

**DIPARTIMENTO DI PROMOZIONE DELLA SALUTE, MATERNO-INFANTILE,
MEDICINA INTERNA E SPECIALISTICA DI ECCELLENZA "G.
D'ALESSANDRO"**
Direttore: Prof. Antonio Craxì

Titolo del progetto

Identificazione di marcatori molecolari di risposta al trattamento nel Linfoma Diffuso a Grandi cellule B dell'anziano

Ricercatori coinvolti

- **Salvatrice Mancuso**, Ricercatore MED/15, Dipartimento PROMISE, Università degli Studi di Palermo (Tutor).
- **Ada Maria Florena**, Professore Ordinario MED/08, Dipartimento PROMISE, Università degli Studi di Palermo (Collaboratore).
- **Alice Turdo**, RTDA MED/50, Dipartimento PROMISE, Università degli Studi di Palermo (Under 40).
- **Irene Pillitteri**, borsista AOUP "Paolo Giaccone" presso il Cellular and Molecular Oncology Laboratory (CMOL), Dipartimento PROMISE, Università degli Studi di Palermo (Ricercatore del Dipartimento PROMISE con meno di due lavori indicizzati su Scopus negli ultimi tre anni).

Introduzione

Il linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL) è il sottotipo più comune di Linfoma non Hodgkin, particolarmente frequente nei soggetti anziani, caratterizzato da spiccata eterogeneità clinica e da una delle più elevate percentuali di mortalità nella maggior parte delle aree sviluppate del mondo. Sebbene più del 50% dei pazienti risponda con successo alla terapia standard con R-CHOP, approssimativamente il 30-40% sviluppa una malattia refrattaria o recidivante, che rimane la principale causa di morbidità e mortalità a causa delle limitate opzioni terapeutiche. Il management del DLBCL nei pazienti anziani rappresenta una sfida per le caratteristiche biologiche sfavorevoli della malattia e la vulnerabilità geriatrica.

Keywords

Linfoma diffuso a grandi cellule B, resistenza alla terapia, valutazione geriatrica multidimensionale, biomarcatori di risposta, tecnologie avanzate di biologia molecolare.

Obiettivi

I principali modelli prognostici del DLBCL si basano sull'*International Prognostic Index*, che tiene conto del "burden" della malattia e delle caratteristiche dell'ospite, sul modello della *cell of origin*, che permette di



DIPARTIMENTO DI PROMOZIONE DELLA SALUTE, MATERNO-INFANTILE, MEDICINA INTERNA E SPECIALISTICA DI ECCELLENZA "G. D'ALESSANDRO"

Direttore: Prof. Antonio Craxì

discriminare il DLBCL in Germinal Center B-cell (GCB) e Activated B-Cell (ABC)-like, e sull'elevata espressione di *MYC* e *BCL2*. Recenti dati di letteratura hanno inoltre mostrato la presenza di 20 geni differentemente mutati tra questi due gruppi, tra i quali *EZH2*, *SGK1*, *GNA13*, *SOCS1*, *STAT6*, e *TNFRSF14* maggiormente mutati nei GCB, *eETV6*, *MYD88*, *PIM1*, e *TBL1XR1* più frequentemente mutati nei ABC DLBCLs. Inoltre analisi di RNA-seq hanno permesso di mettere in evidenza due differenti *signatures* di espressione genica che caratterizzano l'uno o l'altro sottotipo molecolare. Tali risultati hanno messo in evidenza nuovi scenari per la caratterizzazione dei DLBCLs, che possono maggiormente rispecchiare l'eterogeneità di questa neoplasia.

Obiettivo del nostro progetto di ricerca è quello pertanto di effettuare un'indagine comprensiva che descriva i profili molecolari nel DLBCL, ponendoli in correlazione con le caratteristiche anagrafiche, cliniche e istopatologiche e con le misure di *outcomes* al trattamento nella popolazione studiata. Utilizzando tecniche di biologia molecolare avanzata, cercheremo di focalizzare lo studio biologico principalmente sui soggetti anziani affetti da DLBCL. Il principale valore innovativo di questo progetto è rappresentato dalla poca disponibilità di letteratura scientifica riguardante le caratteristiche biologiche e la valutazione prognostica del DLBCL nella popolazione con età avanzata, la quale tuttavia rappresenta il gruppo di pazienti più colpito dalla malattia ed è in progressivo aumento a causa delle aumentate aspettative di vita.

Risultati attesi

La possibilità di poter individuare in anticipo i pazienti che necessitano di un trattamento "*targeted*" diversificato risulta di fondamentale importanza specialmente nei soggetti anziani. Pertanto i risultati che conseguiremo nel contesto di questo studio permetteranno di ***chiare importanti aspetti sulla base biologica che causa la resistenza ai farmaci nel 35% dei pazienti affetti da DLBCL.***

Mediante tecniche di biologia molecolare avanzata ci aspettiamo di poter definire con accuratezza l'eterogeneità che caratterizza questa neoplasia ed, allo stesso tempo, un *genomic risk* che sarà successivamente paragonato al valore predittivo ottenuto dal *cell of origin model* e dall'*International Prognostic Index*. Il *genomic risk model* ha di fatto dimostrato una performance migliore rispetto agli altri modelli nel predire i pazienti con minore o maggiore rischio di mortalità a breve e a lungo termine, e si è anche rivelato anche altamente predittivo nella risposta alla terapia (Reddy, A., Cell, 2017).

Fase 1. Selezionare i casi elegibili per lo studio e per la composizione della casistica. Saranno raccolti i dati relativi alle caratteristiche demografiche, cliniche (stadiazione, IPI, valutazione geriatrica multifunzionale),



**DIPARTIMENTO DI PROMOZIONE DELLA SALUTE, MATERNO-INFANTILE,
MEDICINA INTERNA E SPECIALISTICA DI ECCELLENZA "G.
D'ALESSANDRO"**

Direttore: Prof. Antonio Craxì

(istopatologiche e immunoistochimiche), algoritmo di Hans, terapia, risposta al trattamento.

Fase 2. Disegnare delle curve di sopravvivenza e tabelle di uni e multi variata che includano i principali dati di interesse clinico.

Fase 3. Valutare l'espressione di *MYC* e *BCL-2*. Per far questo potremmo utilizzare un duplice approccio, mediante tecnica di immunoistochimica su tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE) e mediante la digital PCR, una tecnologia innovativa che permette di valutare in maniera assoluta, precisa e altamente sensibile la quantità di acidi nucleici (DNA ed RNA) anche a partire da basse quantità di campione biologico proveniente da tessuti che hanno subito un processo di fissazione.

Fase 4. Condurremo, su campioni FFPE di pazienti responder e no responder alla terapia con R-CHOP, una analisi trascrittomica dei seguenti geni *MYC*; *GAPDH*; *BCL2*; *BCL6*; *IRF4*; *BMF*; *CCND2*; *PTPN1*; *MYBL1*; *DENND3*; *LMO2* (Reddy, A., Cell, 2017), valuteremo le *copy number variation* del gene *MYC* e le mutazioni dei geni *EZH2*, *SGK1*, *GNAI3*, *SOCS1*, *STAT6*, *TNFRSF14*, *ETV6*, *MYD88*, *PIM1*, e *TBLIXR1* (Reddy, A., Cell, 2017), utilizzando la digital PCR, al fine di correlare questi dati con la risposta alla terapia ed il decorso della patologia nella nostra coorte di soggetti anziani affetti da DLBCL.

I nostri risultati preliminari hanno dimostrato, mediante l'estrazione di RNA da 5 pazienti in remissione e 2

*pazienti refrattari alla terapia con R-CHOP e successiva analisi mediante digital PCR, l'aumentata espressione di *BCL6*, *DENND3*, *LMO2* nei pazienti in remissione e di *MYC*, *BCL2* e *IRF4* nei pazienti refrattari (Figura 1), confermando la fattibilità e la validità di questo approccio nell'individuazione di pazienti a rischio.*

*I nostri dati preliminari hanno inoltre dimostrato la possibilità di poter valutare la copy number variation dei geni di interesse a partire da campioni FFPE, come dimostrato dall'analisi riportata in Figura 2. In particolare è stato possibile rilevare l'amplificazione di *MYC* in un paziente refrattario alla terapia con R-CHOP. Condurremo inoltre degli esperimenti di DNA-seq ed RNA-seq al fine di individuare nuovi marcatori prognostici e predittivi nella nostra popolazione.*

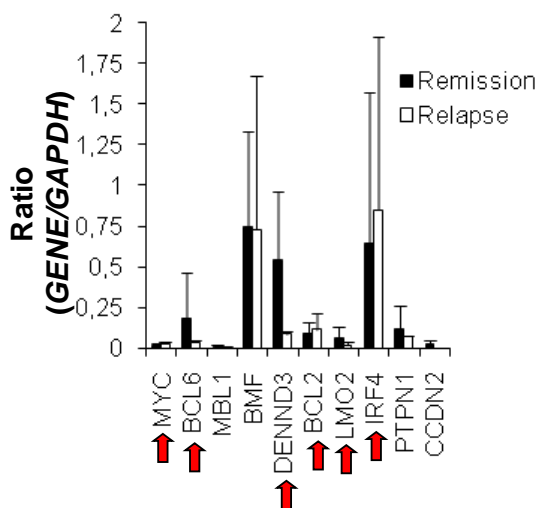


Figura 1. Profilo di espressione genica di *MYC*, *BCL6*, *MYBL1*, *BMF*, *DENND3*, *BCL2*, *LMO2*, *IRF4*, *PTPN1*, *CCND2* di 5 pazienti affetti da DLBCL in remissione e 2 pazienti refrattari. L'RNA è stato estratto da tessuti FFPE e successivamente l'espressione genica è stata valutata mediante digital PCR. La maggiore o minore espressione dei geni evidenziati correla con la risposta dei pazienti alla terapia.



**DIPARTIMENTO DI PROMOZIONE DELLA SALUTE, MATERNO-INFANTILE,
MEDICINA INTERNA E SPECIALISTICA DI ECCELLENZA "G.
D'ALESSANDRO"**
Direttore: Prof. Antonio Craxì

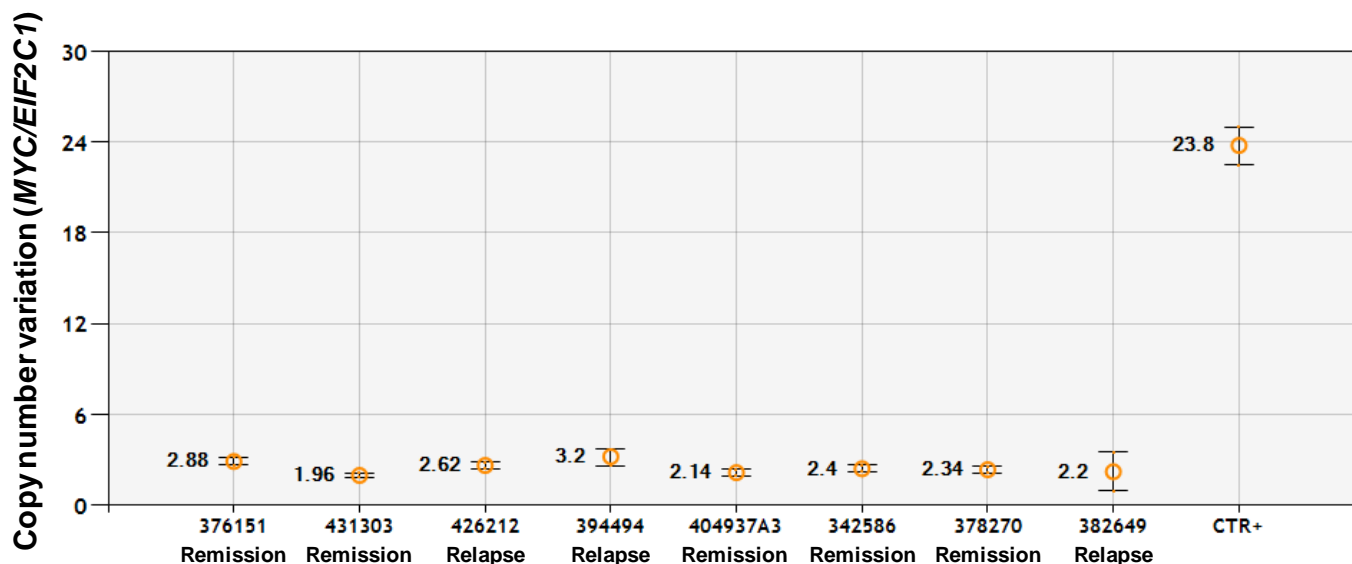


Figura 2. Copy number variation del gene *MYC* su 7 campioni FFPE di pazienti affetti da DLBCL. Da 5 campioni in remissione e due refrattari è stato estratto il DNA e condotta una digital PCR per la valutazione dell'amplificazione di *MYC*. Considerando come campioni significativamente amplificati un cut-off ≥ 3 , solo un campione risulta essere amplificato.

Fase 5. Al fine di valutare il valore predittivo dei geni risulteranno significativamente de-regolati dalle precedenti analisi, condurremo esperimenti *ex vivo* su campioni "a fresco" ottenuti da pazienti candidati al trattamento, correlandoli con la risposta terapeutica.

Inoltre, l'espressione di questi geni verrà valutata su linee cellulari commerciali di DLBCL sensibili alla terapia e rese resistenti alla terapia con R-CHOP, mediante esposizione prolungata a basse dosi dei farmaci. Inoltre valuteremo l'effetto della diminuita o aumentata espressione di questi geni mediante saggi funzionali *in vitro* (saggi di proliferazione cellulare, invasione, clonogenesi, valutazione di espressione di marcatori di staminalità, risposta alla terapia).

Aspetti innovativi

In considerazione di quanto sopra descritto, il progetto ambisce all'identificazione di marcatori prognostici e predittivi nei soggetti anziani affetti da DLBCL. A questo aspetto si unisce l'innovazione tecnologica che ci permetterà di valutare anche in retrospettiva, da campioni FFPE, la variazione nell'espressione di geni già validati in precedenti studi che messi in evidenza dalle nostre analisi.

**DIPARTIMENTO DI PROMOZIONE DELLA SALUTE, MATERNO-INFANTILE,
MEDICINA INTERNA E SPECIALISTICA DI ECCELLENZA "G.
D'ALESSANDRO"
Direttore: Prof. Antonio Craxì**

Fattibilità del progetto e coinvolgimento dei ricercatori

La ricercatrice Salvatrice Mancuso è responsabile della diagnosi e il trattamento dei Linfomi presso la Divisione di Ematologia dell'Azienda Ospedaliera Policlinico di Palermo. E' inoltre componente del board della Commissione Anziani della Fondazione Italiana Linfomi. Presso le strutture di ambulatorio e di Day Service/Day Hospital della Divisione di Ematologia, sono in carico in media 40-50 nuovi casi di malattie linfoproliferative l'anno cui si aggiungono i restanti pazienti sottoposti a follow-up. E' pertanto disponibile una casistica da cui è possibile attingere per la conduzione del progetto.

La Prof.ssa Ada Maria Florena è Direttore della Divisione di Anatomia patologica dell'U.O.C. di Anatomia e Istologia patologica dell'Azienda Ospedaliera Policlinico di Palermo ed è titolare del Programma Intradipartimentale complesso "Emolinfopatia e Biologia molecolare applicata". E' responsabile della diagnostica delle emo- linfopatie primitive, disponendo di un laboratorio che le consente di applicare i protocolli attualmente validati alla luce delle linee guida internazionali.

I ricercatori Alice Turdo ed Irene Pillitteri possono contare su un laboratorio di ricerca, il Laboratorio di Fisiopatologia Cellulare e Molecolare, all'Università degli Studi di Palermo (<http://www.cmol.it>), attrezzato con tecnologie all'avanguardia quali microscopi confocale, apparecchi per la Next Generation Sequencing (NGS) (MiSeq benchtop sequencer, IonGeneStudio S5 e la digital PCR), Bioplex (Bio-Rad), una microultracentrifuga MTX150, apparecchiature FACS Aria I e FACS MELODY che permettono l'analisi citofluorimetrica e la separazione cellulare sulla base dell'espressione di particolari marcatori, un DEPArray ed una camera di colture cellulari BL3. La proposta progettuale beneficerà dell'esperienza e delle procedure laboratoristiche per esperimenti *in vitro* che sono già state validate dai ricercatori, come risulta nelle recenti pubblicazioni.

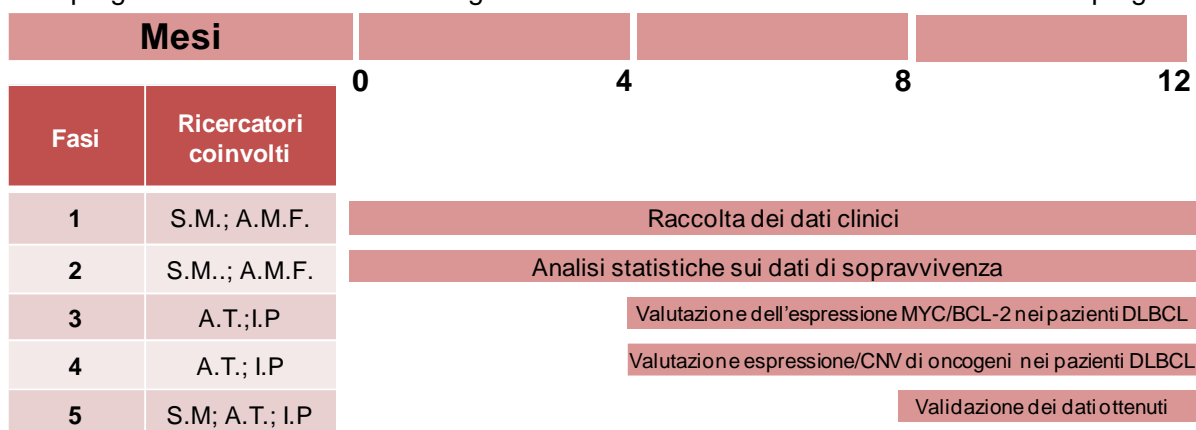
I vari aspetti della ricerca saranno coniugati da questo team interdisciplinare di ricercatori, i quali possiedono competenze eterogenee e trasversali che comprendono sia la ricerca di base, che quella traslazionale e clinica.

Il budget richiesto per l'espletamento di questo progetto prevede una spesa che rientrerebbe tra i costi indicati dal presente bando. Le apparecchiature ed il personale coinvolto sono infatti già a disposizione del Dipartimento PROMISE e l'eventuale budget messo a disposizione verrebbe impiegato per l'acquisto di consumabili (reagenti per estrazione DNA/RNA, reagenti per digital PCR, reagenti per sequenziamento DNA/RNA).



**DIPARTIMENTO DI PROMOZIONE DELLA SALUTE, MATERNO-INFANTILE,
MEDICINA INTERNA E SPECIALISTICA DI ECCELLENZA "G.
D'ALESSANDRO"**
Direttore: Prof. Antonio Craxì

Cronoprogramma che mostra il coinvolgimento di ciascun ricercatore in ciascuna fase del progetto.



Il Tutor proponente

Salvatrice Mancuso