26 (47 di 49) 5. Altro

PREME: PROGRAMMA ITALIANO DI MEDICINA DI PRECISIONE PER IL NEUROBLASTOMA AD ALTO RISCHIO

M. Capasso^{1,3,*}, C. Brignole^{2,*}, V. Bensa², V.a. Lasorsa³, E. Sebastiani⁴, S. Cantalupo^{1,3}, M. Avitabile^{1,3}, A.r. Sementa⁵, K. Mazzocco⁵, B. Cafferata⁵, V. g. Vellone⁵, M. Cilli⁶, E. Calarco², E. Giusto², E. Ciampi², P. Perri², M.v. Corrias², S. Aveic⁷, D. Fruci⁸, S. A. Quattrone⁴, A. Tondo⁹, R. Luksch¹⁰, R. Mura¹¹, M. Rabusin¹², Francesco De Leonardis¹³, M. Cellini¹⁴, P. Coccia¹⁵, A. Iolascon^{1,3}, M. Conte¹⁶, L. Amoroso¹⁶, A. Garaventa¹⁶, M. Ponzoni^{2,**}, F. Pastorino^{2,**}

1. Università di Napoli Federico II, Dipartimento di Biotecnologie Mediche e Medicina Molecolare; 2. Laboratorio di Terapie Sperimentali in Oncologia, IRCCS Istituto Giannina Gaslini; 3. CEINGE Biotecnologie Avanzate; 4. CIBIO, Università di Trento; 5. UOC Anatomia Patologica, IRCCS Istituto Giannina Gaslini;

6. Stabulario, IRCCS Policlinico San Martino; 7. Fondazione Istituto di Ricerca Pediatrica Città della Speranza; 8. Dipartimento di Ematologia-Oncologia Pediatrica e Terapia Cellulare e Genica, IRCCS Bambino Gesù Children's Hospital; 9. Dipartimento di Ematologia-Oncologia, Anna Meyer Children's Hospital; 10. Unità di Oncologia Pediatrica, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori; 11. Oncoematologia Pediatrica, Ospedale Pediatrico Microcitemico "Antonio Cao" Azienda Ospedaliera Brotzu; 12. Dipartimento di Pediatria, Institute for Maternal and Child Health, IRCCS Burlo Garofolo; 13. Dipartimento di Oncologia Pediatrica, Azienda Ospedale Policlinico di Bari; 14. Divisione di Emato-Oncologia Pediatrica, Azienda Policlinico di Modena;

15. Azienda Ospedaliero Universitaria delle Marche, Presidio Ospedaliero "G. Salesi"; 16. UOC Oncologia, IRCCS Istituto Giannina Gaslini; ; * Questi autori hanno contribuito equamente in qualità di primo autore; ** Questi autori hanno contribuito equamente in qualità di ultimo autore.

Background: Nell'era della medicina di precisione, la necessità di terapie specifiche per i pazienti con neuroblastoma (NB) ad alto rischio è fondamentale.

Metodi: Da novembre 2018 a febbraio 2021, il programma italiano Personalized Medicine (PREME) ha arruolato 18 pazienti affetti da NB. Dopo l'immunofenotipizzazione istologica o tramite citometria a flusso, le cellule tumorali e infiltranti il midollo osseo sono state utilizzate per: 1) estrazione del DNA per sequenziamento o dell'esoma, con una copertura media di 100x, o di 498 geni tumorali, con una copertura media di 1000x; 2) estrazione dell'RNA per RNAseq; 3) sviluppo di modelli xenograft in topo (PDX) derivanti dal paziente e di colture di cellule primarie di NB (3D/sfere tumorali).

Risultati: In 14 pazienti su 18 (77,7%), il 'Molecular Tumor Board' ha identificato una o più alterazioni somatiche target (incluse mutazioni puntiformi, variazioni del numero di copie e over-espressione di mRNA). Nove tumori hanno mostrato alterazioni, classificate come "ad altissima priorità", che sono state convalidate per essere direttamente bersagliabili da un farmaco approvato o da un agente in sperimentazione, mentre cinque tumori hanno mostrato alterazioni, classificate come "ad alta priorità", che sono state predette come patogenetiche in geni o pathway bersagliabili da un farmaco approvato o da un agente in sperimentazione. Per 4 pazienti è stata applicata una terapia a bersaglio molecolare. A 2 pazienti che presentavano una variante germinale patogena in geni noti di predisposizione al cancro è stata suggerita una consulenza genetica. Degli 11 campioni di tumore impiantati nei topi, 5 hanno dato origine a PDX. Confrontando tutte le varianti genomiche dei 5 tumori con i campioni PDX sviluppati fino alla seconda generazione, è stato osservato un elevato grado di somiglianza tra i tumori primari e i modelli PDX (coefficienti di Pearson >0,8). La validità e la riproducibilità dei nostri modelli PDX è stata dimostrata anche dagli alti tassi di varianti somatiche conservate (media: 81,3%) e dall'identificazione di tutte le alterazioni genetiche potenzialmente attivabili tra i tumori primari e le generazioni PDX. Confrontando i profili istologici, immunofenotipici e trascrittomici tra i tumori primari e le generazioni di PDX, è stato confermato un elevato grado di somiglianza. Le cellule NB coltivate in 3D hanno dimostrato un buon tasso di varianti somatiche conservate.

Conclusioni: Il programma PREME ha individuato pazienti con NB che presentano alterazioni genomiche bersagliabili con farmaci molecolari e ha permesso lo sviluppo di una bio-banca di modelli preclinici per la medicina di precisione.

Abs P27 (48 di 49) 5. Altro

ATTIVINA-A MODULA IL CONTENUTO DI MICRORNA DELLE VESICOLE EXTRACELLULARI RILASCIATE DALLE CELLULE DI LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA DI TIPO B (LLA-B), PROMUOVENDO LA CHEMIORESISTENZA

E. Licari¹, G. Cricri¹, F. Raimondo², M. Pitto², S. Bresolin³, A. Biondi^{4,5}, V. Bollati⁶, E. Dander¹, G. D'amico¹.

1. Centro Tettamanti, Fondazione IRCCS San Gerardo dei Tintori; 2. Unità di Proteomica e Metabolomica Clinica, Università di Milano-Bicocca; 3. Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino, Università di Padova; 4. Pediatria, Fondazione IRCCS San Gerardo dei Tintori; 5. Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi Milano-Bicocca; 6. EPIGET – Laboratorio di Epidemiologia, Epigenetica e Tossicologi, Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità, Università di Milano

Recentemente abbiamo dimostrato che Attivina-A (ActA) è abbondante nel midollo dei pazienti pediatrici con LLA-B e promuove migrazione e invasività delle cellule leucemiche. Come nella migrazione, anche nella produzione delle Vescicole Extracellulari (VE) avviene il rimodellamento del citoscheletro. Le VE rappresentano una via di comunicazione inter-cellulare grazie al loro contenuto, fra cui i microRNA (miRNA). Scopo del progetto è stato studiare l'impatto di ActA sulla vescicolazione delle cellule di LLA-B, sfruttando la linea 697.

Dopo stimolazione con ActA, le cellule 697 hanno presentato un aumento significativo della produzione di esosomi e micro-vescicole (Fold Change (FC)=2, $p<0.0001$ e 1.3, $p=0.003$, rispettivamente, $n=16$). Inoltre, ActA ha anche modificato il contenuto dei miRNA delle VE. Fra quelli modulati, il miR-491-5p è risultato aumentato da ActA di 3 volte nelle VE ($p<0.0001$), e di 1,5 volte a livello intracellulare ($p=0.0004$, $n=14$). A proposito del suo ruolo, dati di letteratura lo correlano alla chemio-resistenza in diversi tumori. Per indagare l'azione chemio-protettiva nella LLA-B, abbiamo svolto esperimenti in cui cellule 697, pre-stimate o no con ActA, sono state trattate con Asparaginasi (ActA+ASNasi versus NS+ASNasi), un chemioterapico utilizzato per il trattamento di pazienti LLA-B pediatrici. Sorprendentemente, ActA è stata in grado di aumentare la vitalità delle cellule 697 trattate con ASNasi del 11,3% rispetto alle cellule controllo ($p=0.006$). Inoltre, la combinazione ActA+ASNasi è risultata superiore rispetto ai singoli stimoli nell'aumentare miR-491-5p nelle cellule 697 (FC=2.5, $p=0.0078$ rispetto controllo, $n=8$). Per confermare il coinvolgimento del miR-491-5p nella chemio-resistenza, ne abbiamo modulato l'espressione tramite trasfezione di un inibitore specifico, ottenendo una riduzione del 40% ($p=0.0423$, $n=3$) dell'azione anti-apoptotica di ActA.

Tramite il database miR-System abbiamo predetto il coinvolgimento di miR-491-5p nell'apoptosi mediata da p53. Per investigare i potenziali target di miR-491-5p, attraverso dati di espressione genica su cellule 697, abbiamo dimostrato che ActA riduce del 30% l'espressione di TP53-AIP1 ($p=0.001$), una molecola pro-apoptotica del pathway di p53. In accordo, il database miR-Walk suggerisce TP53-AIP1 come target diretto di miR-491-5p. La modulazione TP53-AIP1 da parte di miR-491-5p è stata confermata sperimentalmente: l'inibizione di miR-491-5p è in grado di aumentare di 5,8 volte l'espressione di TP53-AIP1 ($p=0.0313$, $n=6$), mentre la trasfezione di un mimic (miR-491-5p sintetico) di diminuirne i livelli del 20% ($p=0.0283$, $n=4$).

In conclusione, abbiamo dimostrato che ActA aumenta la produzione di vescicole ricche di miR-491-5p, un mediatore cruciale per svolgere la sua azione chemio-protettiva. Studi futuri saranno necessari per investigare se la chemio-resistenza possa essere trasferita anche a distanza grazie alle VE.



Abs P28 (49 di 49) 5. Altro

PRIMA DESCRIZIONE DI UN CASO DI NEUTROPENIA AUTOIMMUNE LEGATO A MUTAZIONE DI LRBA

A. Guarina¹, P. Farruggia¹, A. Giambona², L. Vivian², A. Maggio³, P. D'angelo¹, F. List².

¹ U.O.C. di Oncoematologia Pediatrica, A.R.N.A.S. Civico, Di Cristina, Benfratelli; ² U.O.S.D. Diagnostica molecolare e malattie rare ematologiche, Ospedali Riuniti "Villa Sofia – Cervello"; ³ Ematologia e Malattie Rare, Ospedali Riuniti "Villa Sofia – Cervello".

Introduzione. L'immunodeficienza combinata da deficit di LRBA (LPS responsive beige-like anchor protein) è un'immunodeficienza primitiva rara, a trasmissione autosomica recessiva (segnalati anche casi di eterozigosi composta), caratterizzata da deficit dei linfociti T regolatori ed ipogammaglobulinemia, associata a malattie autoimmuni, soprattutto enteropatia e citopenie. In letteratura il fenotipo descritto è comunque molto variabile. Descriviamo una paziente con neutropenia autoimmune e tiroidite autoimmune.

Case report. Femmina, anamnesi familiare negativa. All'età di 17 anni riscontro occasionale di neutropenia: Hb 12.3 g/dl, GB 2.280/mmc, N 517/mmc, PLTs 280.000/mmc. Allo screening per autoimmunità ANA positivi con titolo 1.640. BM e BOM nella norma. Successiva diagnosi di tiroidite autoimmune. Giunge per la prima volta alla nostra attenzione a 34 anni, ripete BM e BOM (nella norma). Ab anti-neutrofilo positivi, immunoglobuline e sottopopolazioni linfocitarie nella norma. Inizia terapia con G-CSF al bisogno in occasione di una suppurazione della ghiandola del Bartolini; dopo 7 mesi comparsa di ascessi e linfadeniti ascellari bilaterali ricorrenti e, per tale ragione, passa a terapia continuativa con G-CSF. Nel 2022 viene eseguito studio dell'esoma che esclude qualsiasi forma di neutropenia congenita e evidenzia la presenza di due varianti (c.7799G>A e c.6786G>C) in eterozigosi composta nel gene LRBA. La paziente è in atto in ottime condizioni cliniche, prosegue terapia con G-CSF a 2 mcg/kg/die ed ha portato a termine una gravidanza gemellare (mantenendo la terapia con G-CSF), dopo un aborto spontaneo.

Discussione e conclusioni. La proteina LRBA è una proteina citosolica che partecipa al turnover del recettore CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) nelle cellule T regolatorie. Il deficit di questa proteina causa una disregolazione immunitaria con spettro clinico variabile: in letteratura sono descritti pazienti in cui il quadro clinico, a pattern immunologico normale, è, come nella nostra paziente, dominato dalla autoimmunità. Nel nostro caso le due varianti riscontrate sono di incerto significato (VUS) ma il fenotipo è assolutamente compatibile con altri descritti in letteratura, sebbene la nostra sia la prima descrizione di associazione con neutropenia autoimmune (descritti fino ad ora solo casi associati a ITP o AIHA). È in corso una analisi di segregazione sui familiari della paziente.