

**ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA**

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

**DOTTORATO DI RICERCA IN EMATOLOGIA CLINICA E
SPERIMENTALE**

Coordinatore: Prof. Stefano A. Pileri

**TERAPIA DI PRIMA LINEA DEL MIELOMA
MULTIPLO CON TALIDOMIDE-DESAMETASONE:
IDENTIFICAZIONE DI UNA "SIGNATURE"
PREDITTIVA DELL'OTTENIMENTO DELLA
RISPOSTA COMPLETA MEDIANTE STUDIO DEL
PROFILO DI ESPRESSIONE GENICA**

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA
XIX CICLO

Presentata da
Dott. Matteo Renzulli

Relatore
Chiar.mo Prof. Michele Cavo

Settore Scientifico Disciplinare: MED/15 MALATTIE DEL SANGUE

Anno Accademico 2005-2006

INDICE

1. INTRODUZIONE	3
1. IL MIELOMA MULTIPLO	4
1.1 LA PLASMACELLULA MIELOMATOSA	6
1.1.1 LA CITOGENETICA	6
1.1.2 LA TRANSLOCAZIONE t(4;14)	7
1.1.3 LA DELEZIONE DEL CROMOSOMA 13	8
1.1.4 LA CLASSIFICAZIONE TC	8
1.1.5 MODELLO DI CANCEROGENESI	9
1.2 IL MICROAMBEINTE MIDOLLARE	10
1.2.1 I FATTORI DI CRESCITA	11
1.2.2 IL-6 E INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-1	11
1.2.3 GLI OSTEOCLASTI	12
1.3 LA TERAPIA	13
1.4 STUDIO DEL PROFILO DI ESPRESSIONE GENICA: I MICROARRAY	16
1.4.1 TECNOLOGIA AFFYMETRIX	16
2. SCOPI	18
3. MATERIALI E METODI	20
3.1 SEPARAZIONE DELLE PLASMACELLULE	21
3.2 ESTRAZIONE DELL'RNA	21
3.3 FISH PER LA DETERMINAZIONE DELLA DEL(13) E DELLA DEL(17)	21
3.4 RETROTRASCRIZIONE	21
3.5 AMPLIFICAZIONE DEL GENE IBRIDO IgH/MMSET	22
3.6 STUDIO DEL PROFILO DI ESPRESSIONE GENICA: LA SINTESI DI cRNA BIOTINILIATO	22

3.7 STUDIO DEL PROFILO DI ESPRESSIONE GENICA: L'IBRIDIZZAZIONE	22
3.8 STUDIO DEL PROFILO DI ESPRESSIONE GENICA: L'ANALISI DEI DATI	22
3.9 CONFERMA DEL PROFILO DI ESPRESSIONE GENICA MEDIANTE MICROFLUIDIC CARD	23
3.10 CRITERI DI VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA ALLA TERAPIA CON TALIDOMIDE E DESAMETASONE	23
4. RISULTATI	25
4.1 ANALISI DEL PROFILO DI ESPRESSIONE GENICA	26
4.2 VALIDAZIONE DELLA LISTA DI GENI PREDITTIVI MEDIANTE MICROFLUIDIC CARD	30
5. DISCUSSIONE	33
6. BIBLIOGRAFIA	39

1. INTRODUZIONE

1. IL MIELOMA MULTIPLO

Il Mieloma Multiplo (MM) è una neoplasia caratterizzata dalla proliferazione e l'accumulo di linfociti B e di plasmacellule (PC), e dalla aumentata produzione di immunoglobuline (Ig) monoclonali complete o incomplete (componente M) rilevabili nel siero e/o nelle urine (1). Il quadro clinico caratteristico di presentazione della malattia è associato all'aumento della produzione di Ig, alle loro caratteristiche chimico-fisiche, alla produzione di citochine (CK) e all'espansione della massa neoplastica.

La patofisiologia del MM è caratterizzata da un'evoluzione a stadi, che prevede:

- a) una condizione iniziale di malignità asintomatica, definita Gammopatia Monoclonale di Incerto Significato (MGUS), riscontrabile approssimativamente nell'1% della popolazione d'età superiore ai 50 anni;
- b) uno stadio intermedio tra MGUS e MM effettivo, definito "MM smoldering", che non presenta ancora i sintomi clinici caratteristici del MM, ma che spesso, in un intervallo di tempo variabile, progredisce verso un MM sintomatico;
- c) uno stadio di MM sintomatico intramedullare, i cui sintomi clinici si manifestano come anemia, lesioni osteolitiche che colpiscono soprattutto lo scheletro assiale, osteoporosi diffusa, ipercalcemia, disfunzioni renali conseguenti a deposizione di Ig ed aumentato rischio d'infezione;
- d) uno stadio terminale di MM extramedullare, o Leucemia plasmacellulare (PCL), in cui le PC neoplastiche sono rilevabili in circolo e possono dare origine a lesioni extramedullari, come plasmacitomi dei tessuti molli (2).

Ad oggi, non sono stati identificati marcatori citogenetici o molecolari, che siano in grado di distinguere o predire in modo chiaro le differenze ed il progredire da uno stadio all'altro. Tuttavia alterazioni geniche e cariotipiche, che si riscontrano raramente nell'MGUS, ma che sono risultate frequenti nel MM sintomatico, sono ritenute le responsabili principali dell'evoluzione maligna della malattia (Figura 1) (2).

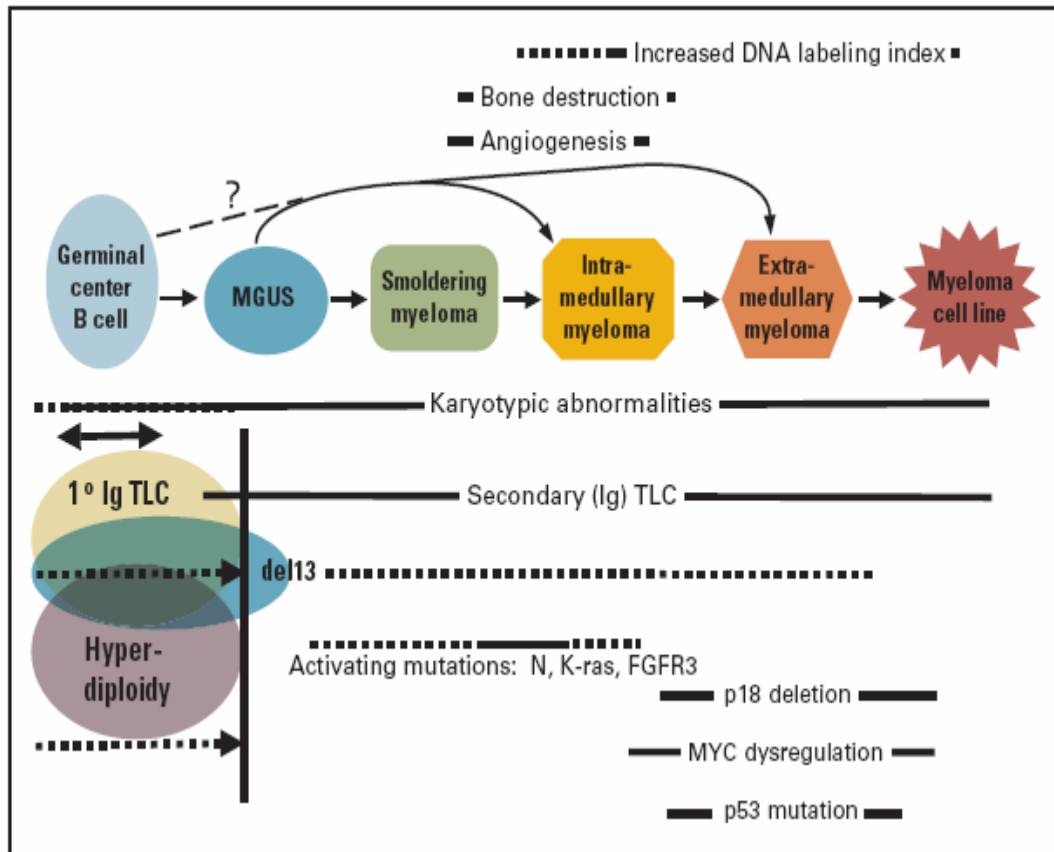


Figura 1. Evoluzione del MM e aberrazioni genetiche correlate.

Le PC mielomatose tendono ad accumularsi nel midollo osseo (MO) (raramente in altri organi e tessuti), dove crescono generalmente in ammassi, visibili ad una radiografia come focolai multipli di osteolisi; più raramente nel MO ci può essere una crescita diffusa che, nel caso, si manifesta in maniera simile ad una osteoporosi più o meno generalizzata. In entrambi i casi si osserva una maggiore fragilità delle ossa che sono predisposte a fratture "spontanee".

Il principale meccanismo di evasione dal sistema immunitario da parte delle PC mielomatose è di tipo diretto: induzione di apoptosi nei linfociti T che presentano il recettore Fas (Fas+) da parte delle PC neoplastiche che non lo presentano (Fas-) e rilascio di fattori solubili inibenti il sistema immunitario come il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), l'interleuchina 6 (IL-6) e l'interleuchina 1 (IL-1) prodotti tanto da cellule dello stroma, quanto dalle PC. E' stata inoltre messa in evidenza nel MM una "diseducazione" delle cellule dendritiche nel riconoscimento delle PC tumorali (3).

Nonostante una apparente uniformità biologica, l'instabilità genetica che caratterizza il MM porta ad avere, in sottogruppi diversi di pazienti, alterazioni cariotipiche ricorrenti (3, 4).

1.1 LA PLASMACELLULA MIELOMATOSA

Il clone tumorale nel MM è costituito da PC monoclonali, caratterizzate da una elevata instabilità cariotipica e definite da un immunofenotipo specifico; è ormai opinione comune che l'evento trasformante primario si realizzi a livello di un progenitore linfoide già andato incontro alla maturazione antigene-dipendente, che ha luogo all'interno del centro germinativo degli organi linfoidei secondari (primariamente i linfonodi). Come accade durante la normale linfocitopoiesi B, anche i precursori mielomatosi, che si sono originati in sedi periferiche, migrano specificatamente nel MO, dove stabiliscono strette interazioni con le cellule stromali del microambiente, ricevendo da queste segnali appropriati per proliferare e differenziarsi in PC mature. Queste interazioni sono alla base della localizzazione elettivamente midollare del MM.

1.1.1 LA CITOGENETICA

Da un punto di vista citogenetico, esiste una notevole eterogeneità a livello del clone neoplastico: alcune alterazioni cariotipiche sono ricorrenti, caratterizzando in questo modo sottogruppi di pazienti; altre sono del tutto sporadiche. In ogni caso non è stata descritta un' unica alterazione citogenetica che caratterizzi tutti i pazienti con MM, come accade invece per altre patologie leucemiche, come ad esempio per la Leucemia Mieloide Cronica (LMC), in cui il cromosoma (cr.) Philadelphia rappresenta il marcatore distintivo di tutte le cellule neoplastiche. In generale, nel MM si distinguono almeno quattro famiglie di aberrazioni cromosomiche (ipodiploidia, pseudodiploidia, iperdiploidia e ipotetraploidia), che essenzialmente possono essere suddivise in due gruppi: le iperdiploidie e le non-iperdiploidie (4). I pazienti iperdiploidi sono caratterizzati da trisomie multiple che possono interessare vari cromosomi (cr. 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 e 21 ma mai il 13). Le monosomie si presentano in entrambi i gruppi di pazienti, ma sono più comuni in quelli non-iperdiploidi, e coinvolgono spesso i cr. 13 e 14. Anomalie a carico del locus della catena pesante delle Ig (IgH), localizzato sul cr. 14q32, interessano oltre l'85% dei casi di non-iperdiploidia e quasi il 30% dei casi di

iperdiploidia (4). Le traslocazioni che coinvolgono il locus IgH sono sempre reciproche e sono stati descritti almeno cinque partner cromosomici ricorrenti (cr. 4p16.3, 6p25, 11q13, 16q23 e 20q11), la cui frequenza può raggiungere anche il 25 % (5). Queste anomalie sono state descritte, seppur con minor frequenza, anche negli stadi meno aggressivi della malattia e per questo vengono definite “primarie”. In ognuna di queste traslocazioni un proto-oncogene viene a trovarsi sotto il controllo trascrizionale dell’enhancer del gene IgH, situazione che causa una espressione deregolata di tale oncogene (*CCND1* sul cr. 11, *CNND3* sul cr. 6, *MMSET* e *FGFR3* sul cr. 4, *MAF* sul cr. 16, *MAFB* sul cr. 20). Si reputa che tali traslocazioni primarie insorgano nei centri germinali come errori nel processo di switch di classe, durante la maturazione dei linfociti B (5).

1.1.2. LA TRASLOCAZIONE t(4;14)

Una delle alterazioni cromosomiche descritte con maggiore frequenza nel MM è la t(4;14), riscontrata nel 25% dei casi all’esordio; essa è stata descritta anche nel 2% dei casi di MGUS (5;6). L’incidenza maggiore della traslocazione nel MM rispetto al MGUS suggerisce un possibile coinvolgimento di questa anomalia con la transizione da MGUS a MM, pur non essendo strettamente necessaria perché tale transizione avvenga. In questa traslocazione, la rottura cromosomica sul cr. 4 si verifica a livello di un cluster genico, i cui geni meglio caratterizzati che ne fanno parte sono *FGFR3* (gene della famiglia dei recettori per il fattore di crescita per i fibroblasti, FGFR), *TACC3* (gene della famiglia delle transforming acidic coiled-coil protein, TACC), e *MMSET* (gene codificante un dominio SET e contenente un dominio di legame per il DNA, omologo ai geni *WHSC* e *NSD2*). Il punto di rottura sul cr. 4 spazia in una regione di 113Kb compresa tra *FGFR3* e l’esone 5 di *MMSET*, all’interno della sua regione codificante: la conseguenza, piuttosto inusuale nel MM nonostante le diverse alterazioni possibili, è la formazione di geni ibridi tra *IgH* e *MMSET* su entrambi i derivativi della traslocazione (Figura 2) (6).

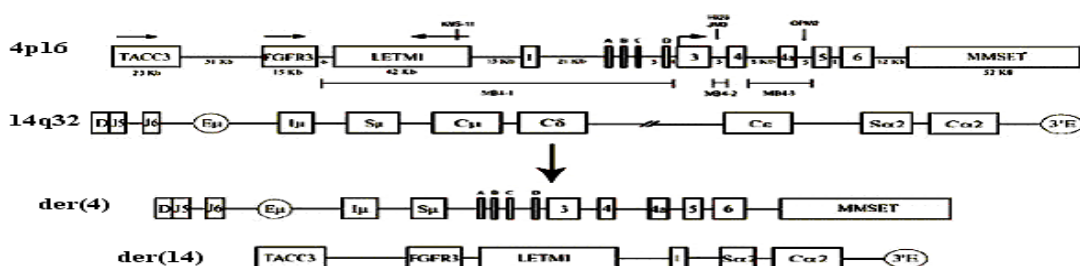


Figura 2. Geni coinvolti nella t(4;14).

1.1.3 LA DELEZIONE DEL CROMOSOMA 13 Un'altra anomalia

cromosomica che interessa complessivamente circa la metà dei casi di MM (pur essendo più comune nelle non-iperdiploidie), riguarda il cr. 13 e consiste nell'85% dei casi in una monosomia, nel 15% in una delezione di tale cromosoma –del(13)-.

Aberrazioni del cr. 13 sono state descritte anche in altri tipi di tumore, ma non si sono trovate specifiche alterazioni associabili alla cancerogenesi, tranne che per retinoblastoma e osteosarcoma. Tuttavia nella Leucemia Linfatica Cronica (LLC) e nel MM, eventi simili che coinvolgano il cr. 13 hanno mostrato riscontri clinici.

La t(4; 14) e la del(13) rivelano una forte associazione tra di loro e con la storia, le caratteristiche immunologiche, lo stadio clinico e la prognosi della malattia. Infatti la del(13) è associata a cattiva prognosi (sopravvivenza più breve e minor probabilità di risposta verso la terapia classica): la somministrazione di interferone alfa (INF- α) in terapia di mantenimento a pazienti con del(13) diminuisce la sopravvivenza (4).

1.1.4 LA CLASSIFICAZIONE TC In questi ultimi anni, i

progressi relativi alla tecnologia con cui è stato affrontato lo studio della patogenesi del mieloma (tecniche di citogenetica molecolare, studio del profilo di espressione genica), hanno suggerito la possibilità di una classificazione del MM sulla base della presenza di alcune alterazioni citogenetiche ricorrenti e dell'espressione di almeno una delle *ciclina D*. Infatti, è stato messo in evidenza come, indipendentemente dall'alterazione citogenetica descritta, gli eventi patogenetici iniziali comportino sempre la deregolazione trascrizionale di uno o più geni per le ciclina D (Figura 3) (5).

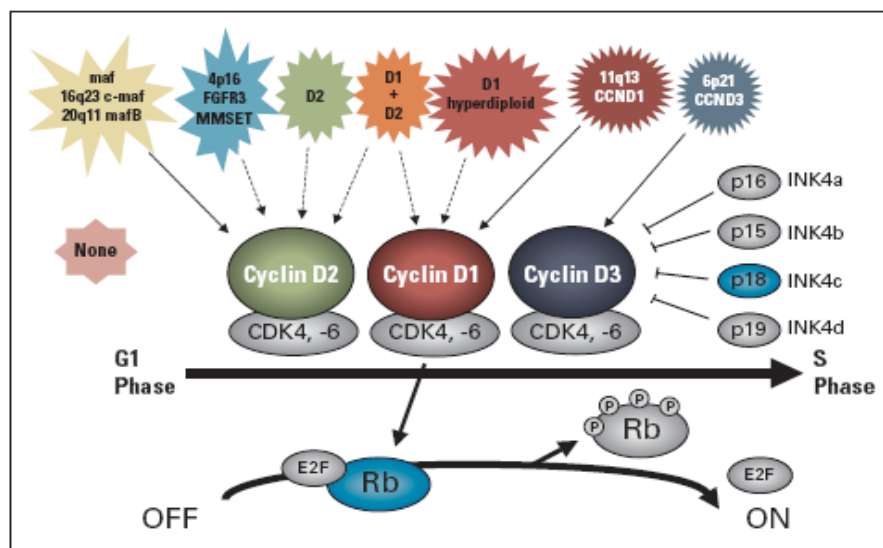


Figura 3. Deregolazione delle ciclina D e corrispondenti gruppi TC.

La deregolazione trascrizionale dei geni per la ciclina D è stata descritta anche in altri tumori iperdiploidi, e questo suggerisce che tale anomalia possa rappresentare un meccanismo patogenetico precoce comune a tutte le manifestazioni cliniche di queste patologie (5). In generale si può dire che nel MM la deregolazione delle *ciclina D* possa rendere la cellula più suscettibile a stimoli proliferativi, con il risultato di una espansione clonale selettiva in risposta all'interazione con le cellule stromali del MO. La classificazione TC prevede l'esistenza di otto sottogruppi di pazienti con MM, ciascuno contraddistinto da una specifica traslocazione del cr. 14 e dalla sovra-espressione di una o più *ciclina D* (Tabella 1) (5).

Classificazione Tc								
Group	Primary Translocation	Gene at Breakpoint	D-Cyclin	Ploidy	Proliferation Index	Bone disease (% MRI Pos)	Frequency (%)	Prognosis
6p21	6p21	CCND3	D3	NH	Average	100	3	? Good
11q13	11q13	CCND1	D1	D, NH	Average	94	16	Good
D1	None	None	D1	H	Low	88	34	Good
D1+D2	None	None	D1 and D2	H	High	100	6	? Poor
D2	None	None	D2	H, NH	Average	67	17	?
None	None	None	None	NH	Average	100	2	? Good
4p16	4p16	FGFR3/MMSET	D2	NH > H	Average	57	15	Poor
maf	16q23	c-maf	D2	NH	High	55	5	Poor
	20q11	mafB					2	

Abbreviations: MRI, magnetic resonance imaging; pos, positive; D, diploid; H, hyperdiploid; NH, nonhyperdiploid.

Tabella 1. Classificazione TC per il Mielosa Multiplo.

I vari sottogruppi risultano omogenei dal punto di vista cariotipico, con pattern di espressione genica distintivi e con fenotipi analoghi all'interno di ogni gruppo. La lettura della classificazione in termini di correlazioni tra riscontri clinici e aberrazioni permette infine di trarre conclusioni anche sul significato prognostico delle singole traslocazioni (5).

1.1.5 MODELLO DI CANCEROGENESI

Sulla base della "TC classification" è stato infine proposto per il MM un modello di cancerogenesi a più passaggi (similmente a quanto accade nei tumori solidi), in cui la traslocazione del cr. 14 rappresenta il primo evento trasformante ed insorge a monte dei progenitori plasmacellulari, mentre la del(13) sarebbe un evento successivo, sebbene comunque precoce, forse derivato dalle specifiche traslocazioni t(4;14) e t(14;16).

Col progredire della malattia insorgerebbero danni genetici secondari, che solitamente riguardano più di due partner cromosomici, che conferirebbero al clone plasmacellulare capacità proliferativa autonoma. Le cellule neoplastiche, non più

vincolate agli stimoli del microambiente, sarebbero così in grado di lasciare il MO, per entrare in circolo (nella fase finale della malattia aumentano infatti le PC circolanti) (3). In più del 50% dei casi di tali alterazioni secondarie è coinvolto il gene *c-Myc*, ma anche mutazioni puntiformi attivanti su geni quali *RAS* sembrano strettamente correlate all'evoluzione extramidollare della neoplasia (3).

1.2 IL MICROAMBIENTE MIDOLLARE

Nella normale B-linfocitopoiesi, avvenuto lo switch di classe negli organi linfoidi periferici, i plasmablasti migrano nel MO per differenziarsi a PC mature. Allo stesso modo i precursori neoplastici mielomatosi raggiungono il midollo dove maturano a PC grazie al contatto con le cellule del microambiente midollare e le CK e i GF prodotti in conseguenza a queste interazioni sia da PC che da cellule dello stroma. Le interazioni tra PC mielomatose e cellule del MO da un lato mantengono vitali e proliferanti le PC, dall'altro modificano il metabolismo delle cellule del microambiente: questa modifica è alla base delle conseguenze cliniche a carico del tessuto osseo in pazienti con MM (Figura 4) (1).

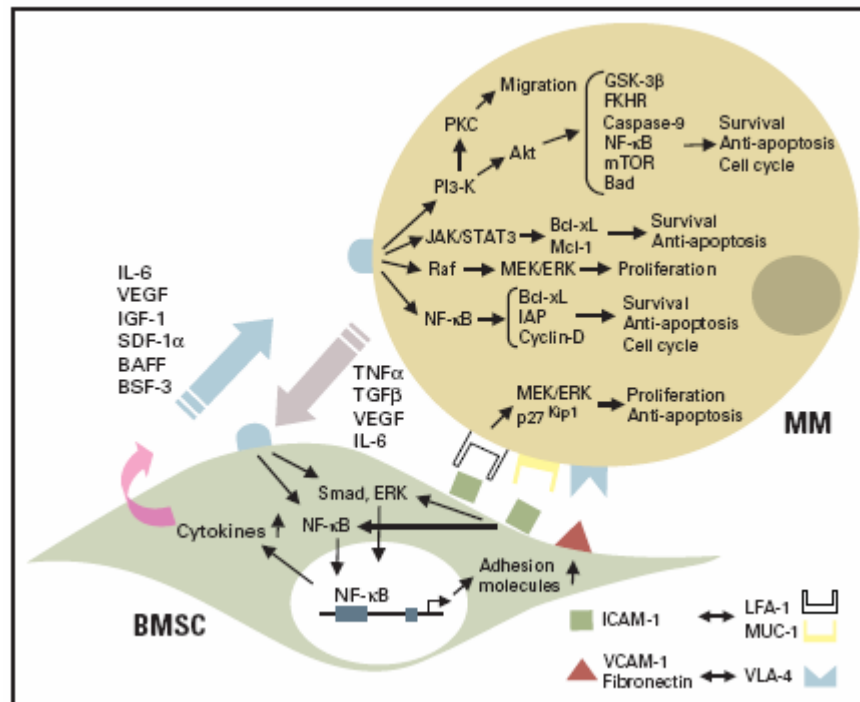


Figura 4. Interazioni tra cellule del microambiente midollare e cellule neoplastiche di Mieloma Multiplo.

1.2.1 I FATTORI DI CRESCITA

La proliferazione del clone mielomatoso nel MO è una sorta di fase d'accumulo che dipende direttamente dagli stimoli che derivano dal microambiente attraverso reciproche interazioni e stimolazioni (1) sia per mezzo di mediatori solubili (CK, fattori angiogenetici, metalloproteinasi) sia grazie ad un aumento dell'espressione di molecole d'adesione. Le cellule dello stroma e le PC mielomatose, in contatto diretto attraverso le integrine, aumentano il loro rilascio nel microambiente di CK come l'IL-6, il VEGF e il Tumor Necrosis Factor alfa (TNF α) che concorrono alla crescita, progressione e diffusione del MM. In particolare, il TNF α secreto up-regola l'espressione di molecole d'adesione e concorre alla sopravvivenza delle cellule neoplastiche proteggendole dall'apoptosi. Inoltre porta all'attivazione del Nuclear Factor-kappaB (NFkB), fattore di trascrizione che, una volta attivato, promuove la trascrizione di IL-6. Il VEGF promuove l'angiogenesi e la migrazione delle plasmacellule tumorali; la sua sintesi è stimolata da IL-6 e un suo effetto sul metabolismo cellulare è quello di indurre trascrizione e secrezione proprio di IL-6.

1.2.2 IL-6 E INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-1

Tra i mediatori in gioco, un ruolo importante è ricoperto da IL-6 che agisce sulle cellule neoplastiche attraverso un meccanismo autocrino e paracrino, inducendo principalmente 4 effetti:

- promuove la sopravvivenza cellulare attraverso la fosforilazione di STAT3;
- induce proliferazione cellulare attivando diverse vie di trasduzione del segnale, come le vie RAS, RAF, MAPK;
- protegge dall'apoptosi;
- induce la secrezione di VEGF.

Nella fase d'accrescimento del clone, le cellule dello stroma e le PC producono livelli di IL-6 notevolmente più alti che determinano un'intensa proliferazione, un aumento della neovascolarizzazione midollare e della secrezione di fattori angiogenetici e metalloproteinasi.

Nell'ambito dei mediatori della crescita del clone neoplastico, recentemente è stata inserita anche l'Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1), che si è scoperto aver azione sinergica a quella di IL-6 nel promuovere la proliferazione delle PC (Figura 5). Come IL-6, anche IGF-1 attiva sia la chinasi Akt (anche se IL-6 in maniera costitutiva, mentre IGF-1 in modo proporzionale alla sua concentrazione) sia la chinasi MAPK

(nonostante attraverso effettori diversi): entrambe le vie di trasduzione attivate portano a proliferazione e a protezione dall'apoptosi

Alcuni studi *in vitro* hanno riconosciuto due fasi nella progressione del MM: una prima fase in cui il clone è "IL-6 dipendente", ed una seconda in cui esso è "IL-6 indipendente" (anche se non sempre la malattia evolve verso questa fase). Poiché le linee "IL-6 indipendenti" mostrano un'espressione molto maggiore del recettore di IGF-1 (IGF-1R) rispetto alle linee "IL-6 dipendenti", è stato ipotizzato che IGF-1 sia tra le CK o i fattori di crescita responsabili del mantenimento e della progressione della malattia per quei cloni che non rispondono più a IL-6, oltre ad avere un effetto sinergico alla presenza di IL-6 (8).

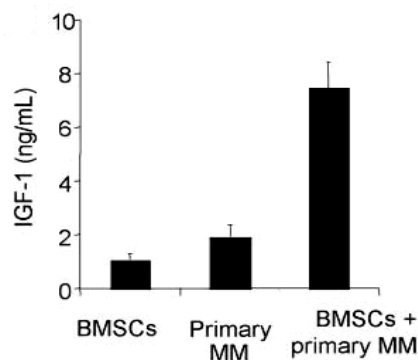


Figura 5. Differenze di produzione di IGF-1 in colture singole e co-culture di linee di MM e cellule del midollo

1.2.3 GLI OSTEOCLASTI

La patologia scheletrica costituisce

la più frequente e severa manifestazione clinica del MM. Si manifesta con osteoporosi di severità variabile, lesioni osteolitiche, quadri di compressione midollare, disturbi del metabolismo del calcio e insufficienza renale. Sul piano patogenetico, la perdita di massa ossea è la conseguenza dell'esaltata attività degli osteoclasti, del loro aumentato reclutamento e della prolungata sopravvivenza cui non corrisponde un'adeguata formazione di nuovo osso per inibizione dell'attività degli osteoblasti. La maturazione degli osteoclasti è mediata normalmente dalla produzione del Receptor Activator of Nuclear Factor kappaB ligand (RANK-L) da parte delle cellule stromali, degli osteoblasti e dei linfociti T. Quando RANK-L lega il recettore RANK sulla membrana degli osteoclasti, questi vanno incontro a maturazione, determinando un incremento del processo di riassorbimento osseo. Le stesse cellule presentano però in superficie anche le osteoprotegerine (OPG), capaci di legare RANK-L, impedendole così di

riconoscere i recettori RANK. Nel MM questo equilibrio tra RANK e OPG per il legame con RANK-L, che regola il riassorbimento osseo, è spostato a favore di RANK, sia perché le PC contattano le cellule stromali inducendo una degradazione di OPG, sia perché gli alti livelli di IL-6 nel microambiente inducono i linfociti T a sintetizzare molta più RANK-L. Gli osteoclasti stessi sono in grado di produrre IL-6 in basse concentrazioni, ma in co-coltura con PC, la produzione aumenta molto (Figura 5). Quindi, la presenza simultanea di PC e cellule dello stroma midollare nel MO, da una parte attiva maggiormente gli osteoclasti, dall'altra promuove la proliferazione e la protezione dall'apoptosi nelle PC neoplastiche (3).

1.3 LA TERAPIA

La terapia convenzionale del MM prevede un trattamento chemioterapico basato sull'impiego di farmaci appartenenti alle famiglie dei glucocorticoidi, degli alchilanti, delle nitrosuree e degli alcaloidi della vinca. L'efficacia di tale terapia in merito al decorso fatale della malattia e alla modifica della sua storia naturale è bassa, in quanto i trattamenti non sono in grado di eradicare il clone mielomatoso e spesso l'effetto di tali farmaci è vanificato dall'insorgenza di resistenze.

Un importante passo avanti è stato rappresentato dall'introduzione della chemioterapia ad alte dosi, che peraltro porta anch'essa a complicanze fatali; soltanto attraverso il trapianto di cellule staminali autologhe da MO o, più recentemente, da sangue periferico (PBSC) è stato possibile migliorare l'esito della patologia. Inoltre, con l'obiettivo di superare le farmacoresistenze e ridurre al minimo la massa tumorale, è possibile incrementare ulteriormente la dose citotossica, associandola ad un doppio autotrapianto.

Il doppio autotrapianto come terapia di prima linea per il MM è in grado di prolungare significativamente la durata della remissione e della sopravvivenza libera da eventi (EFS); inoltre i maggiori benefici clinici sono stati conseguiti da quei pazienti per cui non c'era stata risposta a chemioterapie convenzionali di prima linea e/o non avevano raggiunto remissione completa dopo trapianto autologo.

Recentemente sono andati delineandosi nuovi scenari terapeutici per la cura del MM basati su farmaci non chemioterapici, in grado di esercitare la propria attività, oltre che sulle cellule neoplastiche, anche sull'interazione di queste con le cellule del

microambiente midollare, interferendo con processi cruciali ai fini della crescita e progressione del tumore, come ad esempio la neoangiogenesi (10). Oltre all'impiego di farmaci di nuova scoperta la ricerca si è mossa anche in direzione dello studio di composti già noti, utilizzati per altre patologie, che potessero essere attivi anche verso i target farmacologici individuati dalle terapie contro il MM.

Talidomide rappresenta il paradigma di questo tipo di approccio terapeutico: dopo il ritiro dal commercio e il conseguente abbandono dalle terapie, negli ultimi anni ha trovato nuovi impieghi farmacologici in patologie AIDS-correlate, nel trattamento della Graft Versus Host Disease (GVHD) cronica e nel sarcoma di Kaposi.

La dimostrazione *in vitro* di un sinergismo tra Talidomide e Desametasone (tali-dex) e la capacità di Talidomide di indurre una sovraespressione dei recettori per i glucocorticoidi sulla membrana delle PC neoplastiche, ha condotto allo studio *in vivo* di una associazione dei due farmaci come terapia di salvataggio nel trattamento di pazienti di MM in fase di avanzata refrattarietà con una risposta che si attestava intorno al 50%. I risultati positivi hanno infine portato alla messa a punto di una terapia di prima linea in pazienti alla diagnosi di MM sintomatico che ha dimostrato una percentuale di risposta attorno al 65-70%.

A livello molecolare il farmaco interferisce con lo sviluppo della neoplasia agendo su vari fronti:

- sfavorisce l'angiogenesi, modulando in cellule endoteliali l'espressione di molecole di adesione e la produzione di fattori angiogenetici come bFGF e VEGF;
- ha attività antitumorale, esercitando un effetto diretto antiproliferativo e apoptotizzante, modulando l'espressione di molecole d'adesione e inibendo la produzione da parte delle cellule stromali di CK coinvolte con il mantenimento della malattia (IL-6, TNF α , IL-1 β , IL-10);
- modula il sistema immunitario, stimolando la proliferazione di linfociti T citotossici e inducendo la produzione da parte di questi di CK antinfiammatorie (IL-2 e IFN γ). (Figura 6).

Gli effetti collaterali di maggior gravità causati dall'impiego di Talidomide consistono principalmente in un aumento dell'incidenza di tromboembolie venose e in neuropatie periferiche, che possono diventare irreversibili qualora non se ne interrompa la somministrazione.

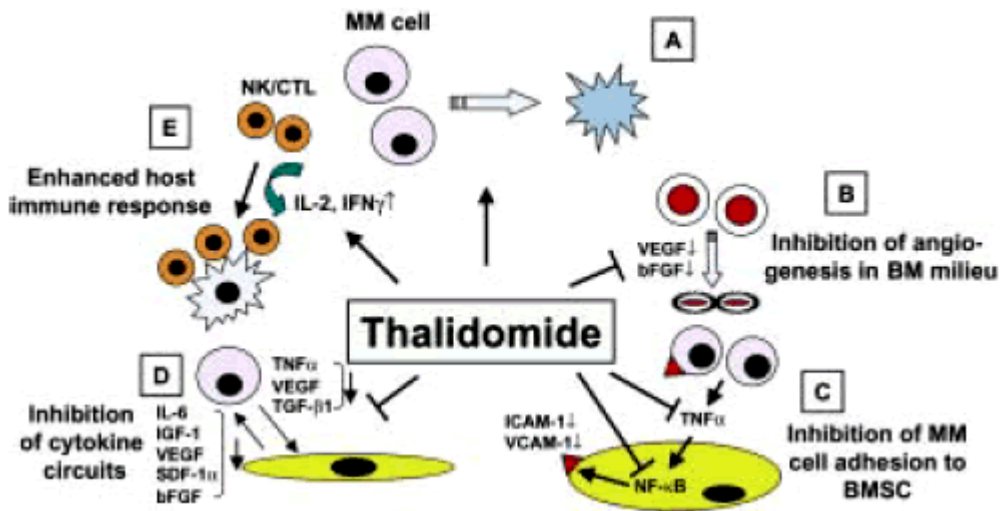


Figura 6. Pathways molecolari su cui interagisce Talidomide.

Nel nostro Istituto si è recentemente concluso un protocollo terapeutico per il MM, il protocollo “Bologna 2002”, che prevedeva un trattamento dei pazienti all’esordio con un’associazione di tali-dex in un programma multifase di progressivo aumento della concentrazione di dose citotossica, sino all’esecuzione di un doppio trapianto autologo di cellule staminali da PBSC (Figura 7).

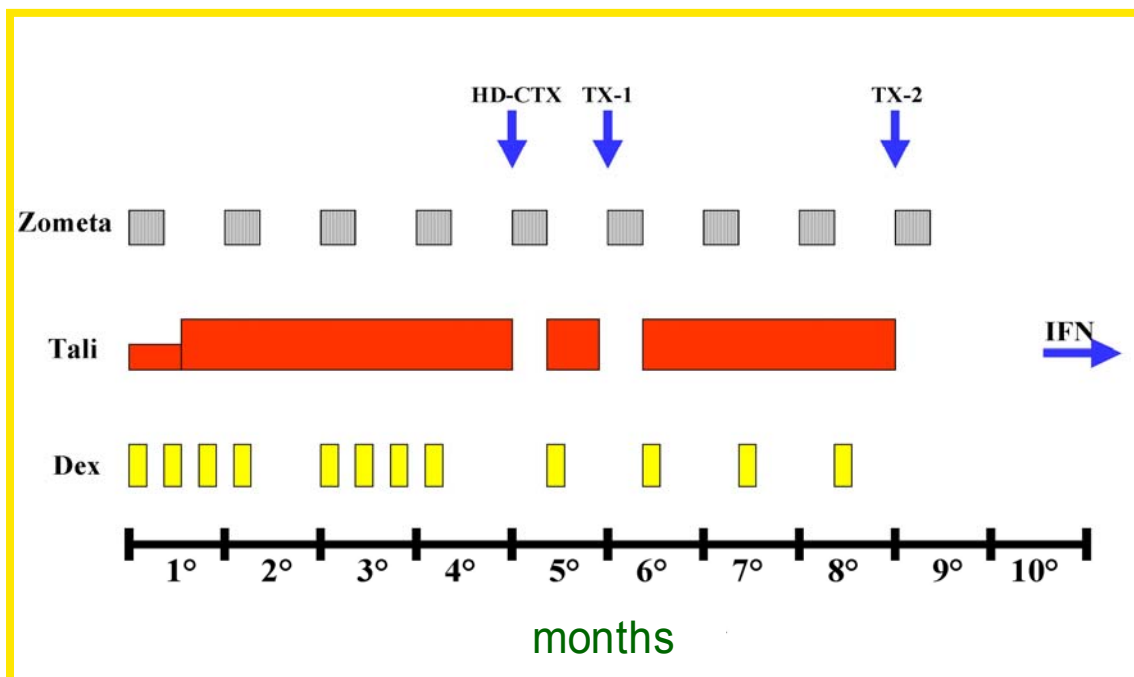


Figura 7. Prospetto del protocollo BOLOGNA-2002.

1.4 STUDIO DEL PROFILO DI ESPRESSIONE GENICA: I MICROARRAY

La tecnologia dei microarray si basa sulla capacità di *ibridizzazione* degli acidi nucleici, secondo cui due filamenti di acido nucleico ibridizzano tra di loro se sono complementari l'uno all'altro. Questa tecnologia permette di analizzare migliaia di geni contemporaneamente.

Nei microarray le sonde oligonucleotidiche complementari per le diverse sequenze di DNA o RNA vengono bloccate su una superficie di vetro. Sonde diverse possono essere posizionate alla distanza di qualche micron l'una dall'altra in modo da disporre un numero molto elevato in pochi centimetri quadrati. Il campione in studio viene marcato con fluorocromi e lasciato ibridizzare con le sonde presenti sul microarray. Dopo aver lavato l'eccesso di materiale non ibridizzato, i fluorocromi legati al campione ibridizzato vengono eccitati con un laser di opportuna lunghezza d'onda che scandisce la superficie del chip. Poiché la posizione delle sonde è individuabile grazie ad uno schema a mappa cartesiana, è possibile quantificare l'ammontare di campione ibridizzato a partire dall'immagine generata con lo scanner. La concentrazione di un particolare mRNA è il risultato dell'espressione del gene da cui esso viene trascritto; per questo motivo le applicazioni che fanno uso di microarray a cDNA vengono spesso denominate *analisi dell'espressione genica*.

Per l'analisi dell'espressione sono presenti sul mercato due tecnologie dominanti: Affymetrix, Inc. GeneChip e quella degli "spotted" array a cDNA.

1.4.1 TECNOLOGIA AFFYMETRIX Affymetrix utilizza attrezzature simili a quelle che servono a realizzare i chip di silicio per i computer, che consentono di avere una produzione massiva di chip ad un costo ragionevole. Così come i chip per computer sono fatti utilizzando maschere che controllano il processo di deposizione e rimozione del silicio dalla superficie del chip, analogamente Affymetrix usa maschere di controllo della sintesi degli oligonucleotidi sul microarray. Il risultato di questo processo è la produzione di alcune centinaia di migliaia di oligonucleotidi differenti, ciascuno dei quali presente in milioni di copie sul vetrino. Per l'analisi di espressione sono utilizzati gruppi di sonde di almeno 40 oligonucleotidi per gene; Affymetrix ha selezionato, per ogni gene, una regione con la minor omologia con altri geni. A partire da questa regione vengono disegnati da 11 a

20 oligonucleotidi rappresentativi del *perfect match* (PM), cioè della perfetta complementarità con l'mRNA bersaglio, e 11-20 oligonucleotidi identici ai precedenti tranne che per il nucleotide centrale, utili per rilevare il *mismatch* (MM), cioè la non perfetta complementarità, in questo modo è possibile mettere in evidenza la presenza di segnali aspecifici permettendo di rilevare con maggior sicurezza i segnali deboli.

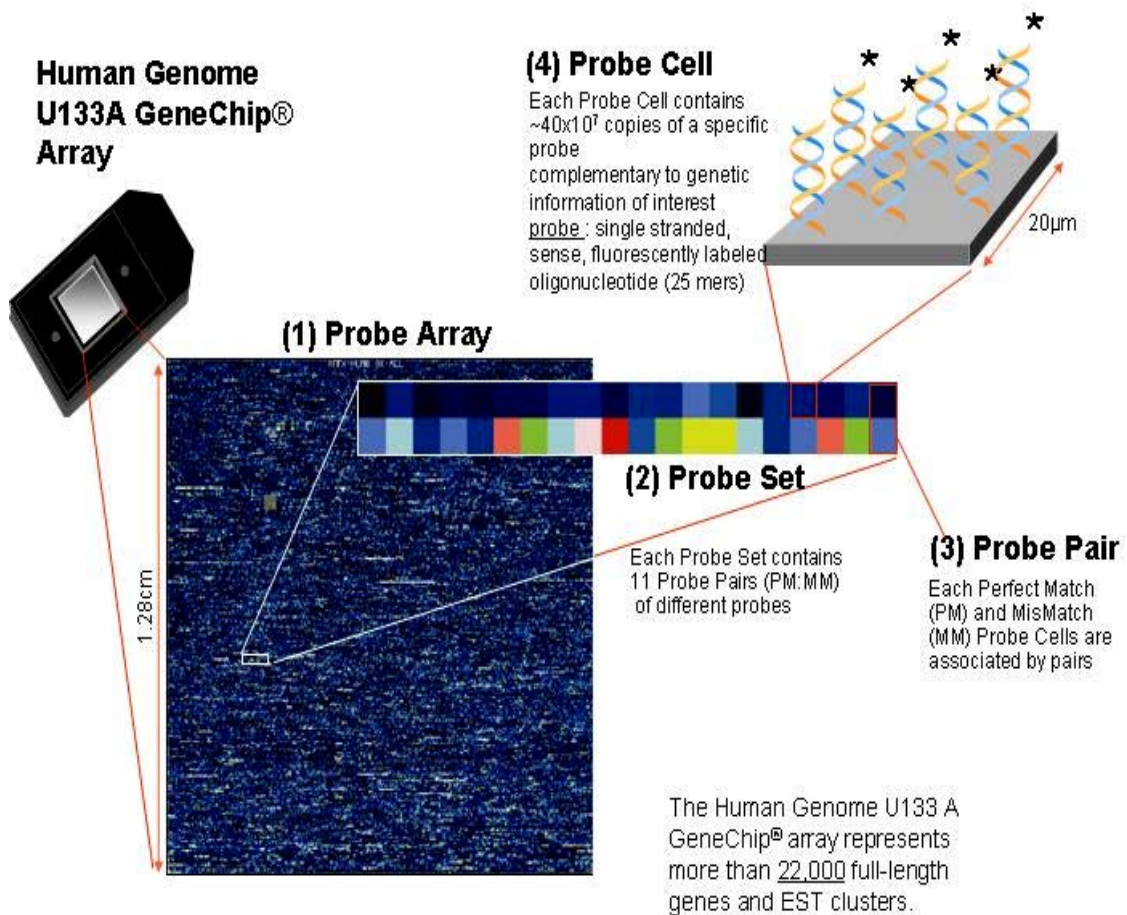


Figura 8. Tecnologia Affymetrix.

2. SCOPI

Gli obiettivi di questo studio sono stati i seguenti:

- 1) identificare un caratteristico pattern di espressione genica (*signature*), in grado di predire, in pazienti con MM all'esordio, la risposta ad una terapia primaria di induzione con tali-dex;
- 2) sviluppare un sistema semplice e riproducibile di analisi dei pazienti all'esordio della malattia, tramite Custom Array o Microfluidic Card con un numero limitato di geni, in grado di personalizzare la terapia più efficace per il singolo paziente;
- 3) studiare e caratterizzare i processi biologici in cui sono coinvolti i geni presenti nella *signature*, per poter sviluppare nuove e più efficaci terapie mirate.

Il piano sperimentale che è stato impostato per perseguire questi obiettivi ha previsto due fasi sperimentali successive. Nella prima fase dello studio è stato analizzato il profilo di espressione genica di 32 pazienti affetti da MM per individuare una *signature* in grado di identificare quelli che avevano conseguito almeno una nRC e per identificare all'interno di questa *signature*, una lista di geni che permetta di predire una nRC.

Nella seconda fase dello studio è stata testata la predittività di questa lista, adottando il metodi di analisi quantitativa della Real Time PCR.

3. MATERIALI E METODI

3.1 SEPARAZIONE DELLE PLASMACELLULE

La separazione della frazione cellulare CD138+ è stata eseguita utilizzando la tecnologia delle biglie immunomagnetiche; in particolare è stato utilizzato lo strumento AutoMacs (Miltenyi), che permette di effettuare la separazione con una purezza del campione del 90%. L'utilizzo di questo strumento consente inoltre l'ottimizzazione dei tempi di separazione, permettendo così di separare numerosi campioni nel corso della stessa giornata. I campioni separati sono stati conservati in una soluzione contenente Guanidinio Isotiocianato (RLT, Qiagen) ad una temperatura di -80°C.

3.2 ESTRAZIONE DELL'RNA

L'RNA totale è stato estratto da ciascun campione utilizzando i kit RNeasy Mini kit o RNeasy Micro kit (Qiagen), a seconda della quantità di cellule di partenza del campione stesso. L'RNA è stato quindi sottoposto ad un'analisi quantitativa mediante lo strumento Nanodrop (NanoDrop Technologies), che consente di effettuare delle analisi estremamente precise con un minimo dispendio di campione. Infine è stata valutata la qualità dell'RNA estratto tramite lo strumento Bioanalyzer, che esprime la qualità dell'acido nucleico sotto forma di una valutazione numerica, il cosiddetto RIN (RNA Integrity Number), che consente di selezionare adeguatamente i campioni.

3.3 FISH PER LA DETERMINAZIONE DELLA DEL(13) E DELLA DEL(17)

Per l'analisi della delezione del cromosoma 13 sono state utilizzate le sonde LSI 13 Spectrum Green e D13S319 (Vysis Inc.) che ibridizzano al locus 13q14. Le sonde utilizzate per la caratterizzazione della delezione 17p sono state invece: LSI p53, Spectrum Red (Vysis Inc.) specifica per il locus p53 nella banda 17p13 e CEP 17, Spectrum Green (Vysis Inc.) specifica per la zona centromerica del 17. Per ogni paziente sono state analizzate, dove possibile, almeno 200 plasmacellule.

3.4 RETROTRASCRIZIONE

Per ciascun campione, la retrotrascrizione a cDNA è stata eseguita a partire da una quantità di partenza pari a 100ng di RNA, utilizzando il kit SuperScriptII First Strand (Invitrogen).

3.5 AMPLIFICAZIONE DEL GENE IBRIDO IgH/MMSET

Le tre rotture cromosomiche più frequenti sul cromosoma 4 determinano la formazione di almeno 3 geni ibridi di lunghezza diversa; l'utilizzo di un primer sense localizzato sul gene *IgH* e di un primer antisense localizzato sull'esone 6 del gene *MMSET*, ha consentito di evidenziare la presenza del trascritto nei pazienti positivi per la t(4;14) con una sensibilità pari a 10^{-5} .

3.6 STUDIO DEL PROFILO DI ESPRESSIONE GENICA: LA SINTESI DI cRNA BIOTINILIATO

Le reazioni di sintesi del target biotinilato sono state effettuate utilizzando i protocolli standard forniti dal fornitore (Affymetrix). Grazie al nuovo kit disponibile GeneChip® Expression 3' Amplification Two Cycle Target Labelling Control Reagents (Invitrogen) è possibile utilizzare per l'esperimento soltanto 100ng. La quantità del prodotto finale è stata determinata mediante lo strumento Nanodrop, mentre la qualità tramite lo strumento Bioanalyzer.

3.7 STUDIO DEL PROFILO DI ESPRESSIONE GENICA: L'IBRIDIZZAZIONE

5 µg del campione di cRNA biotinilato sono stati frammentati ed ibridizzati sul chip Affymetrix HG133 2.0 Plus Gene Chip Array.

3.8 STUDIO DEL PROFILO DI ESPRESSIONE GENICA: L'ANALISI DEI DATI

I CEL file, ciascuno corrispondente al profilo di espressione di ogni singolo paziente, sono stati ottenuti grazie all'elaborazione delle immagini dei chip utilizzando lo scanner Affymetrix 300 sito presso il laboratorio del Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università degli Studi di Modena.

L'analisi dei dati è stata eseguita tramite l'utilizzo di vari pacchetti di software, in particolare è stato utilizzato GeneSpring 7.3 software standard per l'analisi di Array Affymetrix e appositi algoritmi originali sviluppati in ambiente R e Matlab per l'implementazione delle più moderne tecniche di classificazione e validazione statistica. Infine tramite l'utilizzo di software innovativi quali Ingenuity e l'applicazione di tecniche fisico-statistiche derivate dalla Teoria dei Network

(implementate con Matlab e R) è stato possibile individuare la funzione di tutti questi geni e i *pathway* in cui risultino essere coinvolti.

3.9 CONFERMA DEL PROFILO DI ESPRESSIONE GENICA MEDIANTE MICROFLUIDIC CARD

Le Microfluidic Card (Figura 9) costituiscono un innovativo sistema di analisi quantitativa che permette di analizzare contemporaneamente i livelli di espressione genica di numerosi geni di uno stesso paziente.

Una volta identificato un numero limitato di geni predittori della risposta alla terapia, tali geni sono stati utilizzati per progettare e allestire le Microfluidic Card. Il 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem) è lo strumento che viene utilizzato per l'analisi di queste Card. I dati prodotti sono stati analizzati utilizzando il metodo della quantificazione relativa del $\Delta\Delta C_t$, con *GAPDH* come gene endogeno di riferimento.

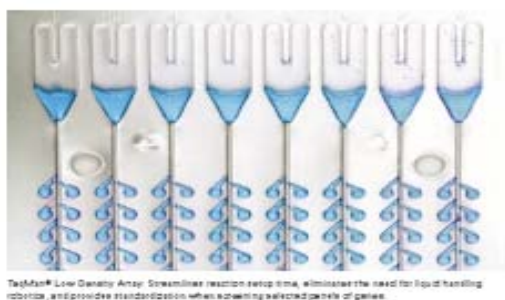


Figura 9. Microfluidic Card.

3.10 CRITERI DI VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA ALLA TERAPIA CON TALIDOMIDE E DESAMETASONE

RISPOSTA COMPLETA (RC) E RISPOSTA QUASI COMPLETA (nearCR, nRC):

1. scomparsa della componente M all'elettroforesi delle proteine +/- immunofissazione;
2. assenza di nuove lesioni osteolitiche (con esclusione dei crolli vertebrali) o aumento dimensionale di preesistenti osteolisi.

VERY GOOD PARTIAL RESPONSE (VGPR):

1. riduzione della componente M sierica $\geq 90\%$ rispetto al valore iniziale;
2. assenza di nuove lesioni osteolitiche (con esclusione dei crolli vertebrali) o aumento dimensionale di preesistenti osteolisi.

RISPOSTA PARZIALE (RP):

1. riduzione della componente M sierica $\geq 50\%$ rispetto al valore iniziale o, in caso di MM Bence Jones, riduzione della escrezione di catene leggere libere urinarie $\geq 75\%$ del valore iniziale;

2. assenza di nuove lesioni osteolitiche (con esclusione dei crolli vertebrali) o aumento dimensionale di preesistenti osteolisi.

NON RISPOSTA:

1. riduzione della componente M sierica $< 50\%$ rispetto al valore iniziale o, in caso di MM Bence Jones, riduzione di escrezione di catene leggere libere urinarie $< 75\%$ del valore iniziale;

2. assenza di nuove lesioni osteolitiche (con esclusione dei crolli vertebrali) o aumento dimensionale di preesistenti osteolisi.

PROGRESSIONE:

1. aumento della componente M sierica $\geq 25\%$ del valore iniziale (e di almeno 500 mg/dl come valore assoluto) o, in caso di MM Bence Jones, della proteinuria di Bence Jones $\geq 25\%$ del valore iniziale (e di almeno 200 mg/die come valore assoluto) (confermati a due determinazioni successive, distanziate di 3 settimane l'una dall'altra);

2. comparsa di nuove lesioni osteolitiche (con esclusione dei crolli vertebrali) o aumento dimensionale di preesistenti osteolisi.

4. RISULTATI

4.1 ANALISI DEL PROFILO DI ESPRESSIONE GENICA

Nella prima parte di questo studio è stata eseguita l'analisi del profilo di espressione genica in un gruppo di 32 pazienti con MM all'esordio, arruolati nel protocollo "Bologna 2002"; questo gruppo di pazienti rappresenta il "training set". Tutti i pazienti inclusi in questo studio avevano completato la terapia di induzione in preparazione al doppio trapianto autologo di cellule staminali del sangue periferico che prevedeva un trattamento per 4 mesi con tali-dex. Le caratteristiche cliniche dei pazienti e la risposta alla terapia di induzione sono indicate rispettivamente nelle tabelle 2 e 3. Sei dei pazienti del "training set" avevano ottenuto una nRC (19%).

N° pazienti	32
Età mediana (<i>range</i>)	58 (40 - 65)
Sesso (M/F)	18/14
Hb mediana (<i>range</i>)(g/dL)	11.3 (6.9 – 15.2)
PLTs x103 mediana (<i>range</i>)	242 (40 - 475)
β2-m mediana (<i>range</i>) (mg/L)	2.7 (1 – 11.8)
CRP mediana (<i>range</i>) (mg/L)	0.34 (0.05 – 5.3)
LDH mediana (<i>range</i>) (UxL)	317 (120 - 2325)
%PC mediana (<i>range</i>)	50 (10 -100)
Stadio I (%)	3 (9%)
Stadio II (%)	7 (22%)
Stadio III (%)	22 (69%)

Tabella 2. Caratteristiche cliniche dei 32 pazienti del "training set".

N° pazienti	32	} 19%
RC (%)	5 (16%)	
nRC (%)	1 (3%)	
VGPR (%)	2 (6%)	
RP (%)	10 (31%)	
NR (%)	11 (34%)	
progressione (%)	3 (9%)	

Tabella 3. Risposte alla terapia di induzione con tali-dex dei 32 pazienti del "training set".

I pazienti sono stati suddivisi in due sottogruppi a seconda della risposta ottenuta in seguito alla terapia: il primo sottogruppo comprende i pazienti che hanno ottenuto almeno una nRC, mentre il secondo comprende quelli la cui risposta è stata al massimo una RP, includendo quindi anche i pazienti in progressione e quelli che non hanno risposto.

L'analisi condotta sul "training set" ha permesso di individuare una *signature* in grado di distinguere il sottogruppo di pazienti che avevano ottenuto una nRC rispetto agli altri. Inoltre nell'ambito di questa *signature* è stata individuata una lista di geni i cui valori di espressione sono in grado di predire l'ottenimento di questa nRC.

L'analisi dei dati ha previsto i seguenti step successivi:

1) è stata effettuata in primo luogo una selezione iniziale dei geni, che ha permesso di scartare tutti quei geni i cui segnali di emissione erano troppo bassi o poco puliti, poiché questi segnali possono essere in realtà causa di rumore di fondo e non dovuti all'effettiva espressione di questi geni, quindi dei 54675 geni inizialmente presenti sui Chip HG-U133 Plus (Affymetrix), il numero è stato ridotto a 22647.

2) Su questi 22647 geni è stata poi condotta l'analisi che ci ha portato alla definizione di una *signature* in grado di distinguere i due diversi sottogruppi di pazienti che abbiano o meno ottenuto una nRC. È stato quindi applicato un filtro che ci ha permesso di selezionare solo quei geni che presentassero un fold change (ovvero una differenza dei livelli di espressione tra i pazienti appartenenti ai due diversi sottogruppi) superiore o uguale a 2, riducendo così il numero dei geni da analizzare a 413.

3) Infine è stata applicata un'analisi di varianza (Anova), adoperando una correzione di Benjamini e con un grado di significatività pari allo 0,05, che ci ha permesso di individuare una *signature* di **162 geni** in grado di poter definire i due diversi sottogruppi di pazienti.

È stato inoltre creato un cluster genico la cui rappresentazione grafica (Figura 10) mostra come effettivamente il profilo di espressione di questi 162 geni è omogeneo tra i 6 pazienti che abbiano ottenuto almeno una nRC, mentre il profilo di espressione degli altri pazienti appare più eterogeneo.

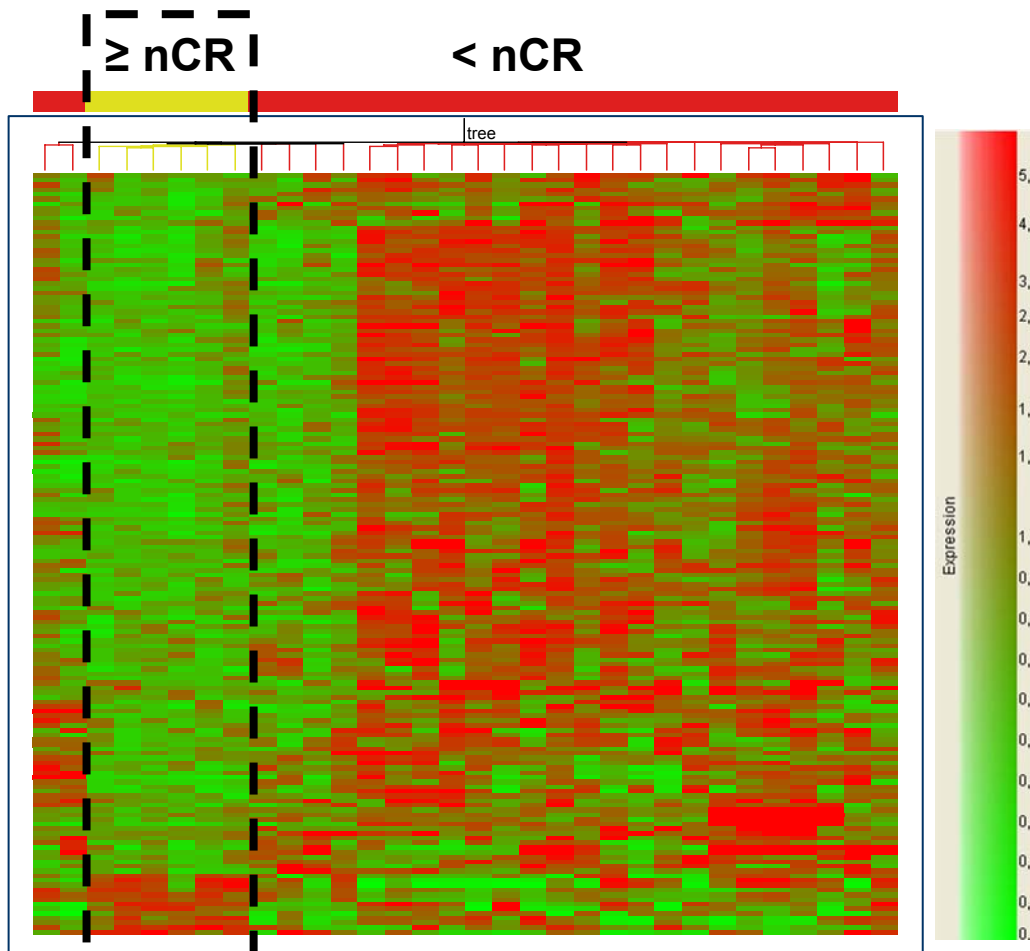


Figura 10. Cluster genico della signature di 162 geni in grado distinguere i pazienti in nRC.

L'individuazione dei processi in cui sono coinvolti i geni individuati è stata possibile grazie all'utilizzo del software "Ingenuity" (Figura 11).

I geni che compongono la *signature* sono coinvolti in processi biologici quali la morte cellulare, il ciclo cellulare, la crescita e la proliferazione cellulare. Tutti questi processi di regolazione potrebbero essere causa di un mancato ottenimento di una nRC in seguito ad una terapia di induzione con tali-dex.

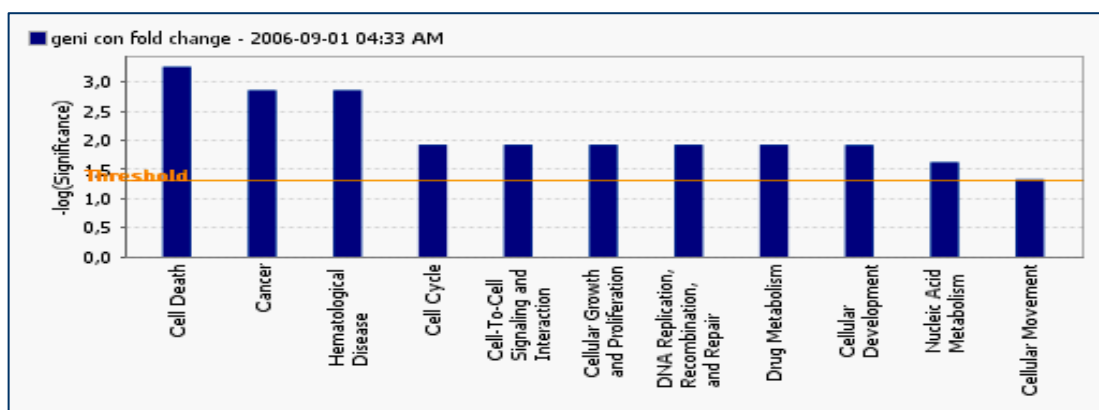


Figura 11. Processi cellulari in cui risultano essere coinvolti i 162 geni della *signature*.

La *signature* identificata è stata considerata come il punto di partenza per individuare una lista di geni in grado di predire l'ottenimento di una nRC. Ciò è stato possibile utilizzando dei metodi statistici, in particolare la "Nearest-Neighbours" (NN) che ci ha permesso di selezionare una lista di **31 geni** con il più alto valore predittivo; in seguito è stata effettuata una validazione del potere predittivo di questa lista sul nostro gruppo di 32 pazienti tramite una "Leave-one-out Cross Validation" (LOOCV) che ci ha dimostrato come l'errore di predizione di questa lista sia pari a 0. In particolare 30 dei geni appartenenti a questa lista mostrano una down-regolazione nel gruppo dei pazienti che abbiano ottenuto una nCR rispetto agli altri, mentre soltanto un gene presenta dei livelli di espressione più elevati in questo sottogruppo.

Affy_Card	Pval	Gene	Chr
219976_at	0,0222	HOOK1	1p32.1
227123_at	0,0194	RAB3B	1p32-p31
225282_at	0,0304	LOC64744	1p35.3-p34.1
204373_s_at	0,00694	CAP350	1p36.13-q41
236223_s_at	0,000903	RIT1	1q22
225455_at	0,00131	STAF42	1q23.3
235589_s_at	0,0456	MDM4	1q32
227577_at	0,0366	EXOC8	1q42.2
226886_at	0,0457	GFPT1	2p13
200729_s_at	0,0236	ACTR2	2p14
212364_at	0,00446	MYO1B	2q12-q34
212984_at	0,00552	ATF2	2q32
239629_at	0,0234	CFLAR	2q33-q34
222777_s_at	0,00625	WHSC1	4p16.3
202581_at	0,0234	HSPA1B	6p21.3
227239_at	0,0302	DRCTNNB1A	7p15.3
216607_s_at	0,0451	CYP51A1	7q21.2-q21.3
242925_at	0,0204	RNF148	7q31.33
212322_at	0,0172	SGPL1	10q21
207543_s_at	0,00742	P4HA1	10q21.3-q23.1
205773_at	0,00745	CPEB3	10q23.33
204780_s_at	0,0497	TNFRSF6	10q24.1
228582_x_at	0,000903	MYOZ2	11cen-q12.3
205848_at	0,0222	GAS2	11p14.3-p15.2
200951_s_at	0,00446	CCND2	12p13
213734_at	0,0237	RFC5	12q24.2-q24.3
200628_s_at	0,0199	WARS	14q32.31
224720_at	0,0147	MIB	18q11.2
230180_at	0,0414	DDX17	22q13.1
215245_x_at	0,0189	FMR1	Xq27.3
209030_s_at	0,0118	IGSF4	11q23.2

Tabella 4. Lista dei 31 geni in grado di predire l'ottenimento di una nRC in seguito ad una terapia di prima linea con tali-dex.

4.2 VALIDAZIONE DELLA LISTA DI GENI PREDITTIVI MEDIANTE MICROFLUIDIC CARD

La seconda parte dello studio è stata dedicata alla valutazione dei valori di espressione dei 31 geni componenti la lista in grado di predire l'ottenimento di una RC su un secondo gruppo di 72 pazienti, denominato "test set", le cui caratteristiche cliniche e la risposta alla terapia sono indicate rispettivamente nelle tabelle 5 e 6.

N° pazienti	72
Età mediana (<i>range</i>)	56 (36 - 66)
Sesso (M/F)	47/25
Hb mediana (<i>range</i>)(g/dL)	11.4 (6.8 – 16)
PLTs x103 mediana (<i>range</i>)	227 (10,6 - 572)
β2-m mediana (<i>range</i>) (mg/L)	3.1 (0.3 – 23.8)
CRP mediana (<i>range</i>) (mg/L)	0.32 (0 – 8)
LDH mediana (<i>range</i>) (UxL)	307 (111 - 1342)
%PC mediana (<i>range</i>)	50 (10 -100)
Stadio I (%)	12
Stadio II (%)	13
Stadio III (%)	47

Tabella 5. Caratteristiche cliniche dei 72 pazienti del "test set".

N° pazienti	72
RC (%)	12 (17%)
nRC (%)	6 (8%)
VGPR (%)	5 (16%)
RP (%)	31 (43%)
NR (%)	15 (21%)
progressione (%)	3 (4%)

} 25%

Tabella 6. Risposte alla terapia di induzione con tali-dex dei 72 pazienti del "test set".

I pazienti appartenenti a questo “test set” sono stati selezionati mantenendo le stesse percentuali di risposta precedentemente osservate nel “training set”, in maniera tale da avere un campione di analisi omogeneo in queste due diverse fasi dello studio: 18 di questi 72 pazienti (25%) hanno ottenuto una nRC dopo una terapia di prima linea con tali-dex.

Anche in questo caso i pazienti sono stati distinti in due diversi sottogruppi in base all’ottenimento o meno di una nRC. Lo scopo di questa seconda analisi è stato quello di validare ulteriormente il valore predittivo di questi geni su un gruppo più ampio di pazienti estraneo all’analisi che ha precedentemente condotto alla loro individuazione per poter così evitare dei possibili errori di *overfitting*, ossia di un eccessivo adattamento delle analisi utilizzate ai dati in esame che rende poi difficilmente generalizzabili i risultati ottenuti, ed inoltre per poter ridurre il numero dei geni appartenenti a questa lista senza però che diminuisca il valore predittivo risultante.

In questa seconda fase dello studio è stata applicata una Real Time PCR, utilizzando le Microfluidic Card per effettuare un’analisi quantitativa dei livelli di espressione dei 31 geni componenti la nostra lista predittiva. E’ stata effettuata un’analisi relativa di espressione di questi geni, utilizzando *GAPDH* come gene endogeno di controllo. La figura 12 rappresenta la configurazione della Microfluidic Card che è stata utilizzata in questa analisi.

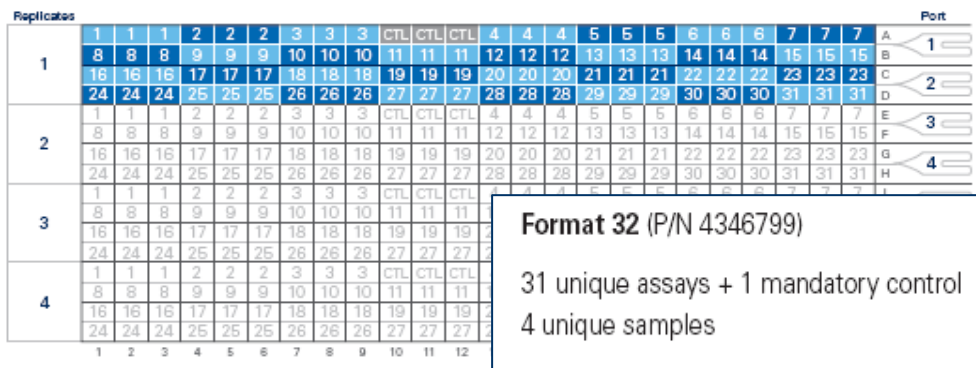


Figura 12. Rappresentazione grafica della composizione della Microfluidic Card adoperata nella fase di validazione; ogni card ha permesso l’analisi quantitativa di 31 geni differenti + 1 gene di controllo per 4 diversi pazienti.

In questo più ampio gruppo di pazienti è stato confermato l’elevato potere predittivo di questa lista di 31 geni sempre utilizzando una LOOCV.

È stata in seguito utilizzata una differente analisi statistica, la “Quadratic Discriminant Analysis” (QDA) che ci ha permesso di selezionare da questa lista di 31 geni, una

sottolista costituita soltanto da **7 geni** che presentano il più alto valore predittivo. I 7 geni inclusi in questa lista definitiva sono: *CYP51A1*, *FMRI*, *CFLAR*, *RAB3B*, *RNF148*, *WHSC1*, *CCND2*.

Utilizzando nuovamente la LOOCV è stata verificata come la sensibilità di predizione di questa lista nei confronti dei nostri pazienti sia dell'82%, in particolare la predizione è risultata essere corretta nei confronti di 14 su 18 (78%) pazienti che abbiano ottenuto una nRC, e di 45 su 54 (83%) che invece avevano ottenuto una risposta inferiore alla nRC.

Affy_Card	Nome comune	chr.	Descrizione
216607_s_at	<i>CYP51A1</i>	7q21.2	cytochrome P450, family 51, subfamily A
215245_x_at	<i>FMRI</i>	Xq27.3	fragile X mental retardation 1 protein
239629_at	<i>CFLAR</i>	2q33-q34	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator
227123_at	<i>RAB3B</i>	1p32-p31	ras-related protein
242925_at	<i>RNF148</i>	7q31-33	ring finger protein 148
222777_s_at	<i>WHSC1</i>	4p16.3	Wolf-Hirshhorn syndrome
200951_s_at	<i>CCND2</i>	12p13	cyclin D2

Tabella 7. Lista dei 7 geni ottenuta in seguito alla seconda fase dello studio in grado di predire l'ottenimento di una nRC.

5. DISCUSSIONE

Il protocollo “Bologna2002” ha dimostrato la superiorità della terapia di prima linea con tali-dex in preparazione al doppio trapianto autologo di cellule staminali del sangue periferico, rispetto ai protocolli terapeutici precedenti, che prevedevano invece l’utilizzo di chemioterapie ad alte dosi. Le percentuali di risposta a questa terapia di induzione sono infatti estremamente favorevoli: oltre l’ 80% dei pazienti ha risposto, ottenendo almeno una remissione parziale (11). Il raggiungimento di una nRC dopo terapia di induzione potrebbe essere un fattore prognostico favorevole molto importante in termini di ottenimento di una risposta completa al termine dell’intero ciclo terapeutico. Per questo motivo, risulta importante ottenere indicazioni fin dall’esordio della malattia in relazione ad un possibile ottenimento di una nRC in seguito ad una terapia di induzione con Talidomide, soprattutto alla luce dello sviluppo di nuovi approcci terapeutici alternativi. Tuttavia le cellule mielomatose sono dotate di molteplici meccanismi antiapoptotici responsabili del mancato ottenimento di una risposta completa; inoltre a causa del “caos genetico” presente in questa malattia è difficile stabilire correlazioni tra anomalie genetiche ed outcome clinico.

Lo sviluppo di nuovi metodi di analisi, come lo studio del profilo di espressione genica, permette di avere una visione globale dei livelli di espressione del genoma; una delle sue principali applicazioni consiste nell’identificazione della deregolazione dell’espressione genica come risposta ad una specifica terapia. La tecnologia dei Microarray fornisce un’enorme quantità di informazioni inerenti ciascun paziente; tuttavia questa incredibile quantità di dati necessita di adeguati sistemi statistici e di analisi.

Il nostro studio è stato impostato prevedendo due fasi successive; questo ha permesso di procedere seguendo degli step predeterminati.

La prima fase dello studio, effettuata su un “training set” di 32 pazienti in cui è stato analizzato il profilo di espressione genica, ci ha permesso di verificare l’esistenza di differenze nell’espressione genica di pazienti che hanno ottenuto almeno una nRC rispetto a quelli che non l’hanno ottenuta. Inoltre analizzando il valore predittivo dei geni inclusi in questa *signature* abbiamo selezionato una lista di 31 geni in grado di predire l’ottenimento di almeno una nRC.

Nella seconda parte dello studio l’obiettivo è stato duplice: in primo luogo validare i risultati ottenuti su un numero più ampio di pazienti, utilizzando una tecnica di analisi quantitativa più sensibile rispetto alla metodologia dei Microarray, ovvero la Real Time PCR utilizzando le Microfluidic Card; in secondo luogo, ridurre il numero dei

geni che componevano la lista predittiva, con l'obiettivo di sviluppare un sistema riproducibile ed economico per l'analisi di pazienti di nuova diagnosi. Questa seconda fase di studio, condotta su un "test set" di 72 pazienti, ci ha permesso non solo di confermare la predittività della nostra lista, ma anche di ridurre a 7 il numero dei geni predittori.

Dei 7 geni che compongono quello che possiamo definire "set di geni predittivo", *WHSC1*, *CFLAR* e *CCND2* erano stati già descritti in letteratura perché coinvolti nella progressione del MM. Questi geni presentano infatti alti livelli di espressione in pazienti affetti da MM rispetto alla popolazione normale (12, 13, 14), e la loro over espressione è stata associata a cattiva prognosi (15, 16).

WHSC1 conosciuto anche come *MMSET* è uno dei geni coinvolti nella rottura cromosomica che porta alla formazione della t(4;14), storicamente associata ad una cattiva prognosi nei pazienti affetti da MM (17, 18, 19). La funzione di questo gene non è ancora del tutto nota, come pure il suo possibile coinvolgimento nella patogenesi del MM. Tra i domini funzionali di *MMSET*, il dominio SET è molto conservato, descritto in diversi fattori trascrizionali e importante per l'espressione di geni coinvolti nello sviluppo (20, 21). È stato dimostrato un aumento dei livelli di espressione di *MMSET* nei pazienti con la t(4;14) probabilmente dovuto ad una deregolazione causata dalla translocazione stessa (22, 23).

CFLAR è un inibitore della caspasi 8. Studi *in vitro* hanno dimostrato come inibitori specifici di questa proteina (BIM e Manimicina) siano in grado di down regolare l'espressione di *CFLAR*, ripristinando l'attività della caspasi 8 e riattivando così la cascata di segnali che porta all'apoptosi (24, 25, 26, 27). La regolazione di *CFLAR* è dovuta all'azione di NF-κB (28); per questo motivo farmaci in grado di inattivare NF-κB sono in grado indirettamente di diminuire i livelli di espressione di *CFLAR*. Talidomide e i suoi derivanti immunomodulatori sono in grado indurre l'apoptosi in seguito ad un'attivazione della caspasi 8 (29). Si può quindi pensare come l'azione di Talidomide nei confronti di pazienti in cui i livelli di espressione di questo gene siano molto elevati, non sia sufficiente per poter inattivare la sua funzione anti-apoptotica. L'utilizzo di terapie più specifiche nei confronti di *CFLAR* potrebbero invece ripristinare la normale capacità apoptotica delle PC mielomatose inducendo così delle risposte superiori in questi pazienti.

CCND2 è il gene che codifica per la Ciclina D2. In vari lavori è stata dimostrata una correlazione tra elevati livelli di espressione di questo gene e la progressione del ciclo

cellulare nel MM; questo potrebbe essere dovuto all'inattivazione del retinoblastoma attraverso una fosforilazione da parte di questa proteina ed un'inattivazione della proteina p27, comportando così un blocco dell'apoptosi (30, 31). Inoltre è stato riportato come livelli aumentati di espressione di *CCND2* siano associati alla presenza della t(4;14) anche se non sono ancora noti i motivi di questa associazione. Anche pazienti che presentano la t(14;16) e la t(14;20) mostrano contemporaneamente una over espressione di *CCND2*, in questo caso però questa deregolazione è giustificata dall'attività delle proteine MAF di cui *CCND2* costituisce un target trascrizionale (12, 13, 32).

Fino ad oggi sono riportati in letteratura diversi studi del profilo di espressione genica su pazienti di MM, che hanno dimostrato l'importanza di questa tecnica nella classificazione molecolare dei pazienti soprattutto in un contesto caratterizzato da elevati livelli di disordine genetico. I primi studi hanno analizzato i profili di espressione di PC mielomatose e PC normali per poter individuare i geni i cui diversi livelli di espressione rappresentassero i cambiamenti fondamentali associati con la trasformazione maligna delle PC (14, 33).

Un approccio diverso, in cui è stato studiato un numero di campioni molto numeroso, è quello che ha portato all'individuazione di un'associazione tra elevati livelli di espressione di determinati geni e una prognosi sfavorevole dopo trapianto autologo, dimostrando come gran parte di questi geni deregolati fossero localizzati sul cromosoma 1 (34).

Ulteriori studi hanno inoltre dimostrato la possibilità di caratterizzare i pazienti in base alla presenza di alterazioni cromosomiche storicamente associate a cattiva prognosi o di caratteristiche cliniche sfavorevoli. Infatti sono state individuate delle *signature* in grado di identificare pazienti con la del(13) o la t(4;14), dimostrando così come i Microarray possano fungere da surrogato della FISH nel MM (35, 36, 37). Confrontando invece i profili di espressione delle PC di pazienti con e senza lesioni osteolitiche al tempo della diagnosi, è stato possibile identificare determinanti molecolari ed individuare l'associazione tra l'over espressione di *DKK1* e la formazione di lesioni osteolitiche (38).

Infine il contributo dei Microarray nel MM nella stratificazione dei pazienti in base alle differenti caratteristiche molecolari è stato determinante per la definizione e caratterizzazione di differenti *signature* associate ai diversi gruppi TC (32).

Attraverso lo studio del profilo di espressione genica è stato quindi possibile avvalorare l'ipotesi che il MM, da sempre considerato una patologia morfologicamente omogenea, rappresenti in realtà l'insieme di scenari molecolarmente diversi tra loro; questa ipotesi correla inoltre con una diversa capacità dei sottogruppi a rispondere alle terapie.

La predizione della risposta ad una specifica terapia è forse il fine più nobile dell'utilizzo del profilo di espressione genica. In letteratura, sono presenti due diversi studi preliminari, presentati a convegni internazionali, relativi alla generazione di liste di geni in grado di predire l'ottenimento della risposta in seguito a terapie nel MM, rispettivamente con Bortezomib (37) e con Talidomide (39). I risultati presentati da questi studi, tuttavia non sono stati ad oggi validati mediante Real Time PCR.

In conclusione, con questo studio abbiamo individuato una *signature* in grado di distinguere i pazienti che hanno ottenuto almeno una nRC in seguito ad una terapia di prima linea con Talidomide e Desametasone rispetto ai pazienti che hanno ottenuto come migliore risposta una RP; nell'ambito di questa *signature* è stata identificata una lista finale di 7 geni che permette di predire l'ottenimento di una nRC con una percentuale di successo dell'82%. Di questi geni, almeno 3 sono stati descritti in letteratura come geni coinvolti nel blocco dell'apoptosi nel MM. Questi risultati gettano le basi per studi futuri più approfonditi per la comprensione dei pathway molecolari deregolati nel MM, a livello dei quali Talidomide non è efficace, e identificare allo stesso tempo possibili nuovi target terapeutici che permettano di sviluppare delle nuove terapie più specifiche. Con questo studio inoltre abbiamo dimostrato l'utilità di nuovi approcci molecolari, ovvero dello studio dell'espressione genica mediante i Microarray e la Real Time PCR con Microfluidic Card, nella predizione della risposta ad una specifica terapia.

Come prospettiva futura, sulla base di questo studio, dopo un'eventuale ulteriore validazione dei risultati su dataset genici del tutto estranei ai nostri (ad esempio ottenuti da pazienti arruolati in altri protocolli clinici, che prevedevano però lo stesso iter terapeutico), sarebbe possibile pensare allo sviluppo di Custom Array o di Microfluidic Card progettati in modo da analizzare più pazienti contemporaneamente per l'espressione dei 7 geni che definiscono il set predittore della risposta. Questo comporterebbe un'ampia applicabilità con anche una riduzione dei costi e dei tempi di risposta. In questo modo si offrirebbe al clinico un reale supporto di analisi molecolare

alla normale diagnosi della malattia e nella scelta della corretta terapia da utilizzare. Questo risultato è estremamente importante soprattutto in una patologia eterogenea come il MM.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1) Tura S., Baccarani M., *Lezioni di Ematologia* società editrice Esculapio 2003.
- 2) Mitsiades C.S., Mitsiades N., Munshi N.C. et al., Focus on Multiple Myeloma, *Cancer Cell*, 2004, 6(5): 439-444.
- 3) VIII Congresso Nazionale SIES Pavia, 14-16 settembre 2004 “Il colloquio fra clone mielomatoso e microambiente”.
- 4) Higgings M.J., Fonseca R., Genetics of multiple myeloma, *Best Pract Res Clin Haematol.*, 2005;18(4): 525-36.
- 5) Bergsagel P.L., Kuehl W.M., Molecular pathogenesis and a consequent classification of Multiple Myeloma, *J Clin Oncol.*, 2005, 23 (26): 6333-6338.
- 6) Keats J.J., Reiman T., Maxwell C.A. et al., In Multiple Myeloma t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression, *Blood*, 2003, 101 (4): 1520-1529.
- 7) L'Hote C.G., Knowles M.A., Cell responses to FGFR3 signalling: growth, differentiation and apoptosis, *Experimental Cell Reserch*, 2005, 304: 417-431.
- 8) Ge N.L., Rudikoff S., IGF-1R is a dual effector of multiple myeloma cell growth, *Blood*, 2000, 96(8): 2856-61.
- 9) Standal T., Borest M., Lenhoff S. et al., Serum Insulinlike growth factor is not elevated in patients with multiple myeloma but is still a prognostic factor, *Blood*, 2002, 100 (12): 3925-3929.
- 10) Anderson K.C., Targeted therapy for multiple myeloma, *Semin Hematol*, 2001, 38 (3): 286-294.

- 11) Cavo M., Zamagni E., Tosi P. et al., Superiority of thalidomide and dexamethasone over vincristine-doxorubicin-dexamethasone (VAD) as primary therapy in preparation for autologous transplantation for multiple myeloma, *Blood*, 2005,106(1): 35-39.
- 12) Bergsagel P.L., Kuehl W.M., Zhan F. et al., Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma, *Blood*, 2005, 106 (1): 296-303.
- 13) Kuehl W.M., Bergsagel P.L., Early genetic events provide the basis for a clinical classification of multiple myeloma, *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.*, 2005:346-352.
- 14) Munshi N.C., Hideshima T., Carrasco D. et al., Identification of genes modulated in multiple myeloma using genetically identical twin samples, *Blood*, 2004,103(5):1799-806.
- 15) Baughn L.B., Di Liberto M., Wu K. et al., A novel orally active small molecule potently induces G1 arrest in primary myeloma cells and prevents tumor growth by specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6, *Cancer Res.*, 2006, 66(15):7661-7667.
- 16) Hanamura I., Huang Y., Zhan F., et al. Prognostic value of cyclin D2 mRNA expression in newly diagnosed multiple myeloma treated with high-dose chemotherapy and tandem autologous stem cell transplantations, *Leukemia*, 2006, 20(7):1288-90.
- 17) Moreau P., Facon T., Leleu X. Et al., Recurrent 14q32 translocations determine the prognosis of multiple myeloma, especially in patients receiving intensive chemotherapy, *Blood*, 2002, 100(5):1579-83.
- 18) Fonseca R., Blood E., Rue M et al., Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma, *Blood*, 2003,101(11):4569-75.

- 19) Cavo M., Terragna C., Renzulli M. et al., Poor outcome with front-line autologous transplantation in t(4;14) multiple myeloma: low complete remission rate and short duration of remission, *J Clin Oncol.*, 2006, 24(3):e4-5.
- 20) Stec I., Wright T.J., van Ommen G.J. et al., WHSC1, a 90 kb SET domain-containing gene, expressed in early development and homologous to a Drosophila dysmorphia gene maps in the Wolf-Hirschhorn syndrome critical region and is fused to IgH in t(4;14) multiple myeloma, *Hum Mol Genet.*, 1998, 7(7):1071-82.
- 21) Todoerti K., Rocchetti T., Agnelli L. et al., Transcription repression activity is associated with the type I isoform of the MMSET gene involved in t(4;14) in multiple myeloma, *Br J Haematol.*, 2005, 131(2):214-8.
- 22) Stewart J.P., Thompson A., Santra M. et al., Correlation of TACC3, FGFR3, MMSET and p21 expression with the t(4;14)(p16.3;q32) in multiple myeloma, *Br J Haematol.*, 2004, 126(1):72-6.
- 23) Dring A.M., Davies F.E., Fenton J.A. et al., A global expression-based analysis of the consequences of the t(4;14) translocation in myeloma, *Clin Cancer Res.*, 2004, 10(17):5692-701.
- 24) Mitsiades N., Mitsiades C.S. Poulaki V et al., Intracellular regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human multiple myeloma cells, *Blood*, 2002, 99(6):2162-71.
- 25) Budd R.C., Yeh W.C., Tschopp J., cFLIP regulation of lymphocyte activation and development, *Nat Rev Immunol.*, 2006, 6(3):196-204.
- 26) Frassanito M.A., Mastromauro L., Cusmai A. et al., Blockade of the Ras pathway by manumycin, a farnesyltransferase inhibitor, overcomes the resistance of myeloma plasma cells to Fas-induced apoptosis, *Clin Exp Med.*, 2005, 4(4):174-82.

- 27) Spencer A., Yeh S.L., Koutrevelis K. et al., TRAIL-induced apoptosis of authentic myeloma cells does not correlate with the procaspase-8/cFLIP ratio, *Blood*, 2002,100(8):3049.
- 28) Watanabe M., Dewan M.Z., Okamura T. et al., A novel NF-kappaB inhibitor DHMEQ selectively targets constitutive NF-kappaB activity and induces apoptosis of multiple myeloma cells in vitro and in vivo, *Int J Cancer.*, 2005, 114(1):32-8.
- 29) Mitsiades N., Mitsiades C.S., Poulaki V. et al., Apoptotic signaling induced by immunomodulatory thalidomide analogs in human multiple myeloma cells: therapeutic implications, *Blood.*, 2002, 99(12):4525-30.
- 30) Chen-Kiang S., Biology of plasma cells, *Best Pract Res Clin Haematol.* 2005, 18(4):493-507.
- 31) Ely S., Di Liberto M., Wu K. et al., Mutually exclusive cyclin-dependent kinase 4/cyclin D1 and cyclin-dependent kinase 6/cyclin D2 pairing inactivates retinoblastoma protein and promotes cell cycle dysregulation in multiple myeloma, *Cancer Res.*, 2005, 65(24):11345-53.
- 32) Agnelli L. Bricciato S., Mattioli M. et al, Molecular classification of multiple myeloma: a distinct transcriptional profile characterizes patients expressing CCND1 and negative for 14q32 translocations, *J Clin Oncol.*, 2005, 23 (29): (7296-7306).
- 33) Zhan F., Hardin J., Kordsmeier B. et al., Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells, *Blood*, 2002, 99(5):1745-57.
- 34) Shaughnessy J. Amplification and overexpression of CKS1B at chromosome band 1q21 is associated with reduced levels of p27Kip1 and an aggressive clinical course in multiple myeloma, *Hematology*, 2005;10 Suppl 1:117-126.

- 35) Mattioli M., Agnelli L., Fabris S. et al., Gene expression profiling of plasma cell dyscrasias reveals molecular patterns associated with distinct IGH translocations in multiple myeloma, *Oncogene*, 2005, 24(15):2461-73.
- 36) Agnelli L., Biccato S., Fabris S. et al., Integrative genomic analysis reveals distinct transcriptional and genetic features associated with chromosome 13 deletion in multiple myeloma, *Haematologica*, 2007, 92(1):56-65.
- 37) Shaughnessy J., Barlogie B., Interpreting the molecular biology and clinical behavior of multiple myeloma in the context of global gene expression profiling, *Immunol Rev.*, 2003, 194:140-63.
- 38) Tian E., Zhan F., Walker R. et al., The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma, *N Engl J Med.*, 2003, 349(26):2483-94.
- 39) Kumar S., Greipp P.R., Haug J. Et al., Gene Expression Profiling of Myeloma Cells at Diagnosis Can Predict Response to Therapy with Thalidomide and Dexamethasone Combination, *Blood*, 2005, 106 (11), issue 11, Abstract #508.