

**Titolo divulgativo:** L'importanza della ricerca di mutazioni del DNA nelle cellule leucemiche e pre-leucemiche durante la terapia farmacologica

**Sottotitolo scientifico:** Medicina Personalizzata: Nuove Mutazioni Puntiformi nelle MDS come Indicatori Prognostici e Bersagli Terapeutici

**Responsabili Scientifici del Progetto:** Prof. Lucio Cocco e Prof.ssa Matilde Y. Follo - Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie, Università di Bologna

**Gruppo di studio:** Dott. Carlo Finelli, IRCCS-S.Orsola; Dott. Antonio Curti, IRCCS-S.Orsola, Prof. Francesco Lanza, Ospedale Santa Maria delle Croci, Ravenna; Dott.ssa Barbara Castagnari, Ospedale Santa Maria delle Croci, Ravenna

## **RELAZIONE SCIENTIFICA FINALE**

### Introduzione

Le Sindromi Mielodisplastiche (MDS) sono neoplasie del sangue che possono evolvere in forme particolarmente aggressive di Leucemia Mieloide Acuta (LMA). Le MDS sono caratterizzate dall'incapacità del midollo osseo di svolgere una corretta emopoiesi, producendo cellule dalla morfologia alterata (1). Le MDS sono malattie clonali, perché è una singola cellula staminale che, presentando mutazioni specifiche, genera cellule maligne, ed eterogenee, perché la produzione di cellule emopoietiche alterate può avvenire a vari stadi nel processo di maturazione delle cellule del sangue. Queste alterazioni causano citopenia, cioè un numero minore di cellule del sangue, che possono avere come conseguenza una maggiore suscettibilità ad infezioni (per mancanza di leucociti), anemia (per un numero minore di globuli rossi) e sanguinamento (per riduzione del numero di piastrine). In circa il 30% dei casi le MDS evolvono in LMA, con un rischio crescente che aumenta all'aumentare dell'età (2). Infatti, si tratta di patologie che si manifestano soprattutto in soggetti sopra i 60 anni di età, nei quali si ritrovano già frequentemente mutazioni, la cui acquisizione può essere associata all'evoluzione leucemica o alla mancata risposta alla terapia farmacologica (3). Quest'ultima è attualmente basata principalmente su farmaci che inibiscono la metilazione del DNA (es. Azacitidina), con lo scopo di ridurre la proliferazione delle cellule tumorali, a volte in associazione con farmaci immunomodulanti (es. Lenalidomide).

### Obiettivi dello Studio

Il Progetto intendeva comprendere se la presenza di specifiche mutazioni:

1. Fosse associata ad una minore risposta ai trattamenti farmacologici. La ricerca di queste specifiche mutazioni in cellule ottenute da pazienti con MDS è stata effettuata alla diagnosi e durante la valutazione clinica (dopo il 4° e 8° ciclo di trattamento), per vedere se il trattamento farmacologico fosse in grado di indurre nuove mutazioni.
2. Potesse permettere di identificare nuove molecole utili a sviluppare nuovi farmaci mirati, per i pazienti che non rispondono ai trattamenti attualmente utilizzati.

### Metodi

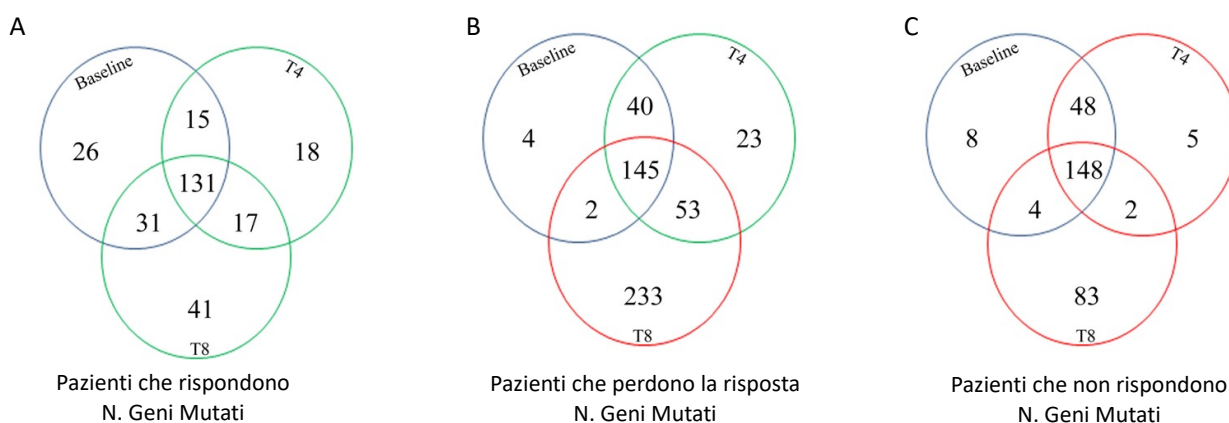
Il progetto è stato sviluppato grazie alla raccolta dei campioni clinici da parte dei centri ematologici di Bologna e Ravenna, senza i quali non sarebbe stato possibile effettuare le analisi. La rete di collaborazione si è estesa anche ad altri centri, ponendo attenzione alle necessità del territorio. Infatti, i campioni

analizzati sono stati ottenuti anche da altre collaborazioni su base provinciale e regionale (Piacenza, Parma, Reggio Emilia, Modena, Ferrara e Rimini). Invece, per la parte sperimentale, ci si è avvalsi di collaborazioni con l'IRST di Meldola (FC), ma anche con altri Enti nazionali e internazionali.

La collaborazione ha permesso di analizzare più di 30 pazienti con MDS alla diagnosi e durante il trattamento, seguendone anche l'andamento clinico. Le analisi, effettuate su campioni di DNA prelevati alla diagnosi e prima di ogni ciclo di trattamento, avevano come obiettivo quello di capire se la terapia farmacologica somministrata fosse in grado di indurre specifiche mutazioni geniche. Inoltre, i risultati molecolari sono stati correlati all'andamento clinico dei pazienti, suddivisi in tre categorie: soggetti che hanno risposto favorevolmente alla terapia e che hanno mantenuto la risposta durante tutto il trattamento; soggetti che hanno mostrato una prima risposta e poi un peggioramento delle condizioni cliniche; soggetti che non hanno mai risposto al trattamento farmacologico. Infine, sono state effettuate analisi in vitro per comprendere l'effetto delle mutazioni identificate sui processi di proliferazione e apoptosi cellulare.

### Risultati

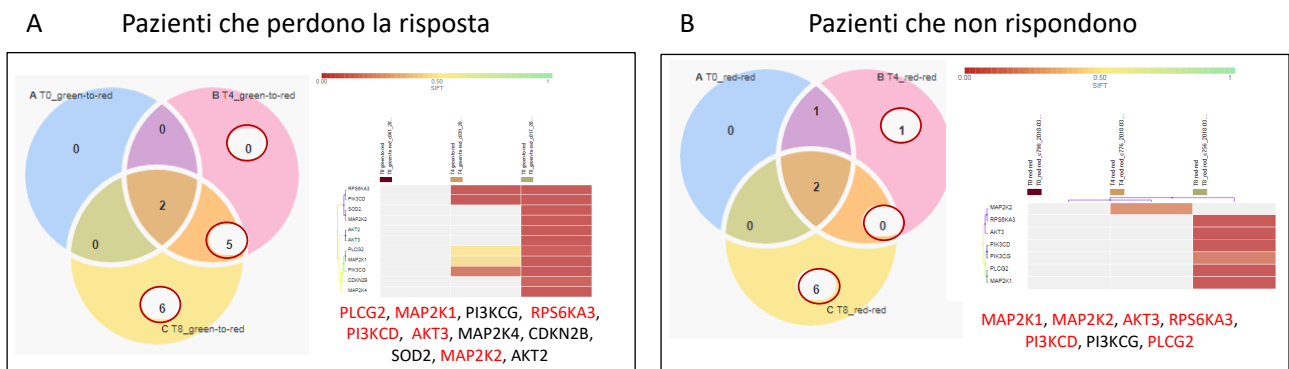
I risultati ottenuti hanno mostrato che, durante la terapia, i pazienti che non rispondono alla terapia o che perdono la risposta acquisiscono un numero maggiore di mutazioni rispetto al numero di mutazioni identificabili allo stato basale, prima del trattamento (Figura 1).



**Figura 1.** Numero di mutazioni geniche presenti (A) nei pazienti che rispondono alla terapia, (B) nei pazienti che perdono la risposta e (C) nei pazienti che non rispondono al trattamento allo stato basale (prima del trattamento, Baseline), al 4° ciclo (T4) e all'8° ciclo (T8) della terapia. Il numero di mutazioni specificatamente acquisite al 4° ciclo e all'8° ciclo (numeri nei cerchi) aumenta nei pazienti che perdono la risposta (23 solo al T4, 233 solo al T8 e 17 comuni tra T4 e T8) e che non rispondono (5 solo al T4, 83 solo al T8 e 53 comuni tra T4 e T8), rispetto ai pazienti che rispondono (18 solo al T4, 41 solo al T8 e 2 comuni tra T4 e T8).

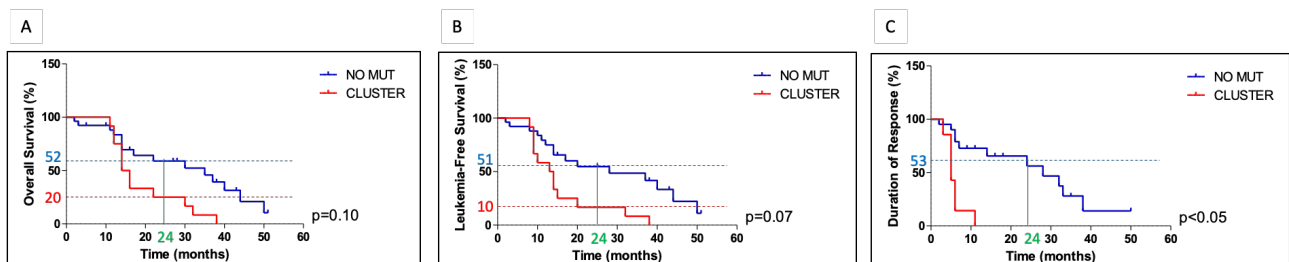
Complessivamente, dei geni che appartengono all'ambito mieloidale, quelli più frequentemente mutati sono stati ASXL1 (47%), TET2 (37%), RUNX1 (27%) e SRSF2 (17%). È interessante notare che tutti i pazienti che mostravano la singola mutazione di SRSF2 sono evoluti in LMA, indicando una correlazione negativa che necessita di essere approfondita, anche alla luce alcuni dati che mostrano come le mutazioni di SRSF2 siano associate a una maggiore incidenza di recidiva (4).

Per quanto riguarda altri geni, ne sono stati analizzati 31 appartenenti al metabolismo degli inositidi, che è generalmente coinvolto nella regolazione della proliferazione cellulare. Tra i geni esaminati, alcuni non hanno mai mostrato mutazioni, né prima del trattamento né durante la terapia, altri hanno mostrato mutazioni prima e durante il trattamento, e 19/31 geni hanno mostrato varianti specifiche solo in seguito al trattamento. Un'analisi più approfondita di questi ultimi ha rivelato un piccolo gruppo di 6 geni mutati solo nei pazienti che non hanno risposto al trattamento o che hanno perso la risposta (Figura 2).



**Figura 2.** Numero e tipo di geni appartenenti alla famiglia degli inositidi le cui mutazioni sono acquisite specificatamente durante la terapia dai (A) pazienti che perdono la risposta (6 solo al T8 e 5 comuni tra T4 e T8) o (B) che non rispondono (1 solo al T4 e 6 solo al T8). Comparando i due insiemi, 6 geni sono comuni a entrambi i gruppi di pazienti.

Ancora più interessante, è stato identificato uno schema comune di 3 mutazioni puntiformi in 3 geni (una mutazione per ogni gene), i quali erano contemporaneamente presenti in tutti i soggetti che non rispondevano alle terapie o che perdevano precocemente la risposta. Come mostrato in Figura 3, l'acquisizione contemporanea di queste mutazioni è stata associata a un andamento clinico peggiore (minore sopravvivenza, maggior rischio di evoluzione leucemica, minor durata della risposta ai farmaci).



**Figura 3.** Correlazione tra la presenza dei 3 geni mutati e (A) la sopravvivenza globale, (B) il rischio di evoluzione in Leucemia Mieloide Acuta, (C) la durata della risposta alla terapia. Se si prende un tempo (es. 24 mesi, linea verde verticale), i casi che mostrano le 3 mutazioni contemporaneamente (CLUSTER, linea blu) e che sono sopravvissuti sono pari al 20% (A, linea rossa tratteggiata orizzontale), mentre quelli che non hanno sviluppato leucemia mieloide acuta sono pari al 10% (B, linea rossa tratteggiata orizzontale). Al contrario, i casi che non mostrano le 3 mutazioni contemporaneamente (NO MUT) e che sono sopravvissuti sono pari al 52% (A, linea blu tratteggiata orizzontale), quelli che non hanno sviluppato leucemia mieloide acuta sono pari al 51% (B, linea blu tratteggiata orizzontale), mentre quelli che stanno ancora rispondendo ai farmaci sono pari al 53% (C, linea blu tratteggiata orizzontale).

E' interessante notare che i 3 geni alterati (PIK3CD, AKT3 e PLCG2) coinvolgono vie di trasduzione del segnale lipide-dipendenti, la cui alterazione è spesso presente nelle cellule tumorali (5). E' quindi probabile che l'acquisizione di queste specifiche mutazioni puntiformi nelle MDS che non rispondono alla terapia possa dare un vantaggio proliferativo alle cellule mutate, soprattutto perché i geni PI3K e AKT3 sono frequentemente correlati alla progressione leucemica e a un'umentata proliferazione cellulare. D'altra parte, poiché il gene PLCG2 è stato associato al differenziamento mieloide, è anche probabile che l'acquisizione di questa mutazione puntiforme specifica in pazienti con MDS non responsivi possa comportare un differenziamento emopoietico compromesso che porta a una mancata risposta o alla progressione in LMA. Lo studio in vitro ha effettivamente dimostrato che la presenza di tali mutazioni induce la proliferazione cellulare e riduce l'apoptosi cellulare, ma ulteriori studi sono ancora in corso.

## Conclusioni

Nel complesso, i nostri dati confermano che l'alterazione dei geni degli inositidi è importante nelle MDS. Infatti, la contemporanea presenza di mutazioni puntiformi nei geni PIK3CD, AKT3 e PLCG2 è correlata e predice un esito clinico negativo, poiché tutti i pazienti con MDS inclusi in questo studio che avevano acquisito le 3 mutazioni sono risultati anche refrattari alla terapia e hanno avuto un andamento peggiore. Sebbene si tratti di un'analisi preliminare, eseguita su un numero relativamente piccolo di casi, l'associazione statisticamente significativa tra questo gruppo di mutazioni e una minore sopravvivenza, un maggior rischio di evoluzione leucemica e una durata della risposta al trattamento più breve apre la strada a studi più ampi.

Inoltre, dato il coinvolgimento dei geni degli inositidi nel ciclo cellulare e nel differenziamento emopoietico, e sulla base dei nostri primi risultati in vitro, si potrebbero sviluppare nuove strategie terapeutiche mirate per i pazienti con MDS, basate sui geni mutati identificati in questo studio, volte a inibire o riattivare specifici processi cellulari che possano indurre l'apoptosi delle cellule tumorali e/o il normale differenziamento emopoietico.

È importante sottolineare che i risultati ottenuti da questo studio possono essere facilmente applicabili, in quanto lo studio delle mutazioni geniche nei pazienti MDS alla diagnosi è sempre più diffuso e la ricerca di poche mutazioni specifiche può essere facilmente aggiunta alle analisi di routine. Dai risultati ottenuti si potrebbero ipotizzare ulteriori analisi che potrebbero essere eseguite durante il trattamento o in fase di rivalutazione clinica dei pazienti, in modo da identificare precocemente pazienti a maggior rischio di evoluzione leucemica o mancata risposta alla terapia. Il Progetto ha quindi mostrato che si possono implementare le attuali metodologie prognostiche, e studi più ampi potrebbero migliorare i percorsi diagnostico-terapeutici delle MDS nella regione. Infatti, la partecipazione di Bologna e di Ravenna, oltre che di altri centri della Romagna, ha permesso di rafforzare la rete di collaborazione tra Bologna, Ravenna e l'Emilia-Romagna, che potrebbero migliorare la performance sanitaria della regione tramite lo sviluppo di nuovi approcci tecnologici all'avanguardia, con importanti ricadute traslazionali.

I risultati di questo studio sono stati presentati a congressi nazionali e internazionali e sono stati oggetto di varie pubblicazioni di rilievo.

## Bibliografia

1. Garcia-Manero G. Myelodysplastic syndromes: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 2023 Aug;98(8):1307-1325. doi: 10.1002/ajh.26984. Epub 2023 Jun 8. PMID: 37288607.
2. Kwon A, Weinberg OK. Acute Myeloid Leukemia Arising from Myelodysplastic Syndromes. *Clin Lab Med.* 2023 Dec;43(4):657-667. doi: 10.1016/j.cll.2023.07.001. Epub 2023 Aug 19. PMID: 37865509.
3. Mendoza H, Siddon AJ. Molecular Techniques and Gene Mutations in Myelodysplastic Syndromes. *Clin Lab Med.* 2023 Dec;43(4):549-563. doi: 10.1016/j.cll.2023.06.002. Epub 2023 Aug 5. PMID: 37865502.
4. Rothenberg-Thurley M, Amler S, Goerlich D, Köhnke T, Konstandin NP, Schneider S, Sauerland MC, Herold T, Hubmann M, Ksienzyk B, Zellmeier E, Bohlander SK, Subklewe M, Faldum A, Hiddemann W, Braess J, Spiekermann K, Metzeler KH. Persistence of pre-leukemic clones during first remission and risk of relapse in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2018 Jul;32(7):1598-1608. doi: 10.1038/s41375-018-0034-z. Epub 2018 Feb 23. PMID: 29472724; PMCID: PMC6035153.
5. De Stefano A, Marvi MV, Fazio A, McCubrey JA, Suh PG, Ratti S, Ramazzotti G, Manzoli L, Cocco L, Follo MY. Advances in MDS/AML and inositide signalling. *Adv Biol Regul.* 2023 Jan;87:100955. doi: 10.1016/j.jbior.2023.100955. Epub 2023 Jan 21. PMID: 36706610.