

Progetto : “IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI SPECIFICI PATHWAY MOLECOLARI COINVOLTI IN LEUCEMIE ACUTE MIELOIDI”

Le leucemie acute mieloidi (LAM) e le sindromi mielodisplastiche (SMD) sono caratterizzate da una elevata eterogeneità genetica dimostrata dall'osservazione di frequenti e ricorrenti alterazioni cromosomiche che contribuiscono in maniera fondamentale alla leucemogenesi. Le alterazioni citogenetiche possono portare alla deregolazione di uno o più geni fisiologicamente coinvolti nella regolazione di processi critici come la proliferazione, il differenziamento e la sopravvivenza cellulare.

Oltre alle alterazioni citogenetiche, la presenza di mutazioni genetiche, modificazioni epigenetiche e/o alterazioni di espressione genica può ugualmente alterare la funzione di un gene e contribuire alla patogenesi della malattia.

La conoscenza e l'identificazione, tramite differenti metodologie, del meccanismo fondamentale che sottende ad una particolare forma di popolazione cellulare neoplastica sono diventati di fondamentale importanza, in quanto permettono di caratterizzare selettivamente le cellule portatrici della lesione genetica. Per alcuni tipi di LAM e SMD mancano tuttora marcatori citogenetici o molecolari, mentre in altri casi, l'eterogeneità e la complessità delle interazioni molecolari alla base del meccanismo patogenetico ne limitano lo studio. Altre problematiche sono legate all'acquisizione di alterazioni genetiche addizionali.

I geni MECOM e PRDM16 sono localizzati rispettivamente nelle regioni cromosomiche 3q26 e 1p36; entrambi appartengono alla stessa famiglia genica e sono due fondamentali regolatori dell'emopoiesi, in quanto svolgono un ruolo chiave nel self-renewal, nella proliferazione e nel differenziamento delle cellule staminali. Il riarrangiamento dovuto a traslocazioni o inversioni che coinvolgono le regioni 3q26 e 1p36, ne determina l'espressione aberrante che svolge un ruolo importante nella patogenesi. Tuttavia, l'espressione aberrante di MECOM e PRDM16 non sembra essere sufficiente per indurre una completa trasformazione leucemica, come emerso da studi su modelli murini, suggerendo la necessità di alterazioni addizionali.

Per quanto riguarda MECOM sono state descritte diverse traslocazioni/inversioni con diversi cromosomi partners; l'alterazione più frequente è l'inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26). A livello molecolare, in seguito al riarrangiamento, si ha la giustapposizione di MECOM ad un enhancer distale di GATA2, localizzato in 3q21. Da un unico riarrangiamento hanno così origine due eventi importanti: l'overespressione di MECOM e l'aploinsufficienza di GATA2. La monosomia del cromosoma 7 è l'alterazione addizionale che più

frequentemente si associa ad alterazioni di MECOM; tuttavia non è stato ancora determinato se essa sia causa o conseguenza del coinvolgimento di MECOM e il meccanismo che sottende alla sua insorgenza. Riarrangiamenti di PRDM16 sono meno frequenti rispetto a quelli di MECOM; l'alterazione più ricorrente è la t(1;3)(p36;q21), ma sono state descritte ulteriori alterazioni più rare che coinvolgono PRDM16, spesso con gli stessi geni partner di MECOM. I dati in letteratura riguardanti le caratteristiche dei riarrangiamenti di PRDM16 sono però meno consistenti.

L'espressione aberrante di entrambi i geni è stata osservata anche in assenza di riarrangiamenti visibili in citogenetica convenzionale delle regioni cromosomiche coinvolte. Il meccanismo che ne determina l'overespressione in questi casi non è stato identificato. Per MECOM sono stati descritti alcuni riarrangiamenti criptici; inoltre, alterazioni delle regioni 3q26 e 1p36 possono essere critiche da valutare in citogenetica convenzionale a causa dell'eventuale limitata risoluzione del preparato o della presenza di riarrangiamenti complessi che ne mascherano il coinvolgimento (Fig.1). Recentemente, l'overespressione di PRDM16, nelle LAM pediatriche, è stata correlata a specifiche anomalie genetiche tra cui le mutazioni FLT3-ITD e il riarrangiamento criptico NUP98-NSD1. Inoltre è stato osservato che l'espressione di MECOM e PRDM16 è mutualmente esclusiva. Pochi studi hanno investigato la frequenza, il meccanismo patogenetico dell'espressione di PRDM16 e le correlazioni con altre alterazioni genetiche nella LAM dell'età adulta.

Il gene BCL11B è localizzato nella regione cromosomica 14q32 e codifica per un fattore di trascrizione fondamentale per il differenziamento e la sopravvivenza dei timociti. Riarrangiamenti di BCL11B con diversi geni partner sono stati descritti nelle leucemie acute linfoide e mieloidi come conseguenza di traslocazioni coinvolgenti la regione 14q32. Nelle LAM è stata osservata l'espressione aberrante di BCL11B e la co-espressione, all'analisi immunofenotipica, di marcatori linfoide T. Tuttavia le caratteristiche biologiche delle leucemie con alterazioni di BCL11B non sono ancora state ben delineate.

OBIETTIVO DEL PROGETTO

L'Istituto di Ematologia "Seràgnoli", presso il quale il progetto verrà condotto, dispone di laboratori dove sono già applicabili le metodiche necessarie: analisi di citogenetica, citogenetica molecolare e di biologia cellulare e molecolare.

L'obiettivo del presente progetto di ricerca è lo studio del ruolo dell'espressione aberrante di MECOM, PRDM16 e BCL11B nella trasformazione neoplastica attraverso la caratterizzazione funzionale, biologica e genetica di linee cellulari murine.

MATERIALI E METODI

Verranno utilizzate sia linee cellulari murine che, come riportato in letteratura, presentano alti livelli di espressione dei geni oggetto di studio (NFS-60, DA-1, DA-3), sia altre linee cellulari (WEHI-3B, C1498) che preliminarmente verranno caratterizzate per lo stato di espressione di tali geni, in quanto non disponibili dati in letteratura.

- Biologia cellulare

Le diverse linee cellulari verranno messe in coltura liquida mediante la stimolazione di appositi mezzi di coltura e testate per la loro capacità di proliferazione e di espansione. A diversi tempi, le cellule così ottenute verranno sottoposte a valutazione citologica e ad analisi fenotipica mediante citofluorometro. Inoltre, le linee cellulari descritte verranno coltivate in terreno semisolido, volto ad investigare la loro capacità di formare colonie. Al termine del periodo di colture, le linee verranno osservate al microscopio e le diverse colonie verranno enumerate e caratterizzate.

- Analisi citogenetica

L'analisi citogenetica sarà eseguita su linee cellulari dopo colture cellulari a breve termine (24 e/o 48 ore). Le cellule saranno incubate con colchicina e trattate successivamente con soluzione ipotonica. Il pellet cellulare sarà fissato con una soluzione di metanolo e acido acetico (3:1) e sottoposto a tre lavaggi in fissativo; infine sarà risospeso in fissativo e saranno allestiti i vetrini. Dopo 'invecchiamento' in termostato a 60°, i vetrini saranno colorati mediante bandeggio GAW. Saranno analizzate almeno 20 metafasi, con l'ausilio di un sistema di analisi di immagini Genikon (Nikon Instruments) collegato a microscopio ottico.

- Analisi citogenetico-molecolare (FISH)

Sugli stessi campioni, conservati a -20°C, verranno applicate metodiche di FISH su interfase e su metafase. Per tali analisi saranno utilizzate sonde a DNA marcate con fluoresceina, rodamina e/o aqua specifiche per le sequenze genomiche in esame. Per analizzare i loci genici di nostro interesse verranno utilizzati differenti mix di sonde a DNA. I vetrini saranno contro-colorati con DAPI e analizzati in fluorescenza con un set di filtri FITC/TRITC/AQUA/DAPI (Nikon Instruments, Tokyo, Japan) e con sistema di analizzatore di immagini Genikon (Nikon Instruments). Saranno analizzate almeno 200 cellule per ogni campione.

- Real Time PCR quantitativa

Sui campioni saranno anche effettuate analisi di espressione genica. RNA totale sarà estratto da campioni di cellule mononucleate utilizzando il kit Allprep DNA/RNA (Qiagen). La quantificazione relativa dei trascritti sarà effettuata mediante Real time PCR

quantitativa (RQ-PCR) usando il metodo $\Delta\Delta Ct$. L'analisi sarà eseguita utilizzando il sistema ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystem) con differenti assays di espressione genica che utilizzano sonde e primers specifici per le sequenze in esame. Per comparare i valori di Ct sarà utilizzato come calibratore l'“Universal Mouse Reference RNA” (Stratagene) e la normalizzazione dell'espressione sarà eseguita utilizzando il gene GAPDH come gene di controllo endogeno.

RISULTATI ATTESI

Dato l'alto rischio delle alterazioni genetiche sopra descritte, le informazioni raccolte dalle suddette analisi potranno portare alla caratterizzazione dei meccanismi patogenetici coinvolti e ad identificare nuovi marcatori, che potranno essere il bersaglio di molecole inibitorie. Questi risultati preliminari ottenuti in vitro potranno traslarsi successivamente in studi in vivo.

BIBLIOGRAFIA:

1. Cardona ME, Simonson OE, Oprea II, Moreno PM, Silva-Lara MF, Mohamed AJ, Christensson B, Gahrton G, Dilber MS, Smith CI, Arteaga HJ. *A murine model of acute myeloid leukemia with Evi1 overexpression and autocrine stimulation by an intracellular form of GM-CSF in DA-3 cells*. *Leuk Lymphoma*. 2016;57(1):183-92. doi: 10.3109/10428194.2015.1043547.
2. Glass C, Wuertzer C, Cui X, Bi Y, Davuluri R, Xiao YY, Wilson M, Owens K, Zhang Y, Perkins A. *Global Identification of EVI1 Target Genes in Acute Myeloid Leukemia*. *PLoS One*. 2013 Jun 27;8(6):e67134.
3. Shiba N, Ohki K, Kobayashi T, Hara Y, Yamato G, Tanoshima R, Ichikawa H, Tomizawa D, Park MJ, Shimada A, Sotomatsu M, Arakawa H, Horibe K, Adachi S, Taga T, Tawa A, Hayashi Y. *High PRDM16 expression identifies a prognostic subgroup of pediatric acute myeloid leukaemia correlated to FLT3-ITD, KMT2A-PTD, and NUP98-NSD1: the results of the Japanese Paediatric Leukaemia/Lymphoma Study Group AML-05 trial*. *Br J Haematol*. 2016 Feb;172(4):581-91. doi: 10.1111/bjh.13869. Epub 2015 Dec 18.
4. Baldazzi C, Luatti S, Zuffa E, Papayannidis C, Ottaviani E, Marzocchi G, Ameli G, Bardi MA, Bonaldi L, Paolini R, Gurrieri C, Rigolin GM, Cuneo A, Martinelli G, Cavo M, Testoni N. *Complex chromosomal rearrangements leading to MECOM overexpression are recurrent in myeloid malignancies with various 3q abnormalities*. *Genes Chromosomes Cancer*. 2016 Apr;55(4):375-88. doi: 10.1002/gcc.22341. Epub 2016 Jan 27.
5. Duhoux FP, Ameye G, Montano-Almendras CP, Bahloula K, Mozziconacci MJ, Laibe S, Wlodarska I, Michaux L, Talmant P, Richebourg S, Lippert E, Speleman F, Herens C, Struski S, Raynaud S, Auger N, Nadal N, Rack K, Mugneret F, Tigaud I, Lafage M, Taviaux S, Roche-Lestienne C, Latinne D, Libouton JM, Demoulin JB, Poirel HA; Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique (GFCH); Belgian Cytogenetic Group for Haematology and Oncology (BCG-HO). *PRDM16 (1p36) translocations define a distinct entity of myeloid malignancies with poor prognosis but may also occur in lymphoid malignancies*. *Br J Haematol*. 2012 Jan;156(1):76-88.
6. Gröschel S, Sanders MA, Hoogenboezem R, de Wit E, Bouwman BA, Erpelinck C, van der Velden VH, Havermans M, Avellino R, van Lom K, Rombouts EJ, van Duin M, Döhner K, Beverloo HB, Bradner JE, Döhner H, Löwenberg B, Valk PJ, Bindels EM, de Laat W, Delwel R. *A single oncogenic enhancer rearrangement causes concomitant EVI1 and GATA2 deregulation in leukemia*. *Cell*. 2014 Apr 10;157(2):369-81.
7. Haferlach C, Bacher U, Grossmann V, Schindela S, Zenger M, Kohlmann A, Kern W, Haferlach T, Schnittger S. *Three novel cytogenetically cryptic EVI1 rearrangements associated with increased EVI1 expression and poor prognosis identified in 27 acute myeloid leukemia cases*. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012 Dec;51(12):1079-85.

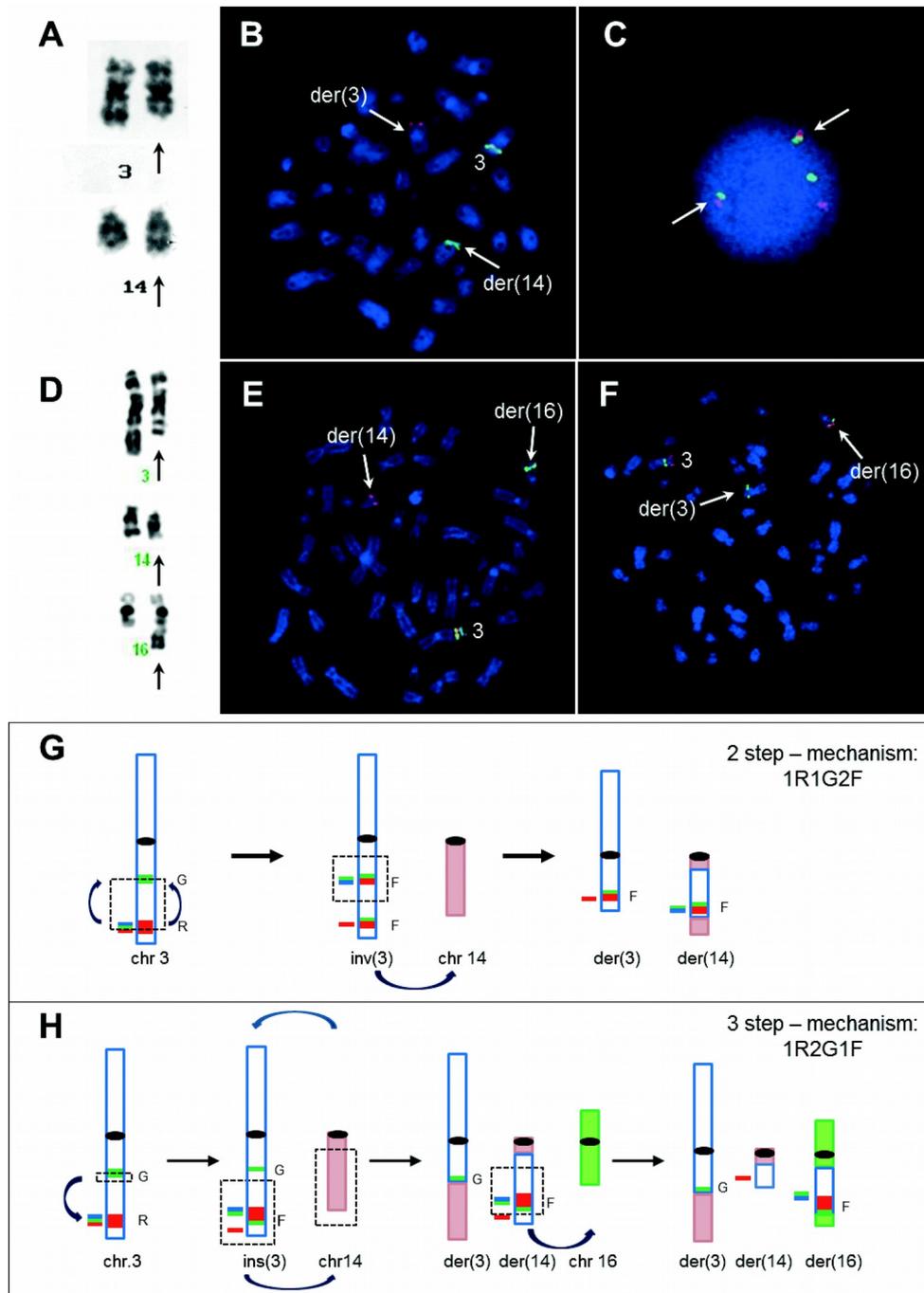


Fig.1 – Alterazioni del cromosoma 3 a livello della banda q26(locus del gene MECOM): A) e D) cariotipi parziali; B)-F) analisi di FISH in interfase e in metaphase; G) e H) diagrammi di ipotesi di riarrangiamento genetico