

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

Abstract

I recenti sviluppi delle tecnologie di sequenziamento genico hanno permesso di approfondire le basi genetiche della leucemia mieloide acuta. Nonostante la crescita di tali conoscenze, i meccanismi biologici che guidano la progressione neoplastica delle cellule leucemiche e permettono loro di eludere il controllo mediato dal sistema immunitario rimangono sconosciuti. Le difficoltà nel mettere a punto modelli sperimentali riproducibili in vitro e la mancanza di modelli animali altamente informativi limitano gli studi funzionali volti ad analizzare il profilo biologico delle leucemie per comprenderne i meccanismi biologici deregolati e per elaborare fattori prognostici. Questo progetto si propone di sviluppare un modello murino umanizzato che permetta di studiare direttamente in vivo e con cellule leucemiche primarie umane i fattori prognostici ed i meccanismi di immunoevasione della leucemia mieloide acuta.

Leucemie primarie alla diagnosi verranno infuse in topi immunodeficienti NSG e la cinetica di attecchimento verrà monitorata per mezzo di tecniche citofluorimetriche. Verranno selezionate le leucemie in grado di generare xenotrapianti e ne verrà analizzata la cinetica di crescita negli animali. Il profilo di espressione genica delle leucemie primarie infuse e delle leucemie attecchite nel topo verranno confrontati e correlati con l'aggressività nel topo e con la prognosi clinica. Una pressione immunologica verrà poi modulata in vivo tramite infusioni seriali di linfociti T con un crescente grado di disparità MHC con la leucemia. Al raggiungimento di una fase di evasione immunologica, le cellule leucemiche resistenti al trattamento verranno isolate e purificate; il loro profilo di espressione genica verrà confrontato con quello di cellule leucemiche attecchite nei topi in assenza di pressione immune, in modo tale da definire i processi attivi nel processo di immunoevasione.

Questo modello mira a identificare i geni e i processi leucemici: (i) deregolati nell'attecchimento dei topi, (ii) implicati nel comportamento aggressivo della leucemia negli animali, (iii) correlati con una prognosi clinica sfavorevole e (iv) caratteristici dei meccanismi biologici di immunoevasione. La comprensione di questi fattori non solo permetterà di identificare nuovi marcatori prognostici sulla base dei quali effettuare appropriate scelte cliniche, ma fornirà anche il razionale per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici.

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

Background

I recenti sviluppi delle tecnologie di sequenziamento genico hanno permesso di approfondire le base genetiche della leucemia mieloide acuta e hanno consentito la caratterizzazione delle mutazioni in grado di guidare una trasformazione neoplastica. Grazie a tali strumenti sappiamo oggi che le leucemie vanno incontro a diversi eventi mutazionali che determinano la nascita della patologia, la sua progressione e, nei casi più sfavorevoli, la resistenza alle terapie^{1,2}. L'utilizzo di piattaforme high-throughput ha permesso di dimostrare come le leucemie mieloidi acute spesso presentino una complessa struttura gerarchica e hanno evidenziato come lo studio delle dinamiche clonali sia fondamentale non solo per la comprensione dei meccanismi di evoluzione delle cellule tumorali, ma anche per l'ideazione di nuovi approcci terapeutici più efficaci³⁻⁵.

Sebbene gli studi attuali abbiano permesso di descrivere le mutazioni più frequenti nelle leucemie mieloidi acute, 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 è volto allo sviluppo di un innovativo modello murino umanizzato per lo studio e la caratterizzazione in vivo dei fattori prognostici molecolari e dei 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.

Scopo dello studio

Questo progetto di ricerca si propone di sviluppare un modello murino umanizzato che permetta lo studio di fattori prognostici e di meccanismi di immunoevasione in vivo e direttamente sulle cellule di leucemia primaria estratte dal paziente. Nel dettaglio tale modello si propone di analizzare i seguenti oggetti:

- *Fattori prognostici nella leucemia mieloide acuta.* I modelli murini immunodeficienti sono stati utilizzati estensivamente per la valutazione del potenziale di attecchimento e proliferazione di diverse tipologie di tumori umani⁶⁻⁸. Nell'ambito delle leucemie mieloidi acute, l'attecchimento in topi

Disease related-variables	No Engraftment ← Engraftment		P value
	Total=14	Total=11	
FAB M4 type	1/8 (12.5%)	4/8 (50%)	0,129
Abnormal karyotype	4/12 (33.3%)	4/10 (40%)	0,746
FLT3-ITD positivity	5/13 (38.5%)	6/10 (60%)	0,309
NPM1 mut A positivity	5/13 (38.5%)	6/11 (54.5%)	0,433
Primary induction failure	3/13 (23.1%)	5/11 (45.5%)	0,253
Relapse post Allo-HSCT	2/11 (18.2%)	8/9 (88.9%)	0,007

Tabella 1. Analisi statistica dell'impatto delle variabili patologiche e cliniche più rilevanti sulla capacità di una leucemia mieloide acuta di attecchire in topi NSG. La recidiva di malattia dopo trapianto è fortemente associata all'attecchimento in topi immunodeficienti.

immunocompromessi risulta essere maggiore per patologie ad alto rischio con una prognosi sfavorevole⁹. In particolare, nella nostra casistica l'attecchimento è strettamente associato alla ricaduta di malattia dopo trapianto di cellule staminali da donatore allogenico (Tabella 1). Inoltre abbiamo osservato che dopo trapianti seriali le leucemie primarie umane acquisiscono sempre maggiore aggressività e rapidità di crescita nell'animale (Fig. 1B), suggerendo un arricchimento in cellule staminali leucemiche¹⁰. L'obiettivo del presente studio è identificare il profilo di espressione genica correlato all'attecchimento e all'aggressività leucemica in tali modelli, e correlare tale profilo con l'assetto molecolare e la prognosi clinica dei pazienti da cui tali leucemie sono state purificate.

- *Meccanismi di immunoevasione nella leucemia mieloide acuta.* Una volta attecchite in topi immunodeficienti, le cellule leucemiche saranno sottoposte in vivo ad una pressione immunologica con lo scopo di ricapitolare il processo dell' immunoevasione. In particolare verrà analizzato il profilo di espressione genica di leucemie sotto pressione immune in modo tale da identificare i meccanismi biologici che una cellula leucemica mette in atto per eludere il riconoscimento mediato dal sistema immunitario.

Lo sviluppo di tale modello umanizzato permetterà infine di vagliare approcci terapeutici direttamente in vivo e di correlarne l'efficacia con le caratteristiche specifiche delle leucemie primarie selezionate.

Metodi

Identificazione di fattori prognostici nella leucemia mieloide acuta. Leucemie primarie umane di nuova diagnosi saranno infuse in topi immunodeficienti NSG (NOD SCID gamma chain^{null}) di 4-8 settimane non irradiati. I linfociti T contenuti nei campioni primari verranno depletati con biglie magnetiche per evitare il loro attecchimento e la conseguente reattività contro i tessuti murini. La comparsa di cellule leucemiche sul sangue periferico verrà quantificata settimanalmente in modo tale da monitorare l'attecchimento. Al raggiungimento di un chimerismo umano maggiore del 70-90%, i topi saranno sacrificati e la leucemia verrà purificata dalla milza e dal midollo degli animali. Le cellule ricavate verranno infuse in altri topi NSG in modo da effettuare trapianti seriali. Una volta valutata la cinetica di crescita delle leucemie in seguito a primo, secondo, terzo e quarto passaggio seriale in topi, le leucemie purificate verranno sottoposte all'analisi del profilo di espressione genica tramite microarray. In particolare il profilo di espressione genica delle leucemie primarie purificate verrà confrontato con quello delle cellule leucemiche ricavate dopo il primo e dopo l'ultimo passaggio seriale in topo. I geni differenzialmente espressi dalle diverse leucemie primarie e dai gruppi sperimentali in oggetto di studio verranno identificati tramite l'analisi bioinformatica. I processi deregolati verranno identificati interrogando le liste annotate di Gene Ontology (GO) e Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). I geni deregolati in grado di predire l'attecchimento in topo, nonché caratteristici di un fenotipo di crescita aggressivo, verranno validati ad hoc tramite saggi molecolari (qPCR o sequenziamento). Infine il set di geni identificati verrà utilizzato per stratificare la nostra coorte di pazienti o casistiche più numerose disponibili in letteratura in modo tale da verificare quale caratteristica biologica risulti essere correlata alla prognosi clinica¹⁰.

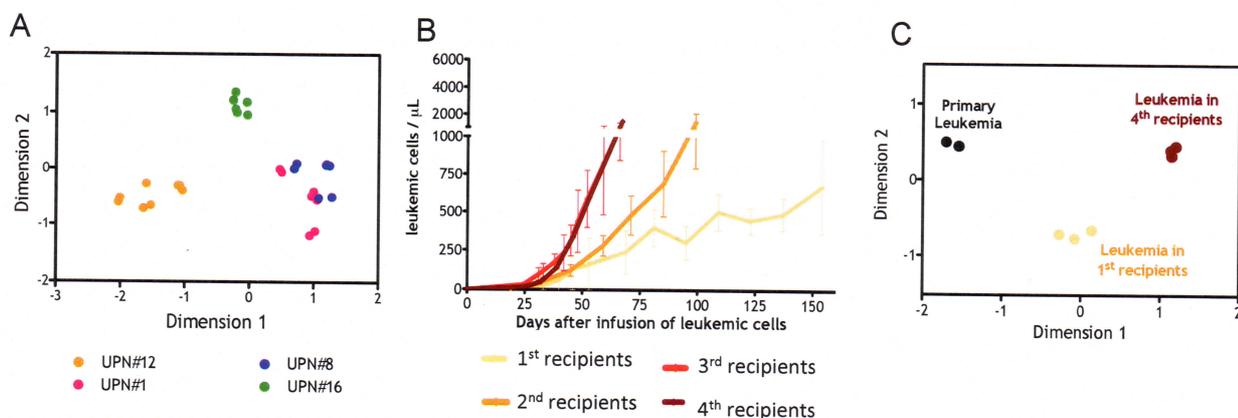


Figura 1. (A) Analisi della dispersione del profilo di espressione genica di leucemie di 4 pazienti alla diagnosi o dopo attecchimento nei topi NSG. I campioni appartenenti allo stesso paziente si raggruppano in posizioni vicine, dimostrando come il profilo di espressione genica di una leucemia sia paziente-specifico. (B) Cinetica di attecchimento in topi NSG di una leucemia rappresentativa. La crescita delle cellule leucemiche monitorata su sangue periferico è più aggressiva in dopo il terzo e il quarto trasferimento seriale negli animali. (C) Confronto del profilo di espressione genica globale della leucemia primaria di un paziente alla diagnosi e delle cellule leucemiche attecchite in topi NSG dopo uno o quattro trapianti seriali.

Studio dei meccanismi di immunoevasione nella leucemia mieloide acuta. In seguito all'attecchimento delle leucemie nei topi NSG, verranno effettuate infusioni di linfociti T autologhi o allogenici con lo scopo di esercitare una pressione immunologica. Per ottenere numeri sufficienti per il trattamento di diversi topi, le cellule T dei differenti donatori verranno 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 effettrici¹¹. In particolare per ogni esperimento saranno disegnati diversi gruppi sperimentali trattati con linfociti T dotati di differente grado di compatibilità nei confronti delle leucemie (linfociti T autologhi, HLA-identici, aploidentici o completamente scorrelati), in modo tale da ottenere un diverso grado di allo-reattività. Un gruppo di controllo riceverà la sola leucemia, in assenza di trattamento linfocitario. La pressione immunologica verrà modulata con infusioni seriali fino a raggiungere una fase di evasione. Al verificarsi di tali condizioni, le cellule leucemiche verranno purificate e sottoposte all'analisi del loro profilo di espressione genica. In particolare cellule leucemiche sottoposte a pressione immune verranno confrontate con controlli non trattati. Come precedentemente spiegato, le analisi bioinformatiche identificheranno i geni e i processi deregolati. I geni di maggior interesse verranno validati tramite saggi molecolari e funzionali ad hoc. Infine i meccanismi biologici identificati verranno confrontati con i processi attivi nelle cellule leucemiche primarie nella fase di recidiva di malattia.

Risultati attesi

Risultati preliminari mostrano che circa il 40-50% delle leucemie è in grado di attecchire stabilmente e in maniera riproducibile in topi NSG e che tale attecchimento è correlato con una prognosi clinica sfavorevole. L'analisi del trascrittoma di tali campioni ha permesso di evidenziare come il profilo di ciascuna leucemia sia paziente-specifico, ma anche come tale profilo sia riproducibile negli animali (Fig. 1A-C). Le cellule leucemiche attecchite possono poi essere infuse in altri topi, in modo tale da realizzare trapianti seriali. In particolare abbiamo

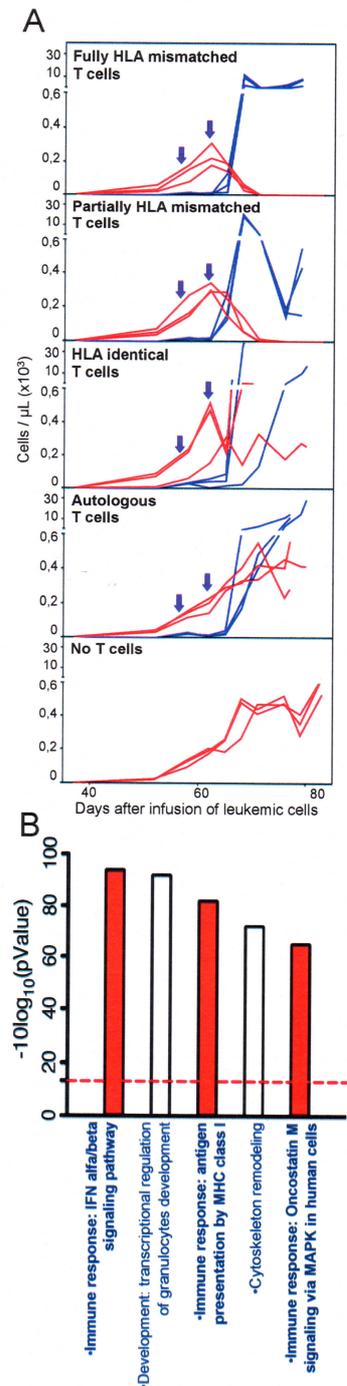


Figura 2. (A) Cinetica di crescita delle cellule leucemiche (rosso) in seguito a infusioni seriali di linfociti T (blu); (B) Pathway genici arricchiti nelle leucemie soggette a pressione immunologica. I processi immunologici sono evidenziati in rosso

osservato che leucemie fortemente adattate all'ambiente murino mostrano una cinetica di crescita più aggressiva (Fig. 1B). Tale comportamento correla con una perturbazione dell'espressione genica e con l'acquisizione di un profilo specifico (Fig. 1C) caratterizzato dalla deregolazione dei geni che regolano la mitosi cellulare e il differenziamento mieloido (come AZU1, ELANE, DEFA1B, DEFA3, DEFA1, CTSG).

Una volta sottoposte a pressione immunologica in vivo, le cellule leucemiche mostrano una sensibilità al trattamento proporzionale alla disparità genetica tra leucemia e linfociti infusi (Fig. 2A). In particolare abbiamo osservato che le cellule leucemiche sotto il controllo dei linfociti T acquisiscono un profilo genetico specifico caratterizzato dalla deregolazione di processi immunologici, quali la risposta agli interferoni e la presentazione antigenica (Fig. 2B).

L'analisi del profilo di espressione genica di leucemie primarie e di leucemie attecchite in topi NSG in presenza o in assenza di pressione immune potrà permettere di determinare i geni e i processi biologici: (i) deregolati nell'attecchimento dei topi, (ii) implicati nel comportamento aggressivo della leucemia negli animali, (iii) correlati con una prognosi clinica sfavorevole e (iv) caratteristici dei meccanismi biologici messi in atto dalle leucemie mieloidi acute per eludere il controllo del sistema immunitario. La comprensione di questi fattori non solo permetterà di identificare nuovi marcatori prognostici sulla base dei quali effettuare appropriate scelte cliniche, ma fornirà anche il razionale per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici.

Bibliografia

1. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med.* 2009;361:1058-66.
2. Ding L, Ley TJ, Larson DE, Miller CA, Koboldt DC, Welch JS, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature.* 2012;481:506-10.
3. Aparicio S, Caldas C. The implications of clonal genome evolution for cancer medicine. *N Engl J Med.* 2013;368:842-51.
4. Kico JM, Spencer DH, Miller CA, Griffith M, Lamprecht TL, et al. Functional heterogeneity of genetically defined subclones in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell.* 2014;25:379-92.
5. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature.* 2012;481:306-13.
6. Terpstra W, Prins A, Visser T, Wognum B, Wagemaker G, Lowenberg B, Wielenga J. Conditions for engraftment of human acute myeloid leukemia (AML) in SCID mice. *Leukemia* 1995; 9: 1573–1577.
7. Dick JE. Human stem cell assays in immune-deficient mice. *Curr Opin Hematol* 1996; 3: 405–409.
8. Lapidot T, Fajerman Y, Kollet O. Immune-deficient SCID and NOD/SCID mice models as functional assays for studying normal and malignant human hematopoiesis. *J Mol Med* 1997; 75: 664–673.
9. Lumkul R, Gorin NC, Malehorn MT, Hoehn GT, Zheng R, et al. Human AML cells in NOD/SCID mice: engraftment potential and gene expression. *Leukemia.* 2002;16:1818-26.
10. Eppert K, Takenaka K, Lechman ER, Waldron L, Nilsson B, van Galen P, et al. Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nat Med.* 2011;17:1086-93.
11. Kaneko S, Mastaglio S, Bondanza A, Ponzoni M, Sanvito F, Aldrighetti L, et al. IL-7 and IL-15 allow the generation of suicide gene-modified alloreactive self-renewing central memory human T lymphocytes. *Blood.* 2009;113:1006-15.