

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Oncologia e Patologia Sperimentale: progetto n.1 Oncologia

Ciclo XXIV

Settore Concorsuale di afferenza: 05/E2

Settore Scientifico disciplinare: BIO/11

Farmacogenomica della Clofarabina nel trattamento delle Leucemie Acute pediatriche: identificazione di nuovi bersagli molecolari e del profilo genomico associato all'efficacia terapeutica del farmaco antitumorale

Presentata da: Dott.ssa Serena Formica

Coordinatore Dottorato

Prof. Sandro Grilli

Relatore

Prof. Andrea Pession

Esame finale anno 2012

INDICE

INTRODUZIONE.....	1
1. Leucemie Acute pediatriche.....	1
1.1 Generalità.....	1
1.2 Epidemiologia.....	3
1.3 Attuali terapie e prospettive.....	4
2. Varianti genetiche.....	6
2.1 Polimorfismi e mutazioni.....	6
2.2 Varianti genetiche e risposta terapeutica.....	7
2.3 Biomarcatori genetici nelle LA pediatriche.....	9
2.4 Biomarcatori genetici e prospettive terapeutiche.....	14
3. Farmacogenomica.....	16
3.1 Definizione.....	16
3.2 Studi di SNP genotyping e Copy Number Analysis (CGH).....	17
3.3 Studi di Gene Expression Profiling.....	18
3.4 Il futuro della farmacogenomica.....	21
3.5 Le tecnologie della farmacogenomica: DNA Microarray e Next Generation Sequencing.....	22
3.5.1 Affymetrix GeneChip arrays.....	27
4. Clofarabina.....	31
4.1 Descrizione.....	31
4.2 Valutazioni precliniche e cliniche.....	32
SCOPO DELLA TESI.....	34

MATERIALI E METODI.....	35
RISULTATI.....	39
DISCUSSIONE.....	53
CONCLUSIONI.....	60
BIBLIOGRAFIA.....	61

INTRODUZIONE

1. Leucemie Acute pediatriche

1.1 Generalità

Le leucemie sono un gruppo eterogeneo di neoplasie maligne che originano dal midollo emopoietico a seguito della trasformazione maligna di un progenitore emopoietico o della cellula staminale emopoietica; sono caratterizzate da blocco della differenziazione, alterazione dei meccanismi che regolano ciclo cellulare e apoptosi e proliferazione clonale incontrollata di elementi cellulari immaturi, atipici e scarsamente funzionanti, denominati blasti, che invadono il midollo osseo, il circolo periferico e, talvolta, altri organi (per esempio le ghiandole linfatiche, la cute, il fegato, la milza e il cervello).

Tutte le cellule del sangue si originano nel midollo osseo a partire dalla cellula staminale ematopoietica, progenitore comune che si differenzia attraverso stadi successivi di maturazione dando origine alle linee cellulari ematiche. In particolare, la mielopoiesi dà origine ai globuli bianchi neutrofili, eosinofili, basofili (detti anche granulociti) e monociti, ai globuli rossi e alle piastrine, la linfopoiesi dà origine ai linfociti T, B e NK. Quando una delle forme immature inizia a riprodursi in maniera incontrollata si ha l'insorgenza della leucemia, caratterizzata dall'iperproliferazione di blasti leucemici immaturi e dalla progressiva perdita di globuli bianchi e piastrine il cui sviluppo è compromesso dalla eccessiva crescita delle cellule maligne.

La leucemia può insorgere a diversi stadi della maturazione delle cellule del sangue, pertanto, può essere mieloide, linfoide, bifenotipica o indifferenziata a seconda che colpisca rispettivamente cellule già differenziate della linea mieloide o linfoide, cellule che possiedono antigeni sia mieloidi che linfoidi o cellule non ancora differenziate.

Da un punto di vista clinico, si suddividono ulteriormente in acute o croniche in base al decorso della malattia: le prime sono dovute alla proliferazione di cellule immature non differenziate, hanno esordio improvviso, prognosi più severa e decorso molto rapido, le seconde sono caratterizzate dalla proliferazione di cellule già differenziate, decorrono più lentamente e sono meglio controllabili con i farmaci.

Le leucemie nell'uomo hanno un'incidenza del 3% di tutti i tumori maligni e rappresentano la forma più comune di tumore infantile. Nell'età giovanile prevalgono le forme acute, in particolare, la Leucemia Acuta Linfoblastica (LAL) ha un'incidenza massima nell'infanzia, tra i

2 e i 4 anni di vita, sebbene possa colpire anche in età adulta¹. Le forme croniche, invece, sono di norma più frequenti nell'età avanzata.

Tutte le forme di leucemia acuta hanno una sintomatologia d'esordio comune, poiché comune è il primitivo disordine di base: l'invasione massiva del midollo osseo da parte di cellule neoplastiche con conseguente riduzione del numero di cellule normali.

Il paziente potrà presentare, quindi, forme isolate o variamente associate di:

- anemia secondaria alla mancanza di globuli rossi, causa di stanchezza, cefalea, pallore, dispnea;
- emorragie, per carenza di piastrine, con sanguinamento gengivale, sottocutaneo, congiuntivale, nasale o a carico di organi interni;
- febbre, a causa della riduzione dei globuli bianchi sani circolanti e imputabile solitamente a infezioni delle vie aeree (faringite, bronchite, polmonite), meno comunemente a infezioni a carico di altri organi.

I meccanismi molecolari responsabili della leucemogenesi, ormai in gran parte noti, consistono nell'attivazione di un oncogene e/o nell'inattivazione di un gene oncosoppressore coinvolti nei meccanismi di trasduzione del segnale intracellulare, di riparazione del DNA o di regolazione del ciclo cellulare, del differenziamento e dell'apoptosi. Le cause che provocano tali alterazioni non sono ancora però del tutto chiare. Attualmente sono noti alcuni fattori di rischio che possono contribuire all'insorgenza delle forme leucemiche in quanto capaci di causare le alterazioni genetiche e le instabilità cromosomiche che a loro volta determinano il sovvertimento dei normali meccanismi di proliferazione e sopravvivenza cellulare^{1,2}. Tra questi, radiazioni ionizzanti (nel caso, per esempio, di soggetti trattati con radioterapia per altre neoplasie), composti chimici tossici come il benzene e l'ossido di etilene, farmaci alchilanti, virus leucemogeni e condizioni ereditarie e congenite predisponenti quali varianti polimorfiche dei geni coinvolti nel metabolismo, nella risposta immune e nella riparazione dei geni e alcune malattie congenite come la sindrome di Down, la sindrome di Bloom, di Klinefelter e l'anemia di Fanconi³. In questi casi, la mutazione genetica è a carico di proteine coinvolte nel riparo del DNA quindi il rischio di sviluppare leucemie dipende da una minore efficienza dell'organismo di riparare il DNA dopo certe lesioni.

Le leucemie vengono suddivise in base a due classificazioni principali: la FAB (French American British) e la WHO (World Health Organization), di recente introduzione.

Entrambe prendono in considerazione le caratteristiche morfologiche, citochimiche ed immunofenotipiche delle cellule neoplastiche per stabilirne il lineage e il grado di maturazione, la classificazione WHO, in aggiunta, integra, però, altre informazioni rilevanti come proprietà citogenetiche, genetico-molecolari e dati su precedenti mielodisplasie o terapie^{4,5}. Più dell'80% dei casi di leucemia presenta alterazioni cromosomiche caratteristiche (Fig.1) e riarrangiamenti specifici identificano sottotipi di leucemia a differente andamento prognostico^{6,7} (Fig.2). Alla luce di queste evidenze, le proprietà citogenetiche dei diversi tipi di leucemia costituiscono oggi il fondamento della stratificazione del rischio prognostico per le leucemie sia del bambino che dell'adulto, ragion per cui la nuova classificazione WHO dell'Organizzazione Mondiale della Sanità sancisce le ricorrenti anomalie genetiche come i criteri di base per differenziare i diversi sottogruppi e riporta i profili prognostici associati a ciascuno di questi⁵.

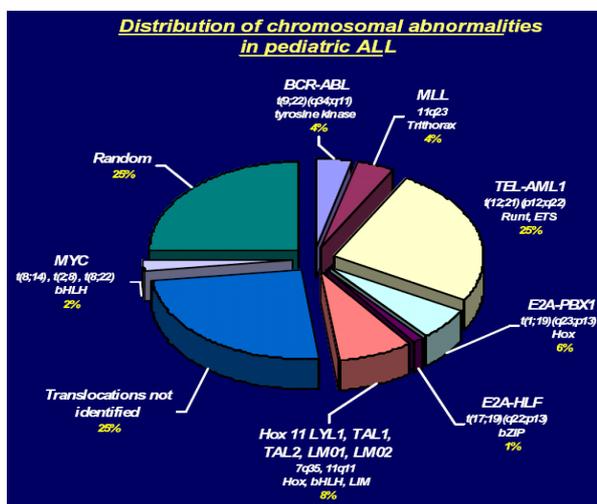


Fig.1 Esempio di alterazioni cromosomiche nelle Leucemie Acute Linfoblastiche (LAL) pediatriche.

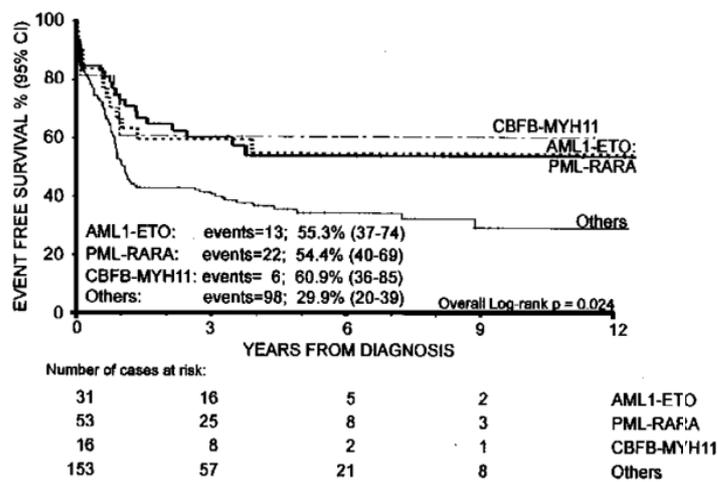


Fig.2 Riarrangiamenti genici specifici identificano distinti sottotipi di leucemia a differente prognosi. Pazienti pediatriche con Leucemia Acuta Mieloide (LAM) trattati con protocolli AIEOP-LAM 87-92, BFM 83-93 e AIDA tra il 1988 e il 1998⁶.

1.2 Epidemiologia

L'incidenza dei tumori in età pediatrica (0-14 anni) risulta essere di 1/7000 nel Nord-America, in Asia, in Europa e in Australia. Le Leucemie Acute Linfoblastiche (LAL) rappresentano la forma tumorale più comune in età pediatrica costituendo il 25% dei tumori che si sviluppano in età compresa tra 0-14 anni. Meno frequenti risultano, invece, essere i casi di Leucemia Acuta Mieloide (LAM) rappresentando il 5% dei tumori infantili.

L'incidenza delle leucemie pediatriche tra 0-18 anni risulta essere di 30-45 nuovi casi per milione all'anno nel mondo. Negli Stati Uniti sono stati diagnosticati nel 2009 circa 3500 nuovi casi di

leucemia acuta (LA) in pazienti con meno di 20 anni di età⁸, in Italia sono stati circa 500⁹; di questi circa 2400 in USA e 400 in Italia hanno presentato una LAL, con un incremento annuo di incidenza dell'1%, i pazienti rimanenti hanno sviluppato soprattutto una LAM. Le leucemie costituiscono il 35% di tutte le forme tumorali nei pazienti pediatrici. Le LAL rappresentano l'80% delle leucemie pediatriche, colpiscono soprattutto la fascia neonatale e hanno un picco di incidenza intorno ai 4-5 anni di età e nella fase prepuberale⁹⁻¹². Inoltre, sono più comuni tra i maschi rispetto alle femmine. Le LAM rappresentano il 10% delle leucemie pediatriche, più frequenti in età inferiore ad 1 anno, a incidenza costante fino ai 10 anni con leggero aumento nell'adolescenza e stabilizzazione nell'età adulta; si registra, poi, un progressivo aumento dell'incidenza dopo i 55 anni di età. Il rapporto di incidenza tra maschi e femmine è di circa 1:1^{9,10}. Il restante 10% delle leucemie pediatriche è dato da sindromi mieloproliferative quali la Leucemia Mieloide Cronica (LMC), la Leucemia Mielomonocitica giovanile (JMML) e Sindromi Mielodisplastiche (SMD).

Esiste una notevole variazione geografica e razziale nella distribuzione delle LA; la LAL è, infatti, assai meno frequente nei paesi sottosviluppati dove non si osserva quasi mai il primo picco dell'età pediatrica. Nei paesi sviluppati è stata riscontrata una correlazione positiva fra incidenza di LAL e lo stato socioeconomico, nonché un progressivo aumento dell'incidenza della LAL nei figli degli immigrati man mano che miglioravano le condizioni economiche della famiglia di origine¹³. Nell'ambito delle LAM pediatriche, si osserva una differente distribuzione dei diversi sottotipi genetici nei vari paesi. In Italia risulta più frequente il sottotipo con traslocazione PML-RAR α rispetto al Nord-Europa e USA⁶.

1.3 Attuali terapie e prospettive

In questi ultimi decenni si è assistito ad un notevole miglioramento nella terapia delle LA pediatriche grazie all'identificazione di fattori prognostici in grado di individuare pazienti ad alto rischio di fallimento terapeutico, ad una migliore caratterizzazione e classificazione molecolare delle LA, che ha consentito l'identificazione di distinti sottotipi genetici a diverso significato prognostico, all'intensificazione dei trattamenti (associata ai sottotipi di leucemia e/o rivolta ai pazienti ad alto rischio), all'introduzione della polichemioterapia e al miglioramento delle terapie di supporto (trattamenti antifungini e antibiotici)¹⁴.

I progressi ottenuti hanno notevolmente aumentato le percentuali di sopravvivenza dei soggetti affetti (sopravvivenza libera da malattia, EFS, a 5 anni) portando a guarigione circa l'80% e il 55% dei casi di LAL e LAM rispettivamente, in Italia e in altri paesi¹⁵⁻¹⁸. Nonostante tutto, si assiste oggi ad una fase di *plateau* della curva di sopravvivenza e le leucemie continuano a rappresentare la

principale causa di morte pediatrica per malattia (33% in USA); una buona percentuale di pazienti risulta, infatti, tuttora resistente alle terapie convenzionali e muore per malattia o per lo sviluppo di reazioni collaterali di varia entità associate al trattamento stesso¹⁹⁻²⁰.

Al meglio della nostra attuale conoscenza, la sopravvivenza dei soggetti resistenti o sensibili allo sviluppo di tossicità potrebbe essere ottenuta orientando gli stessi verso protocolli terapeutici alternativi, più efficaci e meno tossici in quanto specificamente disegnati sul patrimonio genetico dei singoli individui e sull'assetto genetico-molecolare della patologia.

Sempre più numerose evidenze suggeriscono infatti il coinvolgimento delle varianti geniche nella risposta individuale ai trattamenti farmacologici creando le basi per il disegno di terapie che, basate sul corredo genetico di ciascun individuo e sull'assetto genetico della cellula tumorale, possano risultare specifiche nella cura della patologia e ad elevata efficacia e a bassa tossicità per i singoli pazienti²¹⁻²².

Ulteriori progressi nel trattamento delle LA pediatriche si possono, dunque, ottenere mediante 1) l'identificazione di "biomarcatori genetici" che siano predittivi della risposta terapeutica in modo da individuare già alla diagnosi, nella popolazione di soggetti malati, i pazienti effettivamente eleggibili per un dato trattamento terapeutico e di indirizzare i rimanenti verso approcci alternativi più specifici e/o meno tossici, con 2) una conoscenza più approfondita della genetica della cellula tumorale e, quindi, dei meccanismi alla base della resistenza farmacologica, intrinseca o acquisita, delle cellule tumorali e con 3) l'introduzione di terapie più mirate ed efficaci perché disegnate sulla base dell'assetto molecolare della leucemia.

2. Varianti genetiche

2.1 Polimorfismi e mutazioni

Si definiscono polimorfismi variazioni genetiche presenti nella popolazione generale con una frequenza superiore all'1%. Mediante il progetto genoma umano sono state identificate diverse variazioni geniche nei 2.9 Gb del patrimonio genetico umano. Queste comprendono variazioni di base nella sequenza nucleotidica (Single-Nucleotide Polymorphisms, SNPs), inserzioni e delezioni, variazioni nella quantità di regioni geniche (>1 kb) (Copy Number Variations, CNVs) e variazioni nelle sequenze ripetute.

Le più frequenti variazioni geniche risultano essere gli SNPs, presenti in esoni, introni, promotori, enhancers e regioni intergeniche. Solo una piccola porzione di SNPs attualmente noti (circa 60000) sono localizzati nelle regioni geniche codificanti e di questi solo la metà determina modificazioni amminoacidiche rilevanti nel prodotto proteico; i rimanenti, localizzati in esoni ma non aventi effetti sulla proteina, vengono battezzati come “sinonimi”. A seconda della loro localizzazione e del loro effetto, gli SNPs possono modificare il livello di espressione genica, il livello di proteina o l'attività proteica di uno specifico gene. Ad oggi, il principale database di SNPs raccoglie circa 10 milioni di SNPs (www.ncbi.nih.gov/SNP/) anche se per il 10%-17% risultano essere falsi positivi²³. Quasi tutti gli SNPs a livello di uno specifico locus genico hanno solo due alleli e approssimativamente l'80% di tutti gli SNPs ha una frequenza dell'allele minore inferiore al 10%. Esistono delle differenze tra le diverse popolazioni per cui un allele comune in una certa etnia potrebbe esser più raro in un'altra.

Gli aplotipi sono combinazioni di SNPs presenti nella stessa regione di DNA (solitamente a distanze inferiori di 50 Kb) che vengono ereditati insieme, presentandosi in Linkage Genetico. In particolare, recenti studi suggeriscono che l'intero genoma umano sia organizzato in aplotipi ad elevato Linkage separati da regioni a basso Linkage²⁴. Pertanto, SNPs ad elevata associazione genetica con uno specifico fenotipo (quali malattia o risposta farmacologica) possono dare strette indicazioni sulla localizzazione cromosomica del gene effettivamente associato al fenotipo anche se gli SNPs in questione non ne sono direttamente responsabili²⁵.

I primi approcci per l'identificazione e la ricerca di nuovi SNPs consistevano in metodi basati su gel elettroforesi quali PCR-RFLP (PCR-restriction fragment length polymorphism analysis), multiplex PCR e mini sequencing. Oggi, sono disponibili tecnologie più avanzate in grado di esaminare più SNPs contemporaneamente utilizzando marcatori fluorescenti; tra questi oligonucleotide ligation

assay, pyro-sequencing, single base extension, Taqman genotyping assay e, in ultimo, genotyping basato sulla spettrometria di massa (MALDI, MassArray) , Next Generation Sequencing e DNA microarrays²⁶⁻²⁸.

Per mutazione genetica si intende ogni modificazione stabile ed ereditabile del genoma dovuta ad agenti esterni o ad eventi casuali ma non alla ricombinazione genetica. Le mutazioni geniche possono essere alterazioni di base nella sequenza nucleotidica (mutazioni puntiformi) o alterazioni cromosomiche che si presentano come eventi “rari”. Tra le alterazioni cromosomiche si possono avere delezioni, amplificazioni, traslocazioni bilanciate e non bilanciate, inserzioni, inversioni. Le mutazioni spesso si associano ad alterazioni aberranti dell’espressione genica o proteica o ad alterazioni della funzione della proteina. Associate a diverse patologie, quando si presentano a carico di oncogeni e oncosoppressori innescano il processo di trasformazione maligna e, quindi, di tumorigenesi^{29,30}.

2.2 Varianti genetiche e risposta terapeutica

Esiste una notevole variabilità inter-individuale alla terapia farmacologica, per cui alcuni soggetti possono rispondere efficacemente ad un certo trattamento, altri non rispondere affatto, altri ancora presentare una maggiore o minore sensibilità allo sviluppo di reazioni avverse.

Le conoscenze sino ad oggi acquisite hanno dimostrato che la risposta terapeutica di un singolo soggetto ad uno specifico trattamento farmacologico è influenzata da 1) fattori fisiologici, quali età, sesso, peso corporeo, 2) fattori patologici, quali condizioni di salute, funzionalità epatica e renale, 3) fattori ambientali, quali assunzione di droghe, fumo, alcool e, soprattutto, da 3) fattori genetici.

E’ infatti ormai noto che i polimorfismi genetici (quali SNPs) a carico dei geni della farmacocinetica (coinvolti nell’assorbimento, metabolismo e clearance del farmaco) e farmacodinamica (coinvolti nella modalità di azione del farmaco) in grado di influire sull’attività enzimatica agendo sul livello di espressione genica o sulla proteina possono modificare la disponibilità e l’azione di un dato farmaco svolgendo, pertanto, un ruolo cruciale nella risposta individuale al trattamento.

Queste varianti genetiche, capaci di influenzare l’efficacia e la tossicità di un trattamento farmacologico, trovano, oggi, ampio utilizzo in clinica quali biomarcatori di risposta terapeutica in grado di predire l’effetto del trattamento e, quindi, di guidare la scelta terapeutica sia per natura che per intensità consentendo la stratificazione prognostica e terapeutica della popolazione, la personalizzazione della terapia ed una notevole ottimizzazione delle strategie terapeutiche già esistenti³¹⁻³⁴.

In campo oncologico, in particolare, l'esito di una terapia è determinato sia dal patrimonio genetico dell'individuo (polimorfismi genetici del tessuto sano) sia dal patrimonio genetico del tessuto tumorale (polimorfismi genetici e mutazioni somatiche acquisite). Nel trattamento delle malattie oncologiche, l'effetto di una terapia in termini di efficacia e di tossicità è, dunque, il risultato

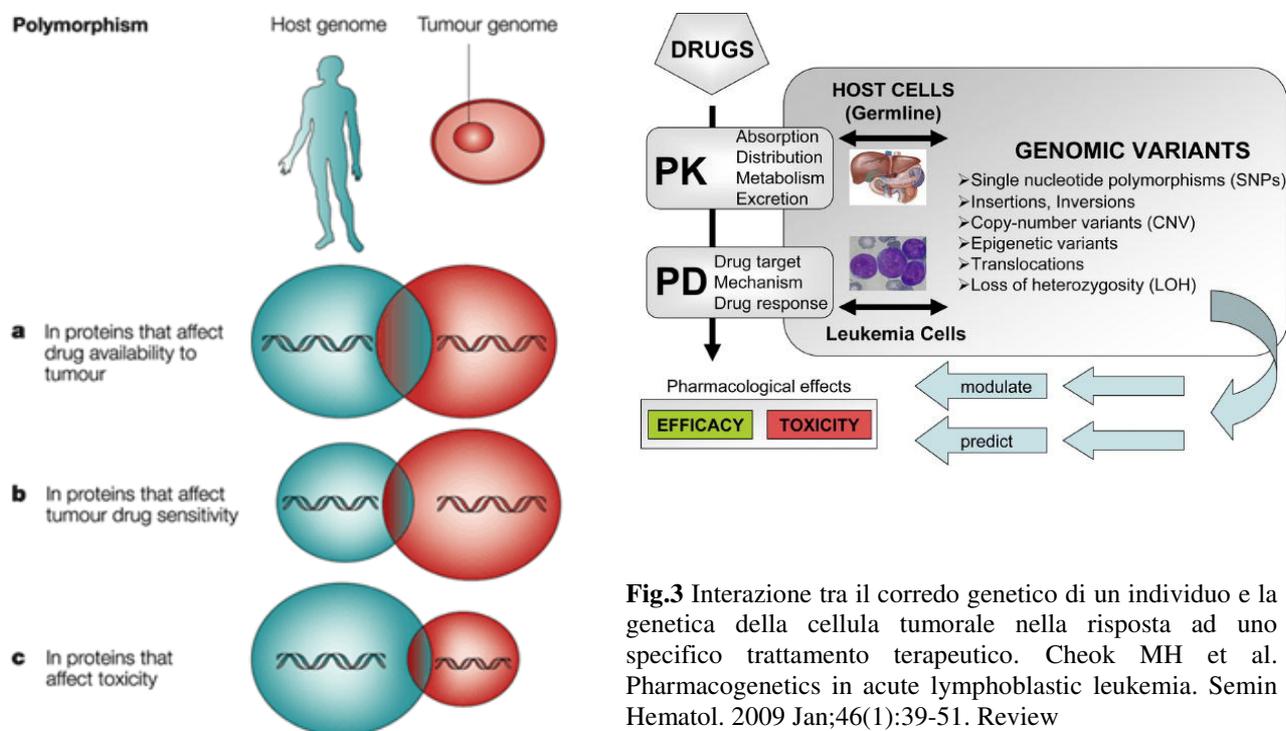


Fig.3 Interazione tra il corredo genetico di un individuo e la genetica della cellula tumorale nella risposta ad uno specifico trattamento terapeutico. Cheek MH et al. Pharmacogenetics in acute lymphoblastic leukemia. Semin Hematol. 2009 Jan;46(1):39-51. Review

dell'interazione tra i polimorfismi a carico dei geni della farmacocinetica e farmacodinamica del farmaco (presenti sia nel tessuto sano che tumorale) e le mutazioni somatiche acquisite dalla cellula tumorale nel corso della sua trasformazione maligna a carico degli stessi geni o di geni che indirettamente influenzano la risposta farmacologica (Fig.3). Le alterazioni genetiche della cellula tumorale possono, inoltre, essere alla base del meccanismo di resistenza farmacologica cellulare, principale causa di fallimento terapeutico nella terapia delle LA³⁵.

La risposta terapeutica è, dunque, un tratto poligenico che dipende dall'interazione di diverse varianti genetiche.

Che l'interazione tra la genetica della cellula normale e tumorale svolga un importante ruolo nella guida della scelta terapeutica è stato dimostrato per un numero ormai piuttosto ampio di tumori e anche nel trattamento delle LA pediatriche³² (Tab.1). Le LA pediatriche risultano malattie geneticamente estremamente eterogenee caratterizzate dall'espressione aberrante di geni di fusione o di oncogeni. Ad oggi, numerosi studi hanno dimostrato la stretta associazione tra prognosi e

sottotipo genetico^{19,36} e messo in luce importanti biomarcatori genetici di risposta farmacologica che trovano tuttora ampio utilizzo in clinica³⁷.

Table 1 | **Genetic polymorphisms known to affect responses to anticancer drugs**

Gene products	Polymorphism	Affected drugs	Effect of mutations
Dihydropyrimidine dehydrogenase	Point mutation leading to aberrant splicing	5-Fluorouracil	Possible neurotoxicity and myelosuppression
Thiopurine methyltransferase	Nonsynonymous SNPs, leading to unstable protein	Mercaptopurine, azathioprine, thioguanine	Acute: myelosuppression Chronic: secondary tumours
Glutathione transferases	Complete deletions; point mutations	Alkylators, topoisomerase II inhibitors, endogenous nucleophiles	Increased sensitivity to toxic and antitumour effects of drugs
Glucuronosyl transferase	Varying number of TA repeats in promoter	Irinotecan	Increased risk of diarrhoea and myelosuppression
CYP17	Promoter point mutation	Oestrogens	Increased risk of secondary cervical cancer
Methylene tetrahydrofolate reductase	Point mutation leading to protein instability	Methotrexate	Increased risk of mucositis

SNPs, single nucleotide polymorphisms.

Online Table 2 | **Examples of tumour genetic alterations associated with cancer drug resistance**

Gene product References	Genetic alteration	Consequence	D
p53	Mutations in the coding sequence or deletion	Mutant protein	Various anticancer drugs
Dihydrofolate reductase	Gene amplification	Increased expression	Methotrexate
P-glycoprotein (MDR1)	Increased transcription	Increased expression	Various anticancer drugs
Multidrug resistance protein 1 (MRP1)	Increased transcription	Increased MRP expression	Vincristine, doxorubicin
O ₆ -Methylguanine methyltransferase	Promoter hypomethylation	Increased expression	Alkylating agents (e.g. carmustine)
hMLH1	Promoter methylation or mutations	Decreased expression or mutant protein	Cisplatin, doxorubicin, 5-Fluorouracil
β-Tubulin	Mutations in coding sequence	Mutant protein	Paclitaxel (alteration in GTP binding site)
Topoisomerase II	Mutations	Mutant protein	Etoposide, amsacrine

Tab.1 Relling MV, Dervieux T. Pharmacogenetics and cancer therapy. Nat Rev Cancer. 2001 Nov;1(2):99-108. Review³²

2.3 Biomarcatori genetici nelle LA pediatriche

Le prime indagini sul ruolo della componente genetica nella risposta individuale ai trattamenti sono state condotte mediante studi di farmacogenetica, volti ad identificare le varianti geniche in grado di influenzare l'effetto farmacologico a partire da singoli geni candidati o da geni appartenenti a specifici pathways.

Nei primi approcci di farmacogenetica, i geni e/o i pathways candidati venivano selezionati in base alle conoscenze a disposizione sui meccanismi di farmacocinetica e farmacodinamica del farmaco in esame. Studi familiari venivano quindi realizzati per verificare la natura ereditaria/genetica delle

differenze inter-individuali nella risposta terapeutica e, successivamente, per delucidare le basi genetiche dei tratti monogenici³⁸. Da allora, numerosi polimorfismi in grado di modificare la disponibilità e l'azione del farmaco alterando l'espressione o la funzione dei geni coinvolti nei suoi meccanismi di assorbimento, distribuzione, metabolismo, trasporto, eliminazione e modalità di azione (geni targets) sono stati identificati quali determinati genetici predittivi di risposta farmacologica in grado di influenzare l'efficacia e la tossicità del farmaco stesso³¹.

Nel trattamento delle LA pediatriche, l'effetto dei polimorfismi a carico dei geni del metabolismo può essere illustrato da due importanti studi di farmacogenetica condotti sui geni della Tiopurina Methyltransferase (TPMT) e del Glutathione S-Transferase (GST).

La TPMT è un enzima ubiquitario che catalizza la S-metilazione delle tiopurine (quali la mercaptopurina, MP, e la tioguanina, TG), analoghi nucleosidici ampiamente utilizzati nel trattamento delle LAL, e risulta essere il principale meccanismo di inattivazione intracellulare delle tiopurine nel tessuto emopoietico. Ad oggi, sono state identificate 17 diverse varianti alleliche del gene TPMT; di queste, 3 alleli (TPMT*2, TPMT*3A e TPMT*3C) sono responsabili del 95% dei casi di soggetti con bassa o intermedia attività enzimatica³⁹⁻⁴³. Circa il 90% della popolazione eredita 2 alleli WT (TPMT*1) e presenta "normale" attività enzimatica, circa il 5-10% di soggetti eredita 1 allele WT e 1 allele non funzionante presentando attività enzimatica intermedia e solo 1 individuo su 300 porta 2 alleli non funzionanti con completa perdita dell'attività enzimatica. Rispetto ai pazienti con alleli WT, i soggetti eterozigoti o omozigoti per gli alleli non funzionanti necessitano di dosi più basse di tiopurine. Se, infatti, venissero trattati con dosi convenzionali, risulterebbero più esposti all'accumulo intracellulare del farmaco specie nel tessuto emopoietico e, quindi, più a rischio di sviluppare severa tossicità emopoietica che potrebbe anche essere fatale.

Il genotipo dell'enzima TPMT consente, dunque, oggi l'identificazione dei pazienti ad alto rischio di tossicità emopoietica dopo terapia con tiopurine nelle LAL guidando alla riduzione delle dosi convenzionali per i soggetti a rischio, ossia ad una personalizzazione della terapia (Fig.4).

Oggi, in diversi centri, i polimorfismi dell'enzima TPMT trovano effettivamente impiego nel disegno delle terapie con tiopurine³¹.

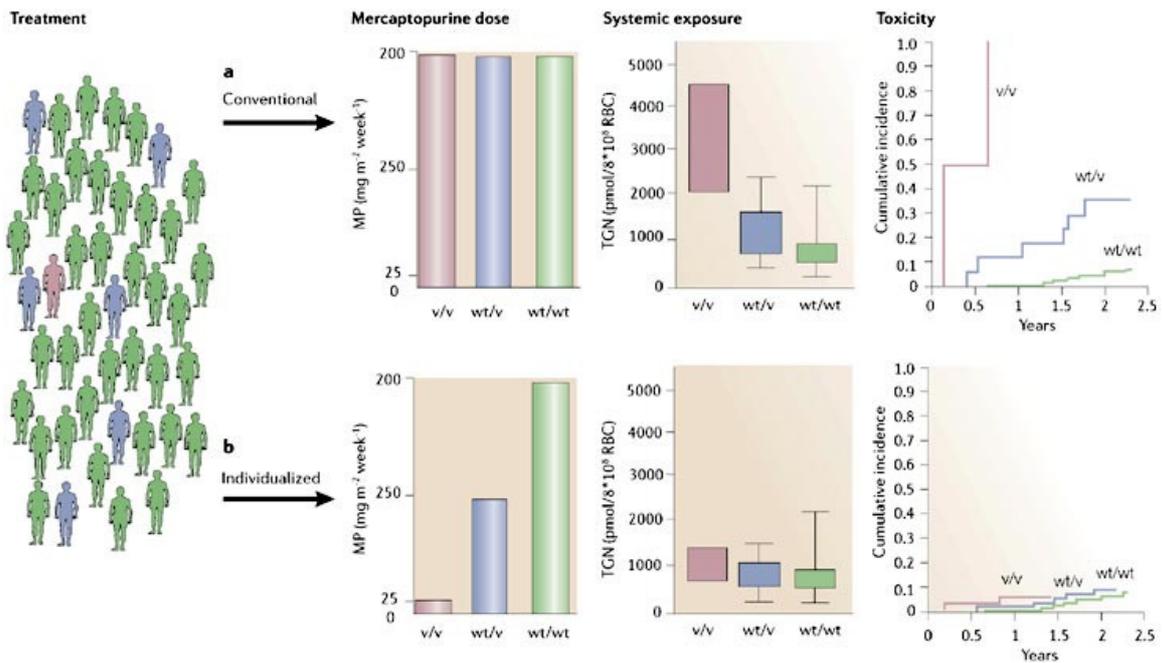


Fig.4 Cheek MH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukaemia: a model for the pharmacogenomics of cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2006 Feb;6(2):117-29³³.

I geni GST si suddividono in 4 famiglie, GST α , GST μ , GST π e GST τ . Gli isoenzimi GST sono preposti all'inattivazione di molte sostanze elettrofiliche endogene e xenobiotiche (inclusi alcuni agenti antileucemici, quali la ciclofosfamide, le antracicline, gli inibitori della topoisomerasi II e i loro metaboliti) attraverso la coniugazione con il glutatione. La loro principale azione è quella di provvedere alla detossificazione dei metaboliti reattivi ma è stato documentato anche un ruolo nella formazione di metaboliti citotossici⁴⁴⁻⁴⁶. I geni GST sono altamente polimorfici e specie quelli delle sottofamiglie GST μ , GST π e GST τ sono stati associati con una maggiore suscettibilità allo sviluppo di tumori, all'insorgenza di tumori secondari dopo terapia, alla tossicità e all'efficacia di specifici trattamenti chemioterapici⁴⁴⁻⁵³. Una delezione omozigote (genotipo nullo) dei geni GSTM1 e GSTT1 è presente in circa il 50% e il 25% rispettivamente della popolazione.

Ad oggi, numerosi studi sono stati condotti al fine di identificare l'effetto del genotipo nullo GSTM1 e GSTT1 nella risposta delle LAL e LAM a specifici protocolli terapeutici. Solo per citarne alcuni, è stata dimostrata una correlazione positiva tra il genotipo GSTT1-nullo (e non il genotipo GSTM1-nullo) e una favorevole veloce risposta al prednisolone nei pazienti pediatrici affetti da LAL^{54,55}. Il genotipo GSTT1-nullo sembrerebbe, invece, associato ad un alto rischio di tossicità e mortalità durante remissione in pazienti pediatrici affetti da LAM trattati con intensiva polichemioterapia⁵⁶. In questi stessi soggetti, il genotipo GSTM1-nullo non risulta invece associato

a diminuzione della sopravvivenza ma ad una maggiore frequenza di recidive⁵⁶ e risultati simili sono stati riportati anche in casi di LAM dell'adulto⁵⁷. Il polimorfismo dell'allele GSTP1*B si associa a bassa attività enzimatica e ad una più elevata eliminazione dell'etoposide in pazienti pediatrici afro-americani affetti da LAL trattati con steroidi, probabilmente per induzione dell'attività del trasportatore ABCB1⁵⁸. In assenza di trattamento steroideo, soggetti omozigoti per la variante allelica GSTP1*B sembrerebbero avere un migliore outcome⁵⁹ e, se affetti da LAL a intermedio-alto rischio, presentano una ridotta incidenza di ricaduta a carico del sistema nervoso centrale, probabilmente, per maggiore esposizione alla chemioterapia⁶⁰.

Altri dati risultano tuttora controversi a suggerire che gli effetti dei genotipi GST potrebbero essere altamente trattamento-specifici e influenzati da altri genotipi in linea con l'osservazione, ormai indiscussa, che la risposta farmacologica è un tratto poligenico.

Nell'ottica della valenza poligenica della risposta farmacologica, un importante approccio di studio di farmacogenetica è quello dell'analisi non di singoli geni ma di interi pathways candidati. Secondo tale strategia si ricercano direttamente, o indirettamente attraverso l'analisi di espressione genica, le varianti geniche associate alla risposta farmacologica in più geni coinvolti nei pathways metabolici e biologici del farmaco di interesse. Questo approccio ha già consentito l'identificazioni di diversi determinanti genetici di risposta terapeutica, quali biomarcatori in grado di influenzare la risposta delle cellule leucemiche alle tiopurine e al methotrexate, anche quest'ultimo, agente antileucemico largamente in uso nel trattamento delle LAL.

La mercaptopurina induce morte cellulare attraverso l'arresto della sintesi del DNA ed RNA e l'inibizione della sintesi *de novo* delle purine (*de novo* purine synthesis, DNPS).

Mediante l'analisi di espressione di 82 geni coinvolti nel metabolismo delle purine in blasti pediatrici di LAL-B con e senza il gene di fusione TEL-AML1, sono stati identificati 16 geni differenzialmente espressi, in maniera significativa, tra il sottotipo TEL-AML1 e il sottotipo senza traslocazione. In particolare, 12 geni sono risultati significativamente meno espressi nelle LAL-B TEL-AML1, quali HPRT, IMPDH, PAICS e GART.

I risultati di espressione assieme ai dati ottenuti sulla velocità di sintesi delle purine nei due sottotipi leucemici hanno, quindi, dimostrato che il sottotipo LAL-B con traslocazione TEL-AML1 presenta una minore sintesi *de novo* delle purine e una minore espressione dei geni coinvolti nel loro metabolismo rispetto ai casi LAL-B senza traslocazione⁶¹. Lo studio è esempio di come i sottotipi genetici delle leucemie possano associarsi a prognosi diversa (in questo caso positiva) per alterazioni a carico di geni che indirettamente influiscono sulla risposta farmacologica (nella

fattispecie, traslocazione TEL-AML1 che influenza l'espressione del pathway delle purine con conseguente minore DNPS).

Il methotrexate (MTX) è un analogo dell'acido folico che agisce inibendo la sintesi di purine e pirimidine nella quale fisiologicamente i folati risultano essere importanti cofattori.

Il polimorfismo G80A del gene SLC19A1, trasportatore cellulare coinvolto nell'uptake dei folati e del MTX quando somministrato a basse dosi, è risultato essere associato con livelli alterati di folati⁶², alta concentrazione plasmatica di MTX ed elevata probabilità di recidiva in pazienti pediatrici affetti da LAL⁶³. Un'elevata espressione del gene, come nei casi di LAL con iperdiploidia (circa 25% dei casi), risulta invece associata ad un migliore outcome in caso di trattamento con basse dosi del farmaco⁶⁴.

Varianti geniche a carico dei geni della thymidylate synthetase (TYMS) e del 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), coinvolti nei pathways biologici e metabolici del MTX, sono state associate rispettivamente ad elevato rischio di fallimento terapeutico in casi di LAL pediatrica^{65,66} e ad epatotossicità associata al trattamento⁶⁷, attualmente superata in clinica con somministrazioni supplementari di acido folico dopo terapia con alti dosi di MTX nei soggetti portatori del polimorfismo.

Anche la capacità della cellula leucemica di accumulare MTX polyglutammato (MTXPG) è un altro importante aspetto dell'effetto del MTX. L'evidenza di un diverso accumulo di MTXPG nei diversi sottotipi genetici di LAL pediatrica ha, quindi, spinto all'identificazione dei meccanismi molecolari responsabili. Per identificare i geni coinvolti, l'espressione di 32 geni associati al pathway dei folati è stata analizzata in blasti provenienti da pazienti pediatrici affetti da LAL a diverso sottotipo genetico, trattati con alte dosi di MTX. I risultati ottenuti hanno dimostrato che il diverso accumulo di MTXPG nei diversi sottotipi è da associarsi ad un pattern di espressione sottotipo-specifico di geni del metabolismo dei folati quali FPGS, ABCC1, ABCG2, SLC19A1. Lo studio ha consentito una migliore conoscenza dei meccanismi molecolari di resistenza farmacologica al MTX associata ai diversi sottotipi offrendo la possibilità di disegnare interventi terapeutici specifici sulla base della genetica delle cellule leucemiche⁶⁸.

In ultimo, l'evidenza più significativa di come lo studio della genetica delle cellule tumorali possa consentire il trattamento con terapie specifiche è fornita dall'identificazione del gene di fusione BCR-ABL nelle cellule maligne e dall'impiego del suo inibitore specifico "imatinib", attualmente in uso in clinica con ragionevole successo⁶⁹; le LAL con tale traslocazione vengono classificate come Cromosoma Philadelphia-positive. Mutazioni nel gene BCR-ABL sono associate a ricaduta⁶⁹,

per cui importante è, inoltre, l'identificazione in clinica delle mutazioni acquisite per individuare i casi di resistenza e, quindi, di fallimento terapeutico.

Numerosi altri studi hanno messo in luce varianti geniche in grado di modulare l'efficacia e l'intensità di una data terapia a carico di trasportatori di membrana⁷⁰, geni targets⁷¹⁻⁷⁵ ed enzimi del metabolismo, dimostrando come specifici genotipi o alterazioni possano consentire nella pratica clinica l'ottimizzazione delle terapie^{76,77} nel trattamento delle LA pediatriche come in altre neoplasie^{78,79}.

Due aspetti molto importanti emergono dagli studi finora condotti.

In primo luogo, molti di questi suggeriscono che l'effetto farmacologico di una specifica variante genica potrebbe essere strettamente associata ad uno specifico protocollo terapeutico e non ad altri, benché utilizzati sempre nel contesto della medesima patologia. L'associazione può essere influenzata, infatti, dalla natura di altri chemioterapici somministrati, dalla dose o dalla schedula di trattamento e dal tipo di trattamenti di supporto. Prima dell'indicazione clinica per l'impiego di un biomarcatore genetico è necessario, pertanto, validarne l'associazione con l'effetto farmacologico presso altri centri e/o nell'ambito di altri protocolli³¹.

In secondo luogo, da molti lavori di "farmacogenetica dei pathways", è emersa l'importanza dell'interazione di più varianti geniche nella definizione della risposta terapeutica. Tali interazioni risultano particolarmente importanti nei casi di geni a bassa penetranza o aventi un basso effetto sulla disponibilità o risposta al farmaco per cui solo quando diverse condizioni avvengono nello stesso pathway l'effetto combinato diventa clinicamente significativo.

2.4 Biomarcatori genetici e prospettive terapeutiche

I primi studi di farmacogenetica hanno delucidato il ruolo della genetica delle cellule normali e tumorali nell'effetto farmacologico, introducendo in clinica il concetto di biomarcatore o determinante genetico di risposta terapeutica quale variante genica in grado di modulare e predire l'efficacia e la tossicità della risposta farmacologica.

I risultati ottenuti consentono, dunque, di inserire tra i fattori prognostici di terapia precedentemente noti, quali età, sesso, conta dei globuli bianchi all'esordio (WBC) e malattia minima residua (MRD), anche fattori genetici: sottotipo genetico di leucemia; alterazioni geniche acquisite dalla cellula leucemica che inducono resistenza farmacologica; polimorfismi genetici.

Alla luce di questi ultimi importanti risultati, è ormai chiaro che un significativo miglioramento nel trattamento oncologico è realizzabile mediante l'identificazione di determinanti genetici, oltre che clinici, di risposta terapeutica 1) per individuare già alla diagnosi i soggetti che potrebbero effettivamente beneficiare di uno specifico trattamento terapeutico ed orientare i rimanenti verso altri approcci alternativi e più specifici, 2) per identificare i pazienti più a rischio di sviluppare reazioni avverse per i quali modulare l'intensità di terapia, 3) per indagare più attentamente i meccanismi di resistenza delle cellule tumorali e, quindi, 4) per mettere in luce nuovi bersagli farmacologici verso cui indirizzare trattamenti più specifici e mirati. Insomma, per consentire la realizzazione di una terapia personalizzata sia in natura che in intensità sulla base del patrimonio genetico dell'individuo e dell'assetto molecolare della patologia.

Questi obiettivi sono oggi facilmente raggiungibili mediante studi di farmacogenomica che, rispetto alla farmacogenetica, consente l'identificazione delle basi genetiche associate alla variabilità inter-individuale ai trattamenti sull'intero genoma umano divenendo tra l'altro un importante strumento di "drug discovery".

3. Farmacogenomica

3.1 Definizione

La farmacogenomica è lo studio delle basi genetiche associate alla risposta ad un farmaco sull'intero genoma umano e nasce dal recente sviluppo di nanotecnologie (quali DNA microarrays e, recentemente, Next Generation Sequencing) che consentono l'analisi di tutto il patrimonio genetico di cellule e tessuti e, quindi, la realizzazione di "Whole-Genome Sampling Analysis" (WGSA). Lo studio sull'intero genoma permette tra l'altro l'analisi della genetica della risposta farmacologica quale tratto poligenico.

Con farmacogenomica si vuole dunque intendere uno studio "genome-wide" volto ad identificare un intero set di geni rilevanti per il loro effetto sulla risposta farmacologica ad uno specifico trattamento. Questo studio consente l'individuazione degli effetti delle varianti geniche sui singoli geni e la valutazione delle interazioni tra i vari prodotti genici nel contesto di pathways biologici e farmacologici nonché la caratterizzazione dei fenotipi di risposta terapeutica che risultano da queste interazioni poligeniche. I risultati ottenuti, integrati con i fattori non genetici in grado di modificare a loro volta l'effetto farmacologico, potrebbero spiegare le basi delle differenze inter-individuali alla terapia con l'ottimizzazione e l'individualizzazione del trattamento terapeutico.

Gli studi di farmacogenomica, avvalendosi delle più moderne tecnologie di analisi genomica, esplorano e interrogano tutto il genoma con diversi approcci in grado di analizzare la componente genetica associata ad un trattamento a diversi livelli⁸⁰. In campo oncologico, gli *studi di SNP genotyping* sono eseguiti sul DNA germinale (tessuto sano) per identificare SNPs e genotipi associati al metabolismo e all'azione del farmaco³³. Gli studi di *Copy Number Analysis*, che consistono in studi di citogenetica CGH, sono invece realizzati nel tessuto tumorale al fine di individuare variazioni strutturali genomiche (per esempio delezioni, amplificazioni, CNVs) che si possano associare alla risposta farmacologica⁸¹. Gli *studi di Gene Expression Profiling*, finalizzati all'analisi del trascrittoma cellulare, consistono invece nell'identificazione del profilo di espressione genica del tessuto tumorale e consentono l'individuazione dei geni i cui livelli di espressione, dovuti a polimorfismi o a variazioni genetiche acquisite dalla cellula tumorale, si associano alla risposta farmacologica. Gli studi di Gene Expression Profiling permettono l'identificazione di marcatori genetici e, considerando la risposta terapeutica come tratto poligenico, di "signatures" di espressione genica associati alla sensibilità o alla resistenza ad uno specifico trattamento, delucidano i meccanismi di resistenza cellulare e mettono in luce nuovi bersagli molecolari verso cui indirizzare terapie innovative più efficaci e mirate⁸².

Recentemente, tecnologie ancora più avanzate consentono, anche, la realizzazione di studi Whole-genome di *ricerca de novo di variazioni nucleotidiche* (ricerca mutazionale o di nuovi SNPs)⁸³⁻⁸⁵ e l'identificazione del profilo di espressione dei miRNAs, molecole non codificanti di RNA per cui è ormai noto un coinvolgimento in diverse patologie anche tumorali⁸⁴⁻⁸⁷.

La farmacogenomica, identificando le basi genetiche associate ad una risposta terapeutica sull'intero genoma, permette da un lato l'individuazione di marcatori, anche precedentemente ignoti, che si associano alla variabilità inter-individuale ai trattamenti e da questa il disegno di terapie personalizzate sia in natura che in intensità (quale farmaco a quale dose per ciascun paziente), dall'altro consente l'identificazione di nuovi bersagli molecolari rappresentando un preziosissimo strumento di *drug discovery* fornendo informazioni necessarie per il disegno di strategie terapeutiche più mirate e specifiche per il trattamento della patologia⁸⁸⁻⁸⁹.

Il bassissimo indice terapeutico dei farmaci antitumorali e la notevole variabilità inter-individuale ai regimi chemioterapici rendono le neoplasie le principali patologie per cui realizzare oggi studi di farmacogenomica per il disegno di terapie meno tossiche e più efficaci sulla base dell'assetto molecolare della patologia e del corredo genetico dei singoli individui.

3.2 Studi di SNP genotyping e Copy Number Analysis (CGH)

Gli studi di SNP genotyping, resi possibili dallo sviluppo di SNP-arrays, consentono l'identificazione delle varianti polimorfiche a singolo nucleotide (SNPs) e dell'assetto allelico del locus genico (genotipo) associati ad uno specifico fenotipo. Gli studi delle varianti polimorfiche consistono in veri e propri Genome-Wide Association Studies (GWAS). Mediante tecniche di microarray su SNP-arrays, l'intero corredo genico di un individuo viene genotipizzato e studi di associazione tra genotipi e risposta terapeutica consentono l'identificazione dei polimorfismi coinvolti. Gli studi di genotyping vengono eseguiti sul patrimonio genetico dell'individuo (DNA germinale) e, data la fruibilità, comunemente sul DNA isolato da un prelievo di sangue periferico.

Gli SNP-arrays consentono anche una analisi globale del cariotipo di cellule e tessuti restituendo un "cariotipo virtuale" sul quale è possibile realizzare analisi di Copy Number e di Loss Of Heterozygosity, LOH (anche "copy-neutral" LOH).

Gli studi di Copy Number permettono l'identificazione di variazioni strutturali, quali CNVs o microdelezioni e microamplificazioni aberranti acquisite dalla cellula tumorale, che potrebbero

associarsi ad uno specifico profilo di risposta terapeutica (successo terapeutico, resistenza, tossicità).

Gli studi di LOH consentono l'individuazione delle regioni geniche in cui si è perso il contributo di uno dei due cromosomi omologhi con perdita di materiale genetico (tipo per delezione) o senza perdita di materiale genetico ("copy-neutral" LOH) come nel caso delle Disomie Uniparentali germinali (UPD) o delle Disomie Uniparentali acquisite dalla cellula somatica per fenomeni di conversione genica, ricombinazione mitotica o non-disgiunzione. Le UPD acquisite risultano abbastanza frequenti nei tumori solidi ed ematologici rappresentando buona parte dei fenomeni di LOH nei tumori umani. Copy-neutral LOH non possono essere identificate mediante altre tecniche oggi comunemente in uso quali array-CGH, FISH o citogenetica convenzionale se non con SNP-arrays.

Uno studio di Loss Of Heterozygosity su pazienti pediatriche affette da LAL ha permesso di individuare regioni di LOH tumore-specifiche (presenti nelle cellule leucemiche ma non nei leucociti normali durante la remissione) alla diagnosi e alla recidiva o solo alla recidiva. Quest'ultime sono state associate alla resistenza farmacologica o alla progressione di malattia⁸¹. Un'elevata frequenza di LOH è stata riscontrata in una regione del cromosoma 9p⁹⁰, contenente i geni oncosoppressori p16 (CDKN2A, INK4A/ARF) e p15 (CDKN2B, p15INK4B), la cui perdita è stata successivamente associata alla progressione tumorale⁹¹.

Lo sviluppo di SNP-arrays di nuova generazione (DNA microarrays ad alta densità) assieme all'inclusione della farmacogenomica nei trial clinici ha il potenziale per identificare numerose varianti geniche attualmente non note associate al trattamento delle patologie oncologiche consentendo la stratificazione terapeutica della popolazione e una scelta mirata del tipo e della dose di terapia per ciascun paziente^{92,93}.

3.3 Studi di Gene Expression Profiling

Gli studi di Gene Expression Profiling consistono nella valutazione globale dell'espressione dell'intero trascrittoma di cellule e tessuti. Nell'ambito della farmacogenomica, consentono l'identificazione dei geni i cui livelli di espressione si associano alla risposta terapeutica e, mettendo in luce tutti gli elementi potenzialmente coinvolti, aprono nuove prospettive per una veloce ricerca di biomarcatori di terapia non noti.

Una volta rilevati i geni implicati nella risposta terapeutica, rendono possibile, tra l'altro, l'individuazione e la localizzazione delle varianti geniche coinvolte; queste possono essere

polimorfismi o mutazioni acquisite dalle cellule tumorali presenti a livello dei geni identificati o di altri che a loro volta ne influenzano l'espressione, come nel caso di alterazioni in sequenze codificanti per fattori di trascrizione⁹⁴.

Già diversi studi di Gene Expression Profiling sono stati condotti nell'ambito delle LA pediatriche. Questi hanno consentito, inizialmente, una migliore classificazione e caratterizzazione genetica-molecolare dei diversi sottotipi di LAL e LAM identificando tipi leucemici a diverso profilo di espressione genica per i quali si sono poi osservati distinti decorsi terapeutico-prognostici⁹⁵⁻¹⁰³; successivamente, hanno permesso l'individuazione dei marcatori associati ai sottotipi tumorali e alla prognosi¹⁰⁴⁻¹¹¹, di patterns e determinanti genetici di resistenza farmacologica, tossicità e outcome terapeutico^{82,112-118} nonché di nuovi bersagli di terapia^{119,120}.

Per il rilievo clinico della resistenza farmacologica intrinseca o acquisita nel trattamento delle LA¹⁴, l'attenzione di molti autori è stata particolarmente rivolta all'identificazione di biomarcatori di resistenza e alla delucidazione dei meccanismi alla sua base; molti lavori di Gene Expression Profiling sono stati, dunque, finalizzati ad individuare specifici determinanti genetici e soprattutto, considerando la molteplicità delle interazioni probabilmente responsabili, ad identificare interi patterns di geni che potessero trovare impiego quali "predittori" della resistenza individuale a determinati trattamenti terapeutici^{82,116,117,121} (Fig.5).

Uno studio condotto sulle LAL pediatriche, confrontando il profilo di espressione genica dei blasti leucemici sensibili e resistenti ad un dato trattamento *in vitro*, ha messo in luce i geni strettamente associati alla resistenza *in vivo* a quattro agenti antileucemici di ampio uso clinico: Prednisone, Vincristina, L-asparaginasi e Daunorubicina⁸². I patterns di resistenza identificati, presentando scarsissima sovrapposizione tra loro, sono risultati essere strettamente specifici per ciascun trattamento, suggerendo, pertanto, differenti meccanismi molecolari di resistenza per ciascun farmaco; inoltre, sono risultati significativamente associati alla risposta terapeutica *in vivo* in analisi multivariata con noti fattori di rischio (età, WBC, sottotipo genetico) nonché effettivamente predittivi di outcome terapeutico in una coorte indipendente di pazienti pediatriche LAL trattati con gli stessi agenti in un diverso protocollo terapeutico e in un altro centro oncologico⁸². In uno studio successivo¹¹⁷, un unico set di 49 geni (diversi da quelli precedentemente identificati) è stato associato alla resistenza al trattamento combinato con i quattro agenti ed è risultato in grado di identificare un sottogruppo di soggetti LAL con scarso outcome di terapia e basse percentuali di sopravvivenza¹¹⁷.

Un lavoro analogo è stato recentemente condotto nelle LAM per individuare i determinanti predittivi di risposta/resistenza alla Citarabina (Ara-C), farmaco d'elezione nel trattamento della patologia¹¹⁶. In tale studio si sono identificati i profili di espressione genica di cellule leucemiche di pazienti pediatriche affetti da LAM associati a multipli *in vitro* e *in vivo* end-points farmacologici e clinici (quali, concentrazione intracellulare del metabolita attivo dell'Ara-C, Ara-CTP, velocità di sintesi del DNA, valutazione morfologica della risposta clinica, durata dell'event free-survival, EFS, malattia minima residua, MRD, sensibilità *in vitro* all'Ara-C delle cellule leucemiche). Lo studio, i cui risultati sono stati validati con successo in una coorte indipendente di soggetti pediatriche con LAM trattati con Ara-C secondo un diverso protocollo terapeutico, ha consentito l'identificazione di "signatures" e marcatori genici i cui livelli di espressione si associano specificamente al fallimento e al successo terapeutico, indipendentemente dal sottotipo genetico di leucemia. Tra i determinanti di resistenza, solo per citarne alcuni, sono stati identificati i geni PIK3C3 (coinvolto nel pathway PI3K/PTEN/Akt/mTOR avente un ruolo nella crescita cellulare e per il quale si è documentata significativa attivazione in vari tumori, quale la stessa leucemia¹²²) e HOXB7; tra i biomarcatori di buona risposta terapeutica, MAPK11 (Map Kinase coinvolta in vari processi, come apoptosi e differenziamento) e FASLG (ligando del recettore Fas, avente ruolo nell'apoptosi)¹¹⁶.

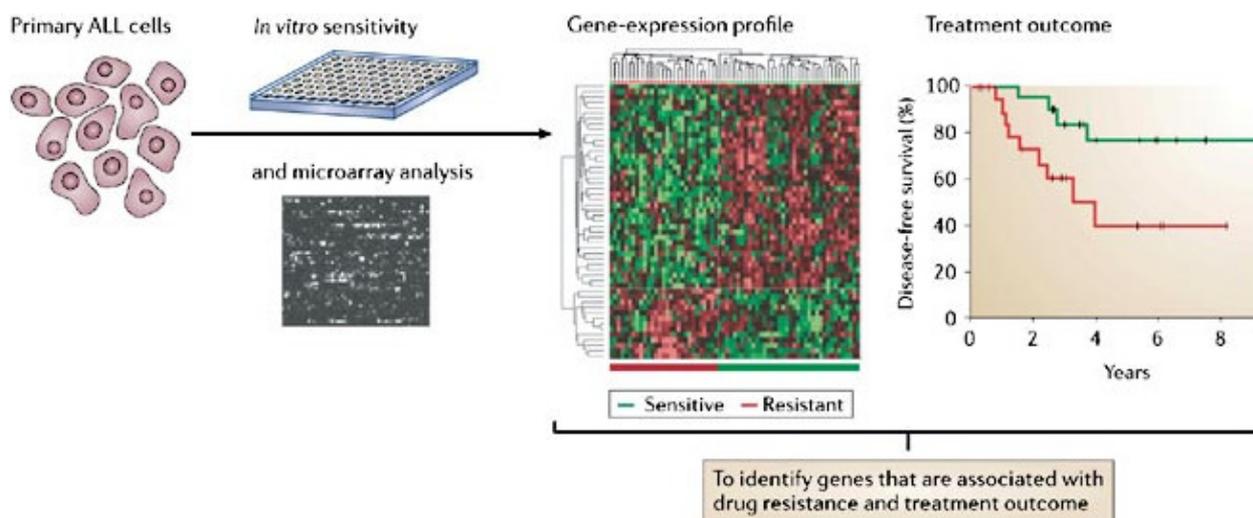


Fig.5 Cheok MH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukaemia: a model for the pharmacogenomics of cancer therapy. Nat Rev Cancer. 2006 Feb;6(2):117-29³³.

Gli studi di Gene Expression Profiling forniscono, dunque, chiare indicazioni su come l'espressione di piccoli set di geni possa identificare cellule tumorali resistenti a specifici trattamenti e determinare l'outcome della terapia: assieme ad altri fattori prognostici, anche non genetici, "signatures" specifiche possono essere utilizzate quali predittori di risposta per identificare i soggetti con cellule tumorali a profilo genetico sovrapponibile e, quindi, sensibili o resistenti al trattamento. Inoltre, offrono la possibilità di individuare nuovi bersagli terapeutici verso cui indirizzare terapie innovative ed efficaci: trattamenti mirati ad aumentare l'attività dei geni associati ad una buona risposta farmacologica o ad inibire quella di biomarcatori di resistenza potrebbero consentire un miglioramento nella terapia delle LA come di altre malattie oncologiche. Infine, l'identificazione specifica delle varianti geniche responsabili dell'espressione dei marcatori selezionati potrebbe consegnare alla medicina nuovi determinanti genici di facile utilizzo nella pratica clinica.

3.4 Il futuro della farmacogenomica

Lo sviluppo di nuove tecnologie, basate su approcci di analisi "Genome-Wide", consente oggi lo studio della genetica di ciascun individuo (DNA germinale) e della genetica delle cellule tumorali e quindi, attraverso studi di SNP genotyping, copy number e gene expression profiling, la realizzazione di Genome-Wide Association Studies (GWAS) tra genetica e risposta farmacologica. I risultati consentono l'identificazione di marcatori genetici in grado di identificare i soggetti eleggibili per un dato trattamento, di predire l'efficacia e la tossicità di un intervento terapeutico, di suggerire nuovi approcci di terapia.

La farmacogenomica, dunque, apre nuove prospettive per l'ottimizzazione e la personalizzazione della terapia in modo che risulti specifica, ad elevata efficacia e a bassa tossicità per ciascun paziente guidando alla scelta della cura, alla scelta della dose appropriata e allo sviluppo di farmaci tumore-specifici mediante individuazione di nuovi bersagli farmacologici.

Un aspetto importante degli approcci di farmacogenomica è la possibilità di valutare contemporaneamente il coinvolgimento di più geni in linea con le attuali conoscenze secondo le quali la risposta farmacologica è per lo più un tratto poligenico il cui fenotipo è il risultato dell'interazione di più varianti geniche⁹².

Per una corretta interpretazione dei dati di farmacogenomica ed una efficace traslazione in clinica, sarà importante, pertanto, garantire lo sviluppo di sistemi bioinformatici e di databases genetici (come il database HapMap project) che consentano la valutazione e l'analisi delle varianti geniche e delle interazioni dei prodotto genici, con integrazione di informazioni genetiche, biologiche, farmacologiche e cliniche^{123,124}. A tal fine "systems biology" si afferma recentemente come un

nuovo campo di studio inter-disciplinare orientato all'identificazione dei meccanismi alla base delle interazioni e dei "network" biologici. Il principio di base, innovativo, è la necessità di utilizzare un approccio di analisi olistico invece che riduttivo che preveda pertanto la raccolta, l'integrazione e l'analisi di informazioni multiple, disponibili da più fonti sperimentali attraverso l'utilizzo di diversi strumenti di studio (transcriptomica, proteomica, metabolomica, epigenomica, genomica ed altri *Omic*s)¹²⁵⁻¹²⁷.

Inoltre, nell'ottimizzazione della terapia, sarà necessario determinare come l'informazione genetica possa essere integrata con i dati sui fattori non genetici a loro volta responsabili della variabilità inter-individuale ai trattamenti.

Nei futuri studi di farmacogenomica, gli approcci di proteomica potrebbero rappresentare un ulteriore valido strumento di analisi fornendo informazioni sulle modificazioni post-trascrizionali e post-traduzionali dei prodotti genici e, affiancati agli attuali sistemi di studio dei profili genetici di cellule normali e tumorali, potrebbero velocizzare e ottimizzare la ricerca di determinanti genici significativi.

A tal fine, la necessità di raccogliere informazioni sulla relazione tra genetica e risposta a terapia suggerisce l'importanza di avviare trial clinici in cui sia prevista la raccolta del materiale genetico dei pazienti arruolati (e/o del tessuto tumorale) e magari l'inclusione negli stessi di end points che potrebbero essere utilizzati per l'identificazione di nuovi biomarcatori di terapia⁹³.

In ultimo, è assolutamente necessario ricordare che specifiche varianti geniche possono risultare associate ad un fenotipo farmacologico solo nel contesto di un certo protocollo o per una certa etnia. Prima di un possibile ampio impiego clinico, i dati di farmacogenomica richiederanno, pertanto, una scrupolosa validazione in altri protocolli e in altri gruppi etnici per verificare l'accuratezza dell'associazione tra determinante genico e risposta farmacologica.

In questo contesto, futuri studi di farmacogenomica consentiranno un notevole miglioramento nella terapia delle LA pediatriche come di altre malattie oncologiche¹²⁸⁻¹³¹.

3.5 Le tecnologie della farmacogenomica: DNA Microarray e Next Generation Sequencing

Per la sua realizzazione la farmacogenomica si avvale di potenti e innovative tecnologie in grado di analizzare l'intero genoma di cellule e tessuti.

I primi studi sono stati effettuati grazie allo sviluppo dei DNA microarrays che, dopo il progetto genoma umano, hanno consegnato buona parte dello stesso in sequenze raccolte e fissate su supporti solidi in grado di interrogare, attraverso l'ibridazione, la presenza di DNA o RNA complementare nel genoma di interesse.

In particolare, i DNA microarrays (battezzati anche GeneChips, DNA Chips o biochips) sono una collezione di spots (features) di DNA su un supporto solido. Ciascuno spot contiene picomoli di specifiche sequenze nucleotidiche (probes) che, porzioni di geni o altri elementi di DNA, sono in grado di riconoscere, sotto le condizioni altamente stringenti dell'ibridazione, sequenze complementari nel campione di interesse (target) il cui DNA o RNA è stato marcato e convertito in cDNA o cRNA. L'ibridazione probe-target è poi rilevata e quantificata mediante fluorocromi o chemiluminescenza per determinare la quantità di sequenze nucleotidiche complementari nel target. Negli "spotted-arrays" le probes sono prima sintetizzate (come oligonucleotidi, BAC, cDNA o prodotti di PCR) e quindi depositate e fissate sul supporto solido che può essere un'ampia superficie in vetro o silicone (tipo i GeneChips Affymetrix) o microscopiche biglie (tipo gli arrays Illumina). Diversamente i microarrays possono essere costruiti mediante la sintesi chimica diretta di probes oligonucleotidiche sul supporto solido (*in situ*) attraverso tecniche di fotolitografia¹³² o "ink-jet deposition"¹³³. Le sequenze possono essere di circa 60-mer (Agilent) o 25-mer (Affymetrix). Questi ultimi sono battezzati "oligonucleotide-arrays". Mentre solo gli oligonucleotide-arrays aventi probes a corti oligonucleotidi (quali SNP-arrays) sono indicati per l'identificazione di variazioni nella sequenza genica, tutti i tipi di microarrays possono essere impiegati per individuare alterazioni strutturali (studi di CGH)¹³⁴. Tuttavia anche per quest'ultimo tipo di analisi gli oligonucleotide-arrays risultano ormai i migliori candidati: anche se potrebbero presentare una minore coverage del genoma rispetto ad arrays con probes a dimensioni maggiori (tipo BACs, bacterial artificial chromosome clones) offrono la possibilità di identificare piccole alterazioni strutturali presentando maggiore risoluzione e maggiore sensibilità rispetto ad altri tipi di arrays^{135,136}.

Un'ulteriore distinzione dei microarrays può essere fatta sulla base di come risultano spazialmente organizzati. L'array tradizionale è un "solid-phase array" (chip) che consiste in features localizzate in posizioni note su un singolo DNA microarray. Il "bead-array", invece, è una collezione di microscopiche biglie in polistirene ognuna con una specifica probe e un rapporto di due o più "dyes" che non interferiscono con il "dye" fluorescente delle sequenze target.

In ultimo, i Two-channel (two-color) microarrays sono tipicamente ibridati contemporaneamente con cDNAs provenienti da 2 campioni marcati diversamente (Agilent Dual-Mode Platform, Eppendorf Dual Chip platform), nei Single-channel (one-color) microarray, invece, l'ibridazione interessa un solo campione: l'array fornisce l'intensità per ciascuna probe e probeset associata alla quantità di sequenze target legate; in corso d'analisi poi più chip, e quindi più campioni, vengono confrontati tra loro. Gli Array one-color sono alla base del funzionamento di diverse piattaforme di microarray quali Affymetrix GeneChip, Illumina BeadChip, Agilent single-Channel array, Applied microarray Codelink array, Eppendorf Dual Chip e Silver Quant.

I notevoli progressi industriali e chimici compiuti dalle compagnie di produzione di microarrays consentono oggi la realizzazione di oligonucleotide-arrays ad alta densità (10^5 - 10^6 probes per array) in grado di coprire ormai un'ottima parte del genoma umano con alta risoluzione.

I DNA microarrays rappresentano un importante e consolidato strumento analitico nel campo della farmacogenomica per il loro potenziale di analisi su l'intero genoma.

I microarrays sono già stati usati con successo per l'identificazioni di variazioni strutturali quali microamplificazioni, microdelezioni e CNVs¹³⁷⁻¹³⁹ (studi di Copy Number, CGH) lasciando alle ben note metodiche di rilevazione sequenza-specifiche, FISH (fluorescent *in situ* hybridization) e PCR quantitativa, un ruolo secondario di validazione. L'avvento degli oligonucleotide-arrays ad alta densità, e quindi ad alto "coverage", consentono oggi l'individuazione di alterazioni geniche sulla quasi totalità del genoma umano con ottima sensibilità ed alta risoluzione¹³⁹⁻¹⁴⁰. I microarrays non sono, tuttavia, del tutto in grado di identificare alterazioni senza perdita di materiale genetico quali inversioni e traslocazioni bilanciate¹³⁴.

Un'altra importante applicazione dei microarrays consiste nella identificazione di SNPs già noti e del loro genotipo e nella ricerca *de novo* di variazioni nucleotidiche non note della sequenza genica. La determinazione di SNPs e del genotipo (studi di genotyping)^{141,142} hanno, ad oggi, fornito importanti indicazioni su determinanti genici di malattia e di terapia. La ricerca di varianti di sequenza non note risultano, invece, in studi di ricerca mutazionale basata sui microarrays (re-sequencing microarrays) che benché abbiano prodotto qualche piccolo successo¹⁴³ si presentano ancora di difficile realizzazione e, soprattutto, possibili solo su genomi di piccole dimensioni, quali quello mitocondriale^{144,145} e virale¹⁴⁶ a meno che non si preveda l'utilizzo di più arrays^{147,148} o la messa a punto di approcci alternativi¹⁴⁹⁻¹⁵¹.

I microarrays sono stati anche impiegati per lo sviluppo di strategie volte all'identificazione di inserzioni geniche dovute a trasposoni, elementi genetici mobili¹³⁴. Data la rilevanza biologica ormai riconosciuta anche per l'uomo^{152,153}, l'analisi della loro presenza richiede in futuro una ulteriore ottimizzazione, ad esempio attraverso l'utilizzo del sequenziamento di seconda generazione¹³⁴.

In ultimo, i DNA microarrays trovano ampio utilizzo nello studio del profilo di espressione genica di cellule e tessuti che, nel campo della farmacogenomica, come precedentemente discusso, ha già consentito una migliore caratterizzazione e classificazione di diversi tipi di tumore nonché l'identificazione di "predittori" di risposta farmacologica, nello studio dei patterns di espressione dei miRNAs, nell'identificazione di forme di splicing alternative (Exon junction arrays ed Exon arrays) e nella realizzazione di studi di Chromatin Immunoprecipitation on Chip (ChIP on chip).

I microarrays forniscono una mole di dati per cui si richiede, a termine della fase sperimentale, l'utilizzo di sofisticati software e tool di analisi. Molti algoritmi e sistemi statistici sono disponibili e in continua evoluzione per l'elaborazione dei dati grezzi e, quindi, per l'analisi e la visualizzazione, per l'identificazione delle sequenze, delle alterazioni geniche e dei geni differenziali in studi di gene expression¹⁵⁴⁻¹⁵⁶. Inoltre nell'era del "systems biology", secondo cui i dati devono essere analizzati nella loro completezza, sono sempre più numerosi i tools emergenti finalizzati alla valutazione biologica delle informazioni ottenute (tipo Gene Ontology) e all'interpretazione dei risultati nel contesto di specifici pathways e network biologici.

In conclusione, i DNA microarrays consentono una veloce caratterizzazione del genoma cellulare permettendo l'identificazioni di numerose varianti geniche; allo stesso modo, però, presentano alcune limitazioni. In primo luogo, rispetto alle metodiche di sequenziamento *de novo* interrogano solo sequenze già note, per cui sequenze non precedentemente identificate da approcci di sequenziamento vengono perse nell'analisi. In secondo luogo, non permettono l'analisi di sequenze altamente ripetute quali trasposoni e regioni telomeriche, oltre alla già citata limitazione nel campo della ricerca mutazionale.

Una nuova tecnologia all'avanguardia nello studio del genoma umano è il sequenziamento di seconda generazione (Next Generation Sequencing, NGS) così battezzato perché successivo al metodo tradizionale di Sanger. Gli approcci di NGS consentono il sequenziamento in parallelo di tutte le sequenze del genoma (massive parallel sequencing) consentendo ricerca mutazionale, di polimorfismi (genotyping) e di alterazioni strutturali, comprese traslocazioni bilanciate^{157,158}.

E' possibile sequenziare il DNA o l'RNA (trascrittoma) di cellule e tessuti¹⁵⁸.

Il sequenziamento del DNA può esser fatto su tutto l'intero genoma (Whole-genome sequencing) oppure solo su certe regioni del genoma (targeted re-sequencing). L'approccio "Whole-genome sequencing" consente di identificare SNPs e mutazioni in regioni codificanti e non codificanti del genoma, di fare analisi di copy number e di individuare riarrangiamenti cromosomici. Piattaforme NGS di ultima generazione, avendo output in Gb molto elevate, consentono il sequenziamento dell'intero genoma (3Gb) con una "coverage" del 50X, intendendo per "coverage" il "numero di volte" in cui il genoma viene letto a favore di una migliore accuratezza e, quindi, attendibilità e completezza dei dati finali. Per il genoma è raccomandata almeno una coverage del 30x. Il "Target re-sequencing" consente il sequenziamento solo di specifiche regioni che possono essere tutti gli esoni, ossia le regioni codificanti del genoma (Exome sequencing), oppure specifiche regioni di

interesse su specifica indicazione (Custom sequencing o Custom amplicon sequencing). Queste ultime due opzioni sono consigliate per validazione, valutazione di geni di specifici pathways o per screening. L'Exome sequencing consente ricerca di SNPs, mutazioni e variazioni strutturali che coinvolgono le regioni esoniche ma anche il sequenziamento di parte delle regioni fiancheggianti gli esoni (quali promotori o introni che potrebbero avere un ruolo nel livello di espressione genica e nello splicing), delle regioni regolatorie 5'UTR e 3'UTR, dei miRNAs e di altri non-coding RNAs (Exome sequencing Illumina).

In linea generale, un approccio di "Target re-sequencing" rispetto al "Whole-genome sequencing" consente di analizzare un maggior numero di campioni con una buona coverage e con un abbattimento dei costi per campione.

Il sequenziamento del trascrittoma (RNA-Seq) consiste invece nel sequenziamento di RNA codificante (mRNA-Seq) o non codificante (small RNA, ncRNA-Seq). Il primo (mRNA-Seq) permette l'identificazione di SNPs, mutazioni, forme di splicing alternative e nuovi geni di fusione a carico di RNAs codificanti per proteine^{159,160}.

Vista l'ampia possibilità di analisi, uno studio di sequenziamento va disegnato sulla base del tipo di informazione da ricercare¹⁶¹. Molte varianti geniche associate a malattia sono presenti a livello degli esoni (o regioni codificanti) del genoma. Nella ricerca mutazionale, per esempio, si può allora decidere di concentrare l'attenzione solo sulla porzione codificante del DNA che costituendo l'1-2% dell'intero genoma permette l'analisi di più campioni a buon coverage e a minor costo.

Alle applicazioni della tecnologia NGS sopra citate vanno inoltre aggiunte l'assemblamento *de novo* di genomi batterici o eucariotici semplici, lo studio Genome-Wide del profilo epigenetico di cellule e tessuti (ChiP-seq, methyl-seq e DNase seq) e la realizzazione di analisi metagenomiche^{162,163}.

Le tecnologie Next-Generation Sequencing rappresentano uno strumento emergente per l'identificazioni di nuovi marcatori genetici^{158,164}.

Oggi sono disponibili sul mercato diverse piattaforme che differiscono nella lunghezza delle reads e nell'entità dell'output finale (Gb per run) e, pertanto, nel tipo di applicazione biologica per cui sono maggiormente indicate. Tra queste, le piattaforme al momento più all'avanguardia risultano essere la Roche/454's GS FLX Titanium, l'Illumina/Solexa's GA_{II}, la Life/APG's SOLiD3, la Polonator G.007, l'Helicos BioSciences HeliScope e la Pacific Biosciences.

Ciascuna di questa si avvale di specifiche metodiche per la preparazione del campione (clonally amplified templates o single DNA-molecule templates), per il sequenziamento (cyclic reversible termination, CRT, single-nucleotide addition, SNA, real-Time sequencing e sequencing by ligation, SBL) e per l'acquisizione e l'analisi dati¹⁵⁷.

3.5.1 Affymetrix GeneChip arrays

La piattaforma Affymetrix consente, oggi, la realizzazione di numerosi studi Whole-Genome basati sull'impiego di arrays oligonucleotidici ad alta densità per ricerca d'avanguardia nel campo della medicina e della farmacogenomica (www.affymetrix.com).

I GeneChips affymetrix sono arrays oligonucleotidici costituiti da probes di 25-mer sintetizzate *in situ* mediante tecniche fotolitografiche. L'affymetrix microarray è disegnato per l'ibridazione di un campione singolo. Le possibili applicazioni in relazione ai tipi di arrays e ai software d'analisi sono riassunti in Tab2.

Studi di Whole-Genome Genotyping e Copy Number vengono realizzati su SNP-arrays ad elevata coverage del genoma umano. Nel corso degli anni si è assistito alla produzione di arrays con numero sempre crescente di SNPs cosicché dai primi arrays (10K, 100K) si sono sviluppati GeneChips ad alta densità sempre più efficienti nell'identificazione di SNPs, a maggiore risoluzione nelle analisi citogenetiche e in grado di realizzare con più accuratezza studi di LOH (Fig.6).

Gli SNPs presenti sui chips affymetrix derivano da diversi databases quali SNP Consortium database, Perlgen Sciences Inc, Baylor data e The HapMap (Haplotype Map of the human genome) project, dopo un rigoroso processo di screening e validazione.

I GeneChip Human Mapping 500k arrays risultano gli ultimi della generazione degli Affymetrix GeneChip Mapping arrays (10K, 100K, 500K).

Il GeneChip Human Mapping 500k array set comprende 2 arrays (250K Nsp array e 250K Sty array), ciascuno capace di genotipizzare in media 250000 SNPs, utilizzati anche come tags per l'identificazione di variazioni cromosomiche. Ciascun array è ibridato con lo stesso target digerito nel corso della marcatura o con l'enzima di restrizione NspI o con l'enzima di restrizione StyI. Ogni array è formato da circa 6.5 milioni di features, ciascuna costituita da più di un milione di copie di probes.

Il disegno dell'array è tale per cui ciascuno SNP è interrogato da 6-10 probe quartets formati da una probe pair per ciascun allele. Ogni probe pair è costituita da una probe con mismatch (probe MM) e da una probe perfettamente complementare (probe PM) alla sequenza allelica.

Dopo l'ibridazione con il campione target, il pattern di fluorescenza indica quale allele è presente e l'intensità la quantità di DNA legato.

Il valore mediano e medio della distanza fisica tra i diversi SNPs inclusi nei 500k arrays risulta essere di 2.5Kb e 5.8Kb rispettivamente.

Applicazioni		Affymetrix Gene Chip arrays	Software di analisi
Analisi DNA	Copy number analysis	Genome-Wide Human SNP array 6.0	Genotyping Console Software (GTC)
	Drug metabolism analysis	DMET Plus Premier array	DMET Console Software
	Genome-Wide Genotyping	Genome-Wide Human SNP Array 5.0/6.0 Human Mapping 500K set, 100K set, 10K 2.0 array Axiom Genome-Wide array plates Axiom myDesign Genotyping array plates	Genotyping Console Software (GTC)
	Molecular Cytogenetics	CytoScan HD array kit Genome-Wide Human SNP array 6.0	Chromosome Analysis Suite (ChAS) Software
	Resequencing Analysis	Human Mitochondrial Resequencing array 2.0	Sequence Analysis Software (GSEQ)
	Targeted Genotyping analysis	Universal Taq array Axiom myDesign Genotyping array plates	Targeted Genotyping Analysis Software (GTGS)
Analisi RNA	3' IVT Expression Analysis	Human Genome Focus array Human Genome U133 Plus 2.0 array Human Genome U133A 2.0 array Human genome U133 set, U95 set PrimeView Human Gene Expression array	Expression Console Software
	Gene Regulation Analysis (such as epigenetic modification)	Chromosome 21/22 2.0R array Human Promoter 1.0R array Human Tiling 1.0R, 2.0R array set	Tiling Analysis Software (TAS)
	miRNA Analysis	miRNA Array	miRNA QC Tool
	Whole-Transcript Expression Analysis e Profiling	Human Exon 1.0 ST array Human Gene 1.0 ST array Human Gene 1.1 ST array plates Human Gene 1.1 ST array strips	Expression Console Software

Tab.2 Applicazioni Affymetrix microarray

Il GeneChip Human Mapping 500k array set è altamente indicato per la realizzazione di WGAS e, in particolare, il GeneChip Human 250K Nsp array permette anche la realizzazione di studi di citogenetica. L'elaborazione dei dati grezzi e la successiva analisi dei dati sono resi possibili da algoritmi altamente specifici forniti da Genotyping Console Software. Per i mapping array (10K,

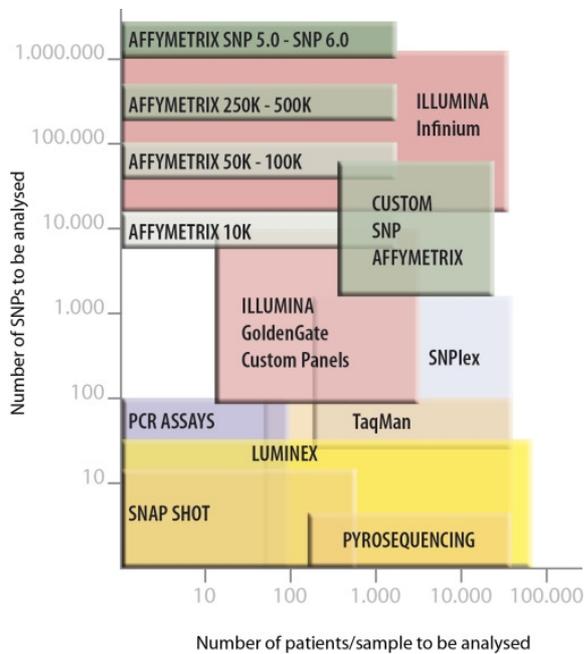


Fig. 6 Densità Affymetrix SNP-arrays

100K, 500K) il primo step per l'analisi dei dati è la "chiamata genotipica" ottenuta con MPAM Mapping algorithm (per i 10K) o tramite Dynamic Model Mapping Algorithm (DM) (per i 100K e i 500K), più recentemente soppiantato dal più sofisticato BRLMM (Bayesian Robust Linear Model with Mahalanobis distance classifier) algorithm. Una volta definiti i genotipi, altri tools consentono ulteriori analisi quali studi di associazione, Copy number e LOH. Per la realizzazione di quest'ultimi ricordiamo CNAT, CNAG, dChip SNP e Partek Genomic Suite.

Tra gli SNP-arrays di ultima generazione emergono, invece, i Genome-Wide Human SNP Array 6.0. Questi comprendono circa 1.8 milioni di marcatori genetici di cui 906600 SNPs e 946000 probes non polimorfiche. Tra le probes non polimorfiche, 202000 probes riconoscono 5677 regioni CNV ottenute dal "Toronto Database of Genomic Variants".

L'inclusione di probes non polimorfiche e la loro distribuzione su tutto il genoma rendono i Genome-Wide Human SNP Array 6.0 indicati per la realizzazione di studi di citogenetica con predizione di alterazioni piccole in dimensioni, di copy-neutral LOH e l'identificazione di variazioni strutturali anche in condizioni di lieve mosaicismo.

L'analisi dei dati è realizzata tramite Genotyping Console Software, in particolare delezioni e amplificazioni sono raccolte dal Segment Reporting Tool e visualizzate con Genotyping Console™(GTC) Browser o ChAS. L'analisi citogenetica può, ancora una volta, essere effettuata con altri tools quale Partek Genomic Suite.

Per l'analisi di espressione genica i GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays consentono l'analisi di 47000 trascritti, circa 6500 geni in più rispetto agli arrays Human Genome U133 Set.

Le sequenze delle probes sono state selezionate da GenBank, dbEST e RefSeq e i clusters di sequenza sono stati creati utilizzando il database UniGene e ridefiniti mediante analisi e confronto con altri databases quale NCBI human genome assembly (Build 31).

I 3'-IVT arrays presentano probes disegnate solo al 3' dei trascritti a differenza dei GeneChip Human Gene 1.0/1.1 ST arrays ed Exon 1.0ST arrays in cui le probe sono presenti per tutta la lunghezza del trascritto (Whole-Transcript arrays). Per questi ultimi, il disegno degli arrays prevede solo probes PM al contrario dei Plus in cui si hanno probes PM e MM.

Nell'array Plus, ciascun gene (o trascritto) è rappresentato da un set di 11-20 probe pairs costituite da una probe PM e una probe MM, identica al suo PM eccetto che per una base nella posizione centrale. La probe MM è usata per valutare il segnale di cross-ibridazione non specifico. Ciascuna probe pair è disegnata al 3' del trascritto. Tutte le probe pairs definiscono un probe set. I livelli di espressione genica sono calcolati sulla media pesata della differenza di intensità PM and MM lungo l'intero probe set.

La disponibilità di SNP-arrays ed expression arrays consente, oggi, un'analisi combinata in cui integrare i dati di copy number ed espressione genica per una identificazione più veloce dei geni di interesse¹⁶⁵ (Fig.7).

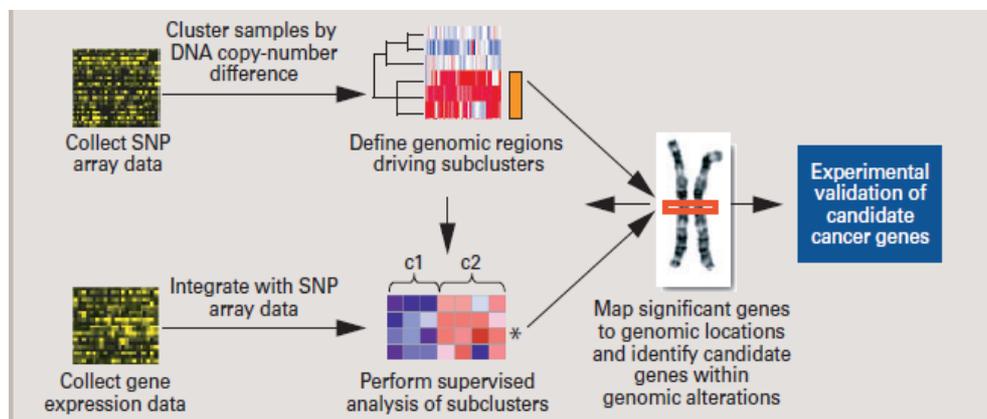


Fig.7 Rappresentazione schematica di un approccio integrato di analisi

In ultimo, di recente introduzione i DMET Plus arrays per l'analisi dei polimorfismi associati alla risposta farmacologica. I chips presentano 1936 varianti geniche a carico di circa 230 geni coinvolti nel metabolismo dei farmaci validati dalla US Food and Drug Administration, FDA.

4. Clofarabina

4.1 Descrizione

La Clofarabina (2-cloro-2'-fluoro-deossi-9-β-D-arabinofuranosiladenina) (CLO) è un analogo nucleosidico, deossiadenosinico, di seconda generazione sintetizzato come ibrido delle molecole Fludarabina e Cladribina per ottenere una molecola a migliore efficacia ma minore tossicità extramidollare rispetto ai precedenti analoghi¹⁶⁶.

Gli analoghi nucleosidici appartengono alla classe farmacologia degli antimetaboliti, farmaci tra i più efficaci per il trattamento delle malattie ematologiche maligne che esercitano la loro azione interferendo con la replicazione cellulare a causa della loro analogia strutturale con cofattori o prodotti intermedi della via biosintetica degli acidi nucleici. In particolare, agendo come substrati per gli enzimi impegnati in questo processo, possono inibire la sintesi del DNA e dell'RNA o sostituirsi alle normali componenti strutturali della catena dell'acido nucleico con conseguente formazione di molecole di acidi nucleici fraudolente. Per tale motivo questi farmaci esplicano un'azione ciclo-specifica e, in particolare, il loro maggior effetto si realizza a livello della fase S. Come gli altri analoghi della deossiadenosina, la CLO è un profarmaco che richiede per la conversione nel metabolita attivo (la forma trifosfato) la fosforilazione intracellulare catalizzata dall'enzima desossicitidina chinasi¹⁶⁷. Rispetto agli altri analoghi della desossiadenosina, la CLO ha una maggiore stabilità in ambiente acido.

L'attività antitumorale della CLO si esplica principalmente attraverso l'induzione di apoptosi ottenuta per inibizione della DNA-polimerasiα che provoca la fine dell'allungamento della catena del DNA e/o la sintesi/riparazione del DNA, analogamente alla Fludarabina trifosfato, attraverso inibizione della ribonucleotide reductasi con riduzione dei pools di desossinucleotide trifosfato cellulare, analogamente alla Cladribina trifosfato, e mediante la distruzione dell'integrità della membrana mitocondriale con rilascio di citocromo C ed altri fattori pro-apoptotici che portano alla morte cellulare programmata anche nei linfociti non in fase di divisione. Quest'ultimo meccanismo sembrerebbe responsabile dell'incremento dell'efficacia della CLO in pazienti previamente trattati con altri analoghi nucleosidici quali la Citarabina (Ara-C). Recenti evidenze suggeriscono inoltre che la clofarabina sia responsabile dell'aumento dell'espressione di alcuni geni, confermato sia a livello trascrizionale che proteico¹⁶⁸.

4.2 Valutazioni precliniche e cliniche

In vitro la CLO è risultata essere efficace in numerosi tipi di linee cellulari tumorali umane mostrando effetto citotossico a valori di LC50 inferiori a quelli della Fludarabina sia in linee cellulari umane di tumore solido che leucemiche^{169,170}.

Altamente incoraggianti sono inoltre i risultati ottenuti *in vivo*, in cui ha mostrato attività antineoplastica selettiva ed efficace contro diversi tipi di tumori solidi in modelli murini¹⁷¹. In tali studi pre-clinici *in vivo* la somministrazione giornaliera del farmaco per 5 giorni è risultata essere il miglior regime terapeutico anche se in modelli murini di leucemia un trattamento più lungo si è associato ad un aumento del tempo di sopravvivenza¹⁷².

Studi di fase I e II sulla CLO come singolo agente, condotti sia in pazienti adulti che in età pediatrica, hanno dimostrato che la Clofarabina è attiva in differenti tipi di leucemia acuta e non è associata alla neurotossicità degli analoghi nucleosidici di prima generazione¹⁷³.

Nello studio pediatrico di fase I condotto da Jeha e colleghi^{174,175}, 25 pazienti affetti da leucemia acuta (17 LAL, 8 LAM) sono stati trattati con CLO come singolo agente a dose progressivamente crescente da 11.25 mg/m²/die a 70 mg/m²/die in infusione endovenosa di 1-2 ore per 5 giorni. Gli effetti collaterali dose limitanti registrati a 70 mg/m²/die sono stati iperbilirubinemia e rash cutaneo e la dose massima tollerata (MTD) è risultata essere di 52 mg/m²/die. Si è osservata una remissione completa in 5 pazienti (1 LAM e 4 LAL) mentre una risposta parziale è stata riportata in 3 pazienti (2 LAM e 1 LAL), con una “overall response” del 32% e una durata media della remissione superiore ad 1 anno. Sulla base di questi risultati è stato condotto, dagli stessi autori, uno studio di fase II nella popolazione adulta per meglio valutare l’efficacia e la sicurezza della CLO come singolo agente nelle LAL refrattarie o recidivate. Alla dose di 52 mg/m²/die per 5 giorni, l’“overall response rate” (ORR) sui 61 pazienti trattati è stata del 30%, con 7 pazienti in remissione completa, 5 pazienti in remissione completa senza recupero piastrinico completo e 6 con remissione parziale. La remissione è stata di durata sufficiente affinché i pazienti potessero essere avviati al trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT).

Alla luce di questi risultati, la Clofarabina è stata approvata in monoterapia dalla US Food and Drug Administration (FDA) e dall’EMA (European Medicines Agency) per il trattamento di pazienti pediatrici affetti da LAL di età compresa tra 1 e 21 anni che non abbiano risposto ad almeno due precedenti regimi di trattamento. La CLO è stato il primo farmaco ancora in fase di sperimentazione clinica approvato per il trattamento di malattie oncologiche pediatriche.

In questi ultimi anni, numerosi lavori sono stati volti a valutare l’effetto della CLO nel trattamento di tumori ematologici sia in monoterapia che in combinazioni con altri agenti

antitumorali¹⁷⁶⁻¹⁸¹, suggerendo che la CLO sia in grado di aumentare l'efficacia di altri agenti chemioterapici. Un recente studio *in vitro* ha dimostrato l'effetto antitumorale sinergico della CLO e Gemcitabina in linee cellulari umane di carcinoma pancreatico¹⁸² e un recente trial clinico di fase II, condotto su pazienti adulti affetti da LAM, ha messo in evidenza come basse dosi di CLO si possano efficacemente combinare a specifici agenti, nella fattispecie con un inibitore specifico del pathway mTOR, attivato in maniera costitutiva nel 90% dei casi LAM¹⁸³.

In un trial clinico condotto arruolando 25 pazienti pediatrici con LAL avanzata è stata testata l'efficacia di un regime terapeutico che prevede la combinazione della CLO con Ciclofosfamide ed Etoposide. Nessun paziente è deceduto per complicanze associate al trattamento e si è raggiunta un overall remission rate del 56%: 52% dei casi in remissione completa (CR) e 4% dei casi in remissione senza recupero piastrinico (CRp). Nel 54% dei casi CR, la remissione è stata di durata sufficiente per consentire al paziente di andare al trapianto allogenico. La probabilità di CR/CRp è risultata essere maggiore nelle LAL-B rispetto alle LAL-T e la probabilità di overall survival a 18 mesi è risultata del 39% nei pazienti responsivi al trattamento e pari allo 0% nei pazienti resistenti. Il dato ottenuto ha, dunque, suggerito che il regime combinato CLO, Ciclofosfamide ed Etoposide è effettivamente ben tollerato e può indurre risposta clinica in una rilevante proporzione di soggetti pediatrici con LAL refrattaria o recidiva¹⁸⁴.

SCOPO DELLA TESI

In questi ultimi decenni si è assistito ad un notevole miglioramento nella terapia delle LA pediatriche, nonostante tutto si assiste oggi ad una fase di *plateau* della curva di sopravvivenza e le leucemie continuano a costituire la principale causa di morte pediatrica per malattia.

Sempre più numerose evidenze hanno dimostrato che specifiche varianti geniche sono in grado di influire sull'efficacia e la tossicità dei trattamenti terapeutici.

La sopravvivenza dei soggetti affetti, resistenti alle terapie attuali o sensibili allo sviluppo di tossicità, potrebbe, dunque, essere ottenuta orientando gli stessi verso protocolli terapeutici alternativi, più efficaci e meno tossici in quanto specificamente disegnati sulla base del patrimonio genico dei singoli individui e dell'assetto genetico-molecolare delle cellule tumorali.

Un'ulteriore ottimizzazione nel trattamento delle LA è pertanto raggiungibile mediante l'identificazione di biomarcatori genetici di risposta terapeutica in grado di individuare già alla diagnosi i pazienti effettivamente eleggibili per un dato trattamento terapeutico e/o la dose appropriata per ciascun individuo nonché mediante una conoscenza più approfondita dei meccanismi di resistenza farmacologica, intrinseca o acquisita, delle cellule leucemiche e l'introduzione di nuove terapie più mirate ed efficaci, disegnate sull'assetto molecolare della patologia. Oggi, questi obiettivi sono raggiungibili attraverso studi di farmacogenomica, indirizzati all'identificazione delle varianti genetiche associate alla risposta ad un farmaco attraverso approcci Genome-Wide.

La Clofarabina (CLO) è un analogo deossiadenosinico di seconda generazione che, risultando promettente in trial pre-clinici e clinici, è stato approvato dalla FDA e dall'EMA per il trattamento dei pazienti con Leucemia Acuta Linfoblastica di età compresa tra 1 e 21 anni recidivati o refrattari alle terapie convenzionali. Ad oggi non si conoscono marcatori predittivi della risposta cellulare alla CLO.

Il lavoro svolto in questo dottorato di ricerca è stato, dunque, finalizzato alla realizzazione di uno studio di farmacogenomica della CLO nell'ambito delle Leucemie Acute pediatriche al fine di 1) identificare marcatori genetici associati alla risposta delle cellule leucemiche al farmaco, 2) delucidare i meccanismi di resistenza farmacologica cellulare e 3) individuare nuovi bersagli terapeutici verso cui indirizzare terapie più mirate ed efficaci.

MATERIALI E METODI

Isolamento delle cellule leucemiche. Il lavoro è stato svolto su campioni provenienti da pazienti pediatrici afferenti all'Unità Operativa di Oncologia ed Ematologia Pediatrica "Lalla Seràgnoli" del Policlinico Universitario Sant'Orsola-Malpighi. Lo studio è stato eseguito su blasti leucemici di 17 campioni provenienti da 24 pazienti pediatrici affetti da LAL (10 pazienti LAL-T e 7 LAL-B) e su blasti leucemici di 6 campioni provenienti da pazienti pediatrici affetti da LAM, crioconservati al momento della diagnosi.

Le cellule mononucleate dei pazienti sono state isolate da sangue midollare (BM) o sangue periferico (PB) mediante centrifugazione su gradiente di densità (FICOLL Isopaque). La provenienza del campione (BM o PB) e il congelamento non influenzano la valutazione dell'attività antitumorale dei farmaci, come indicato in precedenti lavori¹⁸⁵.

Lo studio è stato condotto esclusivamente su campioni con una percentuale di blasti nella popolazione di cellule vive $\geq 70\%$ allo scongelamento e una vitalità $\geq 60\%$ a 96h dalla coltura *in vitro*, valutate mediante analisi citofluorimetrica e conta con arancio di acridina.

Analisi Citofluorimetrica. L'analisi citofluorimetrica è stata utilizzata al fine di valutare la percentuale di blasti e la vitalità dei campioni al momento dello scongelamento.

La vitalità è stata valutata mediante caratterizzazioni morfologiche di scattering con il Forward Scattered light (FSC), proporzionale alle dimensioni della cellula, e il Side Scattered light (SSC), proporzionale alla granulosità e alla complessità interna della cellula.

La percentuale di blasti nella popolazione di cellule vive è stata rilevata mediante selezione con Side Scattered light e positività al CD45, poi mediante marcatura con anticorpi specifici: Ab anti-CD7/CD2-CD5 (Becton, Dickinson) per i campioni LAL-T, Ab anti-CD19/CD10 o anti-CD7/CD13 (Becton, Dickinson) per i campioni LAL-B e Ab anti-CD33/CD34 (Becton, Dickinson) per i campioni LAM. Per l'analisi è stato utilizzato il Citofluorimetro FACSCalibur (Becton, Dickinson).

Farmaci. La Clofarabina (CLO, 1mg/ml, Genzyme Corporation), analogo purinico di sintesi di nuova generazione approvato dalla US Food and Drug Administration (FDA) nel 2004 per il trattamento delle LAL pediatriche refrattarie o resistenti, è stata utilizzata nel range di concentrazione 1,58 nM-370,46 uM. Il Desametasone (DEX, 4mg/ml, DECADRON, Visufarma), glucocorticoide utilizzato nella terapia di prima linea nel trattamento delle LAL, è stato utilizzato nel range di concentrazione 1,22 nM-286,65 uM. Il Compound E (CompE, 1mg/ml,

CALBIOCHEM), potente inibitore delle gamma secretasi, e' stato disciolto in DMSO ed utilizzato nel range di concentrazione 39.1 pM-3.06 uM.

CLO e CompE sono stati conservati ad una temperatura di -20°C. DEX e' stato conservato ad una temperatura di +4°C. Per ciascun farmaco sono state preparate 9 diluizioni seriali in terreno di coltura.

Colture cellulari. Il mezzo di coltura utilizzato per la semina dei blasti è costituito da RPMI1640 (GIBCO) arricchito con 20% di siero fetale bovino scomplementato (FBS, *Invitrogen*), 1% di L-Glutammina 200mM (GIBCO), 1% di Penicillina 10000 U/ml (GIBCO), 1% Streptomicina 10000 ug/ml (GIBCO), 1X ITS (Insulin-Transferrin-Sodium Selenite Supplement, Roche), 0.2 mg/ml di Gentamicina (SIGMA-ALDRICH), 0.125ug/ml di Amfotericina B (SIGMA-ALDRICH). Il mezzo di coltura utilizzato per la semina delle linee cellulari e' costituito da RPMI1640, 10% FBS scomplementato, 1% di L-Glutammina, 1% streptomicina/penicillina come sopra. *RPMI8402*, *DND41* e *HPB-ALL*, linee cellulari di LAL-T con pathway di Notch attivato. *JURKAT*, linea cellulare di LAL-T senza attivazione del pathway di Notch.

Saggio di vitalità in blasti. L'attività antitumorale dei farmaci CLO e DEX nei blasti è stata valutata *in vitro* mediante il saggio di vitalità WST-1 (Roche), basato sul principio che solo le cellule vive sono in grado di metabolizzare il WST-1 dando luogo ad una reazione colorimetrica quantificabile mediante un lettore ELISA (Infinite F200, TECAN) alla lunghezza d'onda di 450nm con una reference di 750 nm.

In breve, al momento dello scongelamento, sono state seminate 50×10^4 cell per pozzetto in piastre da 96 pozzetti. Le cellule sono state trattate con 9 diverse diluizioni dei farmaci per un volume finale di 100ul per pozzetto. Ai pozzetti CTR (cellule leucemiche non trattate) è stato addizionato solo terreno.

Per ogni diluizione dei farmaci, l'esperimento è stato condotto in triplicato. Per ogni paziente, sono state seminate almeno due piastre conservate in incubatore a 37°C in presenza di CO₂ al 5%.

A 96h dal trattamento, sono stati aggiunti 10ul di WST1 per pozzetto e le piastre sono state conservate a 37° C; dopo 2h-5h di incubazione, a seconda della vitalità cellulare, si è proceduto con la lettura delle piastre al lettore ELISA, misurando l'assorbanza a 450 nm e a 750 nm. Dalla differenza delle letture alle 2 lunghezze d'onda si sono ottenuti per ciascun pozzetto valori di assorbanza correlati alla vitalità cellulare. L'analisi dell'effetto citotossico dei farmaci è stata condotta solo su quei campioni per i quali a 96h si sono riscontrati nei CTR una buona vitalità cellulare, valutata mediante conta con arancio di acridina, e un OD (Optical Density) medio ≥ 0.05 dopo correzione del background (OD dei pozzetti di solo terreno). La percentuale di mortalità

cellulare dopo trattamento è stata calcolata dal rapporto dei valori di assorbanza delle cellule trattate verso i controlli non trattati. La sensibilità ai trattamenti è stata misurata in termini di concentrazione del farmaco associata al 50% di mortalità cellulare (LC50, uM). I valori di LC50 per i vari campioni sono stati calcolati sulle curve dose-risposta ottenute dalla interpolazione dei dati grezzi utilizzando il programma della curva di regressione non lineare di GraphPad Prism Software (San Diego, CA, USA). Per quei campioni per cui non si è ottenuta una curva dose-risposta nel range di concentrazioni utilizzate o per i quali non si è raggiunta una citotossicità pari al 100%, è stato assegnato un valore LC50 pari alla concentrazione più alta del range utilizzata.

Saggio di vitalità in linee cellulari. L'attività antitumorale del CompE nelle linee cellulari è stata valutata *in vitro* mediante il saggio di vitalità WST-1 (Roche) come descritto in precedenza. In particolare, le cellule sono state seminate alla densità di 10×10^4 cell/ml per le DND41, 20×10^4 cell/ml per le RPMI8402 e per le JURKAT e di 40×10^4 cell/ml per le HPB-ALL in pozzetti da piastra da 96. Ai pozzetti sono state aggiunte dosi crescenti di CompE e DMSO diluito in terreno allo stesso modo ($v_f=100\mu\text{l}$). Le dosi sono state testate in triplicato. Per il calcolo della percentuale di inibizione di ciascuna dose di CompE sono stati utilizzati i rispettivi pozzetti DMSO come CTR. L'attività antitumorale della CLO nelle linee cellulari LAL-T è stata valutata *in vitro* mediante il saggio di vitalità WST-1 (Roche) come sopra descritto. Le cellule utilizzate come CTR sono state trattate con terreno.

Trattamento combinato. Linee cellulari RPMI8402 e DND41 e blasti ottenuti dai pazienti LAL-T#6, LAL-T#8 e LAL-T#10 sono stati seminati in piastra 96 pozzetti. Ciascun campione è stato trattato con DMSO (CTR), CompE, CLO+DMSO e CompE+ CLO a specifiche dosi. Il DMSO è da intendersi diluito in terreno allo stesso modo del CompE. I trattamenti sono stati eseguiti almeno in triplicato. La vitalità cellulare è stata determinata con saggio WST-1, come precedentemente descritto, a 72h e a 96 h dalla coltura. Nelle linee cellulari, la CLO è stata aggiunta a 24h ore dalla semina.

Estrazione degli acidi nucleici. L'RNA totale è stato estratto da ciascun campione con l'RNAeasy Mini Kit della Qiagen secondo protocollo. L'estrazione del DNA è stata eseguita utilizzando il QIAamp DNA Mini Kit della Qiagen secondo protocollo.

Espressione genica. 1ug RNA totale e' stato retotrascritto con la SuperScript II RT 200U/ul dell'Invitrogen secondo protocollo. L'espressione genica dei geni target e' stata valutata mediante Real Time PCR con SybrGreen della Roche sul LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche).

Copy number Analysis. L'ibridazione del DNA di ciascun campione e' stata effettuata su Affymetrix GeneChip® Human Mapping 250K Nsp arrays. Il DNA e' stato marcato e ibridato secondo protocollo (Affymetrix Inc, Santa Clara, CA, USA). L'analisi genomica di copy number e' stata eseguita utilizzando Partek software.

Studio del profilo di espressione genica. Nell'ambito dei casi LAL-T, in risposta alla CLO, il saggio di vitalità *in vitro* ha consentito di classificare i pazienti in 2 categorie associate ad una diversa sensibilità al farmaco in maniera statisticamente significativa: a maggiore sensibilità oppure a minore sensibilità al nuovo farmaco. Lo studio di espressione genica dei campioni delle 2 categorie LAL-T è stato effettuato mediante microarray Affymetrix, su HumanGenome U133 Plus 2.0 arrays, valutando l'espressione di più di 47000 geni, di cui circa 6500 non noti. L'RNA di ciascun campione e' stato marcato e ibridato secondo protocollo (Affymetrix Inc, Santa Clara, CA, USA). In analisi, sono stati selezionati i geni differenzialmente espressi fra i due gruppi di pazienti eseguendo un'analisi supervisionata e applicando un t test modificato (limma) con correzione per i test multipli (metodo di Benjamini e Hochberg). Sono risultati più di 60 geni differenziali con cutoff di *p value* di 0.05. Per identificare le vie di segnalazione connesse alla resistenza è stata effettuata un'analisi di pathway con il database KEGG e il tool di Gene Set enrichment (*p value* < 0.05).

Analisi Statistica. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata utilizzando GraphPad Prism Software (San Diego, CA, USA).

Per valutare la significatività delle differenze tra i valori mediani di popolazioni a confronto e' stato utilizzato il Mann-Whitney U test, test non parametrico a 2 code. Sono state considerate come statisticamente significative differenze con un valore di *p value* <0.05.

Per l'analisi della correlazione tra la sensibilità a due farmaci è stato utilizzato il test non parametrico a coppie di Wilcoxon (coefficiente: rho di Spearman, *p value* significativo <0.05). Per l'analisi di correlazione tra sensibilità alla CLO e parametri clinici e' stato utilizzato il test di Fisher con tabelle di contigenza, *p value* significativo <0.05.

Per valutare la significatività delle differenze tra i valori medi delle percentuali di inibizione cellulare in risposta ai trattamenti è stato utilizzato lo Student's *t* Test. Sono state considerate come statisticamente significative differenze con un valore di *p value* <0.05.

RISULTATI

Selezione campioni. Nello studio svolto in questo lavoro sono stati inclusi solo i campioni che allo scongelamento hanno presentato una percentuale di blasti nella popolazione di cellule vive $\geq 70\%$ e, a 96h dalla semina, una vitalità delle cellule di controllo $\geq 60\%$ con un OD medio ≥ 0.05 dopo correzione con il background. La vitalità cellulare e la percentuale di blasti allo scongelamento sono stati valutati con citofluorimetria a flusso. La vitalità è stata valutata mediante caratterizzazioni morfologiche di scattering. La percentuale di blasti nella popolazione di cellule vive è stata rilevata mediante selezione per Side Scattered light e positività al CD45 e successiva analisi immunofenotipica con Ab anti-CD7/CD2-CD5 per i campioni LAL-T, Ab anti-CD19/CD10 o anti-CD7/CD13 per i campioni LAL-B e Ab anti-CD33/CD34 per i campioni LAM. A seguito della selezione effettuata, è stato possibile valutare l'effetto della CLO in 10 casi di LAL di lineage di tipo T, in 7 casi di LAL di lineage di tipo B e in 6 casi di LAM.

Sensibilità *in vitro* alla CLO. La sensibilità *in vitro* alla CLO è stata misurata in termini di LC50 ossia dose del farmaco associata al 50% della mortalità cellulare. Come si osserva in Fig1, sia i blasti di LAM (mediana LC50, 0.072uM; range, 0.013uM-0.149uM; n=6) che i blasti di LAL (mediana LC50, 0.057uM; range, 0.0095uM-289.4uM, n=17) risultano essere sensibili alla CLO (Mann-Whitney *U* test, $P= 0.916$). A differenza delle LAM, nell'ambito delle LAL è possibile però osservare una maggiore diversificazione della risposta cellulare al trattamento. In precedenti lavori è stato dimostrato che la risposta ai farmaci nelle LAL è associata alle caratteristiche immunofenotipiche delle cellule leucemiche¹⁸⁷. Si è dunque valutata la risposta alla CLO nelle LAL-T rispetto alle LAL-B. Effettuando un'analisi statistica mediante test non parametrico di Mann Whitney è emerso che le LAL-B (mediana LC50, 0.040 uM; range, 0.013uM-0.086uM, n=7) e le LAL di tipo T (mediana LC50, 0.240uM; range, 0.009uM-289.40uM, n=10) non presentano alcuna differenza statisticamente significativa nella sensibilità al nuovo farmaco (Mann Whitney *U* test, $P=0.315$). Ad ogni modo, dal confronto della distribuzione dei valori di LC50 tra i casi di LAL-B e i casi di LAL-T si osserva che la diversificazione della risposta al farmaco è da ricercarsi nell'ambito delle cellule ad immunofenotipo T, infatti mentre le cellule di lineage B rispondono tutte a basse dosi e in maniera omogenea alla CLO, le cellule di LAL-T presentano sensibilità nettamente diversa alla CLO. E infatti, proprio nell'ambito delle LAL-T è stato possibile identificare due diverse sottopopolazioni che rispondono alla CLO diversamente in maniera statisticamente significativa: cellule a maggiore sensibilità (LAL-Ts) (mediana LC50, 0.018uM; range, 0.009uM-0.026uM, n=4) e cellule a minore sensibilità al farmaco (LAL-Tr) (mediana LC50,

5.97 uM; range 0.216uM-289.4uM; n=6) (Mann Whitney *U* test, *P* =0.0095). Come si osserva in Fig2, le LAL-Tr rappresentano una categoria di cellule a minore sensibilità alla CLO sia rispetto alle LAL-Ts che rispetto alle LAL-B suggerendo che si tratti di una classe di cellule leucemiche a diversa sensibilità alla CLO nell'ambito delle LAL indipendentemente dall'immunofenotipo. I risultati ottenuti dagli studi *in vitro* sulla CLO sono riportati in tabella 1.

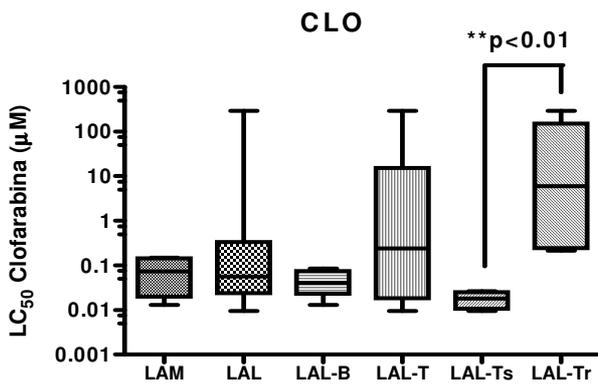


Fig.1 Distribuzione dei valori medi di LC50 per la CLO nei casi di LA pediatrici inclusi nello studio. Nell'ambito delle LAL-T sono state identificate due sottopopolazioni a diversa sensibilità alla CLO in maniera statisticamente significativa (LAL-Ts vs LAL-Tr; Mann Whitney *U* test, *p*=0.0095). In grafico, rappresentazione della mediana e del 25th e 75th percentile per ciascun farmaco.

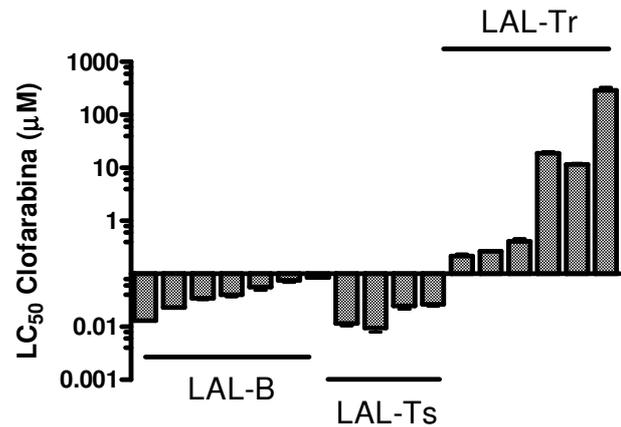


Fig.2 Valori medi di LC50 per la CLO nei casi di LAL inclusi nello studio. La sottopopolazione LAL-Tr risulta essere significativamente meno sensibile alla CLO nell'ambito delle LAL, indipendentemente dall'immunofenotipo.

LC50(uM)	LAM	LAL-T	LAL-B	LAL-Ts	LAL-Tr	LAM vs LAL <i>p value</i>	LAL-B vs LAL-T <i>p value</i>	LAL-Ts vs LAL-Tr <i>p value</i>
mediana	0.0724	0.240	0.040	0.018	5.97			
CLO p25-p75	0.020-0.148	0.018-15.22	0.023-0.076	0.011-0.026	0.240-154.1	0.916	0.315	0.0095*
range	0.013-0.149	0.009-289.4	0.013-0.086	0.009-0.026	0.216-289.4			
n	6	10	7	4	6			

Tab.1 Risultati ottenuti dagli studi *in vitro* sulla CLO in campioni LAM e LAL di tipo B e di tipo T. Mediana: mediana dei valori LC50 (uM); range: valore minimo e valore massimo della distribuzione dei valori LC50; p25-p75: 25th e 75th percentile; n: numero dei pazienti; *p value*: significatività determinata con il test non parametrico Mann-Whitney U-test. Differenze significative: *p value*<0.05 e indicate con *. LAL-Ts: categoria di LAL-T a maggiore sensibilità alla CLO; LAL-Tr: categoria di LAL-T a minore sensibilità alla CLO.

Correlazione tra la risposta *in vitro* alla CLO e parametri clinici. I saggi *in vitro* sui campioni LAL hanno dimostrato che nell'ambito delle LAL vi sono cellule leucemiche a sensibilità diversa alla CLO. Alla luce dei risultati ottenuti, e' stata valutata la correlazione tra la sensibilità delle

cellule LAL alla CLO e i parametri clinici di comune uso per la stratificazione prognostica dei pazienti.

Di ciascun paziente si sono raccolti dati su: 1) la risposta al prednisone (PDN), valutata sulla base del numero di blasti periferici all' 8° giorno dopo 7 giorni di terapia steroidea, 2) la malattia residua minima (MRD), 3) l'immunofenotipo e 4) il numero di globuli bianchi all'esordio (WBC).

I dati clinici sono riassunti in tabella 2.

Pazienti	Risposta clinica al PDN	MRD	Immunofenotipo	WBC, x10 ³ /ul
LAL-B#1	PPR	MR	?	87.80
LAL-B #2	-	-	cALL	3.68
LAL-B #3	GPR	MR	cALL	21.40
LAL-B #4	PPR	MR	cALL	8.80
LAL-B #5	GPR	SR	cALL	50.00
LAL-B #6	GPR	MR	cALL	38.80
LAL-B #7	GPR	-	pre-B ALL	5.40
LAL-T#1	GPR	MR	T-ALL	>100
LAL-T #2	PPR	HR	T-ALL	300.00
LAL-T #3	PPR	HR	T-ALL	350.00
LAL-T #4	PPR	HR	T-ALL	45.00
LAL-T #5	GPR	HR	T-ALL	150.00
LAL-T #6	GPR	MR	T-ALL	310.00
LAL-T #7	PPR	MR	T-ALL	44.00
LAL-T #8	GPR	SR	T-ALL	150.00
LAL-T #9	GPR	MR	T-ALL	84.00
LAL-T #10	PPR	HR	T-ALL	502.00

Tab.2 Informazioni cliniche dei pazienti. PB= sangue periferico, BM= sangue midollare, PPR= poor prednisone responder, GPR= good prednisone responder, MRD= malattia residua minima, MR= medio rischio, HR= alto rischio, SR= rischio standard, WBC= conta dei globuli bianchi all'esordio.

La scarsa risposta al PDN all'8° giorno dopo 7 giorni di trattamento (soggetti Poor Prednisone Responder) e un numero di globuli bianchi all'esordio superiori a >100000/ μ l o per altri autori >50000/ μ l risultano essere fattori prognostici negativi di malattia. E' stata dunque valutata l'associazione tra la risposta alla CLO dei blasti LAL e a) la risposta al PDN, b) l'iperleucocitosi con più di 50000/ μ l e c) l'iperleucocitosi con più di 100000/ μ l globuli bianchi all'esordio. I risultati ottenuti suggeriscono che la sensibilità delle cellule LAL alla CLO non correla con nessun parametro clinico oggi rilevante per la prognosi e la stratificazione dei pazienti in fasce di rischio e di trattamento. Di seguito sono riportate le tabelle di contingenza rispetto ai parametri clinici.

A)

LAL	GPR	PPR	Tot
sensibili	5 (31%)	5 (31%)	10 (63%)
resistenti	4 (25%)	2 (13%)	6 (38%)
Tot	9 (56%)	7 (44%)	16 (100%)

Correlazione tra la risposta alla CLO e la risposta al prednisone.

Test di Fisher $p=0.633$, Sensibilità=0.56, Specificità=0.29.

C)

LAL	<100000	>100000	Tot
sensibili	7 (44%)	3 (19%)	10 (63%)
resistenti	2 (13%)	4 (25%)	6 (38%)
Tot	9 (56%)	7 (44%)	16 (100%)

Correlazione tra la risposta alla CLO e la iperleucocitosi all'esordio con cut off di 100000 globuli bianchi / μ l.

Test di Fisher $p=0.302$, Sensibilità=0.778, Specificità=0.571.

B)

LAL	<50000	>50000	Tot
sensibili	5 (31%)	5 (31%)	10 (63%)
resistenti	1 (6%)	5 (31%)	6 (38%)
Tot	6 (38%)	10 (63%)	16 (100%)

Correlazione tra la risposta alla CLO e la iperleucocitosi all'esordio con cut off di 50000 globuli bianchi / μ l.

Test di Fisher $p=0.307$, Sensibilità=0.833, Specificità=0.500

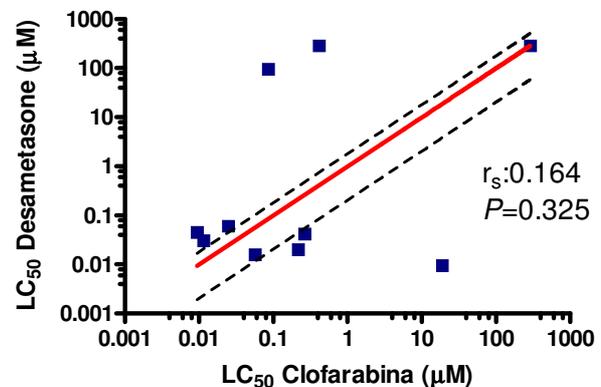


Fig.3 Correlazione tra la risposta alla CLO dei blasti LAL e la risposta ai glucocorticoidi (Desametasone) *in vitro*. Per ciascun campione sono rappresentati i valori di LC50 medi per la CLO e DEX. Non esiste alcuna correlazione tra la risposta *in vitro* dei due farmaci (Test a coppie di Wilcoxon, rho di Spearman=0.16; $p=0.325$).

Correlazione tra la risposta *in vitro* alla CLO

e al Desametasone *in vitro*. La risposta al prednisone e' un parametro comunemente usato in clinica per la prognosi e la stratificazione di rischio dei pazienti. Per indagare ulteriormente la possibilità che la sensibilità alla CLO nelle LAL possa correlare con la risposta ai glucocorticoidi, abbiamo dunque valutato l'effetto del glucocorticoide desametasone (DEX) *in vitro* sui blasti di LAL inclusi nello studio (Fig. 3) e correlato per ciascun campione la risposta al glucocorticoide con la risposta alla CLO. Utilizzando il test non parametrico a coppie di Wilcoxon, è stato documentato che non vi è alcuna correlazione tra la risposta ai due farmaci, misurata in termini di LC50, nei blasti LAL (Test a coppie di Wilcoxon, rho di Spearman=0.16; $p=0.325$). La risposta alla CLO non correla dunque con la risposta ai glucocorticoidi né *in vitro* né *in vivo*.

Nell'insieme gli studi di correlazione hanno dimostrato che ad oggi i parametri clinici in uso per la stratificazione prognostica e terapeutica delle LAL non sono predittivi della risposta alla CLO

e sottolineano la necessità di identificare nuovi marcatori da associarsi alla risposta cellulare al nuovo farmaco.

Copy Number Analysis. Lo studio di copy number analysis e' stato eseguito sui casi LAL-T sensibili e resistenti alla CLO inclusi nello studio al fine di valutare se vi sono alterazioni cromosomiche (delezioni o amplificazioni) nel genoma tumorale associate alla diversa sensibilità delle cellule leucemiche al farmaco. L'analisi ha evidenziato, come da letteratura^{81,90,91}, la presenza ubiquitaria della delezione sul chr 9, in corrispondenza degli oncosoppressori CDKN2A (p16) e 2B (p15), oltre alle delezioni su chr 7 e 14, in corrispondenza dei geni del TCR. I casi presentano altre alterazioni a livello dei chr 1, 5, 6, 13, 16, 17, 21 (Fig.4). Il test del chi quadrato applicato alla suddivisione dei pazienti in sensibili e resistenti non ha mostrato nessuna alterazione significativamente associata al fenotipo

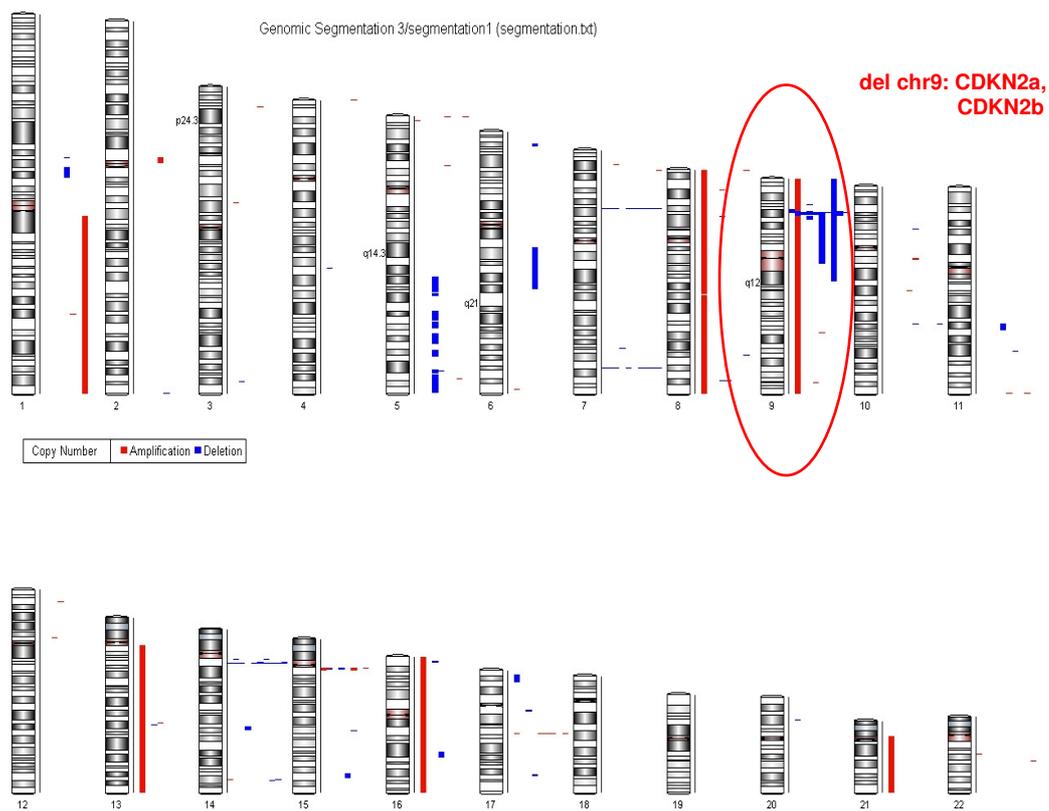


Fig.4 Cariotipo delle cellule leucemiche ottenuto con lo studio genome-wide Copy Number Analysis

Identificazione della signature genetica associata alla resistenza alla CLO. Al fine di definire dei marcatori molecolari di risposta delle cellule LAL-T alla CLO, si è effettuato uno studio di Gene Expression Profiling in cui si sono identificati i geni differenzialmente espressi tra i campioni LAL-Tr e LAL-Ts. Si sono individuati più di 60 geni differenzialmente espressi in maniera statisticamente significativa ($p < 0.05$) tra le due sottopopolazioni identificando la signature genetica associata specificamente alla maggiore e minore sensibilità al nuovo farmaco (Fig 5).

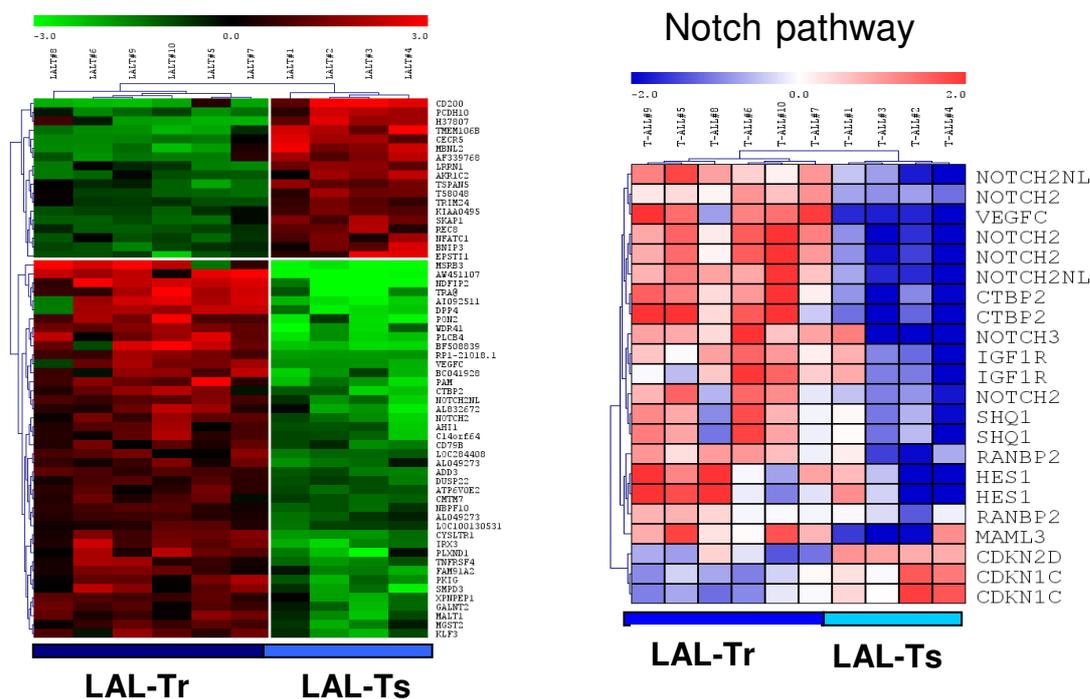


Fig.5 Rappresentazione HeatMap di parte dei geni espressi in maniera differenziale tra i casi LAL-Tr e LAL-Ts ($p < 0.05$). Il livello di espressione genica è indicata in 2 colori: in rosso elevata espressione e in verde/blu bassa espressione dei geni rispetto al valore medio. In colonna sono rappresentati i campioni, in riga i geni. Messi in evidenza i risultati dell'analisi di espressione genica sui target del pathway di notch. L'analisi di espressione genica è stata effettuata mediante microarray Affymetrix su HumanGenome U133 Plus 2.0 arrays.

Per meglio caratterizzare i geni differenziali e le diverse basi genetiche delle due sottopopolazioni, è stata effettuata l'analisi dei pathways espressi in maniera differenziale sul Kegg map database e utilizzando il tool di Gene Set enrichment. Quattro diversi tools statistici hanno riportato una maggiore espressione dei componenti del Pathway di Notch nei casi LAL-Tr rispetto ai LAL-Ts suggerendone un'attivazione strettamente associata ai casi di LAL-T a

minore sensibilità al nuovo farmaco (Tab 3). Fra i geni differenziali: Notch2, Ctbp2, Notch3, Maml3, Hes1, Dtx3 (Tab 4).

KEGG pathway	Pathway description	EASE score	LS permutation	Efron-Tibshirani's GSA test	Goeman's global test
hsa04330	Notch signaling pathway	0.015	0.00001	< 0.005	0.0048

Tab. 3 Risultato dell'analisi di pathways condotta con quattro tools statistici su Kegg map Database relativo al pathway di Notch

Probe ID	symbol	Description	p-value
212377_s_at	NOTCH2	Notch homolog 2	1.76E-05
210554_s_at	CTBP2	C-terminal binding protein 2	7.47E-05
203238_s_at	NOTCH3	Notch homolog 3	0.00347
242794_at	MAML3	mastermind-like 3	0.00561
203394_s_at	HES1	hairy and enhancer of split 1	0.00968
49049_at	DTX3	deltex 3 homolog	0.03236

Tab. 4 Notch signaling pathway (KEGG map hsa04330). Geni più significativi del pathway (p value=0,05).

Validazione in real time dei dati di microarray. I dati di microarray sulla maggiore espressione del pathway di Notch nelle LAL-Tr sono stati validati in Real-Time PCR. E' stata effettuata un'analisi di espressione genica con Real-Time PCR su due componenti del pathway, NOTCH2 e HES1. Come si osserva in Fig 6, i risultati di espressione genica in Real-Time PCR confermano una maggiore espressione statisticamente significativa di NOTCH2 ed HES1 nelle LAL-Tr rispetto alle LAL-Ts. Interessanti sono anche i dati preliminari di espressione genica di HES1 nelle LAL-B, in cui si osserva un'espressione simile alle LAL-Ts e significativamente inferiore alle LAL-Tr. Il dato ottenuto risulta perfettamente in linea con quanto osservato *in vitro* dove la sensibilità alla CLO delle LAL-B è risultata simile alle LAL-Ts, suggerendo che il pathway di Notch possa effettivamente essere coinvolto nella resistenza delle cellule LAL alla CLO indipendentemente dall'immunofenotipo.

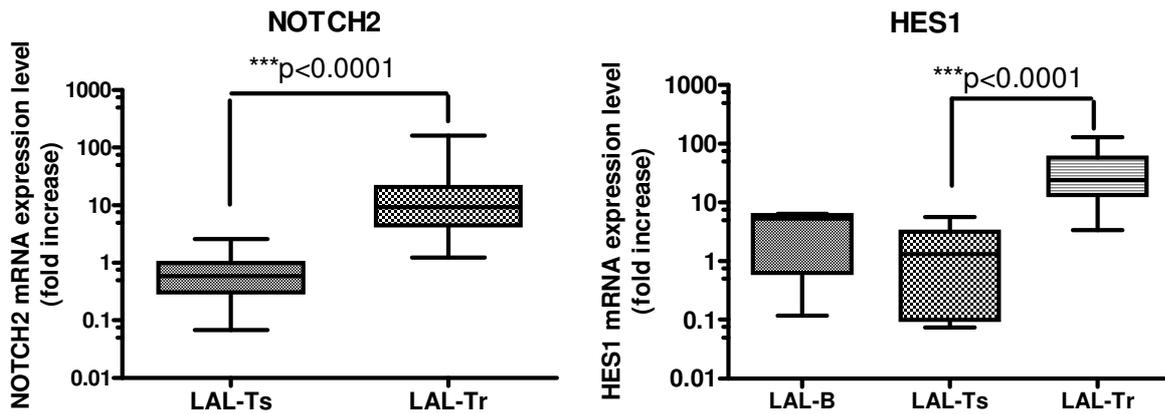
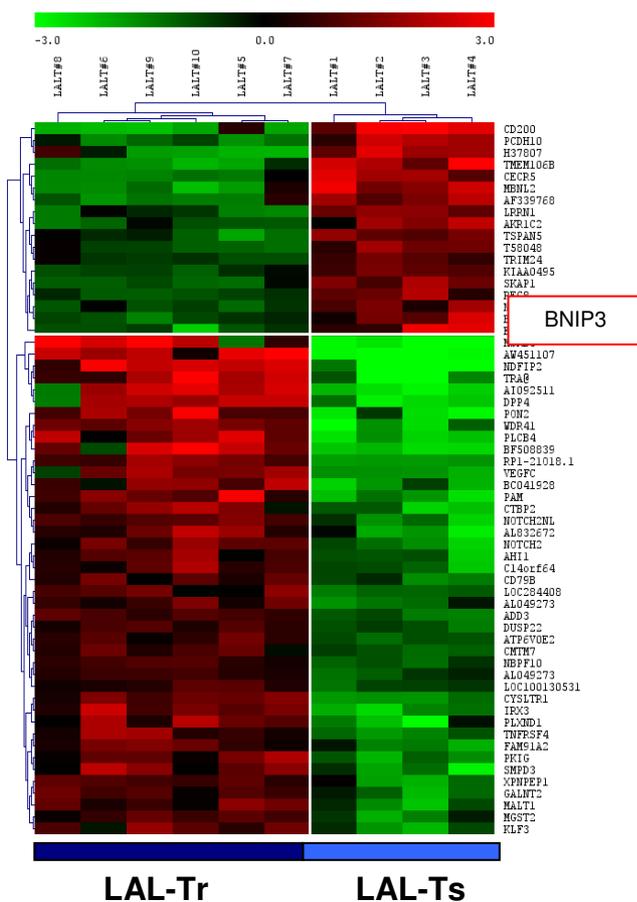
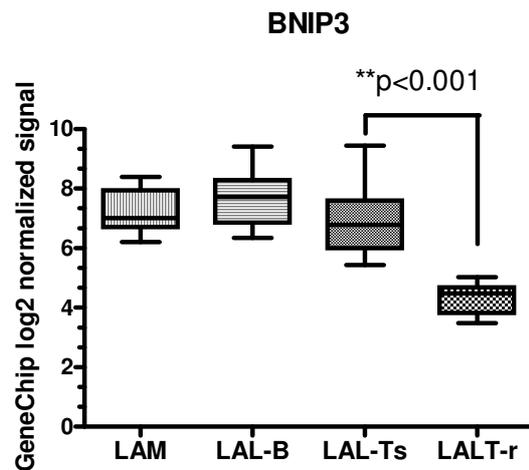


Fig.6 Livello di espressione genica di NOTCH2 ed HES1 valutato mediante Real-time PCR nei casi LAL-Ts, LAL-Tr e, in maniera preliminare, nei casi LAL-B inclusi nello studio. *p value*: significatività determinata con il test non parametrico Mann-Whitney U-test. Differenze significative: *p value*<0.05.

Caratterizzazione dei geni differenziali. La caratterizzazione funzionale dei geni differenziali mediante GeneOntology ha, in particolare, sottolineato il coinvolgimento di geni appartenenti ai meccanismi di risposta immunitaria, di comunicazione cellulare, trasduzione del segnale e apoptosi. Il gene BNIP3, gene mitocondriale pro-apoptotico, e' risultato essere uno dei geni differenzialmente espressi tra i casi LAL-Ts e LAL-Tr emersi dall'analisi di Gene Expression Profiling. Inoltre, estendendo l'analisi di Gene Expression Profiling ai casi di LAM e LAL-B inclusi nello studio e raccogliendo i valori di signal per BNIP3 in ciascuno di questi, è emerso che il gene è meno espresso, in maniera statisticamente significativa, nelle LAL-Tr sia rispetto alle LAL-Ts che alle LAM e LAL-B, indipendentemente dall'immunofenotipo (Fig.7a). I risultati sono stati confermati in Real-Time PCR (Fig.7b). Interessante notare che i dati di espressione del gene BNIP3 risultano in linea con la sensibilità osservata *in vitro* alla CLO per queste popolazioni cellulari. La CLO oltre che indurre apoptosi come analogo deossadenosinico determinando la produzione di molecole di DNA fraudolente induce morte cellulare agendo sui mitocondri e liberando nel citoplasma molecole mitocondriali pro-apoptotiche. Si può dunque supporre per BNIP3 un ruolo come mediatore dell'azione apoptotica della CLO e, pertanto, la sua minore espressione potrebbe spiegare la minore sensibilità delle LAL-Tr al trattamento. I dati ottenuti suggeriscono la necessità di approfondire il ruolo di BNIP3 nella risposta alla CLO.



Microarray DATA



Real-Time PCR DATA

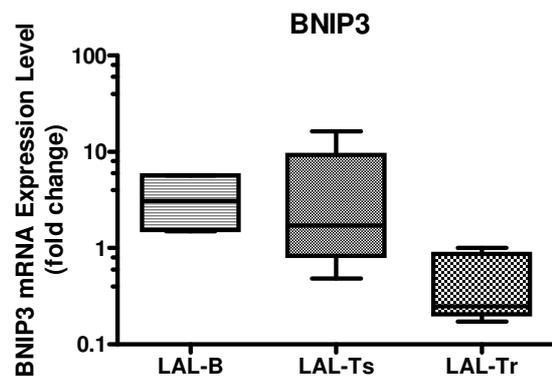


Fig.7 a) Rappresentazione dei signal di espressione di BNIP3 ottenuti dai microarray sulla casistica di LAL-T, LAM e LAL-B inclusa nello studio. b) Validazione in RealTime dei dati di microarray sull'espressione di BNIP3 sulla casistica di LAL-T, LAM e LAL-B inclusa nello studio. *p value*: significatività determinata con il test non parametrico Mann-Whitney U-test. Differenze significative: *p value*<0.05

Valutazione della risposta cellulare alla CLO dopo inibizione del pathway di Notch. Il pathway di Notch svolge un ruolo cruciale nello sviluppo dei timociti e recenti pubblicazioni hanno dimostrato il suo coinvolgimento nella leucemogenesi. Ad oggi, inoltre, risulta che circa il 50% dei casi LAL-T presentano mutazioni attivanti il pathway. Alla luce dei risultati ottenuti dallo studio di Gene Expression Profiling che hanno dimostrato una maggiore attivazione di Notch nelle LAL-Tr rispetto alle LAL-Ts, sono stati eseguiti studi *in vitro* volti a valutarne il coinvolgimento nella sensibilità delle cellule LAL-T alla CLO e un possibile ruolo come nuovo target di terapia per le forme di LAL-T a minore sensibilità al farmaco. A tal fine, e' stata

valutata la risposta di linee cellulari e di blasti LAL-T alla CLO in presenza del Comp E, potente inibitore delle gamma secretasi (GSI) e quindi inibitore del pathway.

Scelta del modello cellulare. Dal momento che non tutti i campioni LAL-T aventi attivazione del pathway di Notch risultano essere sensibili al GSI, e' stata effettuata una curva dose-risposta al GSI in 3 linee LAL-T con Notch attivato: RPMI8402, DND-41 e HPB-ALL. La linea Jurkat non avente attivazione del pathway e' stata utilizzata come controllo. Tutte e 3 le linee in esame sono risultate essere responsive al trattamento; le RPMI8402 e le DND41 presentano una maggiore sensibilità al farmaco (Fig. 8) rispetto alle HPB-ALL.

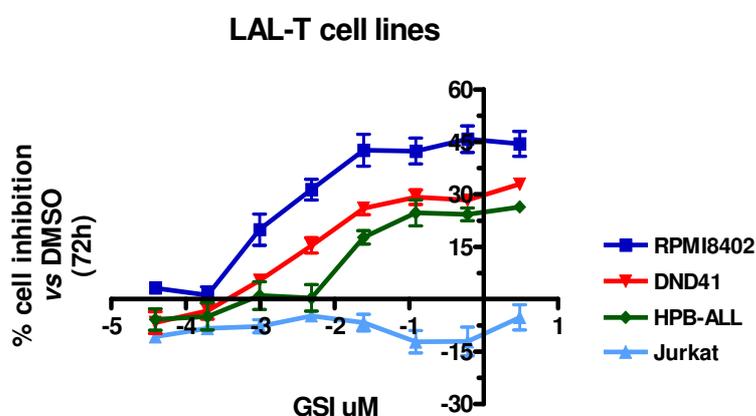


Fig. 8 Curva dose-risposta al GSI in 3 linee cellulari di LAL-T con NOTCH attivato. La linea Jurkat non avente attivazione del pathway è stata utilizzata come controllo.

Per verificare che l'inibizione cellulare indotta dal GSI osservata nelle linee più sensibili, RPMI8402 e DND41, fosse effettivamente dovuta all'inibizione del pathway di Notch, si e' proceduto con una caratterizzazione molecolare dell'effetto farmacologico, analizzando in Real-Time PCR l'espressione dei geni target di Notch dopo trattamento. Come evidenziato in Fig. 9, il trattamento con GSI induce un'inibizione dei target di Notch Hes-1 e c-Myc a diverse dosi del farmaco e a diversi tempi di esposizione in entrambe le linee cellulari.

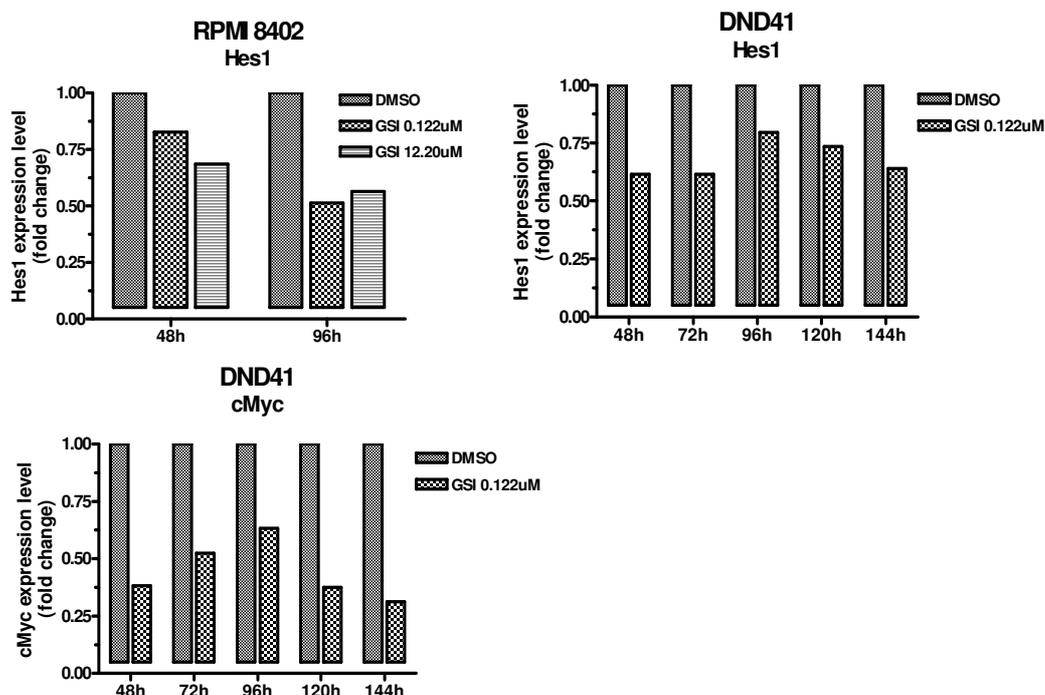


Fig.9 Valutazione dell'espressione dei geni HES-1 e c-Myc, componenti del Signaling di Notch, dopo trattamento con CompE, GSI, in linee RPMI8402 e DND-41 a diverse dosi del farmaco e a diversi tempi di esposizione. L'espressione genica e' stata valutata in Real-Time PCR.

Effetto del trattamento combinato CLO+GSI in linee cellulari LAL-T. L'effetto della combinazione dei due farmaci e' stata dapprima valutata nelle linee cellulari RPMI8402 e DND41. Come illustrato in Fig. 10, il trattamento combinato CLO+GSI, a diverse concentrazioni di CLO, ha un effetto significativamente maggiore rispetto ai trattamenti singoli in entrambi i modelli cellulari.

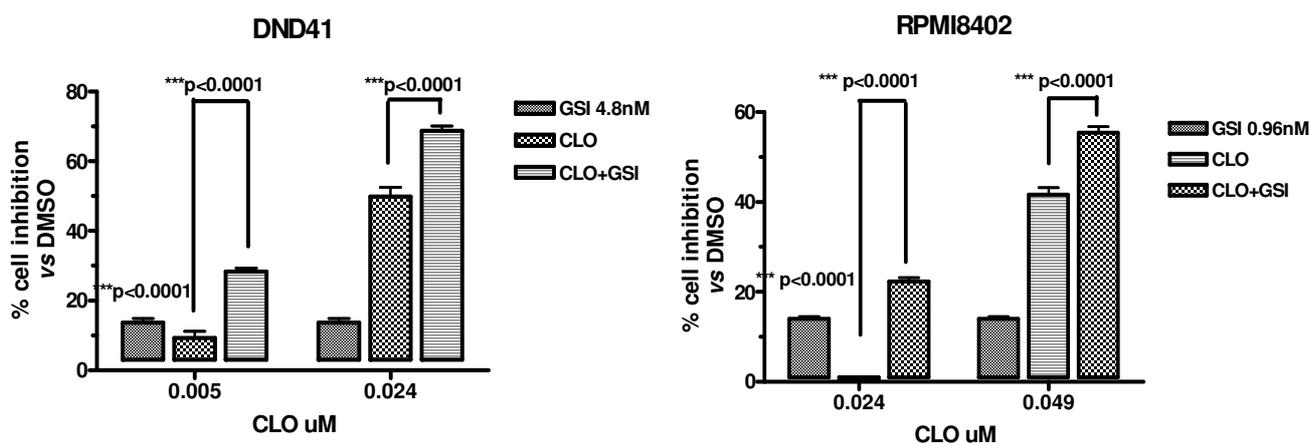


Fig. 10 Effetto della CLO sulla vitalità cellulare in presenza e assenza di GSI a 72h nelle linee cellulari di LAL-T, RPMI8402 e DND41. *p* value: significatività determinata con lo Student's *t* Test. Differenze significative: *p* value<0.05

Effetto del trattamento combinato CLO+GSI in blasti LAL-Tr. L'effetto del trattamento con CLO in presenza di GSI e' stato valutato anche su cellule leucemiche provenienti da 3 campioni LAL-Tr inclusi nello studio. In 2 su 3 campioni, si conferma il dato osservato nelle linee cellulari per cui il trattamento combinato risulta essere più efficace rispetto ai trattamenti singoli in maniera statisticamente significativa. In particolare, a 72h dal trattamento, nei blasti del paziente

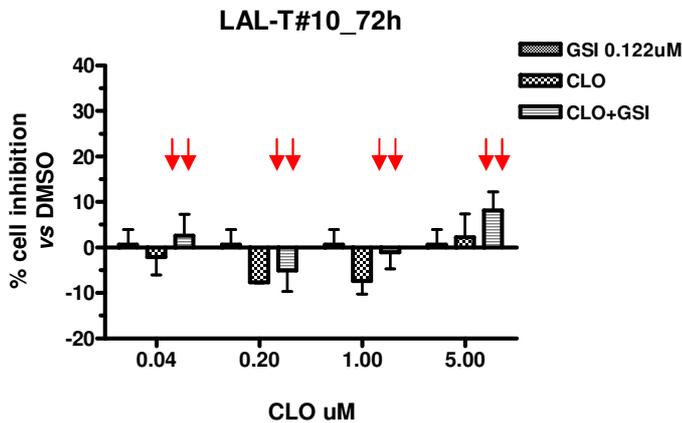


Fig.11 Effetto della CLO sulla vitalità cellulare in presenza e assenza di GSI nei blasti provenienti dal paziente LAL-Tr#10 dopo 72h di trattamento.

LAL-T#10 non si osserva alcuna risposta alla combinazione dei due farmaci e ai trattamenti singoli neanche a dosi crescenti di CLO (Fig.11), nei campioni LAL-T#6 e LAL-T#8 invece, a 72h dal trattamento, si osserva in presenza di GSI un aumento della risposta a basse dosi di CLO (Fig.12). Il vantaggio dell'utilizzo del trattamento combinato e' confermato anche alle 96h.

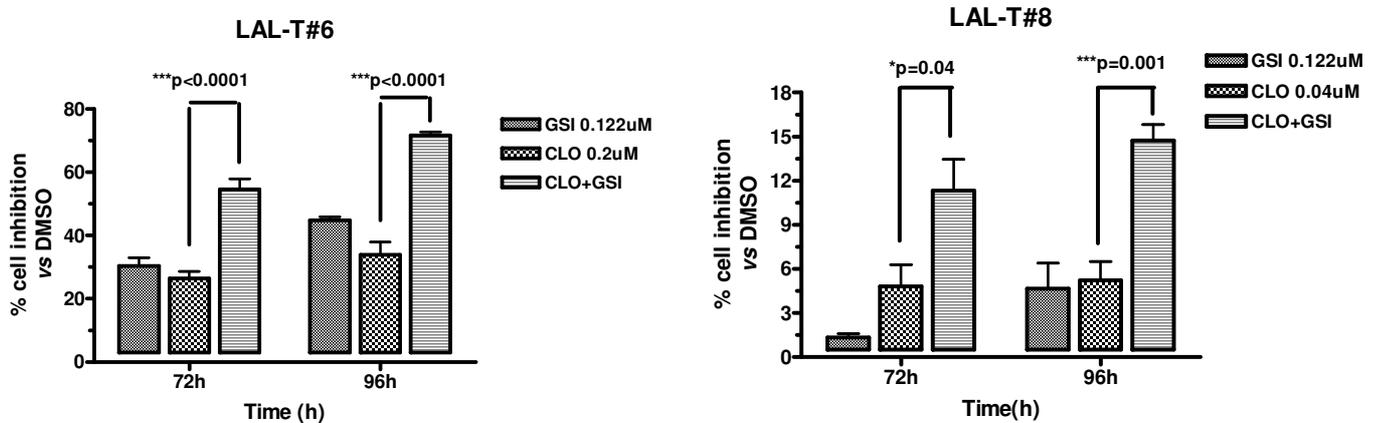


Fig.12 Effetto della CLO sulla vitalità cellulare in presenza e assenza di GSI nei blasti provenienti dai pazienti LAL-Tr#6 e LAL-Tr#8, inclusi nello studio, a 72h e 96h di trattamento.

Per confermare che il vantaggio del trattamento combinato fosse effettivamente da associarsi all'inibizione del pathway di Notch, si e' proceduto con la caratterizzazione molecolare della risposta al GSI in due dei casi LAL-Tr analizzati *in vitro* per l'effetto del trattamento combinato CLO+GSI. L'espressione genica dei geni target di Notch, Hes-1 e c-Myc, e' stata valutata in Real-Time PCR dopo trattamento con GSI in singolo e in combinazione. Come si osserva in Fig.13, si assiste ad una diminuzione di espressione di entrambi i geni target in risposta al farmaco in singolo e in combinazione nei blasti LAL-T#8 ma non nei blasti LAL-T#10 che *in*

in vitro sono risultati essere resistenti sia alla CLO che al GSI. I risultati ottenuti indicano che l'inibizione di vitalità in risposta al GSI osservata *in vitro* nei blasti LAL-Tr testati e' effettivamente da associarsi ad una inibizione specifica del pathway di Notch.

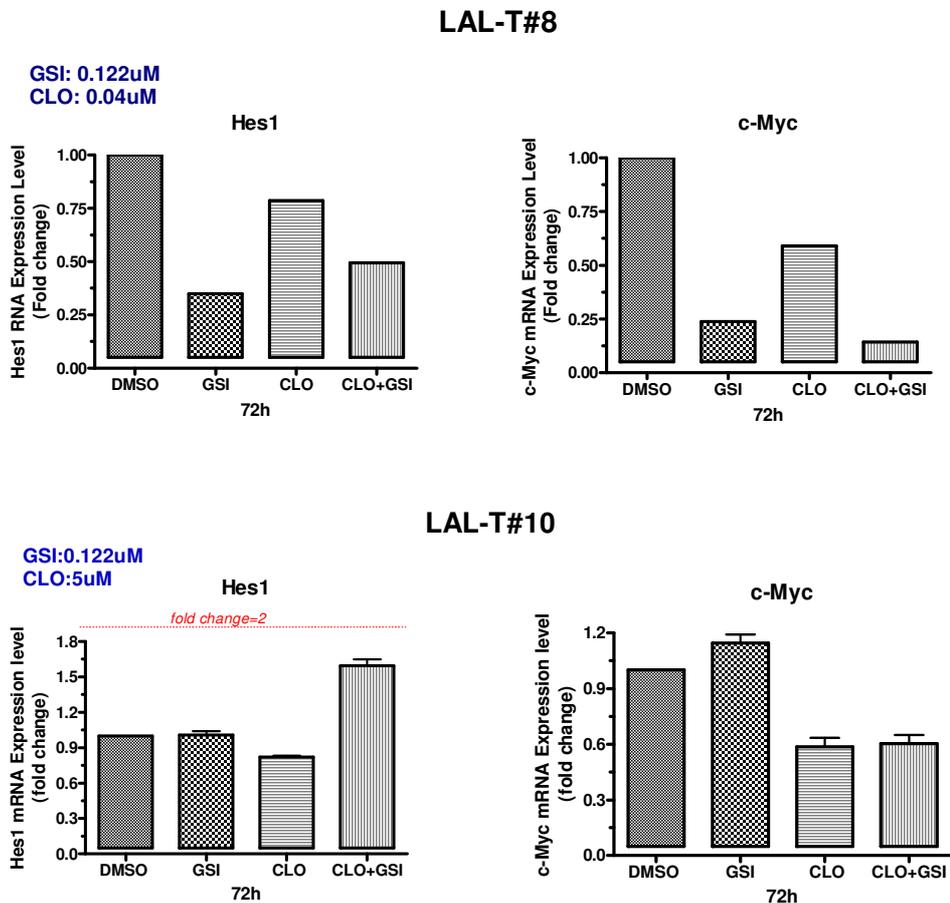


Fig. 13. Analisi dell'espressione genica dopo trattamento con GSI e/o CLO dei geni target di Notch, Hes-1 e c-Myc, mediante Real-Time PCR nei blasti LAL-T#8 e LAL-T#10 studiati *in vitro* per la risposta al trattamento combinato CLO+GSI .

I risultati conseguiti sulla risposta delle cellule LAL-T alla CLO in presenza e assenza di GSI suggeriscono un ruolo del pathway di Notch come nuovo target di terapia per le cellule LAL-T meno sensibili alla CLO e un suo possibile coinvolgimento nella sensibilità al farmaco. Si e' allora indagato sui possibili meccanismi molecolari alla base dell'interazione dei due farmaci e quindi del pathway di Notch con la risposta alla CLO.

Indagine sui meccanismi molecolari di interazione tra GSI e CLO. Lo studio di Gene Expression Profiling ha messo in luce la minore espressione statisticamente significativa del gene mitocondriale proapoptotico BNIP3 nelle forme LAL-Tr rispetto alle LAL-Ts e alle LAM e LAL-B incluse nello studio. Un approccio di metanalisi su dati di gene expression pubblicati e ottenuti su linee LAL-T trattate con GSI hanno messo in evidenza come il gene BNIP3 sia il gene più

DISCUSSIONE

Le recenti acquisizioni sul ruolo della componente genetica nello sviluppo della malattia e nella risposta individuale ad un trattamento farmacologico ottenute mediante studi di farmacogenetica hanno aperto nuove prospettive sulla possibilità di operare scelte terapeutiche sempre più mirate e personalizzate¹⁸⁶. Numerose evidenze hanno, infatti, dimostrato il ruolo delle varianti geniche nel determinare l'efficacia e la tossicità di uno specifico trattamento terapeutico creando le basi per il disegno di terapie che basate sul patrimonio genetico di ciascun individuo e, in ambito oncologico anche sulla genetica delle cellule tumorali, possano risultare specifiche nel trattamento della patologia e ad elevata efficacia e a bassa tossicità per i singoli pazienti. Polimorfismi a carico dei geni della farmacocinetica e farmacodinamica e mutazioni somatiche acquisite dalla cellule tumorale durante la trasformazione maligna, a carico degli stessi geni o di geni che indirettamente influenzano la risposta terapeutica, sono in grado di modificare la disponibilità e l'azione di un farmaco modulando la risposta farmacologica sia in efficacia che in tossicità. L'identificazione di questi "biomarcatori" genetici potrebbe pertanto consentire la razionalizzazione della terapia guidando la scelta terapeutica e nella scelta del tipo di cura e nella scelta della dose specifiche ed appropriate per ciascun individuo. Questo risultato è altamente auspicabile nel trattamento oncologico considerando che i farmaci antitumorali presentano un bassissimo indice terapeutico e che varianti genetiche della cellula tumorale possono contribuire notevolmente allo sviluppo di resistenza o consentire, se note, il disegno di farmaci più mirati e specifici.

Ulteriori progressi nell'ambito dell'oncologia e, nella fattispecie nell'ambito del trattamento delle LA pediatriche che si presentano tuttora come la principale causa di morte infantile per malattia, potrebbero, dunque, essere ottenuti mediante studi finalizzati a chiarire le componenti genetiche coinvolte nella risposta individuale ai trattamenti. Questi permetterebbero l'identificazione di marcatori genetici, oltre che clinici, in grado di individuare già alla diagnosi i soggetti che possono effettivamente beneficiare di una determinata terapia e la dose ad alta efficacia e a bassa tossicità per ciascun paziente nonché una migliore conoscenza dei meccanismi di resistenza tumorale e l'individuazione di nuovi bersagli farmacologici verso cui indirizzare trattamenti più efficaci e mirati, in quanto appositamente disegnati sull'assetto molecolare della patologia. Insomma la prospettiva futura è una personalizzazione della terapia sulla base del patrimonio genetico del singolo individuo e sull'assetto genetico della cellula tumorale.

Questi obiettivi sono oggi facilmente raggiungibili mediante studi di farmacogenomica, studi “genome-wide” finalizzati all’identificazione della componente genetica associata alla risposta farmacologica e alla variabilità inter-individuale ai trattamenti. Studi di farmacogenomica sono già stati realizzati in ambito oncologico consentendo l’identificazione di polimorfismi di efficacia o tossicità e l’identificazione di varianti geniche di risposta anche tumore-specifiche.

Precedenti studi di farmacogenomica condotti in LAL e LAM hanno consentito l’identificazione di profili genetici associati alla resistenza delle cellule tumorali a specifici trattamenti ampiamente in uso nei protocolli convenzionali di terapia^{82,116}. Le “signatures” genetiche identificate sono risultate strettamente associate alla risposta terapeutica e all’outcome *in vivo* ed estremamente specifiche per ciascun trattamento suggerendo meccanismi di resistenza indipendenti per ciascun agente. Questi primi studi hanno dimostrato la possibilità di identificare profili di espressione genica delle cellule tumorali associate alla risposta terapeutica (efficacia, tossicità, resistenza) che possono essere utilizzati nella pratica clinica quali predittori di risposta per una stratificazione prognostica e terapeutica della popolazione.

Alla luce delle attuali conoscenze sul ruolo della genomica e delle future prospettive di applicabilità clinica, il lavoro condotto in questo dottorato di ricerca è stato volto alla realizzazione dello studio della farmacogenomica della Clofarabina (CLO) nel trattamento delle Leucemie Acute pediatriche al fine di identificare determinanti genetici di risposta cellulare al trattamento, quindi nuovi bersagli di terapia e delucidare i meccanismi di resistenza delle cellule tumorali al farmaco.

Si è, dunque, proceduto alla caratterizzazione genetica-molecolare delle cellule leucemiche mediante approcci di Whole-Genome Sampling Analysis (WGSA) sul genoma e trascrittoma mediante DNA microarrays. Lo studio è stato eseguito su blasti leucemici isolati da sangue midollare (BM) o sangue periferico (PB) crioconservati alla diagnosi. Precedenti lavori hanno già dimostrato che la provenienza del campione (BM o PB) e il congelamento non alterano i risultati sperimentali¹⁸⁵. L’efficacia del farmaco è stata testata mediante saggi di vitalità *in vitro* in risposta al trattamento su blasti provenienti da pazienti pediatriche affetti da LAM e LAL sia di immunofenotipo B che T.

Come suggerito da numerosi trial clinici¹⁷³⁻¹⁷⁵, la CLO è risultata estremamente efficace nel trattamento sia delle LAM che delle LAL-B e T. Nell’ambito delle LAL-T si è però osservata una maggiore diversificazione nella risposta cellulare al farmaco che ha consentito l’identificazione di due sottopopolazioni a maggiore e minore sensibilità, battezzate LAL-Ts e

LAL-Tr rispettivamente. La diversa risposta al trattamento nell'ambito delle LAL era già stata suggerita da precedenti lavori in cui si è osservato un effetto farmacologico diverso tra LAL-B e LAL-T¹⁸⁷, i nostri dati, però, in aggiunta identificano esattamente una sottopopolazione di cellule LAL-T meno responsive alla CLO sia rispetto alle LAL-Ts che rispetto alle LAL-B mettendo in luce una categoria di cellule leucemiche a diversa sensibilità al farmaco nell'ambito delle LAL indipendentemente dall'immunofenotipo.

Trial clinici eseguiti su pazienti pediatrici affetti da LAL e LAM trattati con CLO hanno consentito una valutazione preliminare della concentrazione plasmatica del farmaco dopo somministrazione della dose massima tollerata (MTD) pari a 52 mg/m²/die di infusione intravenosa di 2 h somministrata per 5 giorni per 2-6 settimane^{175,188}. In uno studio condotto nel 2004 su pazienti pediatrici affetti da LAL refrattari o recidivati, già dopo circa 10 ore dalla fine dell'infusione si è osservata una riduzione della concentrazione plasmatica di circa l'85%¹⁸⁸.

Interessante sottolineare che il valore misurato risulta inferiore al valore LC50 più basso riportato nella popolazione LAL-Tr identificata.

Ad oggi non si conoscono marcatori predittivi di risposta alla CLO e, infatti, anche nel nostro lavoro la risposta *in vitro* nelle cellule LAL non risulta associata né alla risposta *in vivo* al prednisone (PDN) né all'iperleucocitosi all'esordio (WBC) valutata ai due diversi cut-off di 50000cell/μl e 100000cell/μl a conferma dell'assenza di correlazione con questi parametri clinici di comune uso per la stratificazione prognostica e terapeutica dei pazienti. I dati di correlazione con la risposta *in vitro* al desametasone confermano ulteriormente l'assenza di correlazione con la risposta ai glucocorticoidi sottolineando la necessità di identificare nuovi marcatori di risposta.

Alla luce di questi risultati il lavoro è stato allora indirizzato ad individuare i determinanti genetici di risposta alla CLO indagando le basi genetiche della risposta delle cellule LAL-T al farmaco. A tal fine si sono condotti studi di Genome-Wide Copy Number Analysis (CGH) e Gene Expression Profiling.

Gli studi di Copy Number Analysis hanno messo in evidenza diverse microdelezioni e microamplificazioni; tra queste è stata osservata la delezione ubiquitaria del braccio corto del Cromosoma 9 in corrispondenza degli oncosoppressori CDKN2A e 2B (p16 e p15), già precedentemente identificata con una certa frequenza nelle LAL e, in particolare, definita da autori come alterazione tumore-specifica a cattiva prognosi^{81,90,91}. Non sono emerse, però, amplificazioni e delezioni cromosomiche significativamente associate alla risposta delle cellule LAL-T alla CLO.

Estremamente significativi, invece, i risultati ottenuti dall'analisi di Gene Expression Profiling. Sono stati, infatti, identificati più di 60 geni differenzialmente espressi tra cellule LAL-Ts e LAL-Tr individuando la "signature" genetica associata alla maggiore e minore responsività delle cellule LAL-T al farmaco. Interessante sottolineare che gli studi di Gene Expression Profiling consentono di individuare geni della farmacocinetica e farmacodinamica, anche precedentemente non noti, i cui livelli di espressione si associano alla risposta farmacologica e che tali livelli di espressione genica possono essere dovuti a polimorfismi o a mutazioni somatiche (puntiformi o cromosomiche) acquisite dalla cellula tumorale durante la tumorigenesi; a tal proposito, i dati di Copy Number ottenuti escludono che alterazioni cromosomiche, quali amplificazioni e delezioni, siano responsabili dell'espressione differenziale dei geni associati alla risposta farmacologica.

La caratterizzazione funzionale dei geni differenziali mediante GeneOntology ha sottolineato il coinvolgimento di geni appartenenti ai meccanismi di risposta immunitaria, di comunicazione cellulare, trasduzione del segnale e apoptosi.

Precedenti lavori hanno messo in luce geni coinvolti nel metabolismo dell'Ara-C i cui livelli di espressione si associano all'outcome i terapia. Per alcuni di questi, approcci di farmacogenetica hanno anche consentito l'identificazione dei polimorfismi associati^{111,189}. I geni identificati, coinvolti in generale nel metabolismo degli analoghi nucleosidici, potrebbero avere un ruolo anche nella risposta alla CLO. Dai nostri dati, non è emersa alcuna espressione differenziale di tali biomarcatori tra LAL-Tr e LAL-Ts (anche se non si possono escludere alterazioni a livello proteico non rilevabili con studi di espressione genica).

L'analisi dei geni differenziali ha invece messo in luce il gene BNIP3, gene pro-apoptotico mitocondriale il cui silenziamento è stato già osservato nei tumori emopoietici¹⁹⁰. Nello studio svolto, il gene BNIP3 è risultato essere meno espresso nelle LAL-Tr rispetto alle LAL-Ts. Inoltre, la valutazione dell'espressione genica di BNIP3 nei casi LAM e LAL-B inclusi nello studio dimostrano che il gene è meno espresso in maniera statisticamente significativa nelle LAL-Tr sia rispetto alle LAL-Ts che alle LAM e LAL-B indipendentemente dall'immunofenotipo. I risultati di espressione, confermati in Real-Time, risultano pertanto in linea con la sensibilità osservata *in vitro* alla CLO per queste popolazioni cellulari suggerendo che il gene possa effettivamente essere coinvolto nella risposta al farmaco.

La CLO, oltre che indurre apoptosi in qualità di analogo deossiadenosinico determinando la produzione di molecole di DNA fraudolente, induce morte cellulare agendo sui mitocondri e liberando nel citoplasma molecole mitocondriali pro-apoptotiche. Si può, dunque, supporre che BNIP3 agisca quale mediatore della risposta alla CLO, motivo per cui una sua minore

espressione nei casi LAL-Tr si associa ad una minore responsività al farmaco diversamente a quanto accade nelle altre popolazioni cellulari altamente sensibili. In questa prospettiva il livello di espressione di BNIP3 nelle LAL-T potrebbe presentarsi quale marcatore di resistenza cellulare; i dati di espressione su LAM e LAL-B responsive al trattamento offrono una “sorta di validazione” di questo risultato.

Un’ulteriore analisi dei dati di Gene Expression condotta per identificare i pathways differenzialmente espressi tra le due sottopopolazioni ha messo in luce una maggiore espressione dei componenti del pathway di Notch nelle LAL-Tr rispetto alle LAL-Ts: la significatività del dato è stata confermata da 4 diversi tool statistici e ulteriormente avvalorata dai risultati di Real-Time PCR. Ancora una volta l’analisi di espressione genica estesa alle LAL-B incluse nello studio conferma una maggiore espressione statisticamente significativa del pathway nelle LAL-Tr rispetto alle altre popolazioni cellulari suggerendo, alla luce dei dati di risposta alla CLO *in vitro*, che anche il pathway di Notch possa effettivamente essere coinvolto nella risposta delle cellule LAL-T al farmaco.

Il pathway di Notch risulta costitutivamente attivato nel 50% dei casi LAL-T a seguito di specifiche mutazioni attivanti e, coinvolto fisiologicamente nello sviluppo dei timociti, svolge un ruolo determinante nella proliferazione e sopravvivenza delle cellule leucemiche rivestendo un ruolo chiave nella leucemogenesi¹⁹¹.

Il pathway di Notch potrebbe allora presentarsi quale marcatore di cellule altamente aggressive e, pertanto, marcatore predittivo di scarsa risposta alla CLO, potrebbe costituire un nuovo target di terapia per il trattamento delle LAL-T poco responsive al nuovo farmaco¹⁹¹ e/o essere coinvolto effettivamente nei meccanismi di risposta al trattamento.

Per valutare se il pathway di Notch è realmente coinvolto nella risposta delle cellule LAL-T alla CLO e/o rappresentare un nuovo target di terapia, sono stati condotti studi *in vitro* di risposta delle cellule LAL-T alla CLO in presenza e assenza del Compound E (CompE), noto Inibitore delle Gamma Secretasi (GSI) e quindi del pathway di Notch.

I primi studi condotti su due linee cellulari di LAL-T con pathway di Notch attivato, DND41 e RPMI8402, dimostrano che il trattamento combinato CLO+GSI, a diverse concentrazioni di CLO, ha un effetto significativamente maggiore rispetto ai trattamenti singoli in entrambi i modelli cellulari. La valutazione della risposta cellulare al GSI e la caratterizzazione molecolare dell’effetto farmacologico hanno dimostrato che, nelle due linee, il GSI induce effettivamente l’inibizione del pathway di Notch.

In 2 su 3 campioni di blasti LAL-Tr inclusi nello studio si è confermato quanto osservato nelle linee cellulari. In 2 campioni LAL-Tr, a 72h dal trattamento, si osserva in presenza di GSI un aumento della risposta a basse dosi di CLO. Il vantaggio dell'utilizzo del trattamento combinato si conferma anche alle 96h. La valutazione in Real-Time PCR dell'espressione dei geni targets del pathway di Notch dopo trattamento con GSI, in singolo e in combinazione con la CLO, conferma che il vantaggio del trattamento combinato è da associarsi all'inibizione del pathway. Il terzo campione LAL-Tr non è, invece, risultato sensibile a nessun trattamento in singolo e in combinazione alle dosi utilizzate e, infatti, la caratterizzazione molecolare dell'azione del GSI ha confermato l'assenza di effetto farmacologico.

I risultati ottenuti sulla risposta delle cellule LAL-T alla CLO in presenza e assenza di GSI suggeriscono un ruolo per il pathway di Notch come nuovo target di terapia per le cellule LAL-T meno sensibili alla CLO e un suo possibile coinvolgimento nella sensibilità al farmaco. Diverse linee cellulari LAL-T sono state testate per la loro risposta alla CLO e tutte sono risultate altamente responsive: l'identificazione di modelli cellulari a maggiore resistenza alla CLO per futuri studi *in vitro* potrebbe consentire una maggiore definizione dell'entità di interazione tra Notch e risposta farmacologica.

Dal momento che i risultati *in vitro* suggeriscono che Notch possa essere implicato nella sensibilità delle cellule leucemiche alla CLO, si è indagato sui possibili meccanismi molecolari alla base dell'interazione tra l'inibizione del pathway e la risposta al farmaco.

Un approccio di meta-analisi su dati di Gene Expression Profiling pubblicati e ottenuti su linee LAL-T trattate con GSI hanno messo in evidenza come il gene BNIP3 sia significativamente indotto dal trattamento con GSI. L'induzione del gene dopo trattamento con GSI è stato confermato anche nei nostri modelli cellulari RPMI8402 e DND41.

Ipotizzando che il gene BNIP3 svolga un ruolo come mediatore della risposta alla CLO il cui basso livello di espressione si associa ad una maggiore resistenza farmacologica, è plausibile allora supporre che il gene costituisca l'elemento chiave alla base dell'interazione tra il pathway di Notch e la CLO. Già altri autori hanno dimostrato che il livello di espressione di geni associati alla risposta ad uno specifico trattamento può essere determinato da alterazioni a carico di altri geni che risultano, così, indirettamente coinvolti⁶¹. L'attivazione del pathway di Notch potrebbe, dunque, essere coinvolto nella minore espressione del gene BNIP3 e, quindi, in una scarsa risposta cellulare al trattamento; di contro, l'inibizione farmacologica del pathway con agenti specifici, quali GSI, potrebbe ripristinare un buon livello di espressione del gene pro-apoptotico "restituendo" la sensibilità cellulare alla CLO.

Ulteriori indagini sono necessarie per approfondire il ruolo di BNIP3 quale mediatore di risposta alla CLO; a tal fine saranno eseguiti saggi di vitalità *in vitro* in cui si valuterà la sensibilità di cellule LAL-T alla CLO dopo inibizione specifica del gene pro-apoptotico.

In conclusione, il lavoro svolto ha permesso di identificare la “signature” genetica strettamente associata alla “resistenza” di una sottopopolazione di cellule LAL-T alla CLO offrendo il razionale per il disegno di trial clinici in cui testarne il valore predittivo. Questa signature genetica potrebbe essere utilizzata in clinica quale predittore di risposta alla CLO in grado di identificare soggetti con cellule tumorali a profilo identico e, quindi, scarsamente responsivi al trattamento.

L’analisi dei geni differenzialmente espressi tra LAL-Ts e LAL-Tr ha, inoltre, messo in luce una maggiore attivazione del pathway di Notch nelle cellule LAL-T resistenti e una minore espressione del gene pro-apoptotico BNIP3. I dati ottenuti suggeriscono, quindi, per il pathway di Notch e per il gene BNIP3 un possibile ruolo quali biomarcatori di risposta alla CLO. Studi su una coorte più ampia e indipendente di soggetti affetti da LAL-T sono dunque necessari per verificare l’effettiva associazione con la risposta al farmaco. Successivamente, se il dato venisse confermato, la ricerca delle varianti geniche responsabili dell’espressione differenziale potrebbe consegnare determinati genetici di effettiva e facile applicazione clinica. Nel frattempo, i risultati conseguiti in questo lavoro aprono nuove prospettive per chiarire il coinvolgimento di BNIP3 nel meccanismo di resistenza cellulare al CLO e suggeriscono un ruolo per il pathway di Notch come nuovo bersaglio di terapia per i casi LAL-T a bassa sensibilità al farmaco lasciando spazio al disegno di un trattamento terapeutico che risulti più specifico ed efficace per questa sottopopolazione di pazienti LAL-T.

CONCLUSIONI

I dati ottenuti nel lavoro svolto in questo dottorato di ricerca hanno consentito l'identificazione del profilo genico associato alla risposta delle cellule leucemiche LAL-T pediatriche al nuovo farmaco Clofarabina, permettendo l'identificazione della "signature" genetica associata alla risposta farmacologica e l'individuazione di due potenziali biomarcatori predittivi di risposta cellulare: pathway di Notch e BNIP3. Lo studio offre dunque un razionale per il disegno di trial clinici in cui testare il valore predittivo dei marcatori identificati in una coorte indipendente di soggetti affetti da LAL-T trattati con CLO. I risultati conseguiti suggeriscono, inoltre, un ruolo per BNIP3 nei meccanismi di resistenza cellulare e per il pathway di Notch come nuovo bersaglio di terapia per i casi LAL-T a bassa sensibilità al farmaco aprendo nuove prospettive per il disegno di un trattamento terapeutico che risulti più specifico ed efficace per questa sottopopolazione di pazienti LAL-T.

BIBLIOGRAFIA

1. Staines A and Cartwright RA (1992). "Acute leukaemias" *Baillieres Clin Haematol* 5(1):1-26.
2. Crans HN and Sakamoto KM. (2001). "Transcription factors and translocations in lymphoid and myeloid leukemia" *Leukemia*.15(3):313-31.
3. Scheinberg D.A., Maslak P., and Weiss M. (2001). "Acute leukemia. In. DeVita V., Hellman S, Rosenberg S.A, eds. *Cancer Principles and Practice of Oncology* (Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins).2404-2433.
4. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J. et al. (1997). "World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues." *J Clin Oncol.* 17:3835-49
5. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 2009 Jul 30;114(5):937-51. Epub 2009 Apr 8.
6. Frascella E, Rondelli R, Pigazzi M, Zampieron C, Fagioli F, Favre C, Lippi AA, Locatelli F, Luciani M, Menna G, Micalizzi C, Rizzari C, Testi AM, Pession A, Basso G. Clinical features of childhood acute myeloid leukaemia with specific gene rearrangements. *Leukemia.* 2004 Aug;18(8):1427-9.
7. von Neuhoff C, Reinhardt D, Sander A, Zimmermann M, Bradtke J, Betts DR, Zemanova Z, Stary J, Bourquin JP, Haas OA, Dworzak MN, Creutzig U. Prognostic impact of specific chromosomal aberrations in a large group of pediatric patients with acute myeloid leukemia treated uniformly according to trial AML-BFM 98. *J Clin Oncol.* 2010 Jun 1;28(16):2682-9. Epub 2010 May 3
8. Global Cancer Facts and Figures 2007. Atlanta,GA:American Cancer Society.
<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@nho/documents/document/globalfactsandfigures2007rev2p.pdf>
9. Basi scientifiche per la definizione di linee-guida in ambito clinico per i Tumori dell'Età Pediatrica
<http://www.iss.it/binary/impac/cont/2008TESTOPEDIATRIAFINALE.1222954230.pdf>
10. Pui CH, Schrappe M, Ribeiro RC, Niemeyer CM. Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2004:118-45.
11. Carroll WL, Bhojwani D, Min DJ, Raetz E, Relling M, Davies S, Downing JR, Willman CL, Reed JC. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2003:102-31
12. Vrooman LM, Silverman LB. Childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors. *Curr Opin Pediatr.* 2009 Feb;21(1):1-8.
13. Sandler DP, (1990).Epidemiology and etiology of leukemia. *Curr Opin Oncol* 2(1):39.

14. Cheok MH, Lugthart S, Evans WE. Pharmacogenomics of acute leukemia.. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2006;46:317-53. Review
15. Conter V, Aricò M, Basso G, Biondi A, Barisone E, Messina C, Parasole R, De Rossi G, Locatelli F, Pession A, Santoro N, Micalizzi C, Citterio M, Rizzari C, Silvestri D, Rondelli R, Lo Nigro L, Ziino O, Testi AM, Masera G, Valsecchi MG; Associazione Italiana di Ematologia ed Oncologia Pediatrica. Long-term results of the Italian Association of Pediatric Hematology and Oncology (AIEOP) Studies 82, 87, 88, 91 and 95 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2010 Feb;24(2):255-64. Epub 2009 Dec 17.
16. Pession A, Rondelli R, Basso G, Rizzari C, Testi AM, Fagioli F, De Stefano P, Locatelli F; AML Strategy & Study Committee of the Associazione Italiana di Ematologia e Oncologia Pediatrica (AIEOP). Treatment and long-term results in children with acute myeloid leukaemia treated according to the AIEOP AML protocols. *Leukemia*. 2005 Dec;19(12):2043-53.
17. Pession A, Rizzari C, Putti MC, Masetti R, Casale F, Fagioli F, Lo Nigro L, Luciani M, Micalizzi MC, Menna G, Santoro N, Testi AM, Rondelli R, Biondi A, Basso G, Locatelli F for the ANLL study group of AIEOP. Results of the AIEOP AML 2002/01 study for treatment of children with acute myeloid leukemia. *Blood* 2009. 114;22,13
18. Masetti R, Rondelli R, Putti C, Rizzari C, Locatelli F, Santoro N, Luciani M, Menna G, Fagioli F, Lo Nigro L, Micalizza C, Di Tullio MT, Basso G, Biondi A, Testi AM, Zecca M, Pession A. CSS AIEOP LAnL. Protocollo AIEOP LAM 2002/01:risultati preliminari. *Haematologica* 2007;92 S.4.
19. Pui CH, Evans WE. 1998. Acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 339:605–15
20. Loeb DM et al. What is the optimal therapy for childhood AML?. *Oncology*. 2002;16 1057-1070
21. Yong WP, Innocenti F. Translation of pharmacogenetic knowledge into cancer therapeutics. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2007 Sep;5(9):698-706. Review.
22. Gonzalez-Angulo AM, Hennessy BT, Mills GB. Future of personalized medicine in oncology: a systems biology approach. *J Clin Oncol*. 2010 Jun 1;28(16):2777-83
23. Mitchell AA, Zwick ME, Chakravarti A, Cutler DJ. 2004. Discrepancies in dbSNP confirmation rates and allele frequency distributions from varying genotyping error rates and patterns. *Bioinformatics* 20:1022–32
24. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, et al. 2002. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296:2225–29
25. Roses AD. 2000. Pharmacogenetics and the practice of medicine. *Nature* 405: 857–65
26. Kim S, Ruparel HD, Gilliam TC, Ju J. 2003. Digital genotyping using molecular affinity and mass spectrometry. *Nat. Rev. Genet.* 4:1001–8
27. Shi MM. 2001. Enabling large-scale pharmacogenetic studies by highthroughput mutation detection and genotyping technologies. *Clin. Chem.* 47:164–72

28. Davey JW, Hohenlohe PA, Etter PD, Boone JQ, Catchen JM, Blaxter ML. Genome wide genetic marker discovery and genotyping using next generation sequencing. *Nat Rev Genet.* 2011 Jun 17;12(7):499-510.
29. Lupski, J. R. Genomic rearrangements and sporadic disease. *Nature Genet.* 39, S43–S47 (2007).
30. Bishop, J. M. The molecular genetics of cancer. *Science* 235, 305–311 (1987).
31. Cheok MH, Pottier N, Kager L, Evans WE. Pharmacogenetics in acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol.* 2009 Jan;46(1):39-51. Review.
32. Relling MV, Dervieux T. Pharmacogenetics and cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2001 Nov;1(2):99-108. Review
33. Cheok MH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukaemia: a model for the pharmacogenomics of cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2006 Feb;6(2):117-29. Review. Erratum in: *Nat Rev Cancer.* 2006 Mar;6(3):249.
34. Huang RS, Ratain MJ. Pharmacogenetics and pharmacogenomics of anticancer agents. *CA Cancer J Clin.* 2009 Jan-Feb;59(1):42-55.
35. Marie JP. 2001. Drug resistance in hematologic malignancies. *Curr. Opin. Oncol.* 13:463–69
36. Pui, C. H., Campana, D. & Evans, W. E. Childhood acute lymphoblastic leukaemia — current status and future perspectives. *Lancet Oncol.* 2, 597–607 (2001).
37. Freedman AN, Sansbury LB, Figg WD, Potosky AL, Weiss Smith SR, Khoury MJ, Nelson SA, Weinshilboum RM, Ratain MJ, McLeod HL, Epstein RS, Ginsburg GS, Schilsky RL, Liu G, Flockhart DA, Ulrich CM, Davis RL, Lesko LJ, Zineh I, Randhawa G, Ambrosone CB, Relling MV, Rothman N, Xie H, Spitz MR, Ballard-Barbash R, Doroshow JH, Minasian LM. Cancer pharmacogenomics and pharmacoepidemiology: setting a research agenda to accelerate translation. *J Natl Cancer Inst.* 2010 Nov 17;102(22):1698-705.
38. Evans, W. E. & Relling, M. V. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 286, 487–491 (1999).
39. Krynetski, E. Y. & Evans, W. E. Pharmacogenetics of cancer therapy: getting personal. *Am. J. Hum. Genet.* 63, 11–16 (1998).
40. McLeod, H. L., Krynetski, E. Y., Relling, M. V. & Evans, W. E. Genetic polymorphism of thiopurine methyltransferase and its clinical relevance for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*14, 567–572 (2000).
41. Yates, C. R. et al. Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Ann. Intern. Med.* 126, 608–614 (1997).
- 42 Krynetski, E. Y. et al. A single point mutation leading to loss of catalytic activity in human thiopurine S-methyltransferase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92, 949–953 (1995).

43. Schaeffeler E, Fischer C, Brockmeier D, Wernet D, Moerike K, et al. 2004. Comprehensive analysis of thiopurine Smethyltransferase phenotype-genotype correlation in a large population of German-Caucasians and identification of novel TPMT variants. *Pharmacogenetics* 14:407–17
44. Chen, C. L. et al. Higher frequency of glutathione S-transferase deletions in black children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 89, 1701–1707 (1997).
45. Hayes, J. D., Flanagan, J. U. & Jowsey, I. R. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51–88 (2005).
46. Woo, M. H. et al. Glutathione S-transferase genotypes in children who develop treatment-related acute myeloid malignancies. *Leukemia* 14, 232–237 (2000).
47. Allan, J. M. et al. Polymorphism in glutathione S-transferase P1 is associated with susceptibility to chemotherapy-induced leukemia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98, 11592–11597 (2001).
48. Anderer, G. et al. Polymorphisms within glutathione S-transferase genes and initial response to glucocorticoids in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Pharmacogenetics* 10, 715–726 (2000).
49. Davies, S. M. et al. Glutathione S-transferase polymorphisms and outcome of chemotherapy in childhood acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* 19, 1279–1287 (2001).
50. Haase, D. et al. Increased risk for therapy-associated hematologic malignancies in patients with carcinoma of the breast and combined homozygous gene deletions of glutathione transferases M1 and T1. *Leuk. Res.* 26, 249–254 (2002).
51. Kishi, S. et al. Effects of prednisone and genetic polymorphisms on etoposide disposition in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 103, 67–72 (2004).
52. Stanulla, M., Schrappe, M., Brechlin, A. M., Zimmermann, M. & Welte, K. Polymorphisms within glutathione S-transferase genes (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*) and risk of relapse in childhood B Cell precursor acute lymphoblastic leukemia: a casecontrol study. *Blood* 95, 1222–1228 (2000).
53. Takanashi, M. et al. Impact of glutathioneS-transferase gene deletion on early relapse in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 88, 1238–1244 (2003).
54. Meissner B, Stanulla M, Ludwig WD, Harbott J, Moricke A, et al. 2004. The GSTT1 deletion polymorphism is associated with initial response to glucocorticoids in childhood acute Lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 18:1920–23
55. Anderer G, Schrappe M, Brechlin AM, Lauten M, Muti P, et al. 2000. Polymorphisms within glutathione S-transferase genes and initial response to glucocorticoids in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Pharmacogenetics* 10:715–26
56. Davies SM, Robison LL, Buckley JD, Tjoa T, Woods WG, et al. 2001. Glutathione S-transferase polymorphisms and outcome of chemotherapy in childhood acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* 19:1279–87

57. Naoe T, Tagawa Y, Kiyoi H, Kodera Y, Miyawaki S, et al. 2002. Prognostic significance of the null genotype of glutathione S-transferase-T1 in patients with acute myeloid leukemia: increased early death after chemotherapy. *Leukemia* 16:203–8
58. Kishi S, Yang W, Boureau B, Morand S, Das S, et al. 2004. Effects of prednisone and genetic polymorphisms on etoposide disposition in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 103:67–72
59. Stanulla M, Schrappe M, Brechlin AM, Zimmermann M, Welte K. 2000. Polymorphisms within glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and risk of relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: a case-control study. *Blood* 95:1222–28
60. Stanulla M, Schaffeler E, Arens S, Rathmann A, Schrauder A, et al. 2005. GSTP1 and MDR1 genotypes and central nervous system relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int. J. Hematol.* 81:39–44
61. Zaza, G. et al. Acute lymphoblastic leukemia with TEL–AML1 fusion has lower expression of genes involved in purine metabolism and lower *de novo* purine synthesis. *Blood* 104, 1435–1441 (2004).
62. Chango, A. et al. A polymorphism (80G->A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. *Mol. Genet. Metab.* 70, 310–315 (2000).
63. Laverdiere, C., Chiasson, S., Costea, I., Moghrabi, A. & Krajcinovic, M. Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 100, 3832–3834 (2002).
64. Levy, A. S. et al. Reduced folate carrier and dihydrofolate reductase expression in acute lymphocytic leukemia may predict outcome: a Children’s Cancer Group Study. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 25, 688–695 (2003).
65. Rocha, J. C. et al. Pharmacogenetics of outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 105, 4752–4758 (2005).
66. Krajcinovic, M., Costea, I. & Chiasson, S. Polymorphism of the thymidylate synthase gene and outcome of acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 359, 1033–1034 (2002).
67. Ulrich, C. M. et al. Pharmacogenetics of methotrexate: toxicity among marrow transplantation patients varies with the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Blood* 98, 231–234 (2001).
68. Kager, L. et al. Folate pathway gene expression differs in subtypes of acute lymphoblastic leukemia and influences methotrexate pharmacodynamics. *J. Clin. Invest.* 115, 110–117 (2005)
69. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, et al. 2001. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCRABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 344:1031–37
70. Ansari M, Sauty G, Labuda M, Gagné V, Rousseau J, Moghrabi A, Laverdière C, Sinnott D, Krajcinovic M. Polymorphism in multidrug resistance-associated protein gene 3 is associated with outcomes in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J.* 2011 May 24

- 71.** Levy AS, Sather HN, Steinherz PG, Sowers R, La M, et al. 2003. Reduced folate carrier and dihydrofolate reductase expression in acute lymphocytic leukemia may predict outcome: a Children's Cancer Group study. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 25:688–95
- 72.** Gorlick R, Goker E, Trippett T, Waltham M, Banerjee D, Bertino JR. 1996. Intrinsic and acquired resistance to methotrexate in acute leukemia. *N. Engl. J. Med.* 335:1041–48
- 73.** Carman MD, Schornagel JH, Rivest RS, Srimatkandada S, Portlock CS, et al. 1984. Resistance to methotrexate due to gene amplification in a patient with acute leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2:16–20
- 74.** Matherly LH, Taub JW, Wong SC, Simpson PM, Ekizian R, et al. 1997. Increased frequency of expression of elevated dihydrofolate reductase in T-cell versus Bprecursor acute lymphoblastic Leukemia in children. *Blood* 90:578–89
- 75.** Fleury I, Primeau M, Doreau A, Costea I, Moghrabi A, et al. 2004. Polymorphisms in genes involved in the corticosteroid response and the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Am.J. Pharmacogenomics* 4:331–41
- 76.** Salazar J, Altés A, Del Río E, Estella J, Rives S, Tasso M, Navajas A, Molina J, Villa M, Vivanco JL, Torrent M, Baiget M, Badell I. Methotrexate consolidation treatment according to pharmacogenetics of MTHFR ameliorates event-free survival in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Pharmacogenomics J.* 2011 Jul 12.
- 77.** D'Angelo V, Ramaglia M, Iannotta A, Crisci S, Indolfi P, Francese M, Affinita MC, Pecoraro G, Napolitano A, Fusco C, Oreste M, Indolfi C, Casale F. Methotrexate toxicity and efficacy during the consolidation phase in paediatric acute lymphoblastic leukaemia and MTHFR polymorphisms as pharmacogenetic determinants. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011 Nov; 68(5):1339-46.
- 78.** Stocco G, Crews KR. Pharmacogenetics, cost of genotyping, and guidelines for individualizing therapy with mercaptopurine in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2011 Dec 15;57(7):1247. doi: 10.1002/pbc.23249. Epub 2011 Jul 27.
- 79.** Tan SH, Lee SC, Goh BC, Wong J. Pharmacogenetics in breast cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2008 Dec 15;14(24):8027-41.
- 80.** Burczynski ME. Pharmacogenomic approaches in clinical studies to identify biomarkers of safety and efficacy. *Toxicol Lett.* 2008 Oct 31.
- 81.** Irving, J. A. et al. Loss of heterozygosity in childhood acute lymphoblastic leukemia detected by genomewide microarray single nucleotide polymorphism analysis. *Cancer Res.* 65, 3053–3058 (2005).
- 82.** Holleman A, Cheok MH, den Boer ML, Yang W, Veerman AJ, Kazemier KM, Pei D, Cheng C, Pui CH, Relling MV, Janka-Schaub GE, Pieters R, Evans WE. Gene-expression patterns in Drug resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. *N Engl J Med.* 2004 Aug 5;351(6):533-42.
- 83.** David Gresham , Maitreya J. Dunham & David Botstein. Comparing whole genomes using DNA microarrays *Nature Reviews Genetics* 9, 291-302 April 2008

- 84.** Hawkins RD, Hon GC, Ren B. Next-generation genomics: an integrative approach. *Nat Rev Genet.* 2010 Jul;11(7):476-86
- 85.** Meyerson M, Gabriel S, Getz G. Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing. *Nat Rev Genet.* 2010 Oct;11(10):685-96.
- 86.** Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281–297.
- 87.** Liu CG, Spizzo R, Calin GA, Croce CM. Expression profiling of microRNA using oligo DNA arrays. *Methods* 2008;44:22–30.
- 88.** Lee W, Lockhart AC, Kim RB, Rothenberg ML. Cancer pharmacogenomics: powerful tools in cancer chemotherapy and drug development. *Oncologist.* 2005 Feb;10(2):104-11. Review.
- 89.** Huang RS, Ratain MJ. Pharmacogenetics and pharmacogenomics of anticancer agents. *CA Cancer J Clin.* 2009 Jan-Feb;59(1):42-55. Review.
- 90.** Takeuchi, S. et al. Long-term study of the clinical significance of loss of heterozygosity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 17, 149–154 (2003).
- 91.** Sherr, C. J. The INK4a–ARF network in tumour suppression. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 731–737 (2001).
- 92.** Evans, W. E. & Relling, M.V. Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics. *Nature* 429, 464–468 (2004).
- 93.** Evans, W. E. & McLeod, H. L. Pharmacogenomics —drug disposition, drug targets, and side effects. *N. Engl. J. Med.* 348, 538–549 (2003).
- 94.** French, D. et al. Global gene expression as a function of germline genetic variation. *Hum. Mol. Genet.* 14, 1621–1629 (2005).
- 95.** Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, et al. 1999. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286:531–37
- 96.** Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, Pieters R, den Boer ML, et al. 2002. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat. Genet.* 30:41–47
- 97.** Kohlmann A, Schoch C, Schnittger S, Dugas M, Hiddemann W, et al. 2003. Molecular characterization of acute leukemias by use of microarray technology. *Genes Chromosomes Cancer* 37: 396–405
- 98.** Moos PJ, Raetz EA, Carlson MA, Szabo A, Smith FE, et al. 2002. Identification of gene expression profiles that segregate patients with childhood leukemia. *Clin. Cancer Res.* 8:3118–30
- 99.** Haferlach T, Schoch C, Schnittger S, Kern W, Löffler H, Hiddemann W. 2002. Distinct genetic patterns can be identified in acute monoblastic and acute monocytic leukaemia (FAB AML M5a and M5b): a study of 124 patients. *Br. J. Haematol.* 118:426–31

- 100.** Yeoh E-J, Ross ME, Surtleff SA, Williams WK, Patel D, et al. 2002. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 1:133–43
- 101.** Miller BG, Stamatoyannopoulos JA. Integrative meta-analysis of differential gene expression in acute myeloid leukemia. *PLoS ONE*. 2010; 5(3):e9466.
- 102.** Ross, M. E. et al. Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Blood* 102, 2951–2959 (2003).
- 103.** Qian, Z., Fernald, A. A., Godley, L. A., Larson, R. A. & Le Beau, M. M. Expression profiling of CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells reveals distinct subtypes of therapy-related acute myeloid leukemia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 14925–14930 (2002).
- 104.** Virtaneva K, Wright FA, Tanner SM, Yuan B, Lemon WJ, et al.. Expression profiling reveals fundamental biological differences in acute myeloid leukemia with isolated trisomy 8 and normal cytogenetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:1124–29. 2001
- 105.** Ross ME, Mahfouz R, Onciu M, Liu HC, Zhou X, et al. 2004. Gene expression profiling of pediatric acute myelogenous leukemia. *Blood* 104:3679–87
- 106.** Bullinger L, Dohner K, Bair E, Frohling S, Schlenk RF, et al. 2004. Use of gene expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 350:1605–16
- 107.** Valk PJ, Verhaak RG, Beijen MA, Erpelinck CA, Barjesteh vanWaalwijk van DoornKhosrovani S, et al. 2004. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 350:1617–28
- 108.** Ferrando AA, Neuberg DS, Staunton J, Loh ML, Huard C, et al. 2002. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 1:75–87
- 109.** Chiaretti S, Li X, Gentleman R, Vitale A, Vignetti M, et al. 2004. Gene expression profile of adult T-cell acute lymphocytic leukemia identifies distinct subsets of patients with different response to therapy and survival. *Blood* 103:2771–78
- 110.** Cario G, Stanulla M, Fine BM, Teuffel O, Neuhoff NV, et al. 2005. Distinct gene expression profiles determine molecular treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 105:821–26
- 111.** Lamba JK. Genetic factors influencing cytarabine therapy. *Pharmacogenomics*. 2009;10:1657-1674.
- 112.** Cheek MH, Yang W, Pui CH, Downing JR, Cheng C, et al. 2003. Treatment specific changes in gene expression discriminate in vivo drug response in human leukemia cells. *Nat. Genet.* 34: 85–90
- 113.** Evans WE, Guy RK. 2004. Gene expression as a drug discovery tool. *Nat. Genet.* 36:214–15

- 114.** Stegmaier K, Ross KN, Colavito SA, O'Malley S, Stockwell BR, Golub TR. 2004. Gene expression-based highthroughput screening (GE-HTS) and application to leukemia differentiation. *Nat. Genet.* 36:257–63
- 115.** Huang Y, Sadee W. 2003. Drug sensitivity and resistance genes in cancer chemotherapy: a chemogenomics approach. *Drug Discov. Today* 8:356–63
- 116.** Lamba JK 2011 Lamba JK, Crews KR, Pounds SB, Cao X, Gandhi V, Plunkett W, Razzouk BI, Lamba V, Baker SD, Raimondi SC, Campana D, Pui CH, Downing JR, Rubnitz JE, Ribeiro RC. Identification of predictive markers of cytarabine response in AML by integrative analysis of gene-expression profiles with multiple phenotypes. *Pharmacogenomics.* 2011 Mar;12(3):327-39.
- 117.** Lugthart, S. et al. Identification of genes associated with chemotherapy crossresistance and treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 7, 375–386 (2005).
- 118.** Bogni A, Cheng C, Liu W, Yang W, Pfeiffer J, Mukatira S, et al. Genome-wide approach to identify risk factors for therapy-related myeloid leukemia. *Leukemia* 2006;20:239–246
- 119.** Brown P, Levis M, Shurtleff S, Campana D, Downing J, Small D. 2005. FLT3 inhibition selectively kills childhood acute lymphoblastic leukemia cells with high levels of FLT3 expression. *Blood* 105:812–20
- 120.** Armstrong SA, Kung AL, Mabon ME, Silverman LB, Stam RW, et al. 2003. Inhibition of FLT3 in MLL. Validation of a therapeutic target identified by gene expression based classification. *Cancer Cell* 3:173–83
- 121.** Staunton, J. E. et al. Chemosensitivity prediction by transcriptional profiling. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98, 10787–10792 (2001).
- 122.** McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, et al. Targeting survival cascades induced by activation of Ras/Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways for effective leukemia therapy. *Leukemia.* 2008; 22:708–722.
- 123.** Altman RB, Klein TE. Challenges for biomedical informatics and pharmacogenomics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002;42:113–133.
- 124.** Kai Wang , Mingyao Li & Hakon Hakonarson Analysing biological pathways in genome-wide association studies *Nature Reviews Genetics* 11, 843-854 December 2010
- 125.** di BD, Thompson MJ, Gardner TS, Chobot SE, Eastwood EL, Wojtovich AP, et al. Chemogenomic profiling on a genome-wide scale using reverse-engineered gene networks. *Nat Biotechnol* 2005;23:377–383.
- 126.** Gardner TS, di BD, Lorenz D, Collins JJ. Inferring genetic networks and identifying compound mode of action via expression profiling. *Science* 2003;301:102–105.
- 127.** Sauer U, Heinemann M, Zamboni N. Genetics. Getting closer to the whole picture. *Science* 2007;316:550–551.
- 128.** van't Veer, L. J. et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415, 530–536 (2002).

- 129.** Chen, C. D. et al. Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nature Med.* 10, 33–39 (2004).
- 130.** Pomeroy, S. L. et al. Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. *Nature* 415, 436–442 (2002).
- 131.** Roepman, P. et al. An expression profile for diagnosis of lymphnode metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas. *Nature Genet.* 37,182–186 (2005).
- 132.** Pease, A. C. et al. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91, 5022–5026 (1994).
- 133.** Hughes, T. R. et al. Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nature Biotechnol.* 19, 342–347 (2001).
- 134.** David Gresham , Maitreya J. Dunham & David Botstein. Comparing whole genomes using DNA microarrays *Nature Reviews Genetics* 9, 291-302 April 2008
- 135.** Redon, R. et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 444, 444–454 (2006).
- 136.** Weir, B. A. et al. Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature* 450, 893–898 (2007).
- 137.** Iafrate, A. J. et al. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nature Genet.* 36, 949–951 (2004).
- 138.** Sebat, J. et al. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 305, 525–528 (2004).
- 139.** Redon, R. et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 444, 444–454 (2006).
- 140.** Weir, B. A. et al. Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature* 450, 893–898 (2007).
- 141.** Fan, J. B., Chee, M. S. & Gunderson, K. L. Highly parallel genomic assays. *Nature Rev. Genet.* 7, 632–644 (2006).
- 142.** Kallioniemi, O. P. Biochip technologies in cancer research. *Ann. Med.* 33, 142–147 (2001).
- 143.** Cutler, D. J. et al. High-throughput variation detection and genotyping using microarrays. *Genome Res.* 11, 1913–1925 (2001).
- 144.** Chee, M. et al. Accessing genetic information with high-density DNA arrays. *Science* 274, 610–614 (1996).
- 145.** Maitra, A. et al. The human MitoChip: a high-throughput sequencing microarray for mitochondrial mutation detection. *Genome Res.* 14, 812–819 (2004).

- 146.** Wong, C. W. et al. Tracking the evolution of the SARS coronavirus using high-throughput, high-density resequencing arrays. *Genome Res.* 14, 398–405 (2004).
- 147.** Clark, R. M. et al. Common sequence polymorphisms shaping genetic diversity in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 317, 338–342 (2007).
- 148.** Hinds, D. A. et al. Whole-genome patterns of common DNA variation in three human populations. *Science* 307, 1072–1079 (2005).
- 149.** Winzeler, E. A. et al. Direct allelic variation scanning of the yeast genome. *Science* 281, 1194–1197 (1998).
- 150.** Borevitz, J. O. et al. Large-scale identification of single-feature polymorphisms in complex genomes. *Genome Res.* 13, 513–523 (2003).
- 151.** Turner, T. L., Hahn, M. W. & Nuzhdin, S. V. Genomic islands of speciation in *Anopheles gambiae*. *PLoS Biol.* 3, e285 (2005).
- 152.** Muotri, A. R. et al. Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition. *Nature* 435, 903–910 (2005).
- 153.** Babushok, D. V. & Kazazian, H. H. Jr. Progress in understanding the biology of the human mutagen LINE-1. *Hum. Mutat.* 28, 527–539 (2007).
- 154.** Fiegler, H. et al. Accurate and reliable high-throughput detection of copy number variation in the human genome. *Genome Res.* 16, 1566–1574 (2006).
- 155.** Olshen, A. B., Venkatraman, E. S., Lucito, R. & Wigler, M. Circular binary segmentation for the analysis of array-based DNA copy number data. *Biostatistics* 5, 557–572 (2004).
- 156.** Marioni, J. C., Thorne, N. P. & Tavare, S. BioHMM: a heterogeneous hidden Markov model for segmenting array CGH data. *Bioinformatics* 22, 1144–1146 (2006).
- 157.** Metzker ML Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010 Jan;11(1):31-46.
- 158.** Meyerson M, Gabriel S, Getz G Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing. *Nat Rev Genet.* 2010 Oct;11(10):685-96.
- 159.** Ozsolak F, Milos PM RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nat Rev Genet.* 2011 Feb;12(2):87-98. Review
- 160.** Marguerat S, Bähler J. RNA-seq: from technology to biology. *M Cell Mol Life Sci.* 2010 Feb;67(4):569-79.
- 161.** Hawkins RD, Hon GC, Ren B. Next-generation genomics: an integrative approach. *Nat Rev Genet.* 2010 Jul;11(7):476-86.
- 162.** Petrosino, J. F., Highlander, S., Luna, R. A., Gibbs, R. A. & Versalovic, J. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clin. Chem.* 55, 856–866 (2009).

- 163.** Park, P. J. ChIP–seq: advantages and challenges of a maturing technology. *Nature Rev. Genet.* 10, 669–680 (2009).
- 164.** John W. Davey, Paul A. Hohenlohe, Paul D. Etter, Jason Q. Boone, Julian M. Catchen & Mark L. Blaxter Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics* 12, 499-510 July 2011
- 165.** Garraway L.A., et al. Integration of expression and copy number data facilitates candidate gene discovery. *Nature* 436: 117-22 (2005).
- 166.** Montgomery JA, Shortnacy-Fowler AT, Clayton SD, Riordan JM, Secrist JA 3rd.(1992).”Synthesis and biologic activity of 2'-fluoro-2'-halo derivatives of 9-beta-D-arabinofuranosyladenine.” *J Med Chem.* 35(2):397-401.
- 167.** Gandhi V. et al. (1996).” Chlorodeoxyadenosine and arabinosylcytosine in patients with acute myelogenous leukemia: pharmacokinetic, pharmacodynamic, and molecular interactions.” *Blood.* 87(1):256-64.
- 168.** Majda K, Lubecka K, Kaufman-Szymczyk A, Fabianowska-Majewska K Clofarabine (2-chloro-2'-fluoro-2'-deoxyarabinosyladenine)--biochemical aspects of anticancer activity. *Acta Pol Pharm.* 2011 Jul-Aug;68(4):459-66.
- 169.** Lotfi K, Månsson E. et al.(1999).”Biochemical pharmacology and resistance to 2-chloro-2'-arabino-fluoro-2'-deoxyadenosine, a novel analogue of cladribine in human leukemic cells.” *Clin Cancer Res.* 5(9):2438-44.
- 170.** Takahashi T. et al. (2002).”Mechanisms of the apoptotic activity of Cl-F-araA in a human T-ALL cell line, CCRF-CEM.” *Cancer Chemother Pharmacol.* 50(3):193-201.
- 171.** Waud WR. et al. (2000).”Preclinical antitumor activity of 2-chloro-9-(2-deoxy-2-fluoro-beta-D- arabinofuranosyl)adenine (Cl-F-ara-A).” *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 19(1-2):447-60.
- 172.** Gandhi V, Plunkett W. (2006).” Clofarabine and nelarabine: two new purine nucleoside analogs.” *Curr Opin Oncol.* 18(6):584-90.
- 173.** Kantarjian HM, Gandhi V, Kozuch P. et al. (2003).”Phase I clinical and pharmacology study of clofarabine in patients with solid and hematologic cancers.” *J Clin Oncol* 21:1167-73.
- 174.** Jeha S, Gandhi V. et al. (2004).”Clofarabine, a novel nucleoside analog, is active in pediatric patients with advanced leukemia.” *Blood.* 103(3):784-9.
- 175.** Jeha, S.et al. (2006).” Phase II study of clofarabine in pediatric patients with refractory or relapsed acute lymphoblastic leukemia.” *Journal of Clinical Oncology.* 24, 1917–1923.
- 176.** Kantarjian, H.M., Jeha, S., Gandhi, V., Wess, M. &Faderl, S. (2007) Clofarabine: past, present, and future. *Leukemia and Lymphoma,* 48, 1922–1930.
- 177.** Burnett, A.K., Russell, N.H., Kell, J., Dennis, M., Milligan, D., Paolini, S., Yin, J., Culligan, D., Johnston, P., Murphy, J., McMullin, M.F., Hunter, A., Das-Gupta, E., Clark, R., Carr, R. & Hills, R.K. (2010) European development of clofarabine as treatment for older patients with acute

myeloid leukemia considered unsuitable for intensive chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, 28, 2389–2395.

178. van Besien K, Stock W, Rich E, Odenike O, Godley LA, O'Donnell PH, Kline J, Nguyen V, Cerro PD, Larson RA, Artz AS. Phase I-II Study of Clofarabine-Melphalan-Alemtuzumab Conditioning for Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011 Nov 9.

179. Hijiya N, Thomson B, Isakoff MS, Silverman LB, Steinherz PG, Borowitz MJ, Kadota R, Cooper T, Shen V, Dahl G, Thottassery JV, Jeha S, Maloney K, Paul JA, Barry E, Carroll WL, Gaynon PS. Phase 2 trial of clofarabine in combination with etoposide and cyclophosphamide in pediatric patients with refractory or relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2011 Dec 1;118(23):6043-9. Epub 2011 Oct 3.

180. Foster MC, Amin C, Voorhees PM, van Deventer HW, Richards KL, Ivanova A, Whitman J, Chiu WM, Barr ND, Shea T.A Phase I, Dose Escalation Study of Clofarabine in Combination with Fractionated Gemtuzumab Ozogamicin in Patients with Refractory or Relapsed Acute Myeloid Leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2011 Dec 12

181. Inaba H, Rubnitz JE, Coustan-Smith E, Li L, Furmanski BD, Mascara GP, Heym KM, Christensen R, Onciu M, Shurtleff SA, Pounds SB, Pui CH, Ribeiro RC, Campana D, Baker SD. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the multikinase inhibitor sorafenib in combination with clofarabine and cytarabine in pediatric relapsed/refractory leukemia. *J Clin Oncol*. 2011 Aug 20;29(24):3293-300.

182. Guo Y, Xu X, Qi W, Xie C, Wang G, Zhang A, Ge Y. Synergistic antitumor interactions between gemcitabine and clofarabine in human pancreatic cancer cell lines. *Mol Med Report*. 2012 Mar;5(3):734-8.

183. Amadori S, Stasi R, Martelli AM, Venditti A, Meloni G, Pane F, Martinelli G, Lunghi M, Pagano L, Cilloni D, Rossetti E, Di Raimondo F, Fozza C, Annino L, Chiarini F, Ricci F, Ammatuna E, La Sala E, Fazi P, Vignetti M. Temsirolimus, an mTOR inhibitor, in combination with lower-dose clofarabine as salvage therapy for older patients with acute myeloid leukaemia: results of a phase II GIMEMA study (AML-1107). *Br J Haematol*. 2012 Jan;156(2):205-212.

184. Locatelli F, Testi AM, Bernardo ME, Rizzari C, Bertaina A, Merli P, Pession A, Giraldi E, Parasole R, Barberi W, Zecca M. Clofarabine, cyclophosphamide and etoposide as single-course re-induction therapy for children with refractory/multiple relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2009 Nov;147(3):371-8. Epub 2009 Aug 29.

185. Kaspers GJ et al. In vitro drug sensitivity of normal peripheral blood lymphocytes and childhood leukaemic cells from bone marrow and peripheral blood. *Br J Cancer*. 1991 Sep;64(3):469-74.

186. The use of genomic information to optimize cancer chemotherapy. Innocenti F, Cox NJ, Dolan ME. *Semin Oncol*. 2011 Apr;38(2):186-95. Review.

187. Beesley AH, Palmer ML, Ford J, Weller RE, Cummings AJ, Freitas JR, Firth MJ, Perera KU, de Klerk NH, Kees UR. In vitro cytotoxicity of nelarabine, clofarabine and flavopiridol in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2007 Apr;137(2):109-16.

- 188.** Bonate PL, Craig A, Gaynon P, Gandhi V, Jeha S, Kadota R, Lam GN, Plunkett W, Razzouk B, Rytting M, Steinherz P, Weitman S.J. Population pharmacokinetics of clofarabine, a second-generation nucleoside analog, in pediatric patients with acute leukemia. *Clin Pharmacol.* 2004 Nov;44(11):1309-22.
- 189.** Lamba JK, Crews K, Pounds S, et al. Pharmacogenetics of deoxycytidine kinase: identification and characterization of novel genetic variants. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007; 323:935–945.
- 190.** Murai M, Toyota M. et al. (2005).”Aberrant DNA methylation associated with silencing BNIP3 gene expression in haematopoietic tumours.” *Br J Cancer.* 92(6):1165-72.
- 191.** Paganin M, Ferrando A. Molecular pathogenesis and targeted therapies for NOTCH1-induced T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Rev.* 2011 Mar;25(2):83-90.