

Messa a punto di un innovativo modello murino umanizzato per lo studio di fattori prognostici molecolari e di meccanismi di immunoevasione nella leucemia mieloide acuta: relazione finale

Background e scopo del progetto di ricerca

Sebbene gli studi attuali abbiano permesso di descrivere le mutazioni più frequenti nelle leucemie mieloidi acute (acute myeloid leukemia, AML), la conoscenza dei meccanismi biologici che permettono alle cellule leucemiche di crescere eludendo il controllo del sistema immunitario e di resistere ai diversi approcci terapeutici rimane tuttavia parziale. Ciò è dovuto alla difficoltà di eseguire studi che permettano di definire l'impatto delle lesioni genetiche sui meccanismi biologici delle cellule leucemiche e di correlare i processi deregolati con la prognosi della patologia. In aggiunta, la grande variabilità inter-paziente spesso limita l'elucidazione di meccanismi condivisi da molteplici patologie leucemiche. Gli studi funzionali sono spesso limitati dall'incapacità di mantenere o crescere in vitro cellule leucemiche primarie, nonché dall'impossibilità di ricostituire artificialmente il microambiente tumorale. D'altro canto, la trasferibilità nella pratica clinica delle informazioni ottenute da modelli di leucemia murina è fortemente limitata dalle evidenti barriere di specie.

Con lo scopo di superare queste limitazioni, questo progetto di ricerca si è rivolto allo sviluppo di un innovativo modello murino umanizzato per (i) studiare fattori prognostici molecolari e (ii) caratterizzare i meccanismi di immunoevasione nella leucemia mieloide acuta. Tale modello si propone di coniugare la riproducibilità e il potere analitico dei modelli animali con l'alta informatività derivante dall'analisi delle leucemie primarie umane.

Tabella 1. Caratteristiche delle leucemie testate.

# AML testate	51
Cellule infuse (x10 ⁶)	9.5
Deplezione linfociti T	86.3% (44)
origine	Midollo: 62.7% (32) Sangue periferico 37.3%(19)
Campione fresco	13.7% (7)
Stato della malattia	Diagnosi: 72.5% (38) Post-chemioterapia: 25.5% (12) Altri: 2% (1)

Risultati

Identificazione di fattori prognostici della leucemia acuta

Cinquantuno leucemie primarie umane (Tabella 1) sono state infuse in topi immunodeficienti NSG (NOD SCID gamma

chain^{null}) di 4-8 settimane non irradiati. I linfociti T contenuti nei campioni primari sono stati depletati con biglie magnetiche per evitare il loro attecchimento e la conseguente reattività contro i tessuti murini. Dopo l'infusione, la comparsa di cellule leucemiche sul sangue periferico è stata quantificata settimanalmente in modo tale da monitorare l'attecchimento. Venticinque delle 51 AML (49%) hanno generato degli xenotrapianti e sono cresciute nei topi (Fig. 1A): ciò ha permesso di espandere di circa 5 volte le cellule leucemiche primarie (Fig. 1B), fattore necessario per la loro caratterizzazione e per il loro impiego nei successivi esperimenti. In particolare la cinetica di attecchimento si è rivelata riproducibile tra i replicati biologici costituiti

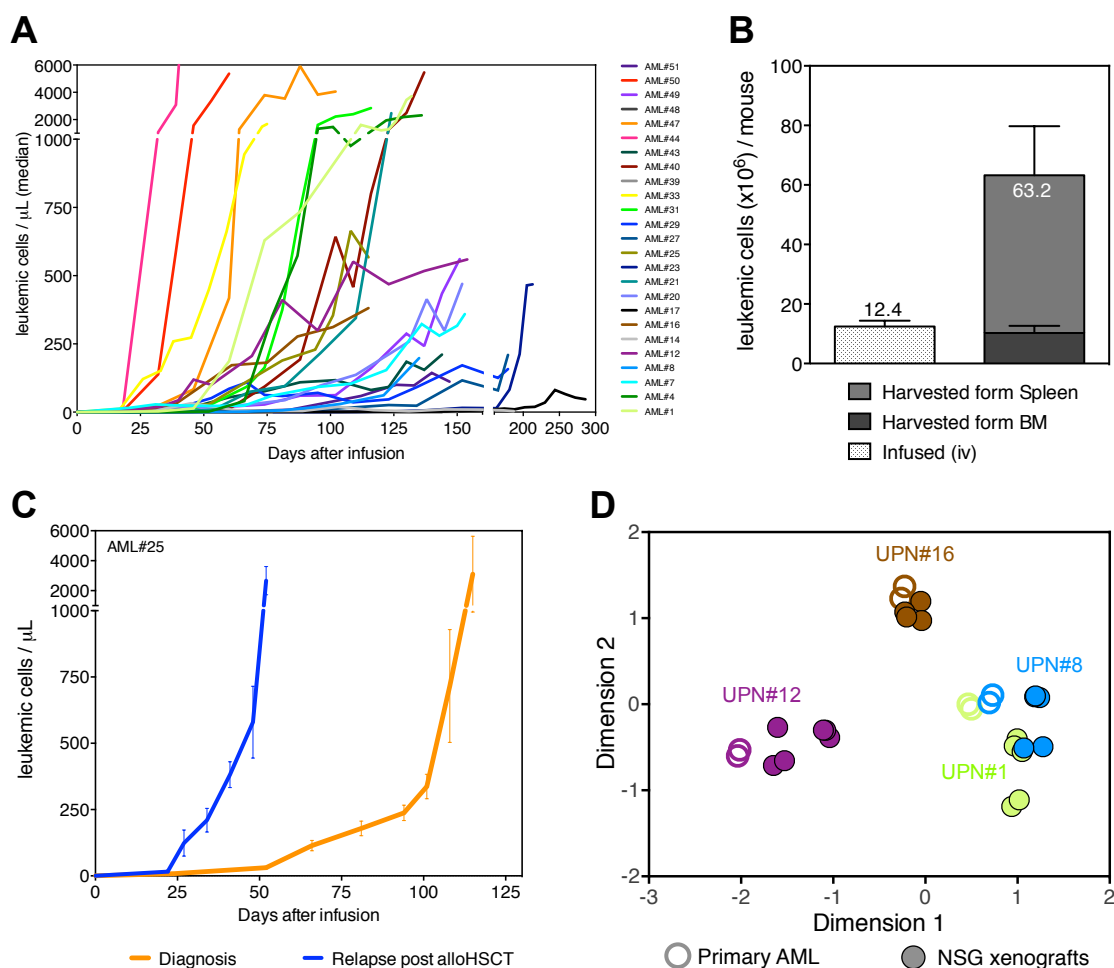


Figura 1. Caratterizzazione dell'attecchimento delle leucemie nei topi NSG. (A) Cinetica di crescita delle cellule leucemiche misurata su sangue periferico di topi NSG. Ogni colore indica una leucemia primaria differente testata in diversi topi (n da 1 a 15). Ogni leucemia mostra un profilo di crescita paziente specifico. (B) Quantità di cellule leucemiche purificate infuse per ciascun topo (grigio chiaro) e ricavate dalla milza e dal midollo osseo dei topi al sacrificio (grigio scuro). Le barre mostrano i risultati per le 25 leucemie che hanno attecchito nei topi. L'attecchimento nei topi permette l'espansione delle cellule leucemiche. (C) Cinetica di crescita su sangue periferico delle cellule leucemiche di uno stesso paziente prelevate in due timepoint differenti del suo decorso clinico (giallo=diagnosi, blu=recidiva post trapianto allogenico). La capacità di attecchire in topi viene mantenuta in maniera indipendente dallo stadio della malattia. (D) Analisi del profilo di espressione genica di 4 leucemia alla diagnosi (cerchi vuoti) e dopo attecchimento in topi NSG (cerchi pieni). Mentre leucemie appartenenti a pazienti diversi sono molto eterogene, i campioni derivati dai topi si dispongono vicini alle rispettive leucemie di origine, dimostrando come il loro trascrittoma sia simile alle leucemie primarie parentali.

da diversi topi NSG; inoltre la capacità di generare xenotrapianti è risultata caratteristica di ogni AML e paziente-specifica, dal momento che tale proprietà si è mantenuta costante quanto sono stati testati differenti campioni provenienti da stadi di malattia diversi dello stesso paziente (Fig. 1C). L'analisi del trascrittoma tramite microarray ha permesso di evidenziare come il profilo di espressione sia caratteristico di ciascun paziente, ma anche come tale profilo sia riproducibile negli animali (Fig. 1D). In casi selezionati (n=6), le cellule leucemiche attecchite sono state reinfuse in altri topi riceventi, in modo tale da realizzare trapianti seriali, e il loro profilo di espressione genica è stato analizzato tramite microarray. In particolare abbiamo osservato che leucemie fortemente adattate all'ambiente murino mostrano una cinetica di crescita più aggressiva (Fig. 2A). Tale comportamento correla con una perturbazione dell'espressione genica e con l'acquisizione di un profilo specifico caratterizzato dalla prevalente deregolazione

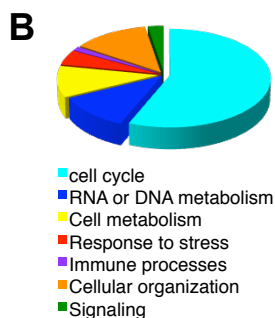
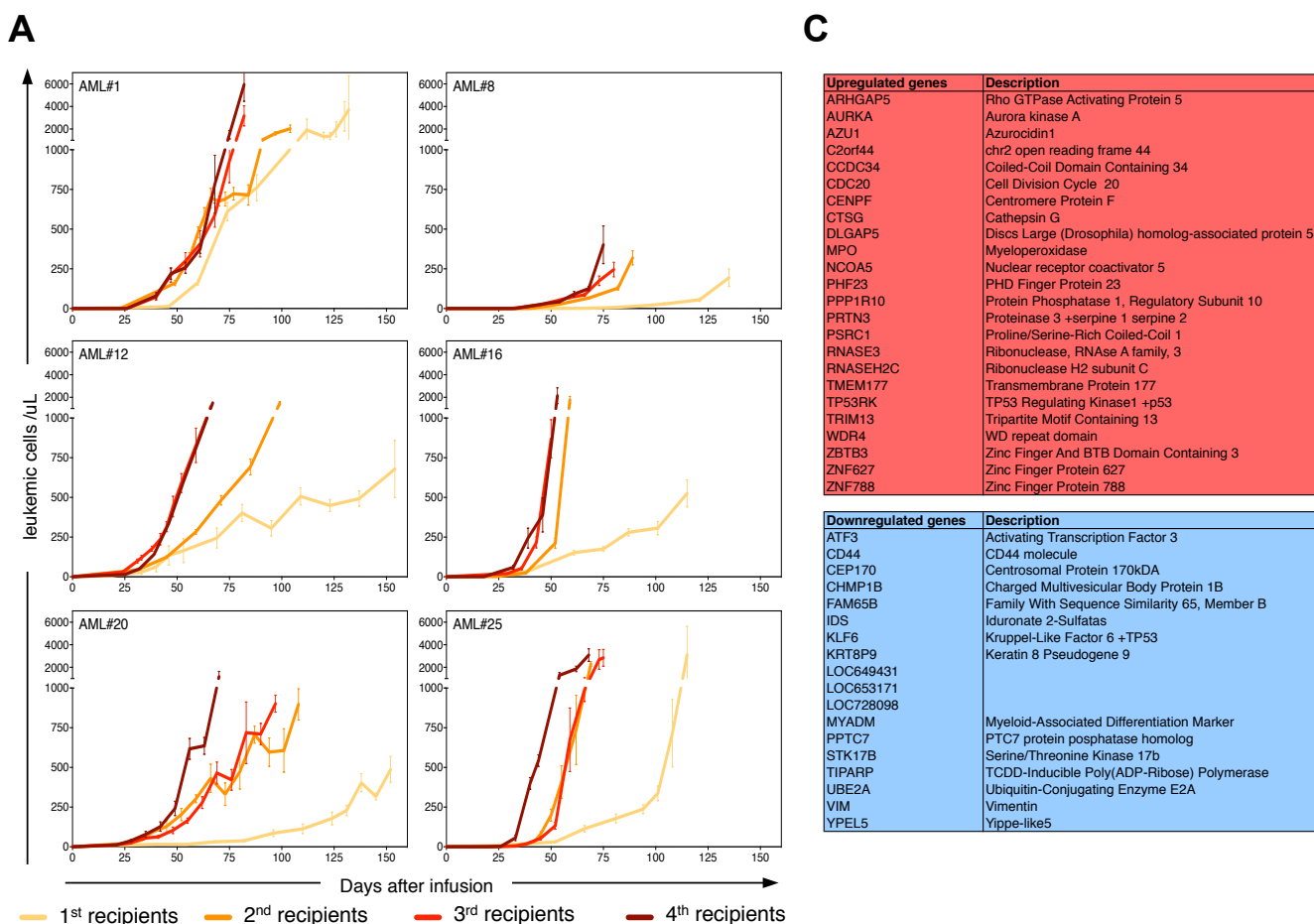


Figura 2. Trapianti seriali delle leucemie attecchite nei topi NSG e identificazione dei geni associati ad una maggiore aggressività in vivo . (A) Cinetica di crescita delle cellule leucemiche misurata su sangue periferico di topi NSG in seguito a trapianti seriali. Con l'aumentare dei trapianti seriali, la stessa leucemia mostra una cinetica di crescita più aggressiva. **(B)** Classificazione dei processi deregolati da ciascuna leucemia in seguito all'attecchimento nel topo. La maggiore parte dei geni deregolati appartiene alla regolazione del ciclo cellulare e al metabolismo degli acidi nucleici ad esso collegato. **(C)** Geni deregolati stabilmente da tutte le leucemie in seguito a trapianto seriale in topi NSG. Sono elencati 24 geni upregolati (rosso) e 18 geni downregolati (blu).

di processi coinvolti nella proliferazione cellulare (Fig. 2B). Sono stati identificati 42 geni deregolati da tutte le leucemie in seguito ad attecchimento nel topo e correlati con un aumento dell'aggressività delle AML nel nostro modello (Fig. 2C). Tra questi spiccano geni legati alla mitosi cellulare (AURKA, CDC20), alla riorganizzazione della cromatina (CENPF, CEP170) e al differenziamento mieloide (come AZU1, MPO, MYADM, CTSG), la cui deregolazione è stata spesso associata ad una maggiore aggressività delle cellule tumorali (Zhang et al, Clin Cancer Res 2013; Jin, Oncogene 2013 et al.; Katayama et al., Cancer Cell 2012). Il nostro modello fornisce quindi un contesto idoneo per lo studio di tali geni nell'ambito della leucemia mieloide acuta.

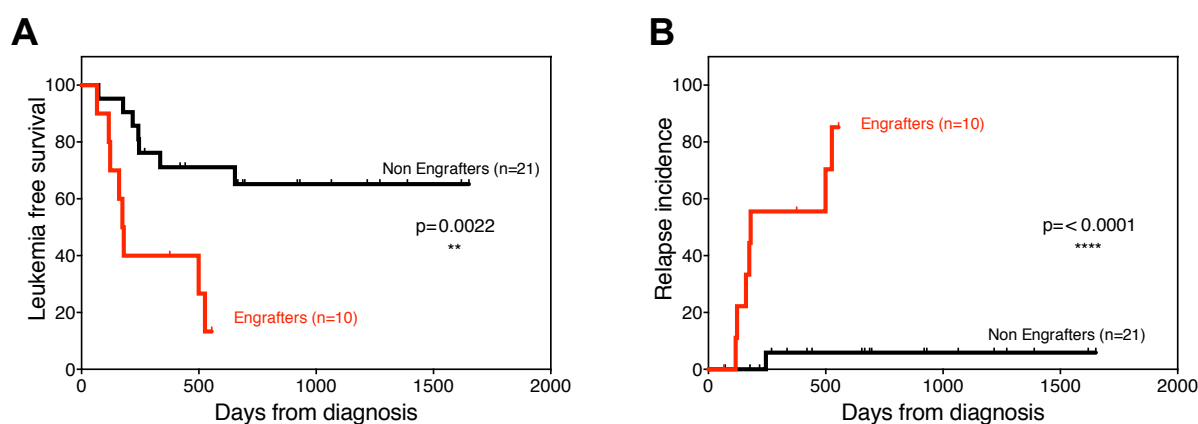
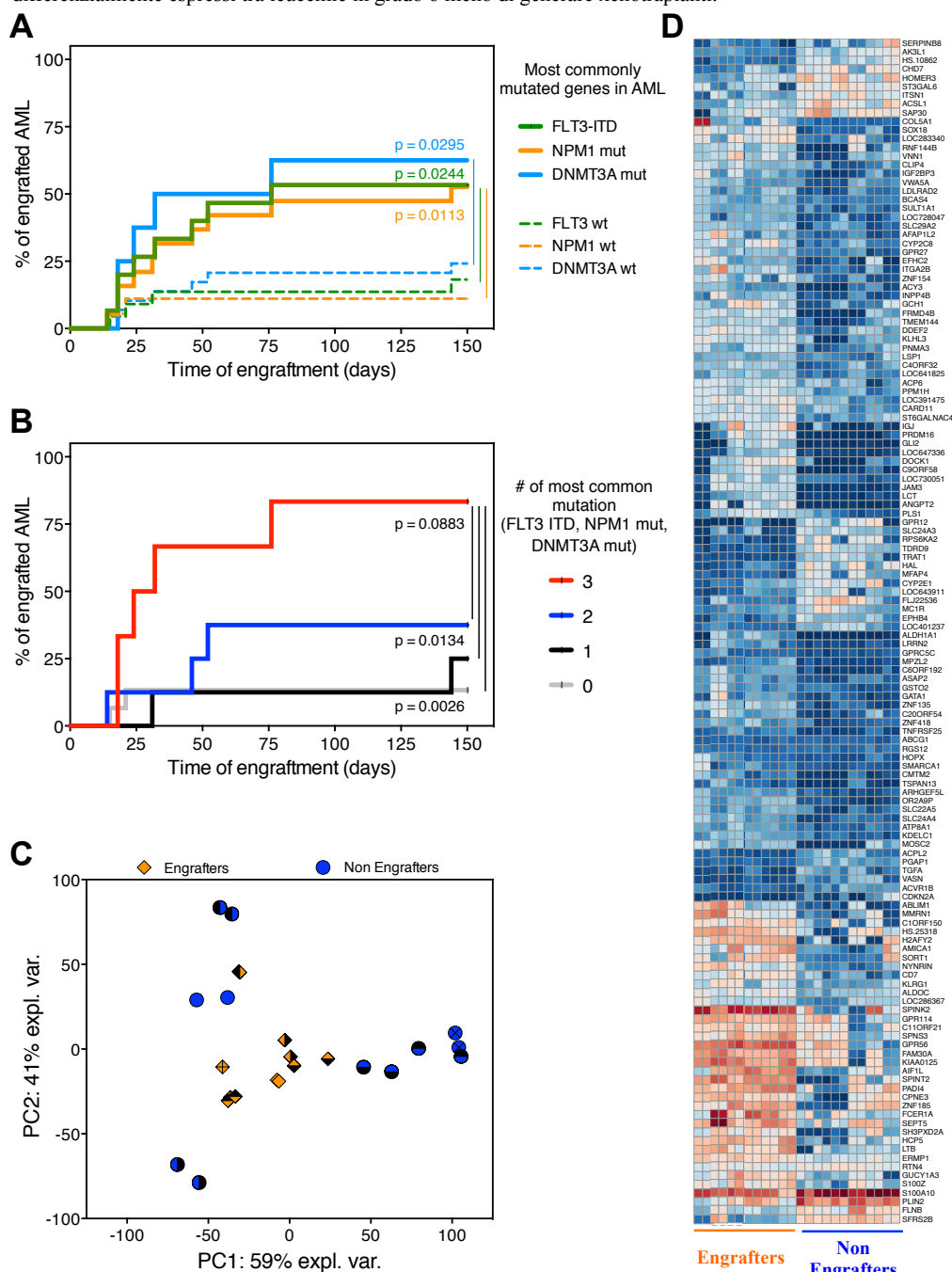


Figura 3. L'attecchimento delle AML in topi NSG come fattore prognostico sfavorevole. Le curve di Kaplan-Meier riportate mostrano la sopravvivenza libera da malattia (A) e l'incidenza di recidiva (B) nei pazienti le cui leucemie acute hanno originato xenotrapianti in topi NSG (rosso, n=10) o in quelli le cui AML non hanno attecchito nel topo (nero, n=21). Entrambe le curve prendono in considerazione i soli pazienti le cui leucemie sono state testate alla diagnosi (Tabella 1). Questi dati dimostrano come l'attecchimento nei topi immunodeficienti permette di identificare pazienti con una prognosi negativa.

Nell'ambito delle leucemie mieloidi acute, l'attecchimento in topi immunocompromessi risulta essere maggiore per patologie ad alto rischio con una prognosi sfavorevole (Pearce et al, Blood 2006). Nella nostra casistica l'attecchimento delle leucemie primarie in topi NSG è strettamente associato alla ricaduta di malattia dopo terapia (Fig. 3A-B). In particolare in analisi statistica univariata e multivariata, la capacità di generare degli xenotrapianti si è dimostrata una proprietà fortemente correlata con la recidiva di malattia ($p=0,002$), indicando come lo studio dei fattori in grado di influire su tale attecchimento sia di grande rilevanza per predire la risposta alle terapie. Sono stati perciò correlate diverse proprietà cliniche e molecolari delle AML testate con la loro capacità di attecchire negli animali. I risultati ottenuti hanno evidenziato come l'assetto mutazionale delle leucemie sia fortemente associato all'attecchimento: mentre la presenza di un cariotipo aberrante non risulta correlata con la capacità di generare degli xenotrapianti, la presenza delle tre mutazioni più frequenti nell'ambito della leucemia acuta (mutazione

puntiforme del gene DNMT3A, mutazione puntiforme del gene NPM1 e duplicazione tandem interna del gene FLT3) è significativamente associata all'attecchimento in topi NSG (Fig. 4A). Inoltre la co-occorrenza di queste tre mutazioni ha un notevole impatto sul tasso di attecchimento (Fig. 4B). Questi dati dimostrano come il carico mutazionale delle leucemie (ed in particolare le mutazioni dei geni DNMT3A, NPM1 e FLT3) influenzi la capacità delle cellule leucemiche di generare degli xenotrapianti in topi immunodeficienti e permetta di identificare AML ad alto rischio prognostico.

Figura 4. Associazione tra il profilo mutazionale e trascrizionale delle leucemia e l'attecchimento in topi immunodeficienti. (A-B) Curve Kaplan-Meier relative al tasso di attecchimento delle leucemie testate alla diagnosi in relazione al tipo (A) o al numero (B) delle mutazioni più ricorrenti nelle AML. I risultati dimostrano che la copresenza delle tre mutazioni si associa a un maggior tasso di attecchimento. (C) Analisi della varianza dell'espressione genica delle leucemie primarie capaci di generare xenotrapianti (arancione) o leucemie che non attecchiscono nei topi (blu). I simboli uguali identificano dei replicati tecnici di uno stesso campione, mentre simboli diversi rappresentano campioni appartenenti a pazienti diversi. Le leucemie in grado di attecchire nel topo mostrano un profilo di espressione genica più omogeneo. (D) Heatmap rappresentante il set di 136 geni differenzialmente espressi tra leucemie in grado o meno di generare xenotrapianti.



Infine, con lo scopo di identificare le peculiarità del trascrittoma delle leucemie più aggressive ed in grado di attecchire nei topi, il profilo di espressione genica delle AML primarie in grado di generare degli xenotrapianti è stato confrontato con quello di leucemie che sono prive di tale proprietà. L'analisi della varianza dell'espressione genica ha permesso di visualizzare che, sebbene le leucemie provenienti da pazienti diversi siano molto eterogenee, le AML in grado di attecchire nei topi risultano più simili tra loro di quanto siano le altre leucemie (Fig. 4C). Dal confronto dei due gruppi sperimentali è stato possibile identificare un set di 136 geni espressi in maniera differenziale dalle leucemie in grado di generare xenotrapianti e che permetta quindi di identificare le leucemie con una prognosi sfavorevole (Fig. 4D).

Messa a punto di un modello di pressione immunologica in vivo

La disponibilità di leucemie umane in grado di attecchire in topo immunodeficienti ha permesso di studiare direttamente in vivo l'efficacia della pressione immunologica nel controllo delle cellule tumorali e i cambiamenti messi in atto dalle leucemie mieloidi acute nell'interazione col sistema immunitario umano. A tal scopo abbiamo messo a punto un modello che ricapitoli una pressione immune nei confronti delle cellule leucemiche: una volta attecchite in topi NSG, le cellule leucemiche sono state sottoposte in vivo ad una pressione immunologica costituita da infusioni seriali di linfociti T umani. In particolare, per mimare una diversa intensità della pressione immune, sono stati utilizzati linfociti T provenienti da diversi donatori e dotati di un differente grado di compatibilità nei confronti delle leucemie (linfociti T autologhi, HLA-identici, HLA compatibili da donatore da registro, aploidentici o completamente scorrelati), in modo tale da ottenere un diverso grado di allo-reattività. Per ottenere numeri sufficienti per il trattamento di diversi topi, le cellule T dei differenti donatori sono state attivate con biglie antiCD3/CD28 ed espanse in presenza di IL-7 e IL-15, in modo tale da preservarne la policlonalità e le potenzialità effettrici (Kaneko, Blood 2009). Un gruppo di controllo ha ricevuto la sola leucemia, in assenza di trattamento linfocitario. I risultati ottenuti su 4 leucemie differenti mostrano che in nessuno dei casi analizzati le cellule autologhe sono state in grado di controllare la crescita delle cellule leucemiche (Fig. 5, linee verdi). A seconda della leucemia testata, l'utilizzo di linfociti T HLA-identiche ha consentito di ottenere un controllo della malattia parziale o duraturo (Fig. 5, linee blu). Al contrario un completo arresto della crescita delle cellule leucemiche è stato raggiunto con l'infusione di linfociti T con una singola incompatibilità dell'HLA di classe seconda (Fig. 5, linee viola). Infine l'utilizzo di linfociti T completamente o parzialmente scorrelati (Fig. 5, linee rosa e rosse) ha comportato la completa scomparsa delle cellule leucemiche circolanti nel

sangue periferico degli animali trattati. Tale modello dimostra come il riconoscimento alloreattivo mediato dai linfociti T rappresenta una delle maggiori forze che determinano un effetto antileucemico delle terapie cellulari che utilizzano linfociti da donatore.

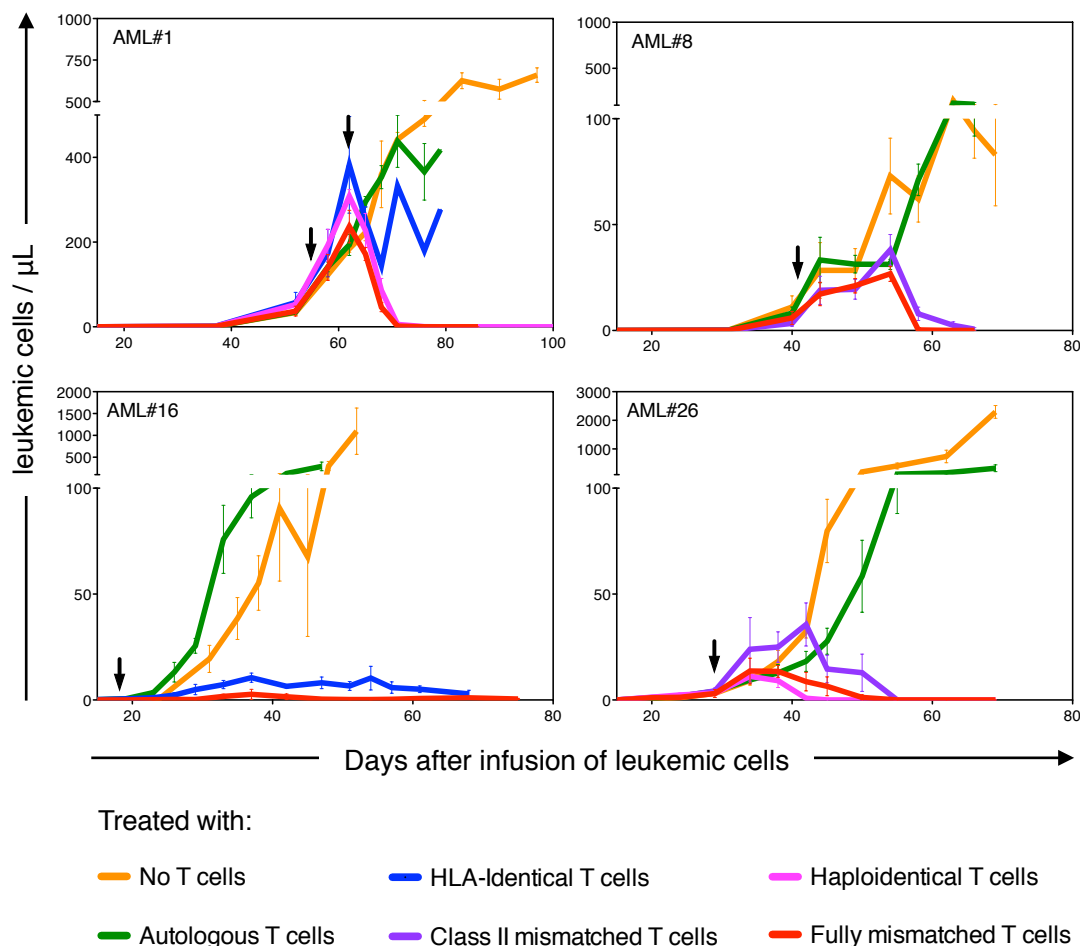


Figura 5. Pressione immunologica mediata in vivo dai linfociti T sulle cellule leucemiche attecchite nei topi NSG. I grafici mostrano le conte delle cellule leucemiche misurate sul sangue periferico di topi immunodeficienti in cui è stata fatta attecchire una specifica AML. Una volta stabilita la presenza della leucemia in vivo, i topi hanno ricevuto una o più infusioni di 5×10^6 linfociti T (freccia nera) provenienti da differenti donatori con un diverso grado di disparità genetica nei confronti della malattia. In particolare i differenti gruppi sperimentali ($n > 4$) hanno ricevuto una pressione immunologica costituita da: linfociti T autologhi (verde), linfociti T HLA-identici (blu), linfociti T da donatore da registro con una disparità in uno degli HLA di classe II (viola), linfociti aploidentici (rosa) e linfociti completamente scorrelati (rosso). Per ciascuna delle 4 leucemie testate, un gruppo ha ricevuto la sola leucemia, senza trattamento linfocitario (giallo). I dati mostrano l'attività antileucemica della pressione immune somministrata nei confronti della leucemia: mentre i linfociti T autologhi risultano inefficaci e i linfociti T HLA-identici lo sono solo parzialmente, una singola disparità dei geni HLA è sufficiente a determinare l'eradicazione delle cellule leucemiche dal sangue dei topi, dimostrando come in tale modello l'alloreattività sia la sorgente principale dell'azione antileucemica.

Nonostante l'efficacia dei linfociti T allogenici nel controllare la crescita della malattia, le cellule leucemiche sono in grado di eludere dal controllo del sistema immunitario, come dimostrato clinicamente dalla recidiva di malattia in seguito a trapianto di cellule staminali da

donatore allogenico. Nel nostro modello abbiamo rilevato due casi sperimentali che indicano come le cellule leucemiche siano in grado di persistere anche in presenza della pressione immune mediata dai linfociti T. In un primo caso, il trattamento con linfociti T HLA-identici si è

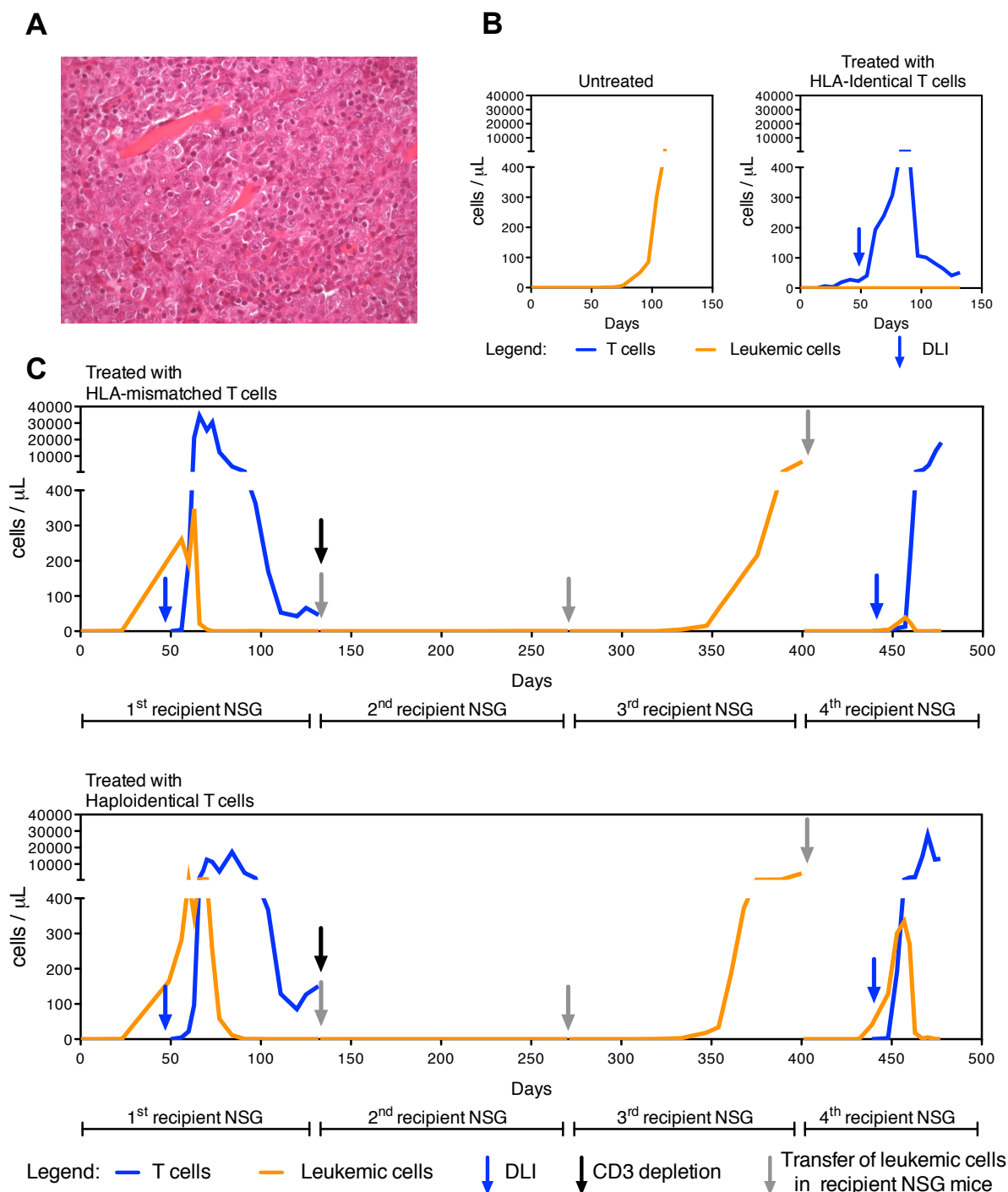


Figura 6. Casi sperimentali di persistenza di malattia in presenza di pressione immunologica mediata dai linfociti T. (A) Immagine istologica raffigurante la colorazione con ematossilina ed eosina del sarcoma extramidollare rilevato in un topo trattato con cellule HLA-identiche. La sezione mostra le cellule leucemiche e l'infiltrato linfocitario umano nelle fibre muscolare murino. (B) Conte cellulari della leucemia (giallo) e dei linfociti T HLA-identici (blu) circolanti nel sangue periferico di topi che hanno ricevuto le cellule leucemiche provenienti dal sarcoma extramidollare in presenza (destra) o in assenza (sinistra) dell'infusione dei linfociti (freccia blu). (C) Conte cellulari misurate su sangue periferico di topi in cui l'AML#1 (giallo) e trattati con linfociti (blu) provenienti da donatore completamente scorrelato (pannello in alto) o donatore aploidentico (pannello in basso). Le frecce blu indicano le infusioni linfocitarie. Al Sacrificio (freccie grigie), i linfociti sono stati rimossi dalla milza e dal midollo osseo degli animali sacrificati (freccie nere) e le cellule rimanenti sono state reinfuse in altri topi riceventi. I dati rimostrano la ricrescita delle cellule leucemiche dopo la rimozione della pressione immune. Le stesse cellule si dimostrano nuovamente sensibili alle infusioni di linfociti T.

dimostrato efficace nel controllare la crescita delle cellule leucemiche; in uno degli animali trattati, tale efficacia è stata però accompagnata dallo sviluppo di un sarcoma extramidollare costituito da cellule leucemiche umane e da un infiltrato linfocitario umano all'intermo nel tessuto muscolare murino (Fig. 6A). Per verificare se ciò fosse il risultato di un evento di immunoevasione della AML#16 nei confronti della pressione immune, le cellule leucemiche del sarcoma sono state purificate e infuse in topi riceventi secondari (Fig. 6B). Tali cellule sono state in grado di ricrescere in assenza di trattamento, ma si sono dimostrate nuovamente sensibili all'infusione degli stessi linfociti T HLA-identici. In un secondo caso abbiamo dimostrato la persistenza di malattia anche in presenza di una pressione immunologica altamente allo-reattiva: in topi con AML#1 e trattati con linfociti T parzialmente o completamente scorrelati, la presenza di cellule leucemiche residue è stata vagliata rimuovendo i linfociti T dal midollo e dalla milza degli animali sacrificati e trapiantando in modo seriale le cellule rimanenti. In modo del tutto inaspettato, abbiamo osservato che alcune rare cellule leucemiche sono sopravvissute al trattamento, sono state trasferite nei topi secondari e sono ricresciute in seguito a trapianti seriali (Fig. 6C). Una volta riapplicata la pressione immune, tali cellule si sono nuovamente dimostrate sensibili al trattamento linfocitario e sono state eradicate dal sangue periferico. Tali osservazioni suggeriscono che alcune cellule leucemiche possono persistere nel nostro modello sotto il controllo dei linfociti T, e sono in grado di riemergere in seguito alla rimozione della pressione immune.

Infine, per determinare come la pressione immunologica mediata dai linfociti T influenzi il profilo di espressione delle cellule leucemiche, abbiamo effettuato un'analisi del trascrittoma delle cellule leucemiche persistenti dopo trattamento. Per questo motivo, le cellule dell'AML#1 sono state purificate dalla milza e dal midollo di topi trattati con linfociti T autologhi o HLA-identici e sono state confrontate tramite microarray con cellule leucemiche isolate da topi non trattati. Data la completa eradicazione, tale studio non è stata effettuata per i topi trattati con linfociti T scorrelati. L'analisi della varianza dell'espressione genica ha dimostrato che il trattamento con linfociti T determina una perturbazione del profilo trascrizionale della AML presa in considerazione (Fig. 7A). Sono stati identificati 2383 geni comunemente deregolati in seguito a trattamento con linfociti T autologhi e HLA-identici. Interrogando le liste annotate di Gene Ontology (GO) e Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) sono stati identificati i processi maggiormente influenzati dalla pressione immune. La maggior parte di questi è costituita da processi immuni (Fig. 7B): i geni maggiormente deregolati risultano essere correlati alla risposta agli interferoni, come molte subunità del proteasoma e dell'immunoproteasoma (PSMD1, PSMB8, PSME2, IP11s regulator, 26S proteasome, 20S core, HSP90), o annoverano molecole

e recettori coinvolti nel processamento e nella presentazione antigenica, come molte molecole classiche e non dell'HLA di classe I e II (HLA-DMA, HLA-DRA, CD74, B2M, TAP1, TAP2, HLA class I). Inoltre la deregolazione dei geni dell'HLA di classe seconda (HLA-DP e HLA-DR) è stata validata in vivo, monitorando l'upregolazione della loro espressione sulle cellule leucemiche in seguito a trattamento con linfociti T (Fig. 7C). In particolare tali esperimenti mostrano come l'upregolazione di queste molecole sia concomitante alla pressione immunologica. Queste osservazioni mostrano come in seguito all'interazione coi linfociti T infusi, le cellule leucemiche vadano incontro ad una perturbazione specifica del loro profilo di espressione genica deregolando processi implicati nel riconoscimento immune.

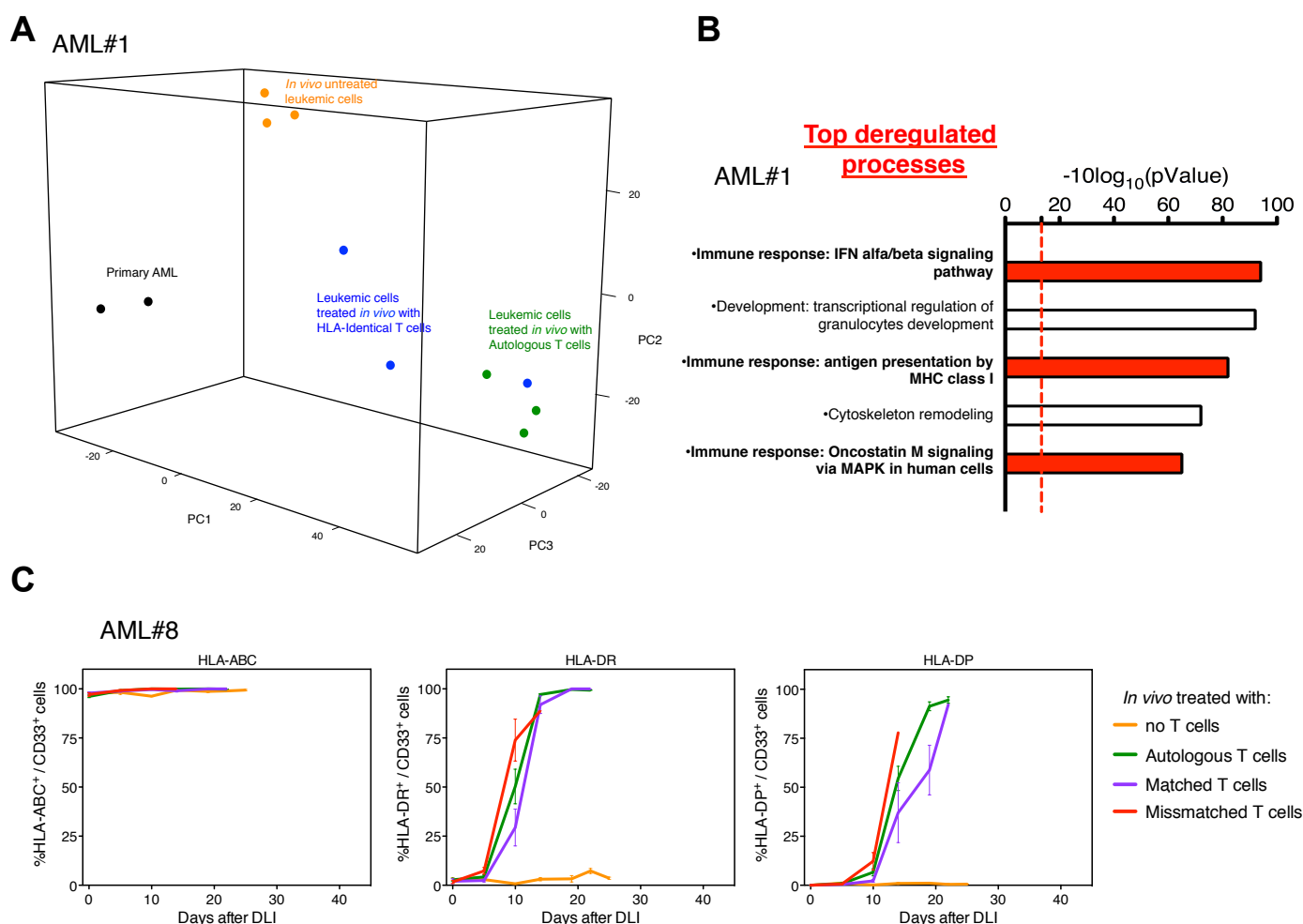


Figura 7. Profilo di espressione genica delle leucemie sottoposte in vivo alla pressione immune mediata dai linfociti T. (A) Analisi della varianza genica del trascrittoma della leucemia primaria AML#1 (nero) e delle cellule purificate dopo l'attecchimento nei topi in assenza della pressione immune (giallo) o in presenza della pressione immune mediata da linfociti T autologhi (verde) o HLA-identici (blu). La pressione immunologica infusa in vivo determina una perturbazione del profilo di espressione genica. (B) Analisi dei processi deregolati in seguito all'infusione dei linfociti T. Il profilo di espressione genica di cellule leucemiche trattate in vivo con pressione immune autologa o HLA-identica è stato confrontato con quello di cellule leucemiche purificate da topi non trattati. I cinque processi maggiormente deregolati nei topi trattati sono mostrati nel grafico. Tali processi deregolati sono prevalentemente implicati nel riconoscimento immunologico (evidenziati in rosso). (C) Andamento dell'espressione dell'HLA di classe prima (HLA-ABC) e di classe seconda (HLA-DR e HLA-DP) rilevata sulle cellule leucemiche attecchite in topi non trattati (giallo) o trattati con linfociti T provenienti da donatore autologo (verde), da donatore non familiare compatibile (viola) o da donatore scorrelato (rosso). I dati mostrano una upregolazione delle molecole di HLA di classe II sulla superficie delle cellule leucemiche in seguito all'infusione di linfociti (giorno 0).

Conclusioni e prospettive future

Nel corso del progetto abbiamo sviluppato e messo a punto un modello murino umanizzato con lo scopo di caratterizzare i fattori prognostici molecolari nell'ambito della leucemia mieloide acuta. I risultati ottenuti dimostrano che l'attecchimento delle AML in topi immunodeficienti costituisce una proprietà che correla con una prognosi infausta: lo studio delle variabili che influenzano tale proprietà ha così permesso di definire come la co-presenza di mutazioni nei geni più frequentemente colpiti nell'ambito delle leucemie mieloidi acute (DNMT3A, NMP1 e FLT3) si associ ad un elevata capacità di attecchire negli animali testati. In linea con queste osservazioni, altri lavori hanno riportato un effetto sfavorevole della co-presenza di tali mutazioni sulla prognosi dei pazienti (Dohner et al, ASH 2015). Confrontando il profilo trascrizionale di AML in grado o meno di generare xenotrapianti abbiamo individuare un set di geni deregolato nelle cellule leucemiche in grado di attecchire nei topi. Tale gruppo di geni potrebbe permettere di stratificare i pazienti in gruppi con differente prognosi: questa ipotesi verrà valutata successivamente prendendo in considerazione database pubblici e analizzando come la deregolazioni dei geni da noi identificati sia un grado di stratificare l'outcome dei pazienti. Inoltre verranno validati e studiati in dettaglio i geni che maggiormente definiscono questa "signature" specifica: tale studio potrebbe costituire la base per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche volte a colpire i geni deregolati nelle leucemie associati ad un fenotipo più aggressivo.

La studio delle leucemie attecchite nei topi ha permesso di dimostrare come le caratteristiche principali delle cellule leucemiche umane rimangano inalterate nei topi immunodeficienti e come tutti i parametri osservati (crescita delle cellule e profilo trascrizionale) siano riproducibili: ciò ci ha permesso di sfruttare questo modello per determinare il potenziale antileucemico dei linfociti T e per studiare come la pressione immunologica da essi esercitata vada a scolpire il profilo delle cellule leucemiche. Il modello umanizzato messo a punto in un contesto privo di fattori confondenti (quali l'immunosoppressione e le reazioni avverse di GvHD), ha permesso di evidenziare come il potenziale leucemico dei linfociti T sia proporzionale alla disparità HLA tra donatore e leucemia. La pressione immune, inoltre, determina una perturbazione specifica del profilo trascrizionale delle cellule leucemiche che è basato sulla deregolazione di processi immuni fondamentali quali il processamento e la presentazione antigenica. Inoltre in diversi casi sperimentali abbiamo documentato la capacità di alcune rare cellule leucemiche di persistere in presenza della pressione immune. Il nostro modello permette di studiare a fondo come la pressione immunologica allogenica sia in grado di eliminare la malattia e come alcune cellule

leucemiche siano in grado di persistere in sua presenza. Nel corso degli esperimenti non abbiamo però identificato delle varianti leucemiche in grado di acquisire una resistenza permanente e capaci di evadere il controllo del sistema immune. Ciò potrebbe essere dato dalla scarsa eterogeneità clonale delle leucemie attecchite nei topi e da una pressione immunologica troppo forte mediata dai linfociti T infusi. A tal proposito sono già state identificate delle modalità sia per indurre instabilità genetica nelle cellule leucemiche, favorendo così l'insorgere di cloni immunoresistenti, sia per controllare la reattività della pressione immune somministrata. In particolare le cellule leucemiche possono essere modificate con vettori lentivirali genotossici in grado di indurre instabilità genetica ed espressione aberrante dei geni colpiti (Cesana et al, Mol Ther 2014). Abbiamo verificato che vettori lentivirali contenenti un gene reporter (GFP) siano in grado di essere trasdurre efficientemente le leucemie testate e che tale processo non influenzi la capacità di attecchimento e di crescita delle cellule in vivo (Fig. 8). Applicando una pressione immunologica su tali cellule leucemiche si potrebbero identificare delle varianti leucemiche capaci di eludere la risposta immune; inoltre, analizzando dove il vettore virale genotossico si è inserito nel DNA delle cellule leucemiche, è possibile identificare i geni deregolati, e quindi coinvolti nell'evasione dalla pressione mediata dai linfociti T. Al tempo stesso verranno valutate delle modalità con cui controllare la forza della reazione linfocitaria: in tal caso la somministrazione di agenti immunosoppressivi selettivi per i linfociti T potrebbe costituire una valida opzione per attenuare la crescita delle cellule antileucemiche. Inoltre i linfociti T possono essere ingegnerizzati con geni suicidi, la cui attivazione permette di eliminare in maniera selettiva le cellule, controllando così la loro reattività. Questi approcci verranno valutati e messi a punti nel corso del progetto, con l'obiettivo di identificare nel nostro modello umanizzato eventi di immunoevasione. La caratterizzazione molecolare e biologica di tali fenomeni potrà consentire lo studio, in un sistema controllato, dei processi indispensabili per acquisire la capacità di eludere il controllo del sistema immunitario.

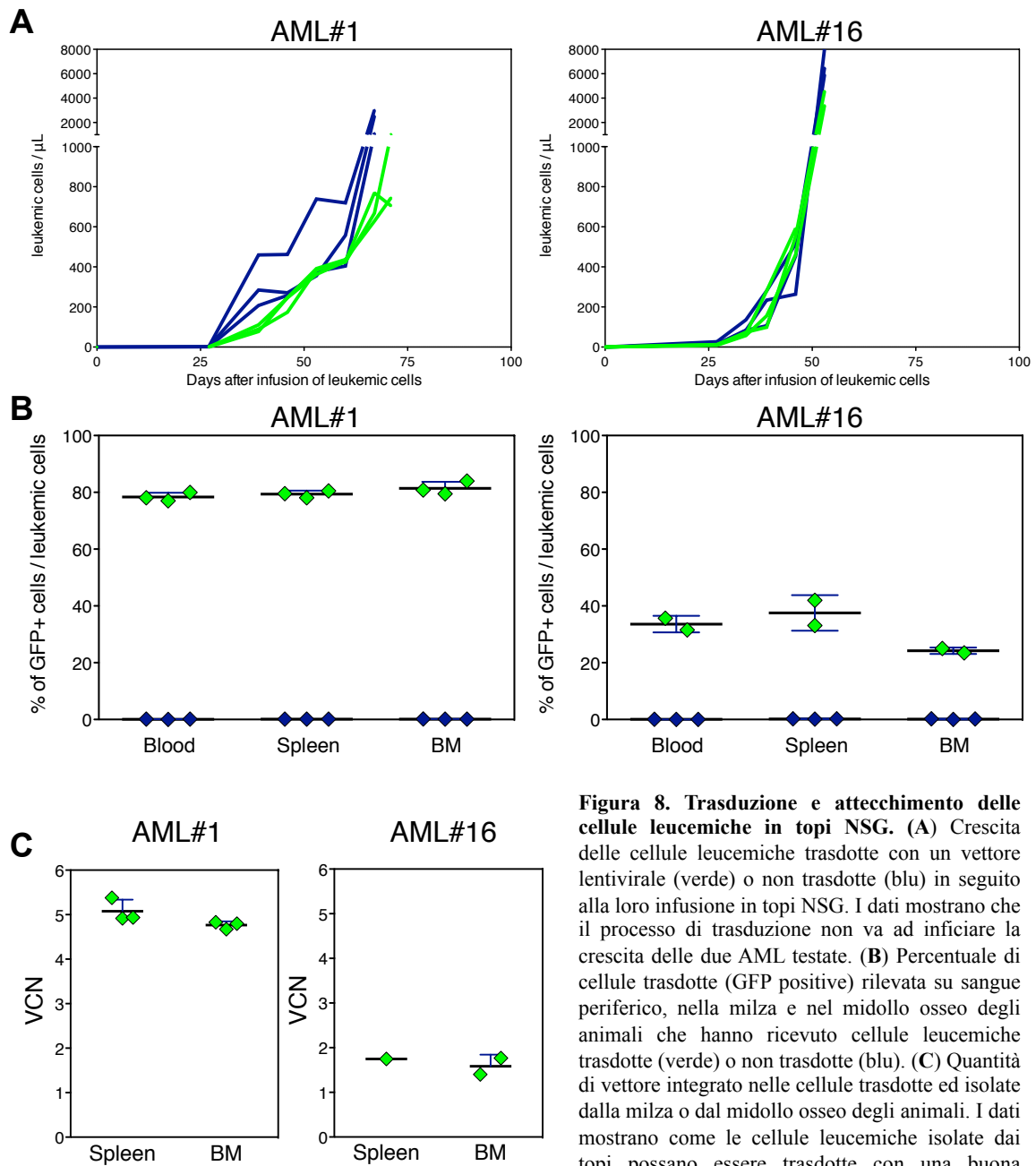


Figura 8. Trasduzione e attecchimento delle cellule leucemiche in topi NSG. (A) Crescita delle cellule leucemiche trasdotte con un vettore lentivirale (verde) o non trasdotte (blu) in seguito alla loro infusione in topi NSG. I dati mostrano che il processo di trasduzione non va ad inficiare la crescita delle due AML testate. (B) Percentuale di cellule trasdotte (GFP positive) rilevata su sangue periferico, nella milza e nel midollo osseo degli animali che hanno ricevuto cellule leucemiche trasdotte (verde) o non trasdotte (blu). (C) Quantità di vettore integrato nelle cellule trasdotte ed isolate dalla milza o dal midollo osseo degli animali. I dati mostrano come le cellule leucemiche isolate dai topi possano essere trasdotte con una buona efficienza con vettori lentivirali per poi essere infuse ed espanse in topi immunodeficienti.