

**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA DELLO SVILUPPO E
SCIENZE DELLA PROGRAMMAZIONE SANITARIA**

INDIRIZZO: Emat oncologia, Genetica, Malattie Rare e Medicina Predittiva

CICLO XXVIII

**Leucemie linfoblastiche acute T pediatriche:
Analisi di mutazione attraverso il sequenziamento di
ampliconi o dell'intero esoma**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Giuseppe Basso

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Giuseppe Basso

Supervisore : Dott.ssa Maddalena Paganin

Dottorando : Grillo Maria Francesca

"Amio marito"

INDICE

Riassunto

Abstract

CAPITOLO 1: Introduzione generale

LE LEUCEMIE

1. Leucemia linfoblastica acuta (ALL)

1.1 Classificazione delle ALL pediatriche

1.2 Fattori di rischio delle ALL

1.3 Sintomi clinici delle ALL

1.4 Diagnosi delle ALL

1.5 Fattori prognostici delle ALL

1.6 Terapia delle ALL

1.7 Stratificazione in gruppi di rischio delle T-ALL

1.8 *Pathways* principalmente coinvolti nella patogenesi delle T-ALL

CAPITOLO 2: Materiali e Metodi

2. MATERIALI

2.1 Caratteristiche cliniche dei pazienti

2. METODI

2.2 Analisi mutazionale dei geni *NOTCH1*, *FBXW7* E *PTEN* in campioni T-ALL all'esordio

2.2.1 Amplificazione del gene di interesse

✓ *NOTCH1* e *FBXW7*

✓ *PTEN*

2.2.2 Analisi elettroforetica

2.2.3 Purificazione del prodotto di PCR

2.2.4 PCR di sequenza

2.2.5 Clonaggio con vettore TOPO TA

✓ Selezione delle colonie positive

✓ PCR da colonia

2.3 Analisi di delezione per il gene *PTEN* mediante *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA)

2.4 Analisi dell'effetto delle mutazioni somatiche *NOTCH1*

2.4.1 Analisi di *gene expression profiling* con *GeneChip Human Genome Arrays*, *Affymetrix* (Santa Clara, CA, USA).

2.4.2 Analisi di *Reverse Phase Protein Array* (RPPA)

2.5 Analisi mutazionale di *IL7R* per lo studio della Malattia Minima Residua mediante *Next-Generation Sequencing Technology*

2.5.1 Amplificazione e sequenziamento del gene *IL7R* mediante PCR

2.5.2 Sequenziamento di ampliconi con tecnologia *454 Junior-Roche*

- ✓ Analisi dei dati ottenuti mediante sequenziamento con tecnologia *454 Junior-Roche*
- ✓ Validazione dei risultati ottenuti

2.5.3 Analisi della Malattia Minima Residua (MRD) mediante Real Time Quantitative PCR (TaqMan)

2.6 Identificazione di nuove mutazioni geniche coinvolte nella patogenesi delle T-ALL mediante *Whole Exome Sequencing* (*Ion Proton Technology*) di pazienti alto rischio

2.6.1 *Whole exome sequencing* (*Ion Proton technology*) di pazienti alto rischio

- ✓ Piattaforma *Ion Proton*

2.6.2 Analisi di ricorrenza di geni selezionati

- ✓ Amplificazione del gene di interesse mediante PCR
- ✓ Sequenziamento *Sanger* dei prodotti di PCR
- ✓ Elettroforesi capillare e analisi dei dati

2.6.3 Amplificazione *in vitro* del trascritto *CCND3*

- ✓ Retrotrascrizione
- ✓ Amplificazione del cDNA
- ✓ Sequenziamento del cDNA

2.6.4 Clonaggio del trascritto *CCND3*

- ✓ Purificazione del cDNA
- ✓ Clonaggio del cDNA
- ✓ Estrazione del DNA plasmidico mediante miniprep
- ✓ Reazione di restrizione
- ✓ Sequenziamento del DNA plasmidico

CAPITOLO 3: Analisi di geni noti mutati in modo ricorrente nelle T-ALL pediatriche

3. INTRODUZIONE

3.1 *NOTCH1*

3.1.1 Struttura e funzione

- 3.1.2 Il Notch signalling nello sviluppo dei linfociti T
- 3.1.3 Anomala attivazione del *NOTCH1 signaling* nelle T-ALL
- 3.1.4 Geni e *pathway* controllati da *NOTCH1* nella trasformazione delle cellule T
- 3.1.5 Le mutazioni di *NOTCH1* come *marker* prognostico nelle T-ALL
- 3.1.6 *NOTCH1* come *target* terapeutico nelle T-ALL

3.2 PTEN

- 3.2.1 Struttura e funzione
- 3.2.2 Regolazione di *PTEN* e coinvolgimento nella via PI3K/AKT
- 3.2.3 Le mutazioni di *PTEN* come *marker* prognostico nelle T-ALL

3. SCOPO DEL PROGETTO

- A. Correlare la presenza delle mutazioni somatiche a livello dei geni NOTCH1, FBXW7, PTEN con la risposta alla terapia nei pazienti pediatrici T-ALL**

3. RISULTATI

3.3 COORTE TOTALE

- 3.3.1 Analisi mutazionale di *NOTCH1* e *PTEN*
- 3.3.2 Correlazione delle mutazioni attivanti *NOTCH1* e inattivanti *PTEN* con la risposta alla terapia
- 3.3.3 Associazione delle mutazioni in *NOTCH1* e *PTEN* con la risposta alla terapia

3.4 COORTE PEDIATRICA T-ALL AIEOP ALL2000/R2006

- 3.4.1 Analisi mutazionale del *pathway NOTCH1*
- 3.4.2 Correlazione delle mutazioni attivanti *NOTCH1* con la risposta alla terapia
- 3.4.3 Correlazione delle mutazioni inattivanti *FBXW7* con la risposta alla terapia
- 3.4.4 Impatto prognostico delle mutazioni *NOTCH1* sui protocolli terapeutici ALL2000 e R2006
- 3.4.5 Analisi mutazionale di *PTEN* nella coorte pediatrica T-ALL AIEOP ALL2000/R2006
- 3.4.6 Correlazione delle mutazioni inattivanti *PTEN* con la risposta alla terapia

3.5 COORTE PEDIATRICA T-ALL AIEOP ALL2009

- 3.5.1 Analisi mutazionale del *pathway NOTCH1*
- 3.5.2 Correlazione delle mutazioni attivanti *NOTCH1* con la risposta alla terapia
- 3.5.3 Analisi mutazionale di *PTEN*
- 3.5.4 Correlazione delle mutazioni inattivanti *PTEN* con la risposta alla terapia

3.6 ANALISI DI DELEZIONE PER IL GENE PTEN MEDIANTE MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA) NELLE COORTI PEDIATRICHE T-ALL AIEOP ALL2000/R2006 E ALL2009

3. DISCUSSIONE

- ✓ *NOTCH1*
- ✓ *FBXW7*
- ✓ *PTEN*

3. CONCLUSIONE

Prospettive future

- B. Comprendere l'effetto delle mutazioni somatiche dei geni *NOTCH1*, *FBXW7* e *PTEN* mediante *Gene Expression Profile* e *Reverse Phase Protein Array* al fine di identificare attivazione di geni specifici o alterazione di pathway e nuovi target terapeutici**

3. RISULTATI

3.7 Analisi dell'effetto delle mutazioni somatiche in *NOTCH1* e *FBXW7* nella coorte pediatrica T-ALL AIEOP ALL2000/R2006 mediante *Reverse Phase Protein Array* (RPPA)

3.8 Analisi dell'effetto delle mutazioni somatiche in *NOTCH1* nella coorte pediatrica T-ALL AIEOP ALL2000/R2006 mediante *Gene Expression Profile* (GEP)

3. DISCUSSIONE

- ✓ RPPA
- ✓ GEP

3. CONCLUSIONI e PROSPETTIVE FUTURE

CAPITOLO 4: Identificazione di nuove mutazioni geniche coinvolte nella patogenesi delle T-ALL (Whole exome sequencing di pazienti alto rischio)

4. INTRODUZIONE

4.1 NEXT GENERATION SEQUENCING

4.1.1 I differenti metodi di sequenziamento NGS: accenni

4.1.2 *Ion Torrent Technology*

4.1.3 NGS nei tumori ematologici

4.2 "MEDICINA PERSONALIZZATA"

4.3 CCND3: GENE CANDIDATO PER L'ANALISI DI RICORRENZA NELLO STUDIO

4.3.1 Il complesso Ciclina D3 - CDK4/6 regola il ciclo cellulare

4.3.2 Ciclina D3: ruolo nella progressione delle T-ALL

4.3.3 Il *NOTCH signaling* regola l'espressione della ciclina D3

4. SCOPO DEL PROGETTO

4. RISULTATI

4.1 WHOLE EXOME SEQUENCING DI 8 PAZIENTI T-ALL HIGH RISK

4.2 ANALISI DI RICORRENZA IN UNA COORTE DI PAZIENTI T-ALL HIGH RISK

4.3 ANALISI DI FREQUENZA NEI PAZIENTI T-ALL

4.4 CONFERMA DELLA NATURA SOMATICA DELLA MUTAZIONE E ANALISI D'ESPRESSIONE

4.5 ANALISI DELL'EFFETTO DELLA MUTAZIONE

5.5.1 Studio in silico delle mutazione identificate in *CCND3* in pazienti pediatrici T-ALL

4.6 ANALISI DELLE MUTAZIONI RICORRENTI NELLE T-ALL NEI PAZIENTI MUTATI PER *CCND3*

4. DISCUSSIONE

4. CONCLUSIONE

5. CAPITOLO 5

Letter to the Editor in preparation : Interleukin-7 receptor mutations in AIEOP T-cell acute lymphoblastic leukemia patients

CONCLUSIONI GENERALI

BIBLIOGRAFIA

PUBBLICAZIONI

RINGRAZIAMENTI

ABSTRACT

Background. Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most frequent neoplastic disease in children and it is generally characterized by favorable outcome, with the long-term cure rate approaching 90%. The stratification of patients into risk groups allows a more specific risk-adapted treatment, saving patients with a low risk of relapse from excessive toxicity, while improving outcome in patients with a high risk of relapse by intensive treatment. Risk stratification has been based on clinical features and response to treatment. *NOTCH1* activation and *PTEN* inactivation are common events implied in leukemogenesis, and appear attractive candidates as drivers for risk stratification. *NOTCH1* is involved in transcriptional upregulation of *IL7R*, a gene known to be mutated in 10% of T-ALL cases. In addition, the NOTCH1 signaling is also involved in the regulation of cyclin D3. This protein is involved in cell proliferation and it is necessary for T-ALL development. Given the fact, in recent studies new genetic alterations are associated with prognosis and could be used for patient's stratification, as well as for targeted therapy. All these highlight the import of the identification of new mutations that could play a pivotal role in the leukemogenesis.

Aim of the study. The purpose of this study was to evaluate the prognostic significance *NOTCH1* and *PTEN* alterations in childhood T-ALL. To this purpose, a large pediatric T-ALL patient cohort treated according to the AIEOP ALL2000/R2006 and AIEOP ALL2009 protocols was comprehensively characterized with respect to *NOTCH1* and *PTEN*; the *NOTCH1/PTEN* mutational status were then correlated with the cumulative incidence of relapse and event free survival. Using the somatic mutations as specific genetic markers for tumor cell we applied next-generation ultra-deep sequencing technologies to detect the presence of residual cells in the bone marrow samples during therapy is the second aim of this study. Therefore, the mutational status of *IL7R* at diagnosis and +33 day therapy was characterized and it was then correlated with MRD RQ-PCR. Finally, it was analyzed the *CCND3* mutation recurrence to identify new genes involved in leukemogenesis.

Materials and methods. Bone marrow samples from 272 children with T-ALL obtained at the time of first diagnosis were analyzed with Sanger sequencing for *PTEN* mutations. Activating *NOTCH1* mutations were detected by Sanger sequencing of the exons coding for the heterodimerisation (HD), PEST and TAD domains. Activating *IL7R* mutations were analyzed by Sanger sequencing and deep-amplicon sequencing of 227 T-ALL patients. The exome from 8 children with T-ALL diagnosis high-risk and related control was analyzed by Ion Torrent Technology. Finally, *CCND3* mutations were analyzed in 80 T-ALL patients at diagnosis by Sanger sequencing.

Results. The frequency of *PTEN* and *NOTCH1* alterations was 12% and 65% respectively. The survival analysis on the total cohort on T-ALL patients shows a higher incidence of relapse and a lower survival in patients with inactivating *PTEN* mutations. Kaplan-Meyer estimate of event free

survival (EFS) show a positive prognostic significance of *NOTCH1* mutations in AIEOP T-ALL total cohort, but this result is not confirmed in the last therapeutic protocol analyzed AIEOP ALL2009. Because the only detectable difference between this cohort and those described in the literature is the treatment that has been applied, we hypothesize that the effect of *NOTCH1* and *PTEN* mutational status on the risk of relapse depends on the treatment applied. By deep-sequencing the *IL7R* clonal mutations have been identify with great sensitivity, even if the frequency of the mutation was less than 10%. Finally, the Ion Proton System technology identified a missense mutation in *CCND3* gene, this mutation have shown a recurrence 6% within a larger cohort of T-ALL by Sanger sequencing.

Conclusions. In the patient cohort that has been analyzed, the *PTEN* mutation were correlated with outcome and were generally important for patients stratification in high risk groups; in contrast, the *NOTCH1* mutation correlation on outcome depends on the type of therapeutic treatment adopted and is not generally useful for risk stratification. Future models of risk stratification will need to include more genetic markers. Preliminary results of *IL7R* show that ultra deep-sequencing have allow detecting mutations at subclonal level and it was possible follow the leukemic clone with the *IL7R* mutation during therapy. Finally, the identification of somatic mutations and the expression of the *CCND3* gene in onset blasts suggests that these genetic alterations could help the disease progression. The future functional studies will need to evaluate the possible gain-of-function of the mutated protein in leukemic blasts and to provide a new therapeutic target.

RIASSUNTO

Presupposti. La leucemia linfoblastica acuta (ALL) è la più frequente patologia neoplastica dell'età pediatrica ed è generalmente caratterizzata da una buona prognosi, con un tasso di guarigione a lungo termine di circa il 90%. La stratificazione dei pazienti in gruppi di rischio, basata su caratteristiche cliniche e risposta al trattamento, permette di sottoporre a terapia intensiva i pazienti ad alto rischio di recidiva migliorandone l'*outcome*, prevenendo nel contempo l'esposizione dei pazienti a basso rischio a eccessiva tossicità. L'attivazione di *NOTCH1* e l'inattivazione di *PTEN* sono eventi frequentemente implicati nella leucemogenesi della T-ALL, così da configurarsi come possibili elementi chiave per una stratificazione del rischio su base non solo clinica, ma anche genetica. *NOTCH1* è coinvolto nella regolazione trascrizionale di *IL7R*, gene noto mutato in circa il 10% dei casi di T-ALL. In aggiunta, il *NOTCH1 signaling* è coinvolto anche nella regolazione dell'espressione della ciclina D3. Questa proteina implicata nella proliferazione cellulare, è necessaria per lo sviluppo della T-ALL. Infine, studi recenti identificano nuove alterazioni genetiche associate alla prognosi e che possono quindi essere utilizzate per la stratificazione dei pazienti, nonché per una terapia mirata. In questo contesto, risulta interessante l'identificazione di nuove mutazioni che potrebbero avere un ruolo nella leucemogenesi.

Scopo dello studio. Lo scopo principale di questo studio è la definizione del potere prognostico delle alterazioni dei geni *NOTCH1* e *PTEN* nella T-ALL pediatrica. A questo fine, è stato analizzato, in una grande coorte di pazienti trattati secondo il protocollo AIEOP ALL2000/R2006 e AIEOP ALL2009, il profilo mutazionale di *NOTCH1* e *PTEN*, correlandolo poi con l'incidenza di ricaduta e la sopravvivenza libera da eventi. Il secondo obiettivo oggetto di studio è l'utilizzo delle mutazioni somatiche come marcatore genetico specifico della cellula tumorale utilizzando le tecniche di sequenziamento di nuova generazione per identificare la presenza di cellule residue nel midollo osseo durante la terapia. A tale scopo, è stato analizzato lo stato mutazionale di *IL7R* alla diagnosi e al giorno +33 di terapia, in un'ampia coorte di pazienti che seguono il protocollo AIEOP ALL2000/R2006, confrontandola con l'analisi in RQ-PCR della MRD agli stessi *time point*. Infine, per identificare nuovi geni implicati nella patogenesi della leucemia, nel lavoro è stata analizzata la ricorrenza di mutazione di *CCND3*.

Materiali e metodi. Campioni di midollo osseo, ottenuti al momento della diagnosi da 272 pazienti affetti da T-ALL, sono stati analizzati con *Sanger sequencing* allo scopo di identificare le mutazioni di *PTEN*. Mutazioni attivanti di *NOTCH1* sono state invece ricercate con *Sanger sequencing* degli esoni codificanti per i domini HD, PEST e TAD. Mutazioni attivanti *IL7R* sono state analizzate mediante *Sanger sequencing* e *deep-amplicon sequencing* in 227 pazienti T-ALL. L'esoma della diagnosi T-ALL e del relativo controllo di 8 pazienti alto rischio è stato analizzato mediante *Ion*

Torrent Technology. Infine, le mutazioni di *CCND3* sono state ricercate mediante *Sanger sequencing* alla diagnosi di 80 pazienti T-ALL.

Risultati. La prevalenza delle mutazioni di *PTEN* e *NOTCH1* è risultata rispettivamente pari a 12% e 65%. L'analisi della sopravvivenza mostra una più alta incidenza di ricaduta ed una sopravvivenza inferiore nei pazienti con mutazioni inattivanti *PTEN*. Al contrario, l'analisi della sopravvivenza basata sulla presenza della mutazione in *NOTCH1* mostra un significato prognostico positivo in *event free survival* (EFS) nella corte AIEOP T-ALL totale, ma lo stesso risultato non si osserva nei pazienti trattati con l'ultimo protocollo terapeutico analizzato AIEOP ALL2009. Poiché l'unica differenza evidenziabile tra questa coorte e quelle descritte in letteratura consta nella tipologia di trattamento, si ipotizza che l'impatto prognostico di *PTEN* e *NOTCH1* dipenda dal protocollo terapeutico utilizzato. Mediante *deep-sequencing* sono state identificate le mutazioni clonali di *IL7R* con grande sensibilità anche quando la frequenza di mutazione è inferiore al 10%. Infine, mediante *Ion Proton System technology* è stata identificata una mutazione missenso nel gene *CCND3* con una ricorrenza, verificata in *Sanger sequencing*, del 6% all'interno di una più ampia coorte di T-ALL.

Conclusioni. Nella coorte di pazienti analizzata, la presenza della mutazione in *PTEN* incide sull'*outcome* e lo *screening* per le alterazioni di questo soppressore tumorale sembra pertanto utile per la stratificazione dei pazienti in gruppi di rischio alto. Al contrario, la correlazione della mutazione in *NOTCH1* con l'*outcome* sembra dipendere dal tipo di trattamento terapeutico utilizzato e lo *screening* per le alterazioni di questo *pathway* non sembra pertanto utile per la stratificazione dei pazienti in gruppi di rischio. Futuri modelli di stratificazione dovranno comunque includere un maggior numero di *marker* genetici.

Dall'interpretazione preliminare dei dati di *IL7R* ottenuti mediante *deep amplicon sequencing* è possibile affermare che la metodica consente di identificare la singola cellula tumorale anche a livello subclonale e di seguirne il decorso durante la terapia. Infine, l'identificazione di mutazioni somatiche a carico del gene *CCND3* e la verificata espressione a livello dei blasti dell'esordio dei pazienti T-ALL fa supporre che queste alterazioni genetiche siano funzionali e contribuenti alla patologia. Questi risultati e i successivi studi funzionali che saranno effettuati per valutare l'eventuale *gain-of-function* della proteina mutata nei blasti leucemici, potranno fornire un nuovo *target* terapeutico di supporto agli attuali trattamenti utilizzati per la cura di questa malattia.

CAPITOLO 1

1. INTRODUZIONE GENERALE

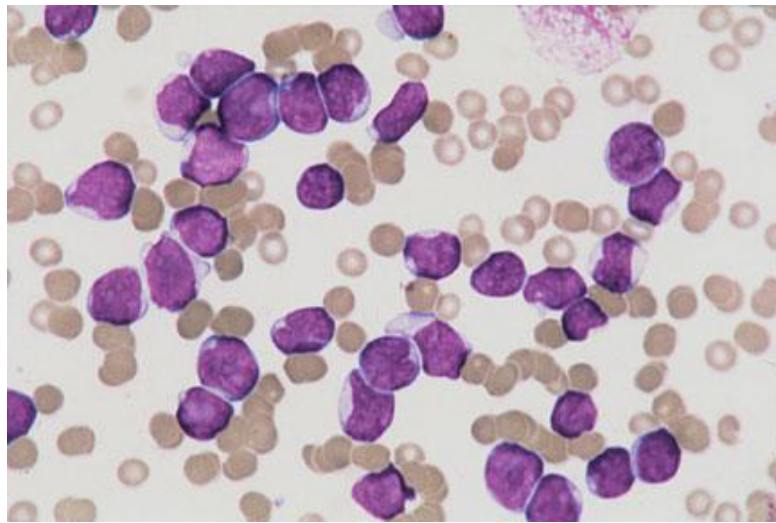


Figura 1: Esempio di colorazione su vetrino di campione di aspirato midollare da un bambino con cellule T leucemia linfoblastica acuta adeguatamente strisciato su un vetrino e colorato per mezzo di coloranti appositi (metodica May Grumwald-Giemsa).

LE LEUCEMIE

Le leucemie sono un gruppo eterogeneo di patologie ematologiche caratterizzate dalla trasformazione neoplastica e clonale di cellule ematopoietiche linfoidi (malattie linfoproliferative) o mieloidi (malattie mieloproliferative).

Le cellule leucemiche sono cellule emopoietiche bloccate ad un certo stadio maturativo che iniziano a proliferare in modo abnorme, ma anche cellule che si differenziano dalle normali per la presenza di un'anomalia genetica che si riflette in una aberrazione fenotipica (1).

Nella maggior parte dei casi il midollo osseo è la sede di origine della leucemia, dove le cellule leucemiche proliferanti interferiscono con le normali funzioni immunitarie ed emopoietiche delle cellule sane. La malattia tende poi a diffondersi attraverso il sangue periferico ad altri tessuti o organi, tra cui linfonodi, fegato, milza, sistema nervoso centrale (SNC), gonadi e rene.

Dal punto di vista clinico, le leucemie si suddividono in:

- **leucemie acute:** quando si osserva una proliferazione di precursori ematopoietici arrestati a stadi di differenziazione immaturi, incapaci di differenziarsi e maturare completamente. Possono essere distinte in mieloblastica (AML) e la linfoblastica (ALL). Hanno prognosi più severa e decorso più rapido.

- **leucemie croniche:** quando le cellule interessate possono maturare e differenziare. Ci sono due sottogruppi: mielocitica (LMC) e linfocitica (LLC). Decorrono più lentamente (2).

1. LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA (ALL)

La leucemia linfoblástica acuta (ALL) è la forma leucemica maggiormente diffusa in età infantile. Essa rappresenta la quasi totalità (80%) delle leucemie osservabili prima dei 4 anni e solo raramente compare in individui che hanno superato i 30 anni di età (3). Le rare forme di ALL in età adulta rappresentano solitamente un'evoluzione acuta della leucemia cronica. Inoltre, l'esordio di tale patologia è solitamente acuto e non vi è una fase indolente e preleucemica. La proliferazione neoplastica alla base di tale leucemia riguarda un precursore molto immaturo della linea linfoide, definito BLASTO.

1.1 Classificazione delle ALL pediatriche

E' molto importante poter classificare le cellule leucemiche. Il metodo più diffuso in passato era quello di tipo FAB (L1, L2 o L3) dalle iniziali delle parole *French-American-British* indicative del gruppo di ematologi francesi, americani e britannici che hanno progettato tale sistema di classificazione nel 1976. Tale metodo classifica le leucemie sulla base della morfologia delle cellule leucemiche. Questo sistema non è oggi molto importante clinicamente, perché non determina di fatto alcuna variazione del trattamento (4).

Un'altra classificazione molto importante è quella definita immunologica, basata cioè sulla presenza di specifici marcatori immunologici sulla superficie delle cellule leucemiche (in base a questa classificazione le cellule possono appartenere alla linea B o T); quest'ultimo sistema ha oggi invece una notevole importanza clinica e determina in alcuni casi un diverso modo di trattare la ALL.

In particolare, la cellula leucemica esprime antigeni superficiali ed intracitoplasmatici, la cui caratterizzazione consente la determinazione della linea di appartenenza, della differenziazione, della maturazione e delle aberrazioni che la identificano (5). Lo studio dell'immunofenotipo si esegue con tecniche citofluorimetriche utilizzando anticorpi monoclonali (AcMo) coniugati a fluorocromi che consentono di individuare e differenziare le cellule linfoide della linea B (ad es. CD10, CD19, CD79a), da quelle della linea T (ad es. CD1a, CD3, CD7, cCD3) e da quelle della linea mieloide (ad es. MPO, CD13, CD33); esistono, inoltre, AcMo non linea-specifici (ad es. il CD34). In base alla positività o meno con i diversi AcMo, è possibile distinguere le forme a fenotipo B, che rappresentano la maggioranza delle ALL (circa l'86% dei casi) e le forme a fenotipo T (circa il 14% dei casi) (6). In accordo con la differenziazione degli antigeni di superficie ed intracitoplasmatici leucemia ALL possono essere classificate in:

- ***B-cell-precursor-ALL***: si caratterizza per l'espressione dell'antigene citoplasmatico CD79a citoplasmatica, di superficie CD19, HLA-DR, più altri antigeni associati alle cellule B. Comprende le *common precursor B cell ALL* (positive per CD10 e senza Ig di superficie o citoplasmatica), le *Pro-B ALL* (negativo per CD10 e Ig di superficie o citoplasmatica) e le *pre-B ALL* (con Ig di superficie o citoplasmatica) (7, 8);
- ***T-ALL***: caratterizzato mediante l'espressione degli antigeni associati alle cellule T (CD3 citoplasmatica, con CD7 più CD2 o CD5). Comprende le *early T-cell precursor ALL (ETP-ALL*, CD1a⁻, CD8⁻, associate marcatori di cellule staminali o mieloidi), le *pro-T* (definite da CD2⁻, CD7⁺, CD4⁻, CD8), le *pre-T* (caratterizzate da CD2⁺, CD7⁺, CD4⁻, CD8⁻), le T-ALL corticali (positive per gli antigeni CD7, CD2, CD5, CD4, CD8, CD1a) ed infine le T-ALL mature (positive per gli antigeni CD3, CD2, CD7, CD4 o CD8, e negative per TdT, CD34, CD1a) (7, 8);
- **ALL con co-espressione di antigeni mieloidi**: gli antigeni mieloidi sono presenti nel 5-30% dei casi e sembrano soprattutto associati con i sottogruppi positivi per le traslocazioni MLL e dei geni ETV6-RUNX1 (7).

1.2 Fattori di rischio delle ALL

Le cause che portano allo sviluppo di ALL non sono completamente note ma è molto probabile che la leucemia sia il risultato dell'interazione tra fattori genetici ed ambientali in un processo complesso che richiede il verificarsi di più eventi (18, 9).

Tra i fattori di rischio ambientali l'esposizione a radiazioni ionizzanti è l'unica che è stata stabilita con certezza (anche per cure mediche come la radioterapia) (10). La percentuale di rischio dipende dalla dose di irradiazione, dalla durata di esposizione e dall'età del soggetto al momento dell'esposizione. Anche l'esposizione materna nel corso della gravidanza aumenta il rischio che il feto sviluppi successivamente una leucemia.

Le classi di prodotti chimici comunemente associate allo sviluppo di leucemia sono gli idrocarburi ed i pesticidi. In particolare, il benzene, utilizzato nelle raffinerie e nelle industrie chimiche e contenuto per esempio in alcuni pesticidi e nel fumo di sigaretta, è un noto fattore di rischio per la leucemia, (10).

Tra i fattori non modificabili, l'età pediatrica e il sesso maschile aumentano il rischio. Non ci sono invece prove che la malattia sia trasmissibile per via ereditaria, anche se il rischio aumenta in caso di un fratello gemello identico affetto da ALL (9) e in seguito ad alcune sindromi ereditarie legate ad anomalie genetiche (sindromi di *Down*, di *Klinefelter* e di *Bloom*; anemia di Fanconi, atassia-teleangiectasia, neurofibromatosi). In particolare, i bambini affetti da Sindrome di *Down* hanno un

rischio di sviluppare una leucemia aumentato di 10-20 volte. Tra i geni più frequentemente coinvolti (in circa il 60% dei casi) vi sono *CRLF2* e *GATA1* (8).

Inoltre, è stata recentemente evidenziata un'associazione tra alcune varianti polimorfiche a carico dei geni *IKZF1*, *ARID5B*, *CEBPE*, *CDKN2A* e *PAX5* e lo sviluppo di leucemia, tanto nel bambino che nell'adulto (11, 12).

L'incidenza di leucemia è aumentata in bambini con difetti cromosomici o danni di riparazione del DNA, con immunodeficienze congenite o cronicamente immunodepressi (13);

Sebbene alcuni virus, ed in particolare i retrovirus, siano in grado di provocare tumori negli animali, non c'è evidenza che ciò avvenga nell'uomo; comunque alla forma di ALL a cellule B mature (definita anche "*Burkitt type*") si può associare la presenza del virus di *Epstein-Barr* (14).

1.3 Sintomi clinici delle ALL

I sintomi della LLA si manifestano precocemente e di solito la diagnosi viene effettuata poco dopo. La gran parte dei sintomi delle ALL sono associati alla perdita di funzionalità del midollo con conseguente mancata produzione di cellule ematiche, causata dalla sostituzione della normale ematopoiesi con la proliferazione e l'accumulo delle cellule leucemiche. Spesso la ALL si manifesta inizialmente con sintomi aspecifici come stanchezza, perdita di appetito, sudorazione notturna e febbre. Più avanti si notano in genere spossatezza e pallore legati all'anemia, facile sanguinamento e comparsa di emorragie cutanee legati alla carenza di piastrine.

Meno frequentemente è la neutropenia a causare i sintomi clinici dell'esordio con infezioni batteriche localizzate (otiti medie, faringiti, polmoniti) oppure sistemiche (quadri di sepsi). In un quarto circa dei pazienti si sviluppa dolore. Il dolore osseo è la forma di dolore più comune e può presentarsi come dolore agli arti, alla schiena oppure ad una articolazione. La leucemia può diffondersi anche in altri organi, causando l'ingrossamento di milza, fegato e linfonodi, nonché raggiungere il sistema nervoso centrale, provocando verificarsi mal di testa, convulsioni e altri segni neurologici.

1.4 Diagnosi delle ALL

La diagnosi delle ALL si basa su di una procedura "*multistep*" che comprende l'analisi della morfologia, della citochimica, dell'immunofenotipo, della citogenetica classica e della genetica molecolare, e, quando necessario, del riarrangiamento dei geni delle Ig e del TCR (15, 16, 17). Una diagnosi corretta di leucemia è essenziale sia per corretto inquadramento clinico-biologico della leucemia, sia per la stratificazione di ogni paziente in diverse classi di rischio e per le decisioni terapeutiche future (17).

Il primo esame normalmente effettuato nel sospetto di ALL è l'emocromo, i cui parametri sono gravemente alterati per la presenza di blasti in circolo.

L'utilizzo della colorazione standard di *May-Grünwald-Giemsa* permette di evidenziare la presenza di blasti su striscio midollare e di effettuare un'iniziale differenziazione classificativa in forme linfoidi e non linfoidi (Figura 1). L'agoaspirato midollare consente la diagnosi definitiva e la tipizzazione della leucemia. Le pietre miliari della diagnostica di ALL su aspirato midollare sono: morfologia, citochimica, tipizzazione immunofenotipica, citogenetica, DNA index, genetica molecolare, biologia molecolare, *microarray gene profiling*.

1.5 Fattori prognostici delle ALL

La prognosi della malattia è influenzata da caratteristiche cliniche e/o biologiche, presenti al momento della diagnosi, in grado di predire, in termini di probabilità, il destino del paziente. Grazie all'intervento dei recenti protocolli terapeutici, i pazienti pediatrici ALL ottengono la remissione completa (RC) da malattia nel 90-95% dei casi con una *event-free survivors* (EFS) a lungo termine nell'80% di questi (20). La risposta al trattamento è, tra tutti, il più importante fattore prognostico, in grado di abolire il significato clinico di molti, se non di tutti, gli altri fattori (18).

Alcuni dei fattori che possono essere utili ai fini della prognosi vi sono:

- l'età: neonati con meno di 1 anno di età e bambini con più di 10 anni hanno una prognosi peggiore;
- il sesso: i maschi hanno prognosi infausta rispetto alle femmine;
- l'immunofenotipo: le forme pro-B-ALL e T-ALL sono state associate con una prognosi sfavorevole (19);
- l'infiltrazione al Sistema Nervoso Centrale (SNC) è un fattore prognostico negativo (19);
- pazienti con conta leucocitaria >50.000/ul alla diagnosi sono più frequentemente associate a ricaduta ed infiltrazione al SNC (19);
- la risposta al trattamento iniziale: una peggior risposta al prednisone misurata al giorno 8 di trattamento (19);
- lo stato di remissione dopo la fase di induzione di terapia: conta dei blasti nel midollo superiore al 5% al giorno +33 di terapia (19).

L'identificazione di fattori prognostici permette di stratificare i pazienti in classi di rischio (basso, intermedio, alto), per sottoporli a trattamenti differenziati al fine di esporli al minimo della terapia efficace riducendo il rischio di tossicità precoce e tardiva causata dalla chemioterapia.

1.6 Terapia delle ALL

La scelta del trattamento della ALL dipende dalle caratteristiche del paziente e dalla classe di rischio, ma in linea generale la chemioterapia rappresenta uno dei principali trattamenti per la ALL: il tipo di farmaco e le dosi sono definite caso per caso dopo aver attentamente valutato molti fattori. In ogni caso, la terapia consente l'eradicazione delle cellule leucemiche dal midollo osseo, preservando i progenitori normali e permette di limitare il rischio di recidiva. Il percorso chemioterapico può essere suddiviso in 4 fasi anni (21):

1. **Induzione:** l'obiettivo dell'induzione è l'ottenimento della remissione completa (98% dei bambini circa) ed il ripristino della normale emopoiesi. Questa fase del trattamento comprende quasi sempre la somministrazione di un GC (prednisone o desametasone), la vincristina, un altro farmaco (normalmente L-asparaginasi, un'antraciclina o entrambe) ed infine la 6-Mercaptopurina (6MP) e la ciclofosfamida. Probabilmente per la sua buona capacità di superare la barriera ematoencefalica e per la sua elevata emivita, l'utilizzo del desametasone nell'induzione sembra garantire un miglior controllo dell'invasione del SNC rispetto a quanto non facciano gli altri GC (22).
2. **Consolidamento:** ripristinata la normale emopoiesi comincia la fase di consolidamento il cui scopo è quello di eliminare i blasti leucemici residui dopo l'induzione, per prevenirne la ricaduta. I regimi terapeutici più comuni comprendono metotrexato (MTX) ad alte dosi, al fine di superare le barriere ematoencefalica e dematotesticolare, associato con 6-MP.
3. **Re-induzione:** è una fase simile all'induzione, con utilizzo di farmaci diversi da quelli già adottati (antracicline, steroidi ed antimetaboliti). Deve essere effettuata in tutti i pazienti, indipendentemente dalla fascia di rischio, e nel caso di pazienti a maggior rischio si è dimostrato utile l'utilizzo di una doppia o tripla reinduzione.
4. **Mantenimento:** va dal termine della re-induzione fino al termine della terapia con lo scopo di ottenere la scomparsa di tutte le cellule leucemiche, in particolare dei blasti residui a bassa proliferazione che potrebbero portare ad eventuale recidiva se non eradicati completamente. Negli attuali protocolli la durata dell'intero trattamento è di 24 mesi. Tale fase è generalmente costituita dalla combinazione di MTX somministrato settimanalmente e una dose giornaliera di 6MP.

Nei pazienti che vanno incontro a recidiva è possibile effettuare anche un **trapianto di cellule staminali emopoietiche**. Il trapianto permette di sostituire le cellule malate del midollo (che vengono distrutte con radiazioni o chemioterapia a dosi molto elevate) con cellule sane che daranno poi origine a cellule del sangue del tutto normali. In genere, nella ALL si predilige il trapianto

allogeneico (da donatore diverso dal paziente) di cellule staminali che devono provenire da un familiare compatibile o da un donatore non consanguineo ad alta affinità (23, 45).

1.7 Stratificazione in gruppi di rischio ALL (47)

La classificazione dei pazienti in gruppi di rischio è utile per migliorare la prognosi dei pazienti con alto rischio di ricaduta intensificandone il trattamento e riducendo il rischio di tossicità precoce e tardiva causata dalla chemioterapia nei pazienti a rischio standard..

Pertanto, è possibile distinguere i pazienti in 3 gruppi:

1) **Gruppo ad alto rischio (HR)**. In questo gruppo vengono stratificati i pazienti che presentano almeno uno dei seguenti criteri:

- conta leucemica $\geq 1.000/\text{ul}$ dopo 7 giorni di trattamento con prednisone;
- conta di blasti nel midollo osseo $\geq 5\%$ al giorno 33 di terapia;
- Ipodiploidia (definita in base al DNA index ≤ 0.8 e / o < 45 cromosomi);
- positività alle traslocazioni t(9; 22) o BCR/ABL o ai riarrangiamenti MLL;
- positività con sensibilità di $\geq 10^{-3}$ al rilevamento della malattia minima residua (MRD) molecolare al giorno 78 di terapia;
- quantità di MRD $\geq 10\%$ (in citofluorimetria) nel midollo osseo al giorno 15 di terapia;

2) **Gruppo medio rischio (MR)**: pazienti non stratificati né HR né SR.

3) **Gruppo di rischio standard (SR)**. pazienti che hanno tutti i seguenti criteri:

- conta leucemica $\leq 1.000/\text{ul}$ dopo 7 giorni di trattamento con prednisone;
- remissione completa al giorno di 33 di terapia;
- negatività per la traslocazione t (9; 22) o BCR/ABL, assenza del riarrangiamento MLL e di ipodiploidia;
- MRD molecolare negativa ai giorni di terapia 33 e 78 con una sensibilità di almeno 10^{-4} .

1.8 Pathway principalmente coinvolti nella patogenesi delle T-ALL

The landscape of genetic alterations in T-ALL.



Figura 2. Principali alterazioni genetiche identificate nelle T-ALL (49).

Come accennato in precedenza, la leucemia linfoblastica acuta cellule T (T-ALL) è un aggressivo tumore ematologico derivante dalla trasformazione delle cellule T; rappresenta il 10% -15% delle leucemie nei pazienti pediatrici e il 25% di tutti i casi di adulti (24) ed è tipicamente più frequente nei maschi rispetto alle femmine. Uno dei principali obiettivi della ricerca è lo sviluppo di farmaci antileucemici sempre più efficaci e meno tossici che richiedono un maggior grado di specificità e una migliore comprensione degli eventi molecolari che portano alla malattia.

La trasformazione delle cellule T è un processo in *multistep* in cui diverse alterazioni genetiche cooperano per alterare i normali meccanismi che controllano la crescita cellulare, la proliferazione, la sopravvivenza e la differenziazione durante lo sviluppo timociti. In questo contesto, l'attivazione costitutiva della via di *signaling NOTCH1* è la via oncogenica principalmente coinvolta (25).

La via di *signaling NOTCH1* gioca un ruolo fondamentale nel *cell lineage commitment* durante lo sviluppo cellulare (26). La prima evidenza di un aberrante *signaling NOTCH1* correlato alla patogenesi delle T-ALL deriva dalla clonazione della traslocazione cromosomica t(7; 9)(q34; q34.3) che conduce all'espressione di una forma di NOTCH1 tronca e costitutivamente attiva (27). Tuttavia, il ruolo centrale del NOTCH1 nella trasformazione delle cellule T è stato stabilito solo dopo l'identificazione di mutazioni attivanti nel gene *NOTCH1* presente in oltre il 50% dei casi T-ALL (25). Le mutazioni NOTCH1 tipicamente coinvolgono domini specifici responsabili del controllo dell'inizio e della terminazione della via di segnale (25). Inoltre mutazioni a livello del gene *FBXW7*, una ubiquitina coinvolta nella degradazione mediata dal proteasoma, sono presenti in circa il 15% dei casi T-ALL, e contribuisce alla attivazione del *signaling NOTCH* alterando la degradazione del proteasoma di NOTCH1 attivato nel nucleo (28, 29).

Nonostante ciò, delezioni del locus *CDKN2A* nel cromosoma 9p21, che comprende i *suppressor genes p16/INK4A* e *P14/ARF*, sono presenti in oltre il 70% dei pazienti T-ALL (24, 26).

Quindi, l'attivazione costitutiva della via di *signaling NOTCH1* coopera con perdita dei geni *p16/INK4A* e *P14/ARF* nella trasformazione delle cellule T e costituisce il nucleo del processo oncogenico nella patogenesi delle T-ALL (30)(27).

Inoltre, le T-ALL mostrano traslocazioni ed anomala espressione di fattori di trascrizione oncogenici che sono fondamentali per lo sviluppo dei progenitori delle cellule T. Questi fattori di trascrizione oncogeni includono membri della famiglia *basic helix-loop-helix* (bHLH), come *TALI*, *TAL2*, *LYL1*, e *BHLHB1*; geni con dominio LIM come *LMO1* e *LMO2*; le traslocazioni TLX1/HOX11, TLX3/HOX11L2, e i geni HOXA, il proto-oncogene *ABLI*, e i fattore di trascrizione *MYC* e *c-MYB* (30).

In particolare, l'espressione ectopica di *TALI* è stata identificata nel 60% dei casi T-ALL con conseguente incremento della proliferazione, diminuita apoptosi e arresto della differenziazione (31, 32). Mentre, *MYC* codifica per una fosfoproteina nucleare coinvolta nella progressione del ciclo cellulare, apoptosi e trasformazione cellulare; i tumori ematopoietici spesso mostrano mutazioni, overespressione, riarrangiamenti e traslocazioni a livello di questo gene, quale è anche *target* diretto di *NOTCH1* (30).

Genetic lesions that define molecular-genetic subtypes in T-ALL

Gene category	Gene target	Genetic rearrangement	Outcome (ref.)	Frequency ^A (ref.)
bHLH family members	<i>TAL1</i>	t(1;14)(p32;q11)	Good (66–68)	3% (28)
		t(1;7)(p32;q34)	Good (66–68)	3% (28)
		1p32 deletion	Good (66–68)	16%–30% (61)
	<i>TAL2</i>	t(7;9)(q34;q32)	NA	1% (11, 30)
	<i>LYL1</i>	t(7;19)(q34;p13)	NA	1% (12)
LMO family members	<i>BHLHB1</i>	t(14;21)(q11.2;q22)	NA	1% (13)
	<i>LMO1</i>	t(11;14)(p15;q11)	NA	1% (15, 30)
		t(7;11)(q34;p15)	NA	1% (15, 30)
	<i>LMO2</i>	t(11;14)(p13;q11)	NA	6% (126)
		t(7;11)(q34;p13)	NA	6% (126)
	<i>LMO3</i>	11p13 deletion	NA	3% (29)
Homeobox family members	<i>TLX1</i>	t(7;12)(q34;p12)	NA	<1% (21)
		t(11;14)(p15;q11)	Good (76)	5%–10% (126)
	<i>TLX3</i>	t(11;14)(p15;q11)	Good (76, 88, 126)	30% (76, 88)
			No impact (67)	20% (20)
			Good (127)	5% (84)
	<i>HOXA</i>	Inv(7)(p15q34)	NA	3% (23, 128)
			NA	3% (23, 128)
	<i>HOXA (CALM-AF10)</i>	t(10;11)(p13;q14)	Poor (87, 126)	5%–10% (87)
	<i>HOXA (MLL-ENL)</i>	t(11;19)(q23;p13)	NA	1% (88)
	<i>HOXA (SET-NUP214)</i>	9q34 deletion	No impact (33)	3% (30)
NA				
<i>NKX2.1</i>	inv(14)(q11.2q13)	NA	5% (21)	
		NA		
		NA		
<i>NKX2.2</i>	t(7;14)(q34;q13)	NA		
		NA		
Proto-oncogene	<i>c-MYB</i>	t(14;20)(q11;p11)	NA	1% (21)
		t(6;7)(q23;q34)	NA	3% (26)

^AFrequency refers to the frequency in which each mutation occurs in the patient population.

Tabella 1. La tabella fornisce una panoramica delle principali lesioni genetiche coinvolte nella patogenesi di T-ALL (30).

Oltre alle anomalie genetiche descritte, la patogenesi delle T-ALL è ulteriormente caratterizzata da una serie di alterazioni citogenetiche e molecolari ricorrenti e causano alterazioni di specifici processi cellulari, quali il ciclo cellulare, la crescita e la proliferazione cellulare, il rimodellamento della cromatina, la differenziazione delle cellule T (Tabella 2).

Tra questi:

- ***PTEN***: è il principale regolatore negativo del *PI3K/AKT signaling pathway* e la perdita della sua funzione risulta nell'attivazione costitutiva dell'AKT, con il conseguente incremento del metabolismo cellulare e proliferazione. Mutazioni e delezioni a livello di questo *tumor suppressor gene* sono state descritte in circa il 17% dei pazienti T-ALL (38), inoltre, è descritta anche l'inattivazione post-trascrizionale (39).

- **RUNX1**: è un importante fattore di trascrizione coinvolto nella patogenesi delle leucemie mieloidi e delle precursor-B-cell ALL. Ha un ruolo nello sviluppo della normale ematopoiesi ed è stato dimostrato che è coinvolto nel processo oncogenico dei fattori di trascrizione TLX1 e TLX3 HOXA. Inoltre, mutazioni *loss-of-function* in *RUNX1* sono presenti in campioni di T-ALL immature, evidenziando un ruolo nella trasformazione delle cellule T (37).
- **GATA3**: è un importante regolatore della differenziazione delle cellule T con un ruolo fondamentale nello sviluppo dei progenitori delle cellule T. Mutazioni somatiche a livello di GATA3 sono state evidenziate solo all'interno del sottogruppo ETP-T-ALL e potrebbero essere responsabili del blocco dello sviluppo delle cellule T in questo sottogruppo leucemico (36).
- **ETV6**: questo gene codifica per un repressore trascrizionale appartenente alla famiglia proteica ETS, quale è coinvolto nello sviluppo delle cellule staminali ematopoietiche. Mutazioni nel gene *ETV6* portano alla produzione di una proteina tronca e sono frequentemente identificate nelle T-ALL immature (35).
- **WT1**: delezioni e mutazioni in questo gene sono presenti nel 10% dei pazienti T-ALL. Le mutazioni nel gene *WT1* identificate nelle T-ALL sono generalmente mutazioni *frameshift* presenti in eterozigosi e risultanti nella produzione di una proteina tronca; sono frequentemente associate con alterata espressione degli oncogeni *TLX1*, *TLX3* e gli *HOXA* (33).
- **LEF1**: delezioni e mutazioni coinvolgenti tale gene sono presenti nel 15% delle T-ALL; queste leucemie mostrano un arresto della differenziazione dei timociti allo stadio di differenziamento corticale (34).
- **RAS**: codifica per un membro della superfamiglia delle GTPasi, mutazioni attivanti sono state descritte nel 5-10% delle T-ALL (36).
- **PHF6**: un fattore con un ruolo nella regolazione epigenetica dell'espressione genica, identificato mutato e deletato in circa il 16% dei pazienti pediatrici T-ALL (40).
- **IL7R**: mutazioni somatiche di tipo *gain-of-function* a livello di tale recettore, risultante nell'attivazione costitutiva della via di *signaling JAK/STAT*, sono riportate nel 10% delle T-ALL (41).

Classification of other recurrent genetic alterations in T-ALL

Category	Gene target	Genetic rearrangement	Outcome (ref.)	Frequency (ref.)
NOTCH1 pathway	<i>NOTCH1</i>	t(7;9)(q34;p13)	NA	<1% (27)
		Activating mutation	Good (51, 129) GPR (45, 49, 50) No impact (48)	>60% (6)
Cell cycle defects	<i>FBXW7</i>	Inactivating mutation	NA	8%–30% (37, 38)
	<i>CDKN2A/2B</i>	9p21 deletion methylation	Good (60)	70% (7)
	<i>CCND2</i>	t(7;12)(q34;p13)	NA	1% (57)
Cell growth transcription factor tumor suppressors	<i>RB1</i>	13q14 deletion	No impact (33)	4% (58)
	<i>CDKN1B</i>	12p13 deletion	NA	2% (59)
	<i>MYC</i>	t(8;14)(q24;q11)	NA	1% (25)
	<i>WT1</i>	Inactivating mutation/deletion	No impact (80)	10% (80)
	<i>LEF1</i>	Inactivating mutation/deletion	NA	10%–15% (93)
	<i>ETV6</i>	Inactivating mutation/deletion	No impact (33)	13% (32, 33)
	<i>BCL11B</i>	Inactivating mutation/deletion	No impact (33)	10% (98)
	<i>RUNX1</i>	Inactivating mutation/deletion	No impact (33) Poor (101)	10%–20% (100, 101)
Signal transduction	<i>GATA3</i>	Inactivating mutation/deletion	Poor (33)	5% (33)
	<i>PTEN</i>	Inactivating mutation	No impact (106, 130) Poor (33)	10% (33, 106, 130)
	<i>NUP214-ABL1</i>	Episomal 9q34 amplification	Poor (108) No impact (131)	4% (108)
	<i>EML1-ABL1</i>	t(9;14)(q34;q32)	NA	<1% (109)
	<i>ETV6-ABL1</i>	t(9;12)(q34;p13)	NA	<1% (110)
	<i>BCR-ABL1</i>	t(9;22)(q34;q11)	Poor (132)	<1% (132)
	<i>NRAS</i>	Activating mutation	No impact (33)	5%–10% (32, 113)
	<i>NF1</i>	Inactivating mutation/deletion	No impact (33)	3% (114)
	<i>JAK1</i>	Activating mutation	No impact (33)	4%–18% (118, 119)
	<i>ETV6-JAK2</i>	t(9;12)(p24;p13)	NA	<1% (117)
	<i>JAK3</i>	activating mutation	No impact (33)	5% (33)
	<i>FLT3</i>	activating mutation	No impact (33)	2%–4% (133, 134)
	<i>IL7R</i>	activating mutation	No impact (33)	10% (120, 121)
	Chromatin remodeling	<i>EZH2</i>	Inactivating mutation/deletion	Poor (33)
<i>SUZ12</i>		Inactivating mutation/deletion	No impact (33)	10% (33)
<i>EED</i>		Inactivating mutation/deletion	No impact (33)	10% (33)
<i>PHF6</i>		Inactivating mutation/deletion	No impact (81)	20%–40% (81)

GPR, good prednisone response.

Tabella 2. La tabella fornisce una classificazione delle alterazioni genetiche coinvolte nella patogenesi di T-ALL (30).

CAPITOLO 2

MATERIALI E METODI

2. MATERIALI

2.1 Caratteristiche cliniche dei pazienti

Tutti i pazienti pediatrici T-ALL arruolati in questo studio sono stati ottenuti al momento della diagnosi e sono stati raccolti e collezionati nel laboratorio di Ematologia Pediatrica del Policlinico Universitario di Padova, (Italia). I soggetti erano idonei al trattamento ALL-AIEOP 2000 e ALL-AIEOP 2009 e sono stati selezionati sulla base della disponibilità di sufficienti quantità di DNA per l'analisi molecolare.

Le cellule mononucleari sono state isolate da campioni di midollo osseo (BM) e conservate a -80° C dopo estrazione del DNA. Tutti i campioni di BM contenevano una percentuale blasti \geq al 70%.

2. METODI

2.2 Analisi mutazionale dei geni *NOTCH1*, *FBXW7* e *PTEN* in campioni T-ALL all'esordio

2.2.1 Amplificazione del gene di interesse

✓ *NOTCH1* e *FBXW7*

La *touchdown PCR* (*Polymerase Chain Reaction*) è la metodica utilizzata per l'amplificazione degli esoni 26, 27 e 34TAD del gene *NOTCH1* e degli esoni 9 e 10 del gene *FBXW7*. La *touchdown PCR* è una tecnica in grado di aumentare la specificità di una reazione di PCR. La maggior parte dei termociclatori può essere programmata per effettuare cicli in cui la temperatura di appaiamento venga abbassata progressivamente durante le varie fasi della PCR, da un iniziale valore superiore alla T_m attesa fino ad un valore inferiore alla T_m . Mantenendo inizialmente molto alta la stringenza dell'ibridazione, si ostacola la formazione di aspecifici, consentendo alla sequenza desiderata di predominare.

Per gli esoni 26, 27 del gene *NOTCH1* la reazione è stata effettuata utilizzando la *Expand long template PCR system* (Roche cat# 11681834001) in un volume di 10 μ l. Il protocollo con le quantità e le concentrazioni dei reagenti utilizzati sono schematizzati nella tabella seguente.

REAGENTE	VOLUME
<i>Buffer III 10X</i>	1 μ l

DMSO 100%	0,3 μ l
Betaina (5M)	1,6 μ l
dNTPs (5 μ M)	0,4 μ l
<i>Primer FW</i> (10pmoli/ μ l)	0,75 μ l
<i>Primer REV</i> (10pmoli/ μ l)	0,75 μ l
Taq polimerasi (5U)	0,1 μ l
H ₂ O	4,55 μ l
DNA (20ng/ μ l)	1 μ l
Volume totale reazione	10 μ l

La reazione viene eseguita su *Mastercycler epgradient (Eppendorf)* alle seguenti condizioni:

FASE	TEMPERTURA	TEMPO	
Denaturazione iniziale	95°C	3'	
Denaturazione	94°C	15"	22 cicli
Annealing	61-50°C (-0,5°C/ciclo)	15"	
Estensione	72°C	1'	
Denaturazione	94°C	15"	
Annealing	50°C	30"	
Estensione	72°C	1'	
Estensione finale	72°C	5'	
Mantenimento	4°C	∞	

Per l'esone 34TAD del gene *NOTCH1* e gli esoni 9 e 10 del gene *FBXW7* la reazione è stata effettuata utilizzando la Taq DNA Polimerasi, 5 U/ μ l (*TAQ-RO ROCHE* cat# 000000011435094001) in un volume di 20 μ l. Il protocollo con le quantità e le concentrazioni dei reagenti utilizzati sono schematizzati nella tabella seguente.

REAGENTE	VOLUME
<i>Buffer</i> 10X	2 μ l
DMSO 100%	0,8 μ l
MgCl ₂ (25Mm)	1,2 μ l
dNTPs (10 μ M)	1 μ l
<i>Primer FW</i> (5pmoli/ μ l)	2 μ l
<i>Primer REV</i> (5pmoli/ μ l)	2 μ l
Taq polimerasi (5U)	0,2 μ l
H ₂ O	9,8 μ l
DNA (20ng/ μ l)	1 μ l
Volume totale di reazione	20 μ l

La reazione viene eseguita su *Mastercycler egradient* (Eppendorf) alle seguenti condizioni:

FASE	TEMPERTURA	TEMPO	
Denaturazione iniziale	95°C	3'	
Denaturazione	94°C	15"	22 cicli
Annealing	61-50°C (-0,5°C/ciclo)	15"	
Estensione	72°C	1'	
Denaturazione	94°C	15"	

Annealing	50°C	30''	18 cicli
Estensione	72°C	1'	
Estensione finale	72°C	5'	
Mantenimento	4°C	∞	

La PCR è la metodica utilizzata per l'amplificazione degli esoni 28 e 34PEST del gene *NOTCH1*. La reazione è stata effettuata utilizzando la *Expand long template PCR system* (Roche cat# 11681834001) in un volume di 10 µl. Il protocollo con le quantità e le concentrazioni dei reagenti utilizzati sono schematizzati nella tabella seguente.

REAGENTE	VOLUME
<i>Buffer III 10X</i>	1 µl
DMSO 100%	0,3 µl
Betaina (5M)	1,6 µl
dNTPs (5µM)	0,4 µl
<i>Primer FW</i> (10pmoli/µl)	0,75 µl
<i>Primer REV</i> (10pmoli/µl)	0,75 µl
Taq polimerasi (5U)	0,1 µl
H ₂ O	4,55 µl
DNA (20ng/µl)	1 µl
Volume totale reazione	10 µl

La reazione viene eseguita su *Mastercycler epgradient* (Eppendorf) alle seguenti condizioni:

FASE	TEMPERATURA	TEMPO	

Denaturazione iniziale	95°C	3'	
Denaturazione	94°C	15"	35 cicli
Annealing	58°C	45"	
Estensione	72°C	1'	
Estensione finale	72°C	7'	
Mantenimento	4°C	∞	

Il gene *NOTCH1* per cui sono stati disegnati i *primers* è l'isoforma NOTCH1-001 (ensembl Protein_Coding Gene ENSG00000148400), che codifica per la relativa proteina di 2555 amminoacidi (ensembl Transcript id ENSP ENST00000277541) da un trascritto primario di 9371 bp, localizzato sul cromosoma 9 tra 136,494,444 e 136,545,862.

Il gene *FBXW7* per cui sono stati disegnati i *primers* è l'isoforma FBXW7-001 (ensembl Protein_Coding Gene ENSG00000109670), che codifica per la relativa proteina di 707 amminoacidi (ensembl Transcript id ENSP ENST00000281708) da un trascritto primario di 4976 bp, localizzato sul cromosoma 4 tra 152,322,623 e 152,535,001.

✓ *PTEN*

La PCR è la metodica utilizzata per l'amplificazione dell'esone 7 del gene *PTEN*. La reazione è stata effettuata utilizzando la Taq DNA Polimerasi, 5 U/μl (*TAQ-RO ROCHE* cat# 000000011435094001) in un volume di 50 μl. Il protocollo con le quantità e le concentrazioni dei reagenti utilizzati sono schematizzati nella tabella seguente.

REAGENTE	VOLUME
<i>Buffer</i> 10X	5 μl
dNTPs (10μM)	1 μl
<i>Primer FW</i> (10μM)	2 μl
<i>Primer REV</i> (10μM)	2 μl
Taq polimerasi (dil 1:10)	2 μl

H ₂ O	38 µl
DNA (20ng/ul)	1 µl
Volume finale di reazione	50 µl

La reazione viene eseguita su *Mastercycler epgradient (Eppendorf)* alle seguenti condizioni:

FASE	TEMPERATURA	TEMPO	
Denaturazione iniziale	94°C	3'	
Denaturazione	94°C	30"	35 cicli
Annealing	60°C	30"	
Estensione	94°C	30"	
Estensione finale	72°C	7'	
Mantenimento	4°C	∞	

Il gene *PTEN* per cui sono stati disegnati i *primers* è l'isoforma PTEN-001 (ensembl Protein_Coding Gene ENSG00000171862), che codifica per la relativa proteina di 403 amminoacidi (ensembl Transcript id ENSP ENST00000371953) da un trascritto primario di 9027 bp, localizzato sul cromosoma 10 tra 87,863,113 e 87,971,930.

Di seguito sono riportati i *primer* utilizzati.

GENE ed ESONE	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
NOTCH1 esone 26	GCTGAGGGAGGACCTGAACTTGG	CCTGAGCTGGAATGCTGCCTCTA
NOTCH1 esone 27	CATGGGCCTCAGTGTCTT	TAGCAACTGGCACAACAGC
NOTCH1	GCGTAGCCGCTGCCTGAT	CAGACTCCCGGTGAGGATGC

esone 28		
NOTCH1 esone 34TAD	GCTGGCCTTTGAGACTGG	CTCCTGGGGCAGAATAGTGT
NOTCH1 esone 34PEST	ACAGATGCAGCAGCAGAACC	CCTGGGGCCAGATAAAACAGTACA
FBXW7 esone 9	TGATGGGATCATTTTATACGGATG	GACAAAACGCTATGGCTTCC
FBXW7 esone 10	CCCAACTTCCCATTCCTTA	TTTCTTCATGCCAATTTTAACG
PTEN esone 7	TGACAGTTTGACAGTTAAAGG	CTTCTCAGTTAACCATCCTTG

2.2.2 Analisi elettroforetica

L'elettroforesi in gel di agarosio permette la separazione di molecole di DNA (plasmidi o prodotti di PCR) in base al loro peso molecolare e al loro grado di superavvolgimento. La scelta della concentrazione d'agarosio, che determina le dimensioni delle maglie del gel, si basa sulla lunghezza delle molecole di DNA da analizzare. Con questa tecnica si possono separare sequenze che vanno dalle 70 paia di basi (agarosio 3%) fino alle 80.000 paia di basi (agarosio 0.1%).

Al termine delle reazioni, i prodotti di PCR sono caricati su un gel di agarosio al 2% in TAE 1X (Trisidrossimetilaminometano – Acido acetico – EDTA) dopo essere stati mescolati ad un *loading buffer* che permette di seguire visivamente la corsa elettroforetica e di aumentare la densità del prodotto di PCR, così il campione resta all'interno dei pozzetti e non si disperde in soluzione. Oltre ai campioni viene anche caricato un marcatore di peso molecolare (*Marker VIII, Roche*) che permette di determinare le dimensioni degli amplificati.

Il gel di agarosio è colorato con Gel Red (nuovo fluoroforo, meno nocivo del vecchio Bromuro di Etidio). La corsa elettroforetica viene svolta in TAE 1X. Al termine della corsa il gel viene osservato utilizzando un transilluminatore a luce ultravioletta e quindi fotografato.

2.2.3 Purificazione del prodotto di PCR

Il prodotto di PCR è stato purificato mediante l'utilizzo dell'*ExoProStar* (*Illustra ExoProStar 1-Step, GE Healthcare Life Sciences cat# US77701*), esonucleasi I e fosfatasi alcalina (*Shrimp Alkaline Phosphatase*), che degradano rispettivamente i DNA a singolo filamento, i dNTPs e i *primers* in non incorporati in modo da non interferire con il successivo sequenziamento.

A 5 µl di prodotto di PCR sono stati aggiunti 2 µl di *ExoProStar* e si è eseguita una incubazione di 15 minuti a 37°C, la reazione è stata poi bloccata con un'incubazione di 15 minuti a 80°C come schematizzato nella figura seguente.

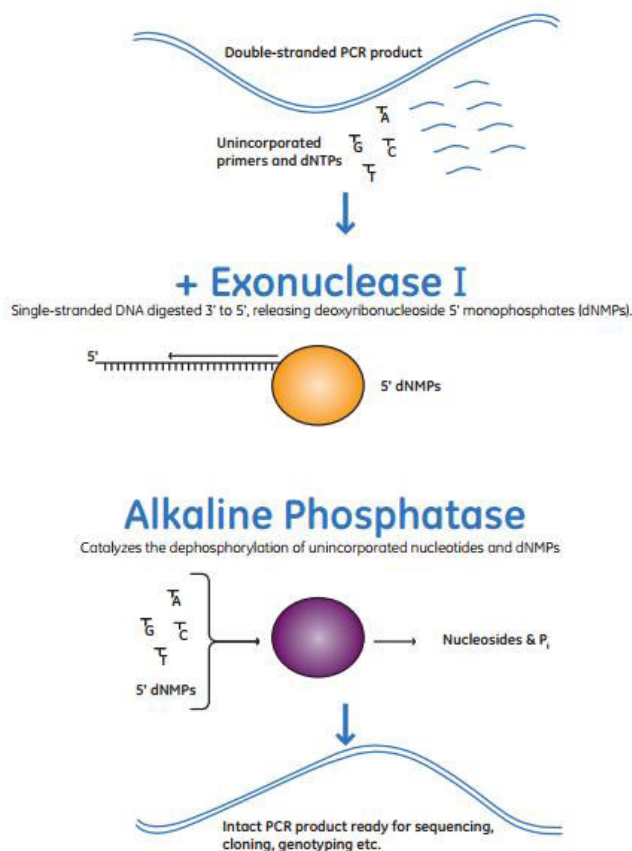


Figura 1. Rappresentazione schematica della reazione di purificazione del prodotto di PCR.

2.2.4 PCR di sequenza

La PCR di sequenza consente di ottenere un insieme di frammenti, marcati solo su una delle due eliche, che hanno una estremità uguale e l'altra variabile di un solo nucleotide.

La reazione avviene in un'unica provetta aggiungendo una preparazione standard, *BigDyeR Terminator (Applied Biosystem)*, che contiene i nucleotidi terminatori (ddNTPs), ovvero nucleotidi coniugati con un fluorocromo diverso per ciascuna base azotata; inoltre si aggiungono 5 pmol/µl del primer specifico per il frammento che si vuole sequenziare e il DNA precedentemente purificato.

L'amplificazione si esegue sul *Mastercycler (Eppendorf)* secondo il seguente protocollo:

FASE	TEMPERTURA	TEMPO	
Denaturazione iniziale	96°C	1'	

Denaturazione	96°C	10"	25 cicli
Annealing	50°C	5'	
Estensione	60°C	4'	
Mantenimento	4°C	∞	

Tale metodica prevede l'uso di 2'-3' dideossinucleotidi trifosfati (ddNTPs) che possono essere incorporati nella catena nascente di DNA durante la reazione di PCR. Una volta inseriti, essi inducono l'interruzione della sintesi, impedendo il legame con il successivo trifosfato. La miscela di reazione contiene quindi, oltre ai quattro dNTPs normali, i quattro ddNTPs, ciascuno coniugato con un fluorocromo di diverso colore. Durante la PCR vengono prodotti frammenti di varia lunghezza, corrispondente al punto in cui il rispettivo ddNTP è stato incorporato provocando l'arresto della crescita della catena e generando frammenti di lunghezza differente.

Il prodotto della PCR di sequenza viene purificato da eventuali residui mediante la precipitazione in etanolo, secondo il seguente protocollo.

Per ogni prodotto di PCR di sequenza, il cui volume finale è di 10 µl, bisogna aggiungere 50 µl di etanolo al 100% e 2 µl di Sodio acetato e incubare 15 minuti a temperatura ambiente. Successivamente si centrifuga a 2000 g per 45 minuti a 4°C. Dopo aver eliminato il surnatante per inversione della piastra su un foglio di carta assorbente, si aggiungono 70 µl di Etanolo al 70% e si centrifuga a 2000 g per 15 minuti a 4°C. Si elimina il surnatante per inversione della piastra e si centrifuga la piastra capovolta su di un foglio di carta assorbente a 700 g per 1 minuto per eliminare eventuali residui di etanolo.

Allo scopo di mantenere il DNA in uno stato di denaturazione, si aggiungono 20 µl di Formammide. Il prodotto è quindi pronto per essere sequenziato.

La sequenza completa è stata ottenuta mediante il caricamento sul sequenziatore *Applied Biosystems® 3500 Series Genetic Analyzer* per esser sottoposta ad elettroforesi capillare in cui 8 capillari consentono l'analisi simultanea di 8 campioni in un'unica iniezione e in un tempo variabile da circa 20 minuti a 2 ore che dipende dalla grandezza dell'amplicone. Durante la corsa elettroforetica, i frammenti generati durante la reazione di sequenza passano all'interno di un capillare, ai capi del quale è applicata una differenza di potenziale che fa migrare il DNA verso il polo positivo (anodo). I frammenti di DNA vengono letti man mano che corrono lungo il capillare e passano da un fascio di luce laser che eccita i marcatori fluorescenti dei rispettivi ddNTPs. L'intensità della fluorescenza emessa viene misurata da un detector che rileva la sequenza di basi

elaborata dal software Sequencing Analysis (Figura 2) in picchi di colore diverso costituenti il cromatogramma che è stato analizzato per ciascun paziente. Ciascun cromatogramma ottenuto è stato visualizzato tramite il software ChromasLite per evidenziare la presenza di eventuali anomalie nella sequenza e confrontando l'omologia di ciascuna sequenza con quella di interesse mediante il sito per l'allineamento delle sequenze BLAST (*The Basic Local Alignment Search Tool*) è stato possibile individuare diverse mutazioni.

Le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle di riferimento depositate in banca dati (www.ensembl.org).

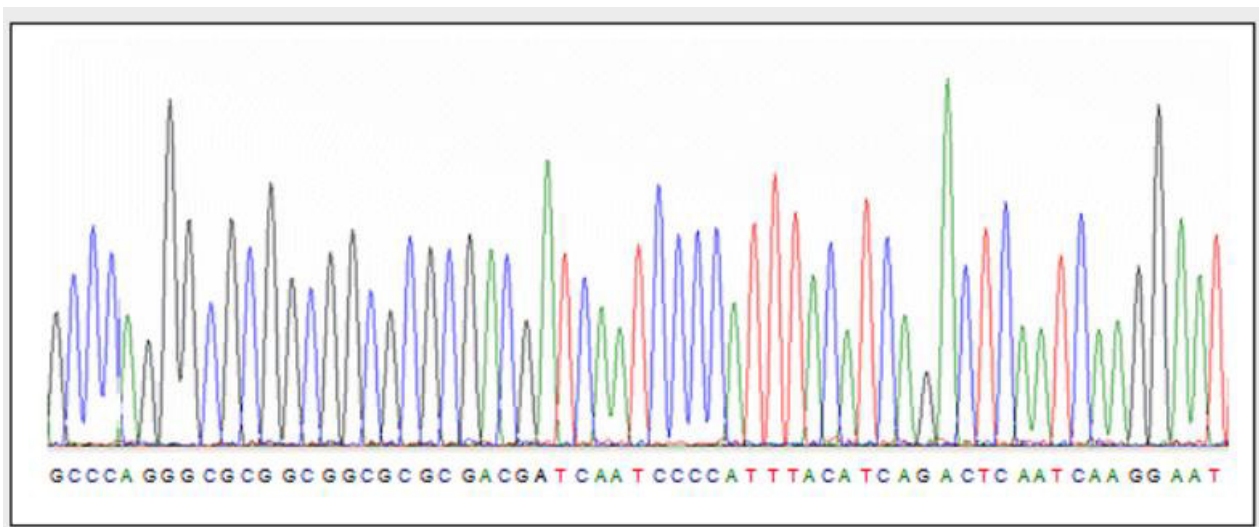


Figura 2. Esempio di elettroferogramma in cui ogni picco corrisponde ad una base azotata e il colore del picco individua la singola base azotata (C, T, A, G).

2.2.5 Clonaggio con vettore TOPO TA

I prodotti di PCR identificati mutati in *frameshift* ma per i quali non è possibile leggere correttamente la mutazione vengono clonati all'interno di un vettore plasmidico ad alta efficienza di trasformazione, il vettore TOPO del kit *TOPO-TA cloning* (Invitrogen) attraverso una strategia che ne permette l'inserimento in pochi minuti con buona efficienza ("TOPO® Cloning") e senza richiedere procedure aggiuntive.

Il vettore plasmidico pCR®2.1-TOPO® viene fornito già linearizzato con una singola Timidina (T) all'estremità 3' per il "TA Cloning" e una Topoisomerasi I covalentemente legata al vettore che così viene denominato "vettore attivato" (Figura 3).

Questo vettore sfrutta la caratteristica della Taq polimerasi di aggiungere ad ogni estremità 3' dell'amplificato una un'Adenina (A), che quindi protrude; sul vettore sono presenti delle timidine al 5' che generano delle estremità coesive, che possono appaiarsi alle A del prodotto di PCR.

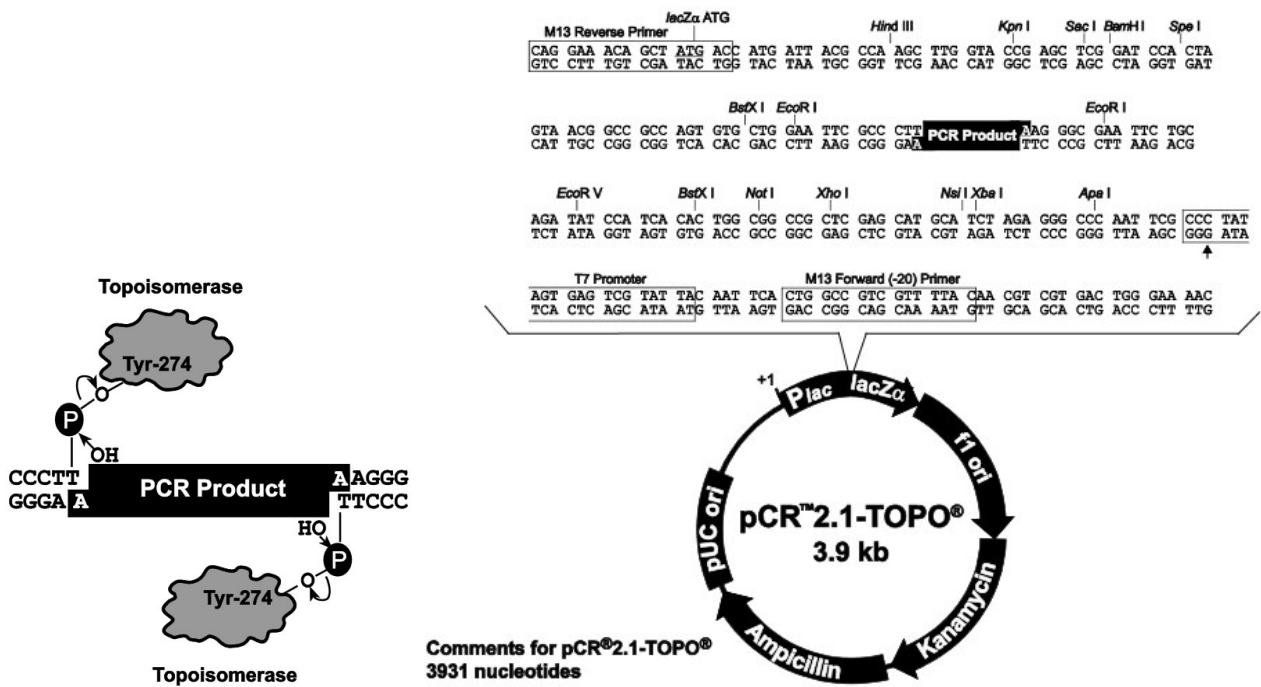


Figura 3. Vettore plasmidico di sequenza.

Il vettore oltre al sito di clonaggio contiene una sequenza di inizio replicazione (pUCori), il promotore e il gene per la β -Galattosidasi, e la resistenza a due antibiotici (Ampicillina e Kanamicina) che permetterà la sopravvivenza delle colonie batteriche che hanno internalizzato il vettore.

L'orientamento con cui si inserisce il prodotto di PCR nel vettore è casuale. Per far avvenire la reazione di inserimento del prodotto di PCR nel vettore vengono mescolati 2 μ l di amplificato di PCR con 1 μ l di soluzione salina (1,2M NaCl, 0,06M MgCl₂) (Invitrogen), che incrementa l'internalizzazione del frammento, 2 μ l di H₂O sterile e infine 1 μ l di vettore pCR 2.1- TOPO *vector* (Invitrogen). La soluzione così ottenuta viene mescolata gentilmente e lasciata a temperatura ambiente per 5 minuti per favorire l'inserimento del frammento nel vettore.

Dopo l'avvenuta ligazione la soluzione ottenuta viene utilizzata per trasformare cellule di *E.Coli*, già rese competenti chimicamente, attraverso lo *shock* termico.

In questo modo il plasmide viene internalizzato dalle cellule e può replicarsi autonomamente.

Dopo aver fatto scongelare le cellule di *E.Coli* che erano conservate a -80°C si aggiungono 2 μ l della soluzione ottenuta e si lasciano 15 minuti in ghiaccio, dopo aver agitato delicatamente.

Si procede poi con lo shock termico per 30 secondi effettuato in un bagnetto riscaldato a 42°C e poi nuovamente in ghiaccio per 2 minuti. L'aumento della temperatura permette la permeabilizzazione della membrana batterica e l'inserimento del plasmide, mentre il conseguente raffreddamento fa richiudere i pori formati sulla membrana, impedendo così al plasmide di fuoriuscire.

Alle cellule trasformate vengono aggiunti 250 μ l di terreno SOC Medium (2% Tryptone; 0,5% Yeast Extract; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM Glucosio) e vengono lasciate un'ora a 37°C in agitazione in modo da far avvenire una prima fase di crescita dei batteri.

Per far crescere le colonie e permetterne poi la selezione, le cellule vengono piastrate in *petri* da 25 ml contenenti terreno LB-Agar (terreno solido: 5 g NaCl; 2,5 g Extract Yeast; 5 g Bacto Tryptone; 8,5 g Agar; H₂O a volume di 500 ml, pH 7.0) aggiunto di 2,1 ml di Ampicillina (100 μ g/ml) e 25 mg X-Gal in 2 ml N,N-Dimetilformammide e lasciate overnight a 37°C.

Il risultato della crescita porta alla formazione di colonie bianche o blu in relazione all'internalizzazione o meno del plasmide.

✓ Selezione delle colonie positive

Il vettore in cui sono stati clonati i plasmidi è costituito da una sequenza pUCori di inizio replicazione, un sito che conferisce la resistenza all'Ampicillina e alla Kanamicina, dei siti di taglio per enzimi di restrizione, il promotore e la sequenza del gene LacZ che codifica per i primi 146 aminoacidi della β -Galattosidasi e che contiene al suo interno un sito di clonaggio multiplo che permette l'inserimento di alcuni aminoacidi all'estremità amino-terminale dell'enzima senza alterare la "open reading frame" (ORF). Al contrario, le cellule di *E.Coli* utilizzate contengono nel loro genoma il gene Lac⁺ che codifica per l'estremità carbossiterminale della β -Galattosidasi.

Pertanto, la complementazione di plasmide e batterio permette la produzione della β -Galattosidasi funzionalmente attiva.

In questo caso si può agevolmente operare la selezione delle colonie positive in quanto se nel plasmide non si è inserito il cDNA ci sarà l'espressione della β -Galattosidasi attiva che, in presenza del suo substrato cromogenico X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galattoside), precedentemente aggiunto alle piastre, sviluppa il caratteristico colore blu.

Al contrario quando vi è un inserto nel plasmide le colonie risulteranno bianche poiché la sequenza codificante per la β -Galattosidasi sarà interrotta e pertanto non ci potrà essere l'espressione dell'enzima attivo.

Infine i batteri che non hanno internalizzato il plasmide non sono in grado di crescere poiché non possiedono la resistenza all'antibiotico che viene conferita dal vettore.

Fra le colonie bianche si scelgono quelle più isolate e ben definite; si prelevano con un puntale per poi fare la PCR.

✓ **PCR da colonia**

Si effettua una PCR prelevando la colonia d'interesse dalla piastra e mettendola direttamente nella provetta contenente la mix di reazione di PCR, con un volume finale di 40 µl. Il protocollo con le quantità e le concentrazioni dei reagenti utilizzati sono schematizzati nella tabella seguente.

REAGENTE	VOLUME
<i>Buffer</i> di reazione 1X	4 µl
dNTPs	0,8 µl
<i>Primer FW</i> (6pmoli/µl)	1,6 µl
<i>Primer REV</i> (6pmoli/µl)	1,6 µl
Taq polimerasi	1,6 µl
H ₂ O	30,4 µl
Volume finale di reazione	40 µl

I *primers* utilizzati per la reazione di amplificazione e la reazione di sequenziamento sono i seguenti:

- *primer forward* M13: 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'

- *primer reverse* M13: 3'-CAGGAAACAGCTATGAC-5'

Le condizioni di PCR prevedono:

FASE	TEMPERTURA	TEMPO	
Denaturazione iniziale	94°C	10'	
Denaturazione	94°C	1'	30 cicli
Annealing	55°C	1'	

Estensione	72°C	1'	
Estensione finale	72°C	10'	
Mantenimento	4°C	∞	

I prodotti di PCR vengono caricati su un gel di agarosio al 2% in TAE 1X (Trisidrossimetilaminometano – Acido acetico – EDTA) dopo essere stati mescolati ad un *loading buffer*. Al termine della corsa il gel viene osservato utilizzando un transilluminatore a luce ultravioletta e quindi fotografato.

2.3 Analisi di delezione per il gene *PTEN* mediante *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification* (MLPA)

La metodica MLPA è una tecnologia recente, abbastanza economico, veloce e che non richiede un'attrezzatura troppo elaborata (oltre ad un termociclatore è necessario almeno un sequenziatore per separare su capillare i frammenti prodotti).

Permette la simultanea identificazione del numero di copie (delezioni o amplificazioni) di diverse sequenze nucleiche in una sola reazione, attraverso l'ausilio di speciali sonde.

Ogni bersaglio sul genoma necessita dell'impiego di 2 sonde così costituite (Figura 5):

- un'estremità (**sequenza di ibridazione**) complementare ad un sito bersaglio sul DNA genomico;
- l'altra estremità è un **oligonucleotide** in cui l'ultima ventina di paia di basi è complementare ad un primer universale M13;
- in una sola delle 2 sonde vi è anche una sequenza aspecifica avente lunghezza precisa (**stuffer sequence**) aggiunta solo per permettere il riconoscimento in base alla lunghezza dei frammenti marcati che si produrranno alla fine dell'esperimento.

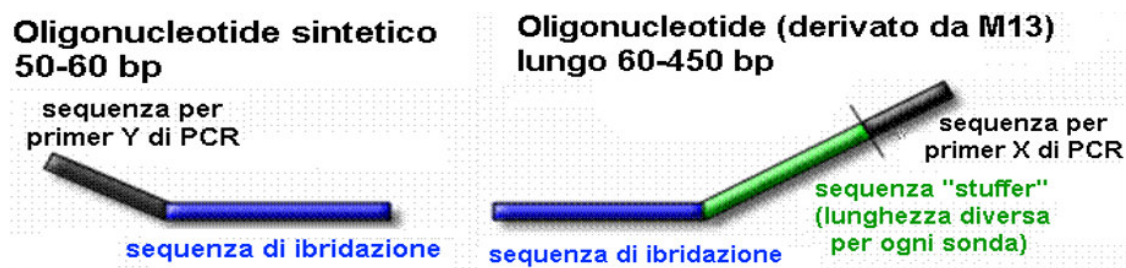


Figura 5. Struttura generale di ogni coppia di sonde MLPA.

La tecnica MLPA prevede le seguenti fasi:

1) Denaturazione ed ibridazione: La denaturazione del DNA genomico ovvero la separazione della doppia eliche del DNA serve per permettere la successiva ibridazione specifica tra un'estremità di ogni sonda ed il sito bersaglio (Figura 6).

Notare che in ogni coppia di sonde, le estremità si devono ibridare in modo consecutivo sul DNA genomico.

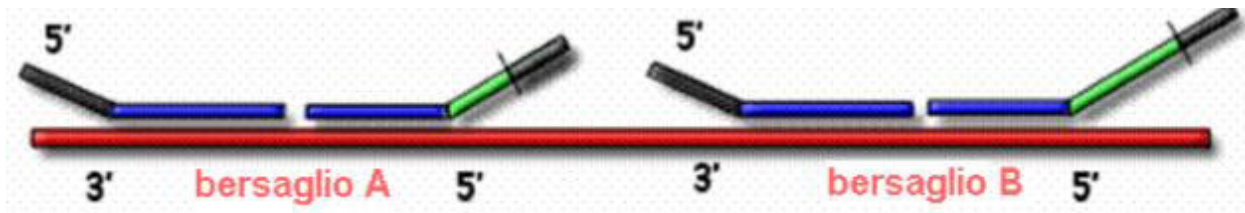


Figura 6. Ibridazione di ogni coppia di sonde MLPA con il relativo bersaglio sul DNA genomico.

2) Ligazione: se l'ibridazione ha avuto successo, la ligasi lega chimicamente tra loro le due mezze sonde connesse al sito target in un'unica sonda (Figura 7). L'enzima ligasi è inattivato per trattamento termico nei passaggi successivi.

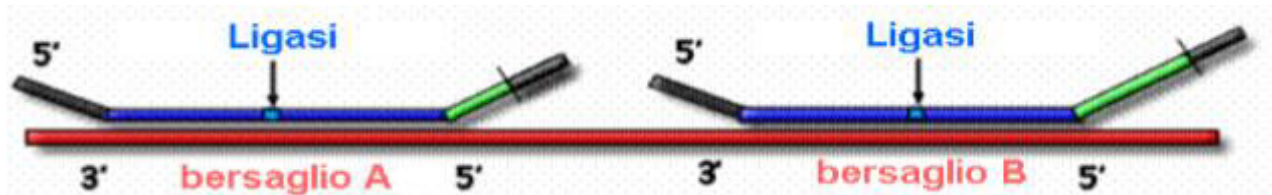


Figura 7. La ligasi unisce le sonde ibridate al DNA bersaglio in posizione adiacente.

Notare che l'ibridazione e la ligasi permettono in pratica di rendere disponibile, nel mix di reazione successivo, una serie di frammenti dalla lunghezza variabile che hanno in comune le estremità che sono complementari alla stessa coppia di primers universali M13.

3) Amplificazione: con l'aggiunta di una coppia di primers universali M13, di una polimerasi ed altri reagenti, può avvenire una reazione di PCR, che permette di amplificare ogni tipo di frammento emerso dall'azione della ligasi e consente la rilevazione e la quantificazione grazie ad emissione di fluorescenza (Figura 8); infatti uno dei due primers M13 ha una marcatura fluorescente utile per la rilevazione in sequenziatori con tecnologia a gel o a capillare.

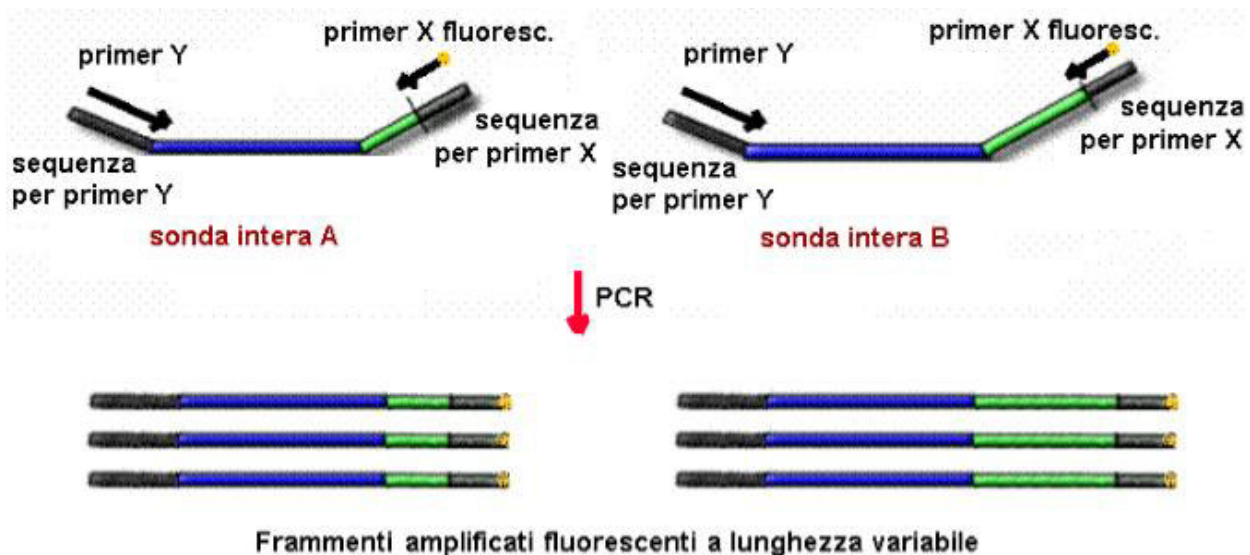


Figura 8. MLPA-Fase di amplificazione. Una volta legate tra loro le mezze sonde, ogni sonda intera risultante è complementare nelle estremità ad una stessa coppia di primers universali M13. La PCR innescata produce una quarantina di tipi di frammenti amplificati fluorescenti che differiscono tra loro per la lunghezza.

4) Separazione e quantificazione dei frammenti amplificati fluorescenti: l'ultima fase sperimentale è la separazione dei diversi frammenti amplificati, la cui lunghezza è connessa al sito bersaglio della sonda MLPA, attraverso elettroforesi capillare (Figura 9).

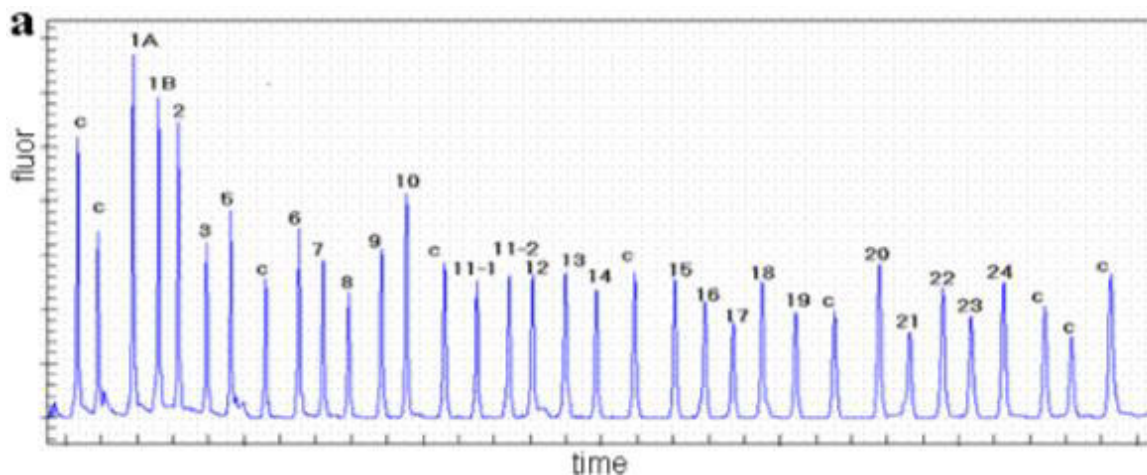


Figura 9. Profilo dei frammenti amplificati e separati mediante elettroforesi capillare.

Per eseguire l'analisi MLPA nella coorte di campioni oggetto di studio, è stato usato il kit di reagenti *SALSA MLPA* (MRC-Holland, Amsterdam, Olanda), in combinazione con *SALSA MLPA probemix P200-A1 Human DNA Reference-1* (MRC-Holland). Le sonde sono stati progettate sulla base di quanto riportato da Mendes et al (104). Queste sonde sono state modificate seguendo le linee guida del produttore (MRCHolland) e in dotazione per ottenere un *probemix* finale con una

concentrazione di 1µM per oligonucleotide. Per l'analisi MLPA è stato rigorosamente seguito il protocollo fornito da MRC Holland (105):

Giorno 1: Denaturazione → 5µl (70ng DNA + *AE Elution Buffer*)

Programma: 98°C 5'

25°C pausa

Ibridizzazione → master mix ("vortexare" tutti i reagenti)

1,5 µl *MLPA Buffer*

1 µl *Probemix* (P200-1)

0,5 µl Synthetic probemix

Miscelare i reagenti con il vortex e aggiungere 3 µl di master mix in ciascun campione e miscelare spipettando.

Programma: 95°C 1'

60°C 16-20 ore (lasciare tutta la notte)

Giorno 2: Ligazione → master mix ("vortexare" i due *Ligase Buffer*)

25 µl H₂O

3 µl *Ligase Buffer A*

3 µl *Ligase Buffer B*

1 µl *Ligase-65*

Preparare la mix e nel frattempo mantenere i campioni nel termociclatore. Programmare il termociclatore alla temperatura di 54°C e aggiungere 32 µl di mix senza togliere i campioni dal termociclatore; miscelare spipettando e far partire il programma successivo.

Programma: 54°C 15'

98°C 5'

20°C pausa

Amplificazione in PCR → master mix ("vortexare" i *SALSA primer mix*)

7,5 µl H₂O

2 µl *SALSA primer mix*

3 µl *SALSA polymerase*

Rimuovere i tubi dal termociclatore e aggiungere 10 µl di mix in ciascun campione a temperatura ambiente; miscelare spipettando, centrifugare e far partire il programma successivo.

Programma: 95°C 30"

60°C 30"

72°C 60" (35 cicli)

72°C 20'

15°C pausa

E' possibile stoccare i prodotti ottenuti per una settimana a 4°C, coprire con un foglio di alluminio.

Giorno 3: Iniezione → mix

0,5 µl ROX (*Applied Biosystems*, catalog number: 401734)

10,5 µl Hidi formamide (*Applied Biosystems*, catalog number: 4401457)

Preparazione della piastra per la separazione in elettroforesi capillare: 11µl di mix per pozzetto + 1µl di prodotto di PCR; coprire con un coperchio di plastica e centrifugare 1' a 1000rpm, poi far partire il programma successivo.

Programma: 86°C 3'

4°C 2'

Rimuovere i campioni dal termociclatore e centrifugare 1' a 1000g. Coprire la piastra con l'apposti coperchio per l'elettroforesi capillare.

Tutte le reazioni sono state eseguite sul *Mastercycler epgradient (Eppendorf)*, mentre la separazione elettroforetica è stata condotta sul sequenziatore *Sanger ABI PRISM 3500 Genetic analyzer* (a 8 capillari; *Applied Biosystem/ThermoFisher*).

I dati derivanti dall'elettroforesi capillare sono stati analizzati con il *Coffalyser Software* (MRC-Holland) utilizzando i parametri di *default*.

Di seguito sono riportate le sonde utilizzate nell'esperimento.

	PROBES	LENGTH	T _m
1	GGGTTCCCTAAGGGTTGGA TCCAGGCAGCTACACTGGGCATGCTCAGTAG	19+1+30=50	79,68
2	GGGTTCCCTAAGGGTTGGA TCCAGAGCCATTTCCATCCTGCAGAAGAA	19+29=48	75,56
3	GGGTTCCCTAAGGGTTGGA GCTGCATATTTTCAGATATTTCTTTCCTTAACTAAAGTACTCA	19+42=61	70,97
4	GGGTTCCCTAAGGGTTGGA CAAGATATACAATCTGTAAGTATGTTTTCTATTGTATGCTTGC	19+45=64	70,86
5	GGGTTCCCTAAGGGTTGGA GCACAGATTCATGTTACTTGATCTGCTTTAAATG	19+34=53	70,83
6	GGGTTCCCTAAGGGTTGGA GTCATAATGTCTTTCAGCACAACTAAAAGAAAAGTT	19+36=55	69,46
7	GGGTTCCCTAAGGGTTGGA GTATCTCACTCGATAATCTGGATGACTCATTATTGTTATGA	19+41=60	72,31
8	GGGTTCCCTAAGGGTTGGA CTGGAAGGGACGAACTGGTGTAAATGATA	19+29=48	72,21
9	GGGTTCCCTAAGGGTTGGA GGAAGTAAGGACCAGACAAAAAGGTAAGTT	19+33=52	72,81

10	GGGTTCCCTAAGGGTTGGA	GATGAGTCATATTTGTGGGTTTTCATTTTAAATTTCTT	19+39=58	70,21
11	GGGTTCCCTAAGGGTTGGA	TAGGGTAAAAAAGATTGGTCAGGAAAAGAGAATTGTTC	19+39=58	73,59
12	GGGTTCCCTAAGGGTTGGA	CAAGAAATCGATAGCATTTCAGTATAGAGCGTGCAGATAATGACAAGGAA	19+51=70	80,01
13	GGGTTCCCTAAGGGTTGGA	CCAAATTTTAAGGTCAGTTAAATTAACATTTTGTGGGGTTGTTGACTGTATGTA	19+57=76	78,3
14	GGGTTCCCTAAGGGTTGGA	CTGCCAGCTAAAGGTGAAGATATATTCCTCAATTCAGGACCCACACGACGGGAA	19+55=74	86,7
15	GGGTTCCCTAAGGGTTGGA	CAAAGTAGAGTCTTCCACAAAAGACAAGATGCTAAAAAAGGTTT	19+47=66	76,2
16	GGGTTCCCTAAGGGTTGGA	CTCTTTTTTCTGTCCACCAGGGAGTAACTATTCAGTCAGAGGCGCTATGTGTA TTATTATAGCTACCTGT	19+74=93	83,97
17	GGGTTCCCTAAGGGTTGGA	CTTCTAGATATGGTTAAGAAAAGTTCCTCAATACATGGAAGGATGAGAATTTCAAGC ACTTACTGCAAGT	19+70=89	81,43
18	AGCCTGCGGCTTGGGGACTCTGCGCTCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC		27+23=50	83,55
19	GCCCCGCCACCAGCAGCTTCTGCCATCTCTCTCTCTCTTTTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC		41+23=64	88,8
20	GATATTTATCCAAACATTATTGCTATGGGATTTCTGCAGAAAAGACTTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC		48+23=71	76,1
21	AAATATCTTCTAAAACAACTATTAAGTGAAAGTTATCTGCTGTTAGAGTGAGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC		53+23=76	71,98
22	ACTTGGCATCTAGCCCATATTTGAGCCCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC		28+23=51	73,29
23	TAAAAGTGATATAAAGTTATCTTTTGCACCTTAGGAAGAAAAAAGTACTTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC		50+23=73	70,21
24	CAGTAAGATACAGTCTATCGGGTTAAGTTATACAACATAGTACAGTACATTCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC		53+23=76	73,52
25	TGTGCATATTTATTACATCGGGCAAATTTTAAAGGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC		37+23=60	72,25
26	ATTTTTGATGTTTTCTCTTCTCTCTCTGATCTGAGAATTTATTGGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC		49+23=72	77,06
27	TCTCTAGGTGAAGCTGTACTTCACAAAAACAGTAGAGGATCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC		39+23=62	74,11
28	CTATAACTGGTAATCTGACACAATGTCCTATTGCCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC		35+23=58	71,8
29	TATCTAGTACTTACTTTAACAAAAATGATCTTGACAAAGCAAATAAAGACAAAGCCAACCGATACTTTTCTCTAGA TTGGATCTTGCTGGCAC		71+23=94	77,96
30	TGTGATGTTGTTAATTCTAGGAGTACAGCTGATGAAGAACTTGCTTGCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC		49+23=72	78,14
31	GACAAGTTCATGTACTTTGAGTTCCTCAGCCGTACCTGTGTGTTGCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC		47+23=70	83,55
32	GTACTTTACTTTTCTTTGGGAGAAATATCCAAAATAAGGACAGATTAAGCTATATTTTATTTTATGACATTTCTAGA TTGGATCTTGCTGGCAC		71+23=94	75,68
33	TAAAGAATCATCTGGATTATAGACCAGTGGCACTGTTGTTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC		40+23=63	74,3
34	TCCGCCACTGAACATTGGAATAGTTCAAACATCATCTTGCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC		40+23=63	77,87

2.4 Analisi dell'effetto delle mutazioni somatiche *NOTCH1*

2.4.1 Analisi di gene expression profiling con GeneChip Human Genome Arrays, Affymetrix (Santa Clara, CA, USA).

La possibilità di quantificare contemporaneamente l'espressione di numerosi geni è la caratteristica fondamentale della tecnologia dei *microarray*. L'mRNA estratto dalle cellule viene marcato e quindi ibridato a sequenze di DNA immobilizzate su una superficie solida. Nei *microarray* a oligonucleotidi sequenze di 20-25 nucleotidi vengono sintetizzate direttamente sul supporto solido tramite una tecnica di fotolitografia, sviluppata da *Affymetrix*, che permette di sintetizzare contemporaneamente centinaia di migliaia di diversi oligonucleotidi. La sintesi in situ degli oligonucleotidi è caratterizzata da un'elevata riproducibilità che permette di confrontare segnali ottenuti da campioni ibridati su distinti *microarray*.

Lo studio di espressione genica dei campioni T-ALL è stato effettuato su di una database di campioni precedentemente collezionato nel Laboratorio di Oncoematologia di Padova, appartenenti allo studio MILE (*Microarray Innovation LEukemia*) (referenza) 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 è stato marcato e ibridato secondo protocollo (*Affymetrix Inc*, Santa Clara, CA, USA).

I dati sono poi stati normalizzati attraverso il programma *Robust Multiarray Averaging* (RMA) del pacchetto *R-Bioconductor* (www.r-project.org). Per rimuovere possibili errori dovuti al Batch è stato utilizzato il programma *Combatch*. In analisi, sono stati selezionati i geni differenzialmente espressi fra i due gruppi di pazienti in analisi eseguendo un'analisi supervisionata e applicando un *Wilcoxon t-test* con correzione di molteplicità con *cutoff* di *p value* < 0.05 come soglia di significatività.

2.4.2 Analisi di Reverse Phase Protein Array (RPPA)

La lisi cellulare, l'estrazione proteica e la quantifica dei campioni diluiti e la procedura di *Reverse Phase Protein Array* è stata eseguita secondo la procedura descritta da Accordi *et al.* (98).

I lisati proteici sono stati caricati su di una piastra a 384 pozzetti e diluiti con un *buffer* di diluizione. I lisati sono successivamente immobilizzati su di un vetrino rivestito di nitrocellulosa (Slides FAST, Whaterman Schleicher & Schuell, Florham Park, NJ) utilizzando il 2470 Arrayer (Aushon BioSystems, Burlington, MA). Prima della colorazione delle proteine depositate sui vetrini, i siti di legame aspecifici sulla membrana di nitrocellulosa vengono bloccati (I-Block 2% - Applied

Biosystems Foster City, CA-, 0,1% Tween20 - Sigma - in PBS 1X). A questo punto i vetrini possono essere sottoposti al processo di *staining* attraverso l'ausilio di un automatore (Dako Autostaines Plus, Dako Cytomation, Carpinteria, CA) con il CSA Kit (Dako Cytomation).

Quindi la molecola d'interesse viene poi rilevata, contemporaneamente in tutti i lisati, tramite un complesso anticorpo primario/anticorpo secondario con sistema di amplificazione.

Ogni anticorpo primario utilizzato in RPPA è stato precedentemente validato per la specificità di banda mediante Western Blot.

Le immagini TIF degli anticorpi o i vetrini Fast Green FCF sono analizzati utilizzando il software MicroVigene™ (VigeneTechInc, Boston, MA). I dati di RPPA sono poi validati mediante analisi Western Blot.

2.5 Analisi mutazionale di *IL7R* per lo studio della Malattia Minima Residua mediante *Next-Generation Sequencing Technology*

2.5.1 Amplificazione e sequenziamento del gene *IL7R* mediante PCR

La PCR è la metodica utilizzata per l'amplificazione dell'esone 6 del gene *IL7R*. La reazione è stata effettuata utilizzando la Taq DNA Polimerasi, 5 U/μl (*TAQ-RO ROCHE* cat# 000000011435094001) in un volume di 50 μl. Il protocollo con le quantità e le concentrazioni dei reagenti utilizzati sono schematizzati nella tabella seguente.

REAGENTE	VOLUME
<i>Buffer</i> 10X	2 μl
dNTPs (10μM)	0,5 μl
<i>Primer FW</i> (5μM)	1 μl
<i>Primer REV</i> (5μM)	1 μl
Taq polimerasi	0,2 μl
H ₂ O	14,3 μl
DNA (20ng/ul)	1 μl
Volule finale di reazione	20 μl

La reazione viene eseguita su *Mastercycler epgradient (Eppendorf)* alle seguenti condizioni:

FASE	TEMPERATURA	TEMPO	
Denaturazione iniziale	94°C	5'	
Denaturazione	94°C	15"	35 cicli
Annealing	55°C	45"	
Estensione	72°C	1'	
Estensione finale	72°C	5'	
Mantenimento	4°C	∞	

Il gene *IL7R* per cui sono stati disegnati i *primers* è l'isoforma IL7R-001 (*ensembl Protein_Coding Gene* ENSG00000168685), che codifica per la relativa proteina di 459 amminoacidi (*ensembl Transcript id* ENST00000303115) da un trascritto primario di 4626 bp, localizzato sul cromosoma 5 tra 35,856,849 e 35,879,603.

Di seguito sono riportati i *primers* utilizzati:

- *Primer forward IL7R 5'-3'* - TGCATGGCTACTGAATGCTC

- *Primer Reverse IL7R 5'-3'* – CCCACACAATCACCCTCTTT

I prodotti di PCR sono poi rivelati mediante elettroforesi su gel d'agoroso e sequenziati in *Sanger* come descritto in precedenza.

2.5.2 Sequenziamento di ampliconi con tecnologia 454 Junior-Roche

La tecnologia 454 (<http://www.454.com>) deriva dalla convergenza di due metodiche: il pirosequenziamento e la “polymerase chain reaction” (PCR) in emulsione (106).

Tale sistema, che si basa sulla tecnologia di GS 20, che prevede l'impiego di una “slide” a fibre ottiche definita piastra “picotiter”. Nel suo formato più recente, sulla superficie della “slide” sono incisi circa $3,4 \times 10^6$ pozzetti in ciascuno dei quali avviene la reazione di sequenziamento (con volume nell'ordine dei picolitri), le cui pareti presentano un rivestimento in metallo per aumentare la discriminazione tra segnale e rumore di fondo.

Per il sequenziamento (Figura 10) viene generata una libreria di frammenti di DNA-stampo mediante nebulizzazione o sonicazione. Successivamente alle estremità di tali frammenti di DNA a

doppio filamento (lunghi diverse centinaia di basi) vengono legati degli oligonucleotidi adattatori. La libreria viene quindi diluita a una concentrazione tale da ottenere singole molecole di DNA, che sono denaturate e ibridate a singole biglie rivestite da sequenze complementari a quelle degli oligonucleotidi adattatori. Le biglie sono catturate nelle goccioline di un'emulsione acqua-olio, in cui avviene la reazione di amplificazione clonale (mediante PCR in emulsione) di ogni singola molecola di DNA legata a ciascuna biglia. Dopo l'amplificazione, le biglie che portano immobilizzati i prodotti di amplificazione clonale vengono recuperate dall'emulsione, separate mediante un'ulteriore diluizione, depositate nei singoli pozzetti di una piastra "picotiter" e combinate con gli enzimi necessari per la reazione di sequenziamento. La piastra viene introdotta nel sequenziatore *GS Junior* e funge da cella a flusso, in cui sono effettuati cicli iterativi di pirosequenziamento mediante aggiunte successive di dNTP.

All'interno di ogni pozzetto contenente i prodotti di amplificazione clonale, ad ogni incorporazione nucleotidica si ha la produzione di pirofosfato e la conseguente generazione di un segnale luminescente, che viene trasmesso attraverso le fibre ottiche della piastra e registrato da una camera "charge-coupled device" (CCD). Dopo l'aggiunta di ciascun dNTP, il segnale luminoso derivante da ciascun pozzetto viene acquisito, analizzato per valutare il rapporto tra segnale e rumore di fondo, filtrato in base a criteri di qualità e successivamente tradotto mediante algoritmi in una sequenza lineare.

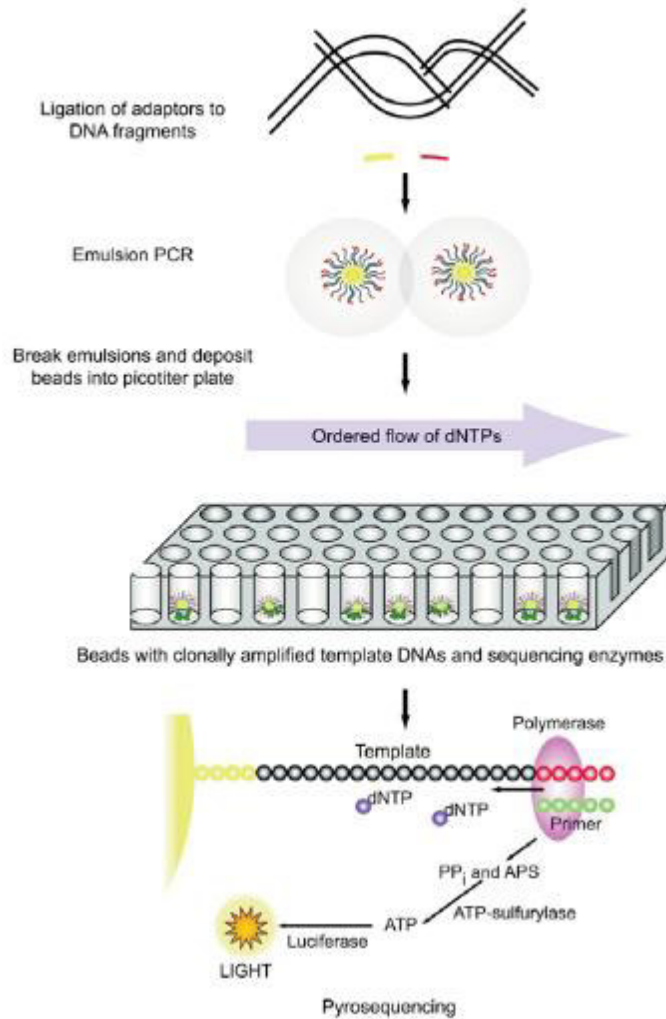


Figura 10. Rappresentazione del sequenziamento mediante piattaforma 454 Junior Roche.

Per il sequenziamento degli ampliconi di IL7R nei campioni T-ALL della coorte AIEOP è stato rigorosamente seguito il protocollo (*GS Junior Manual*) fornito da Roche LifeSciences.

I kits utilizzati sono i seguenti:

- *GS Junior Titanium emPCR Kit :emPCR Reagents (Lib-A)* (Cat. n°. 05 996 538 001)
- *GS Junior Titanium emPCR Kit: Bead Recovery reagents* (Cat. n°. 05 996 490 001)
- *GS Junior Titanium emPCR Kit: Oil and Breaking Kit* (Cat. n°. 05 996 511 001)
- *GS Junior Titanium PicoTiterPlate Kit* (Cat. n°. 05 996 619 001)
- *GS Junior Titanium Sequencing Buffers Kit* (Cat. n°. 06 627 589 001)
- *GS Junior Titanium Sequencing Kit: Packing Beads and Supplement CB* (Cat. n°. 05 996 597 001)
- *GS Junior Maintenance Wash Kit* (Cat. n°. 05 889 111 001)
- *GS Junior Sipper Maintenance Kit* (Cat. n°. 05 954 070 001)

I *primers* utilizzati sono riportati di seguito:

- *Primer M13AILRe6fwd1* - ACTGGCCGTCGTTTTACAtgcatggctactgaatgctc
- *Primer M13BILRe6rev1* - GGTCATAGCTGTTTCCTGcccacacaatcaccctcttt

La reazione di **PCR 1** con i *Primers M13A e M13B* viene eseguita su *Mastercycler epgradient* (Eppendorf) alle seguenti condizioni:

REAGENTE	VOLUME
<i>Buffer</i> 10X	2 μ l
dNTPs (10 μ M)	0,5 μ l
<i>Primer FW</i> (5 μ M)	1 μ l
<i>Primer REV</i> (5 μ M)	1 μ l
Taq polimerasi	0,2 μ l
H ₂ O	14,3 μ l
DNA (20ng/ul)	1 μ l
Volule finale di reazione	20 μ l

FASE	TEMPERTURA	TEMPO	
Denaturazione iniziale	94°C	3'	
Denaturazione	94°C	15"	35 cicli
Annealing	60°C	45"	
Estensione	72°C	1'	
Estensione finale	72°C	8'	
Mantenimento	4°C	∞	

I prodotti di PCR sono poi rivelati mediante elettroforesi su gel d'agoroso, quantificati, diluiti a 20ng/μl e nuovamente amplificati con i *Primers MID* (un *barcode* che permetterà di identificare ciascun paziente; per i dettagli consultare: *454 Sequencing System Guidelines for Amplicon Experimental Design*).

La reazione di **PCR 2** con i *Primers-MID* viene eseguita su *Mastercycler egradient (Eppendorf)* alle condizioni fornite dal manuale di sequenziamento *454 Roche*.

I prodotti di PCR sono poi rivelati mediante elettroforesi su gel d'agoroso e quantificati per procedere con le fasi di PCR in emulsione, Amplificazione e infine sequenziamento secondo il manuale fornito da *Roche*.

Il sequenziamento è stato condotto con il *454 GS Junior- Roche*, mentre l'analisi dei dati ottenuti è stata effettuata con il GS Amplicon Variant Analysis (AVA) Software (Figura 11).

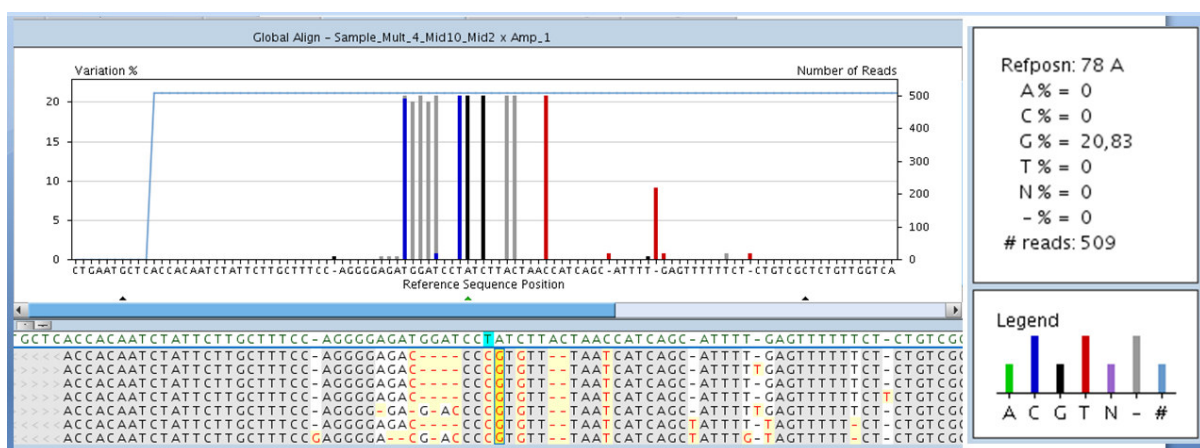


Figura 11. Output dei dati ottenuti con l'AVA Software.

✓ **Analisi dei dati ottenuti mediante sequenziamento con tecnologia 454 Junior-Roche**

Gli esperimenti con piattaforme NGS generano una quantità di informazioni senza precedenti e questo rappresenta una sfida per la gestione, l'archiviazione e, soprattutto, l'analisi dei dati. Come primo tipo di informazione si ottiene un'enorme quantità di immagini dei segnali di luminescenza o acquisiti dalla superficie della cella a flusso, registrate dopo ogni passaggio di sequenziamento iterativo.

Questa massa di informazioni richiede un sistema interconnesso ("*data-pipeline system*") con capacità operativa molto elevata per l'archiviazione, la gestione e l'elaborazione dei dati.

L'operazione di elaborazione principale del "*data-pipeline system*" consiste nella conversione delle immagini acquisite in "*reads*", definita "*base calling*", che richiede un intenso lavoro computazionale. Mediante l'impiego di algoritmi specifici per ogni piattaforma vengono quindi valutati una serie di parametri di immagine quali intensità, rumore di fondo e presenza di eventuali

segnali aspecifici per generare sequenze nucleotidiche e assegnare a ciascuna base punteggi di qualità (“*quality scores*”), correlati alla probabilità di errore. I “*quality scores*” sono uno strumento importante per escludere “reads” ed eliminare basi che mostrano una bassa qualità, per migliorare l’accuratezza dell’allineamento e per determinare una sequenza “*consensus*” e la presenza di basi varianti (“*variant calls*”). L’allineamento è stato ottenuto mediante l’ausilio dell’AVA *software*.

✓ **Validazione dei risultati ottenuti**

Le mutazioni identificate con *deep-amplicon sequencing* sono state validate con le classiche tecniche di sequenziamento *Sanger* utilizzando le procedure di amplificazione in PCR e di sequenziamento descritte nei paragrafi precedenti.

2.5.3 Analisi della Malattia Minima Residua (MRD) mediante Real Time Quantitative PCR (TaqMan)

La tecnologia della RQ-PCR utilizza il saggio TaqMan (*5’ exonuclease detection assay*) che consente la rivelazione e la quantificazione del prodotto di PCR simultaneamente alla sua amplificazione. Si tratta di un saggio di amplificazione modificato (149) in cui, grazie al particolare disegno delle sonde marcate con i fluorocromi e grazie all’attività 5’-3’ esonucleasica della Taq polimerasi, è possibile produrre durante la PCR un segnale fluorescente con intensità direttamente proporzionale al target di reazione. Più in dettaglio, nel saggio TaqMan si introduce, oltre ai due primer, un terzo oligonucleotide fluorescente (sonda o probe) complementare a uno dei due filamenti e situato in posizione intermedia tra i due primer. La sonda è marcata in 5’ con un fluorocromo detto *Reporter* (generalmente FAM) e in 3’ con un fluorocromo detto *Quencher* (generalmente TAMRA). Quando la sonda è intatta, la fluorescenza del Reporter viene inibita dal *Quencher*. Durante la PCR la sonda si ibridizza alla sequenza target all’interno dell’amplicone delimitato dai *primer*. La Taq polimerasi possiede attività 5’-3’ esonucleasica: durante la polimerizzazione la sonda viene tagliata, separando il *Quencher* dal *Reporter* che, libero in soluzione, emette la sua caratteristica fluorescenza che viene rilevata dallo strumento (*ABI Prism 7900 Real Time Quantitative PCR* (TaqMan®) Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Tale processo avviene in ogni ciclo di amplificazione e non interferisce con l’accumulo esponenziale del prodotto di PCR. L’aumento della fluorescenza viene misurato ed è conseguenza diretta dell’amplificazione del target durante la PCR. È necessario che sia i *primer* sia la sonda si ibridizzino al DNA perché si verifichino l’amplificazione e l’idrolisi della sonda: la fluorescenza viene quindi generata solo se viene amplificata la sequenza cui si è legata la sonda. Per tale motivo non si ha amplificazione aspecifica. L’aumento di fluorescenza del *Reporter* è direttamente

proporzionale al numero di ampliconi generati, e ad ogni ciclo della fase esponenziale della PCR la quantità di copie prodotte è in relazione al numero di copie di DNA template di appartenenza.

La RQ-PCR può essere utilizzata per effettuare una quantificazione assoluta o relativa di acido nucleico nel campione in esame. Nel primo caso si determina in maniera accurata la quantità assoluta di acido nucleico nel campione, nel secondo l'obiettivo è di determinare la quantificazione relativa di acido nucleico nel campione in esame in relazione a quella di un campione calibratore. Nel nostro caso viene utilizzata la quantificazione relativa con il metodo della curva standard. È infatti necessario costruire una curva standard con campioni a concentrazione nota: essa è stata ottenuta diluendo serialmente di fattore 10 (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) il DNA dell'esordio. L'esordio è quindi il calibratore in riferimento al quale è espressa la quantità relativa di ogni campione a concentrazione ignota analizzato. Tale quantità relativa è espressa usando la formula (107):

$$\text{Quantità} = 10^{(\text{Ct} - \text{intercetta}) / \text{pendenza}}$$

in cui intercetta (*intercept*) e pendenza (*slope*) sono parametri della curva standard, e Ct (*Cycle Threshold*) è il ciclo della PCR in cui la fluorescenza del campione supera di 10 volte la deviazione standard del rumore di fondo (fluorescenza intrinseca della miscela di reazione, o background). La soglia (*threshold*) corrisponde quindi al livello oltre al quale la fluorescenza rilevata è quella specifica del campione in analisi e non quella del background (figure 18 e 19). In linea teorica (cioè quando l'efficienza di reazione è massima e le diluizioni sono accurate) la differenza di Ct tra diluizioni seriali di fattore 10 consecutive è di 3.3, valore che si riflette in una pendenza pari a -3.3 della curva standard. Interpolando il valore di Ct di un campione ignoto sulla curva standard è possibile calcolarne la quantità in relazione al campione non diluito (calibratore). Generalmente la soglia viene determinata automaticamente dallo strumento, ma è possibile aggiustarla manualmente al fine di ottenere la miglior curva standard possibile.

Per verificare la presenza del clone residuo con la mutazione identificata mediante sequenziamento *Sanger* e *NGS* sono stati disegnati degli ASO (*allele specific oligonucleotide*) primer paziente-specifici. Questi, usati in combinazione con sonde TaqMan fluorescenti, permettono di verificare la presenza dello specifico clone mutato in cellule leucemiche.

2.6 Identificazione di nuove mutazioni geniche coinvolte nella patogenesi delle T-ALL mediante *Whole Exome Sequencing* (Ion Proton Technology) di pazienti alto rischio

2.6.1 *Whole exome sequencing* (Ion Proton technology) di pazienti alto rischio

La tecnologia NGS è un sistema di sequenziamento "high-throughput" in grado di generare in breve tempo e contemporaneamente milioni di sequenze geniche. Il flusso di lavoro prevede il frazionamento del DNA genomico in numerosi frammenti le cui estremità vengono riparate per aggiungere degli adattatori; questi frammenti di DNA vengono poi amplificati simultaneamente per generare una library finale. Le "reads" generate vengono riassemblate usando un genoma umano di riferimento che consente l'allineamento per ricostruire la sequenza del DNA. Con questa tecnica è possibile sequenziare l'intero esoma, che costituisce l'1,4% del genoma umano, in modo da ottenere l'intera regione codificante di un individuo ed identificare le varianti putative di molte patologie.

✓ Piattaforma *Ion Proton*

Nella parte iniziale di questo studio è stata utilizzata la piattaforma *Ion Proton*TM *Sequencer* (*Life technologies*TM) un sistema di sequenziamento che combina la tecnologia dei semiconduttori con la biochimica naturale per tradurre direttamente le informazioni chimiche in dati digitali, senza un sistema di rilevamento ottico fornendo risultati veloci e abbattendo i costi.

L'*Ion Proton*TM *Sequencer* nasce come sequenziatore di tipo "benchtop", letteralmente da bancone" con l'intento di rendere più economica, quindi maggiormente fruibile, la tecnologia NGS.

Anche il protocollo *Ion Torrent* prevede l'amplificazione clonale del campione attraverso *EmulsionPCR* ma il processo di sequenziamento presenta due aspetti essenziali che lo caratterizzano rispetto alle altre tecnologie: a) l'utilizzo dei semiconduttori come elemento strutturale dei supporti in cui viene dispensato il campione per il sequenziamento (*Ion Chips*), e b) l'impiego di un sistema di rilevamento non basato su reazioni luminescenti ma su variazioni di potenziale.

Il primo *step* per l'utilizzo del sequenziatore *Ion Torrent* riguarda la pianificazione della corsa da effettuare mediante il *browser Ion Torrent*. Prima di iniziare, bisogna pulire il sequenziatore preparando uno stock giornaliero di NaOH 1M diluendo NaOH 10 M, per la purificazione del sistema e successivamente settare lo strumento con reagenti specifici attraverso un processo che dura circa 90 minuti. Quando lo strumento è pronto per l'utilizzo si procede con il caricamento del chip. In questa fase, bisogna inizialmente preparare il templatato utilizzando lo *Ion PI*TM *Sequencing 200 Kit v3* che include reagenti e materiali per il sequenziamento di librerie di inserto medio di 200 bp. La *library* preparata con gli adattatori fiancheggiati, viene successivamente amplificata mediante PCR in emulsione, eseguita (con *Ion AmpliSeq*TM *Exome libraries*) aggiungendo 5 µl di *Ion Sphere*TM *Particles* (ISPs) all'intero volume di templatato positivo. In seguito, si esegue l'allineamento dei *primers* di sequenziamento alle biglie e si prepara la calibrazione dello *Ion PI*TM *Chip v2*. Al termine della calibrazione il *Chip* è pronto per l'utilizzo.

Esso è costituito da uno strato superficiale superiore, in cui sono ricavati dei pozzetti appositamente strutturati per poter accogliere le *beads* e i reagenti per il sequenziamento. Ciascun pozzetto ha diametro di pochi micron, tale che in esso possa trovare spazio una sola biglia con DNA consentendo il sequenziamento massivo parallelo dell'intero esoma di un individuo. Questo primo strato superficiale poggia su un secondo costituito da semiconduttori, che permette la trasmissione dei segnali allo strato ancora sottostante. Quest'ultimo è strutturato come una piastra di sensori, uno corrispondente a ciascun pozzetto, che hanno la capacità di registrare le piccolissime variazioni di pH che avvengono all'interno del pozzetto durante il sequenziamento, trasformandole in differenze di potenziale, ovvero, in dati digitali.

Infatti, il principio di questo tipo di sequenziamento si basa su l'emissione sequenziale dei flussi di nucleotidi seguiti da cicli di lavaggio in cui ogni volta che un nucleotide viene incorporato dall'enzima DNA polimerasi nella catena di DNA nascente, viene rilasciato un protone, provocando un cambiamento di pH in ciascun pozzetto. Questo processo viene ripetuto ciclicamente.

Il rilascio dei protoni causa l'abbassamento del pH della soluzione presente all'interno del pozzetto; questa variazione viene trasmessa e registrata dal sensore sottostante e digitalizzata (Figura 12). Durante ciascun flusso, la variazione di pH registrata è direttamente proporzionale al numero delle basi incorporate nella sequenza nascente, e, nel momento in cui la sequenza stampo presenta una zona omopolimerica, l'intensità della variazione di potenziale registrata è tanto superiore quante più sono le basi identiche consecutive.

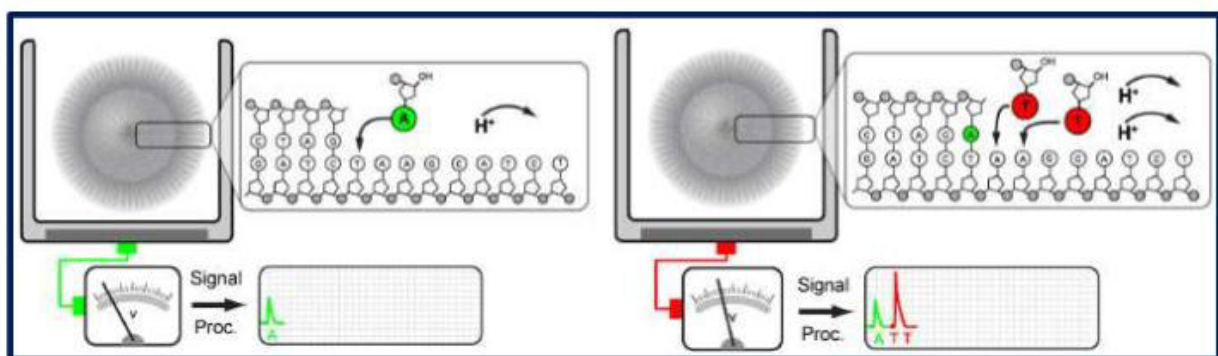


Figura 12. Schema di sequenziamento nell'*Ion Chip*. *Primers*, Dna polimerasi e *beads* a cui è legato il template sono contenuti all'interno di un pozzetto. Ciclicamente fluiscono sulla superficie del chip i quattro nucleotidi. La differenza di potenziale viene registrata per ciascun pozzetto del *chip* ad ogni *flow* e, nel caso si registri una sua variazione, questa è tradotta nella chiamata della base.

Alla fine i dati vengono analizzati mediante il *Torrent Suite™ Software Version 4.0.2*. L'accuratezza di ogni lettura (*reads*) ottenuta con questa tecnologia, può risultare significativamente inferiore rispetto ai risultati generati dal sequenziamento di *Sanger* e per questo

motivo viene generalmente richiesta una validazione utilizzando i tradizionali metodi di sequenziamento.

Due ulteriori strumenti vengono impiegati nel sistema *Ion Technology*: *Ion OneTouch DL*, che svolge il compito di effettuare automaticamente l'*EmulsionPCR*, e il *OneTouch ES*, che viene utilizzato per l'arricchimento/purificazione del campione successivamente alla reazione di amplificazione clonale.

Di seguito è raffigurato un esempio di workflow di sequenziamento di un esoma con il sistema Ion Proton (Figura 13).

Exome sequencing workflow

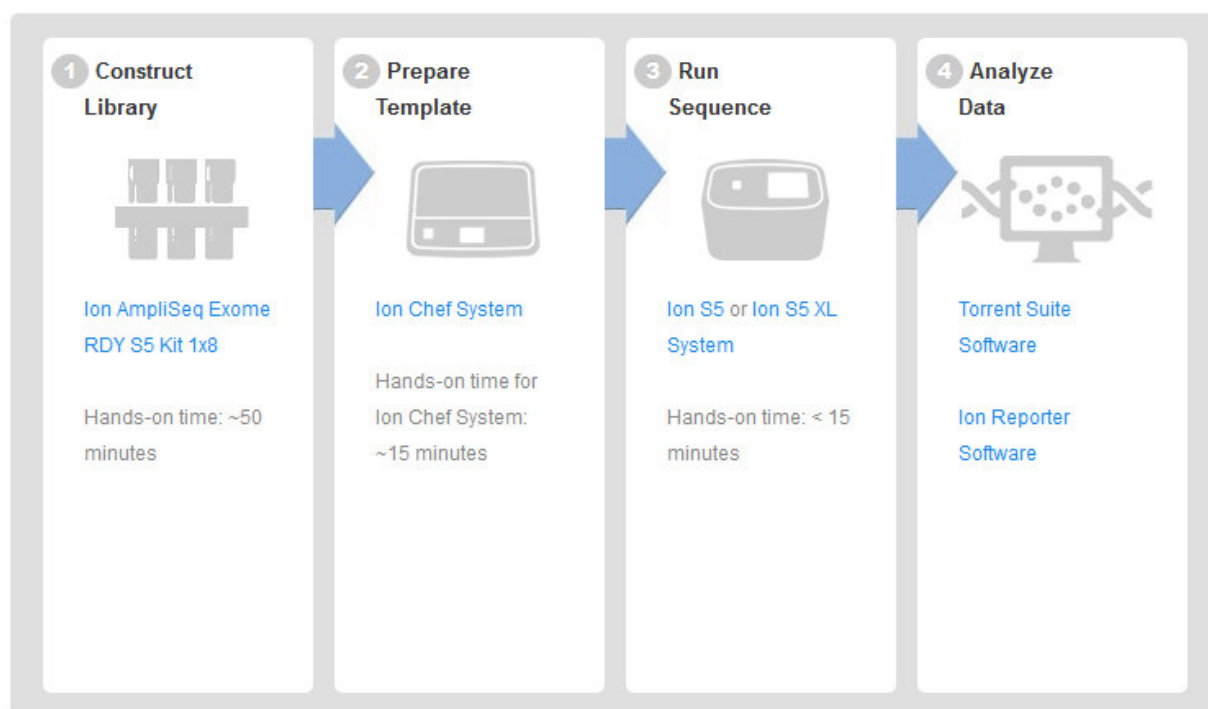


Figura 13. Steps di una corsa di sequenziamento di esoma mediante *Ion Technology*.

2.6.2 Analisi di ricorrenza di geni selezionati

✓ Amplificazione del gene di interesse mediante PCR

La *touchdown PCR* è la metodica utilizzata per l'amplificazione degli esoni 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 del gene WEE1.

La reazione è stata effettuata utilizzando la Taq DNA Polimerasi, 5 U/ μ l (*TAQ-RO ROCHE* cat# 000000011435094001) in un volume di 20 μ l. Il protocollo con le quantità e le concentrazioni dei reagenti utilizzati sono schematizzati nella tabella seguente.

REAGENTE	VOLUME
<i>Buffer 10X</i>	2 μ l
DMSO 100%	0,8 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	1,2 μ l
dNTPs (10 μ M)	1 μ l
<i>Primer FW</i> (5 μ M)	2 μ l
<i>Primer REV</i> (5 μ M)	2 μ l
Taq polimerasi (5U/ μ l)	0,2 μ l
H ₂ O	9,8 μ l
DNA (20ng/ μ l)	1 μ l
Volule finale di reazione	20 μ l

La reazione viene eseguita su *Mastercycler epgradient (Eppendorf)* alle seguenti condizioni:

FASE	TEMPERTURA	TEMPO	
Denaturazione iniziale	95°C	3'	
Denaturazione	94°C	15"	22 cicli
Annealing	61-50°C (-0,5°C/ciclo)	15"	
Estensione	72°C	1'	
Denaturazione	94°C	15"	
Annealing	50°C	30"	
Estensione	72°C	1'	
Estensione finale	72°C	5'	

Mantenimento	4°C	∞	
--------------	-----	---	--

Il gene *WEE1* per cui sono stati disegnati i *primers* è l'isoforma WEE1-001 (*ensembl Protein_Coding Gene* ENSG00000166483), che codifica per la relativa proteina di 646 amminoacidi (*ensembl Transcript id* ENST00000450114) da un trascritto primario di 2799 bp, localizzato sul cromosoma 11 tra 9,573,681 e 9,593,457.

Di seguito sono riportati i *primers* utilizzati:

- *WEE1* esone 4 Forward - TCACACATAGCCCTATCACCA
- *WEE1* esone 4 Reverse - AGGGGACAAAAGAGCAAAAGAC
- *WEE1* esone 5 Forward - ACCCCTTCTCTCTTAAGCAAG
- *WEE1* esone 5 Reverse - TCTCAAGCTCACAAGAAAACCA
- *WEE1* esone 6 Forward - TGGTTGGTTGAGACTCATTTGG
- *WEE1* esone 6 Reverse - ACCCAAAGAACACAGGTCA
- *WEE1* esone 7 Forward - CTGGTTTCTGTCCCCTGAGA
- *WEE1* esone 7 Reverse - GCCCTCTTCAACTTGTGGAC
- *WEE1* esone 8 Forward - GCTGCCTCTGAAGAAGGAGA
- *WEE1* esone 8 Reverse - TGCCCTCAGATGACGGTTA
- *WEE1* esone 9 Forward - AGGTCCCAAACCTTAAATGTGGT
- *WEE1* esone 9 Reverse - ACCATGTCAATAAAGGGCTTCA
- *WEE1* esone 10 Forward - ACAGAGTTGCTAAAAGTGAGCA
- *WEE1* esone 10 Reverse - TGATGACAGTGAGACCCTGT

La *PCR* è la metodica utilizzata per l'amplificazione dell'esone 7 del gene *MAPK1* e dell'esone 5 del gene *CCND3*.

La reazione è stata effettuata utilizzando la Taq DNA Polimerasi, 5 U/μl (*TAQ-RO ROCHE* cat# 000000011435094001) in un volume di 20 μl. Il protocollo con le quantità e le concentrazioni dei reagenti utilizzati sono schematizzati nella tabella seguente.

REAGENTE	VOLUME
<i>Buffer</i> 10X	2 μl
DMSO 100%	0,8 μl

MgCl ₂ (25 mM)	1,2 µl
dNTPs (10µM)	1 µl
<i>Primer FW</i> (5µM)	2 µl
<i>Primer REV</i> (5µM)	2 µl
Taq polimerasi (5U/µl)	0,2 µl
H ₂ O	9,8 µl
DNA (20ng/ul)	1 µl
Volule finale di reazione	20 µl

La reazione viene eseguita su *Mastercycler epgradient (Eppendorf)* alle seguenti condizioni:

FASE	TEMPERTURA	TEMPO	
Denaturazione iniziale	94°C	3'	
Denaturazione	94°C	15"	45 cicli
Annealing	60°C	45"	
Estensione	72°C	1'	
Estensione finale	72°C	8'	
Mantenimento	4°C	∞	

Il gene *MAPK1* per cui sono stati disegnati i *primers* è l'isoforma MAPK1-001 (*ensembl Protein_Coding Gene* ENSG00000100030), che codifica per la relativa proteina di 360 amminoacidi (*ensembl Transcript id* ENST00000215832) da un trascritto primario di 11022 bp, localizzato sul cromosoma 22 tra 21,754,500 e 21,867,680.

Il gene *CCND3* per cui sono stati disegnati i *primers* è l'isoforma CCND3-001 (*ensembl Protein_Coding Gene* ENSG00000112576), che codifica per la relativa proteina di 292

amminoacidi (*ensembl Transcript id ENST00000372991*) da un trascritto primario di 2085 bp, localizzato sul cromosoma 6 tra 41,934,933 e 42,050,357.

Di seguito sono riportati i *primers* utilizzati:

- *MAPK1 ex7 Forward* - GGTCGGTCCCTATGTTTCCACA
- *MAPK1 ex7 Reverse* - CGGGTATGGCAGCAGGTATA
- *CCND3 ex5 Forward* - TGGCCCTAGGGGTTCTTTTCTTG
- *CCND3 ex5 Reverse* - TCCTCTGCTTAGTGGCCAC

I prodotti di PCR ottenuti sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in gel d'agarosio al 2% e purificati con l'enzima *ExoProStar™ 1-Step* (Illustra™), con come descritto in precedenza, per procedere con la reazione di sequenziamento.

✓ Sequenziamento Sanger dei prodotti di PCR

La reazione è stata effettuata utilizzando il kit BigDye® Terminator v3.1 (ABI PRISM®) in un volume di 20 µl. Il protocollo con le quantità e le concentrazioni dei reagenti utilizzati sono schematizzati nella tabella seguente.

REAGENTE	VOLUME
<i>Sequencing Buffer (1X)</i>	1 µl
<i>BigDye Terminator v3.1</i>	1 µl
<i>Primer (5µM)</i>	0,5 µl
H ₂ O	14 µl
Prodotto di PCR purificato	3,5 µl
Volule finale di reazione	20 µl

Diversamente dai geni *WEE1*, *MED12* e *MAPK1*, per il gene *CCND3* i *primers* utilizzati per la reazione di sequenziamento sono diversi rispetto a quelli utilizzati durante la fase di amplificazione, come riportato di seguito:

- *CCND3 Seq Primer Forward* 5'- CCCCTGCACCTGCTGCCAGAT -3'
- *CCND3 Seq Primer Reverse* 5'- GCTACAGGTGTATGGCTGTG -3'

La reazione viene eseguita su *Mastercycler epgradient (Eppendorf)* alle seguenti condizioni:

FASE	TEMPERTURA	TEMPO	
Denaturazione iniziale	96°C	1'	
Denaturazione	96°C	10"	25 cicli
Annealing	50°C	5'	
Estensione	60°C	4'	
Mantenimento	4°C	∞	

Il prodotto di sequenza è stato poi purificato in etanolo/Sodio Acetato come precedentemente descritto e alla fine della procedura, il DNA precipitato è stato risospeso in 20 µl di formammide Hi-Di™ (Applied Biosystems) per esser sottoposto all'elettroforesi capillare.

✓ **Elettroforesi capillare e analisi dei dati**

La piastra contenente i campioni sospesi in formamide è stata spinnata brevemente e inserita nel sequenziatore *Applied Biosystems® 3500 Series Genetic Analyzer* per esser sottoposta ad elettroforesi capillare in cui 8 capillari consentono l'analisi simultanea di 8 campioni in un'unica iniezione e in un tempo variabile da circa 20 minuti a 2 ore che dipende dalla grandezza dell'amplicone. L'intensità della fluorescenza emessa viene misurata da un detector che rileva la sequenza di basi elaborata dal *software Sequencing Analysis* (Figura) in picchi di colore diverso costituenti il cromatogramma che è stato analizzato per ciascun paziente. Ciascun cromatogramma ottenuto è stato visualizzato tramite il software *ChromasLite* per evidenziare la presenza di eventuali anomalie nella sequenza e confrontando l'omologia di ciascuna sequenza con quella di interesse mediante il sito per l'allineamento delle sequenze BLAST (*The Basic Local Alignment Search Tool*) è stato possibile individuare diverse mutazioni.

2.6.3 Amplificazione *in vitro* del trascritto CCND3

✓ **Retrotrascrizione**

La retrotrascrizione di molecole di RNA consente di ottenere copie di cDNA prodotte dall'enzima trascrittasi inversa che utilizza un corto innesco oligonucleotidico complementare alla coda poli-A dell'RNA.

Per ogni campione in cui è stata individuata la mutazione e per un controllo, è stato preparato in un eppendorf da microcentrifuga nuclease-free, 0,5-1 µg/ µl di RNA per campione al volume finale di 10 µl con acqua sterile, che si incuba a 72°C per 3 minuti, a cui poi si aggiunge 1 µl di 50-250 ng di random primer e 1 µl di dNTP (10 mM) portando al volume di 12 µl. Si incuba a 65°C per 5 minuti e si porta velocemente in ghiaccio. Dopo una breve centrifuga per raccogliere il contenuto sul fondo della provetta, si aggiunge 4 µl di First-Strand Buffer 5X, 2 µl di DTT 0,1 M che ottimizza il lavoro della trascrittasi inversa e riduce i ponti disolfuro; e 1µl di RNaseOUT™ (40 unità/ µl) richiesta quando si usano < 50 ng di RNA iniziale e viene incubato tutto a 25°C per 2 minuti. Al termine di questo step si aggiunge 1µl di SuperScript™ II RT(200 unità), una trascrittasi Mo-MLV ingegnerizzata in cui l'attività endonucleasica è assente (Invitrogen Life Technologies), mixando gentilmente ed 1 µl di RNase H (2 unità) di *E.Coli* che rimuove l'RNA complementare al cDNA incubando a 25°C per 10 minuti, 42°C per 50 minuti e 70°C per 15 minuti, per inattivare la reazione. Il singolo filamento di cDNA ottenuto è stato copiato in un cDNA a doppio filamento dalla DNA polimerasi utilizzando un frammento dell'mRNA originale come innesco per la reazione di sintesi. Quindi il cDNA è stato utilizzato come template per la reazione di amplificazione, a conferma dell'avvenuta reazione di retrotrascrizione. La seguente PCR è stata effettuata aggiungendo: 2 µl di Buffer 10X [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500mM KCl], 0,4 µl dNTPs (10mM), 0,4 µl di MgCl₂ (25mM), 0,2 µl di Forward primer (20µM) e 0,2 µl di Reverse primer (20µM), 0,08 µl *Taq* DNA polimerasi (5U/µl) e 15,8 µl di acqua sterile, per un volume finale di 20 µl. Per ogni campione è stato messa 19 µl di mix e 1 µl di cDNA, avviando il seguente programma:

FASE	TEMPERTURA	TEMPO	
Denaturazione iniziale	96°C	3'	
Denaturazione	94°C	30"	35 cicli
Annealing	60°C	30"	
Estensione	72°C	30"	
Mantenimento	4°C	∞	

Infine il prodotto di PCR è stato fatto correre in gel d'agarosio al 2%.

✓ Amplificazione del cDNA

L'intera sequenza del trascritto (*coding DNA sequence, CDS*) del gene *CCND3*, dei pazienti che presentano la mutazione, è stato amplificato utilizzando una coppia di *primers* con sequenze specifiche che verranno riconosciute dagli enzimi di restrizione *EcoRI* e *XhoI* per consentire la digestione del frammento dopo il processo di clonaggio delle sequenze stesse.

Primers utilizzati:

- *CCND3 Forward EcoRI* - 5'- agctGAATTCGAGTATGGAGCTGCTGTGTT - 3'
- *CCND3 Reverse XhoI* - 5'- agctCTCGAGCCAGGGCTACAGGTGTATGGCTGTG - 3'

La reazione di amplificazione è stata eseguita con i seguenti reagenti costituenti il mixture:

- 5 µl di *Buffer 10X*
- 1 µl di *dNTPs* (10 µM)
- 3 µl di DMSO 100%
- 2 µl di *Primer Forward EcoRI* (10 picomoli/µl)
- 2 µl di *Primer Reverse XhoI* (10 picomoli/µl)
- 2 µl *Taq DNA polimerasi* (dil 1:10)
- Acqua sterile al volume finale di 50 µl.

Ad ogni campione è stata distribuita 48,5 µl di mix in ghiaccio a cui è stato aggiunto 1,5 µl di cDNA.

La reazione viene eseguita su *Mastercycler epgradient (Eppendorf)* alle seguenti condizioni:

FASE	TEMPERTUR	TEMPO	
Denaturazione iniziale	94°C	2'	
Denaturazione	94°C	30"	35 cicli
Annealing	62°C	30"	
Estensione	72°C	2'	
Estensione finale	72°C	10'	

Mantenimento	4°C	∞	
--------------	-----	---	--

I campioni vengono sottoposti ad elettroforesi in gel d'agarosio 1,5% (1,5 gr di agarosio in 100 ml di TAE 1X).

✓ Sequenziamento del cDNA

Il prodotto di PCR del CDS del gene *CCND3* è stato infine sequenziato come riportato precedentemente, procedendo con la purificazione iniziale del prodotto di PCR seguita dalla reazione di sequenza con il kit BigDye[®] Terminator v3.1 (ABI PRISM[®]) utilizzando il *Primer Forward* 5'- CTGGAGGAGCGCTACGTAC- 3' (5 picomoli/μl). Il termocilcatore è stato impostato con lo stesso programma allestito precedentemente. Al termina della reazione il cDNA è stato purificato con un sistema più rapido, avendo pochi campioni da preparare per il sequenziamento. Il protocollo per la purificazione della reazione di sequenza da *ABI BigDye v3.1 con AutoSeq G-50 Dye Terminator Removal kit* (Illustra) prevede inizialmente la preparazione della colonna che viene vortexata per risospendere la resina presente all'interno; successivamente si posiziona la colonna in un tubo di supporto per esser centrifugata a 2000 x g per 1 minuto. Nel secondo step si posiziona la colonnina in un nuovo tubo da 1,5 ml e si applica 20 μl di campione da purificare al centro della resina, avendo cura di non toccarla. Il campione viene eluito dalla resina mediante centrifugazione a 2000 x g per 1 minuto. Alla fine di questa procedura il campione purificato può esser caricato nella piastra che verrà inserita nel sequenziatore *Applied Biosystems[®] 3500 Series Genetic Analyzer*, dopo aver risospeso 5 μl di prodotto purificato con 15 μl di formammide Hi-Di[™] (*Applied Biosystems*). A questo punto i campioni vengono fatti correre in elettroforesi capillare e la successiva analisi del cromatogramma che è stato allineato con il programma per l'allineamento BLAST (*The Basic Local Alignment Search Tool*) ha confermato l'espressione delle mutazioni a livello di cDNA.

2.6.4 Clonaggio del trascritto CCND3

✓ Purificazione del cDNA

Il prodotti di PCR del paziente selezionato per lo studio funzionale e del controllo *wildtype*, è stato purificato dai reagenti utilizzati nella reazione di amplificazione, mediante l'impiego delle colonnine *Vivaspin 500 (Sartorius)*. Questi dispositivi di ultrafiltrazione monouso consentono di concentrare il campione in un unico passaggio: il prodotto di PCR viene messo nella colonnina che viene centrifugata a 4000 rpm per 7 minuti. Dopo aver centrifugato, è stato prelevato il prodotto

purificato dalla colonnina (circa 20 μ l) e trasferito in una nuova *ependorf tube*. Infine, la concentrazione del prodotto purificato è stata misurata con lo spettrofotometro *NanoDrop 1000* (ThermoSCIENTIFIC).

✓ **Clonaggio del cDNA**

I prodotti di PCR mutato *e wildtype*, sono stati clonati in un vettore plasmidico utilizzando il kit *TOPO® TA-Cloning* (Invitrogen). Per la ligazione dell'inserto al vettore plasmidico pCR® 2.1 TOPO VECTOR è stato preparato la seguente mix di reazione:

- 2,5 μ l di prodotto di PCR
- 1 μ l di salt solution
- 1,5 μ l di dH₂O
- 1 μ l di TOPO vector

La mix è stata incubata 10 minuti a temperatura ambiente per favorire l'inserimento dell'inserto al vettore. In seguito, sono stati aggiunti 2 μ l della reazione TOPOcloning ai rispettivi tubi contenenti le cellule competenti di *E.Coli* TOP10 (Invitrogen), che vengono incubati in ghiaccio per 30 minuti. Nel passaggio successivo, lo shock termico delle cellule a 42°C per 30 secondi in bagnetto, consente il trasferimento del plasmide all'interno della cellula. I tubi vengono riposizionati immediatamente in ghiaccio per 2 minuti alla fine dei quali viene aggiunto 300 μ l di S.O.C. Medium a temperatura ambiente. Le cellule trasformate vengono poi incubate in agitazione a 37°C per circa un'ora, mantenendo il tubo orizzontale. Una volta replicate, le cellule sono state piastrate in terreno solido LB con Carbenicillina, distribuendo una diluizione di 50 μ l di crescita batterica in 100 μ l di S.O.C. Medium in una piastra e il resto della crescita batterica in un'altra; infine le piastre sono state incubate capovolte overnight a 37°C. Il giorno successivo, sono state piccate con il puntale 10 colonie dell'inserto con la mutazione e 5 colonie dal controllo direttamente dalla piastra, e vengono fatte crescere ciascuna in 3 ml di terreno LB liquido (10 gr di triptone, 5 gr di yeast, 10 gr di NaCl, 0,5 ml di NaOH [10 N], 10 gr di agar) con 3 μ l di Carbenicillina 1X per un'altra notte in agitazione a 37°C per poi procedere alla purificazione del DNA plasmidico.

✓ **Estrazione del DNA plasmidico mediante miniprep**

Il DNA plasmidico clonato nelle cellule competenti, è stato estratto da 10 colonie mutate e 5 colonie *wildtype* seguendo il protocollo del kit *FastPlasmid™ Mini Kit* (5PRIME).

- Sono stati prelevati 2 ml di coltura batterica liquida per ciascun campione e messi in una *ependorf* da 2 ml per esser centrifugati a 14.000 rpm per 1 minuto al fine di pellettare la cellule;

- Dopo aver eliminato il surnatante, è stata aggiunta 400 µl di *Lysis Solution* fredda e la provetta è stata vortexata per 30 secondi al setting più alto;
- In seguito, si incuba a temperatura ambiente per 3 minuti.
- Il lisato si trasferisce in una *Spin Column* assemblata e si centrifuga per 1 minuto alla velocità di 14.000 rpm;
- Alla fine della centrifuga, si elimina il filtrato e si riassume la colonnina per aggiungere 400 µl di *Wash Buffer* diluito e si centrifuga per 1 minuto alla velocità di 14000 rpm;
- Il filtrato viene decantato dal tubo di raccolta e dopo aver riassume la colonnina si centrifuga nuovamente per 1 minuto a 14.000 rpm
- Successivamente la *Spin Column* si trasferisce in un nuovo tubo e vengono aggiunti 25 µl di acqua deionizzata al centro della colonna, e si incuba a temperatura ambiente per 1 minuto;
- Infine, si centrifuga il tutto per 1 minuto alla velocità di 14.000 rpm e al termine si butta via la *Spin Column* e si quantifica 1 µl di DNA plasmidico per ciascun campione allo spettrofotometro *NanoDrop 1000* (ThermoSCIENTIFIC).
- Generalmente si estraggono circa 400 ng di DNA plasmidico.

✓ **Reazione di restrizione**

La presenza dell'inserto nel DNA batterico estratto, è stata verificata mediante la digestione enzimatica che è stata eseguita con gli enzimi di restrizione *EcoRI* e *XhoI* (Promega) che tagliano a monte e a valle del transgene inserito nel plasmide, generando due frammenti, uno corrispondente all'intero plasmide della lunghezza di 3,9 Kb, e l'altro corrispondente al frammento di 900 bp. La mix di reazione contiene per ogni campione:

- 2 µl di *Buffer 4*
- 2 µl di BSA
- 0,3 µl di *EcoRI*
- 0,3 µl di *XhoI*
- 2 µl di plasmide (ca.200 ng)
- 13,4 µl di H₂O, per un volume finale di 20 µl.

La reazione è stata effettuata per 2 ore in bagnetto a 37°C, e successivamente fatta correre in gel d'agarosio al 1,5% per selezionare le colonie contenenti l'inserto da quelle vuote.

✓ **Sequenziamento del DNA plasmidico**

Le colonie che presentano l'inserto sono state sequenziate con *primers* universali *M13 Forward* e *M13 Reverse* per confermare la sequenza di *CCND3* mutato e *CCND3 wildtype*. Il vettore, ottenuto

mediante estrazione dai batteri con *miniprep*, è stato sequenziato utilizzando il kit *BigDye Terminator v3.1* (Applied Biosystems). La mix utilizzata per la reazione di sequenza di ogni campione contiene:

- 3 µl di buffer 5x;
- 1 µl di Big Dye Terminator;
- 2,5 µl di primer (2 pmol/ µl);
- 2 µl di plasmide (ca. 200 ng);

La reazione è stata eseguita come segue:

FASE	TEMPERATURA	TEMPO	
Denaturazione iniziale	96°C	4'	
Denaturazione	96°C	10"	25 cicli
Annealing	55°C	5"	
Estensione	60°C	4'	
Mantenimento	4°C	∞	

Terminata la reazione di sequenziamento, è necessario eseguire la purificazione su colonna per eliminare i ddNTPs e i *primers* in eccesso. A tale scopo, sono state utilizzate le colonne *AutoSeq G-50 Dye Terminator Removal kit* (Illustra) come descritto nel paragrafo precedente. Dopo la purificazione, a 5 µl di ciascun prodotto della reazione di sequenza sono stati aggiunti 10 µl di formamide. Per l'analisi della sequenza è stato utilizzato lo strumento *3500 Series Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*[®]). Le sequenze ottenute sono state allineate con la sequenza del cDNA del gene utilizzando il programma BLAST (*The Basic Local Alignment Search Tool*) per identificare il frammento inserito e verificare la presenza della mutazione.

CAPITOLO 3

Analisi di geni noti mutati in modo ricorrente nelle T-ALL pediatriche

3. INTRODUZIONE

3.1 *NOTCH1*

3.1.1 Struttura e funzione

Il *pathway* di *Notch1* è un meccanismo conservato evolutivamente che controlla una vasta gamma di processi cellulari inclusi il differenziamento, la proliferazione e l'apoptosi. I segnali trasdotti dal recettore *Notch1* controllano le risposte della cellula a stimoli intrinseci ed estrinseci e necessitano del contatto tra due cellule adiacenti.

Il gene *NOTCH1* codifica per una proteina di circa 300 kDa sintetizzata nel reticolo endoplasmatico in una forma inattiva che viene processata proteoliticamente da una furin-proteasi nel network del trans-Golgi, generando un frammento extracellulare (NEC) ed un frammento transmembrana (NTM). Questi due frammenti, legati uno all'altro in modo non covalente attraverso il dominio di eterodimerizzazione (HD), sono poi presentati come recettore di membrana.

Il dominio extracellulare (circa 1700 aa) si compone di 29-36 ripetizioni in tandem tipo EGF, seguite da tre ripetizioni Notch/Lin-12 (LNR) ricche in cisteina, probabilmente implicate nel mantenimento del recettore in uno stato inattivo in assenza di legame (42). Nel dominio intracellulare sono stati individuati 6 "repeats" ANK, un dominio ricco di glutammina ed una sequenza PEST, ricca in prolina (P), acido glutammico (E), serina (S) e treonina (T); entrambi i domini sono implicati nei processi degradativi della proteina (43).

L'attivazione del recettore *NOTCH1* avviene solitamente tramite il contatto cellula-cellula e l'interazione di una proteina con il ligando espresso sulla superficie di una cellula vicina. Il modello di attivazione *NOTCH1* supporta che l'interazione ligando-recettore induce un cambiamento conformazionale delle ripetizioni LNR che si traduce in:

- la dissociazione delle subunità HD;
- l'esposizione di un sito di taglio da parte di metalloproteasi a livello del C-terminale del dominio HD;
- rilascio del dominio intracellulare di NOTCH1 dalla membrana tramite un doppio taglio proteolitico del recettore (Figura 1).

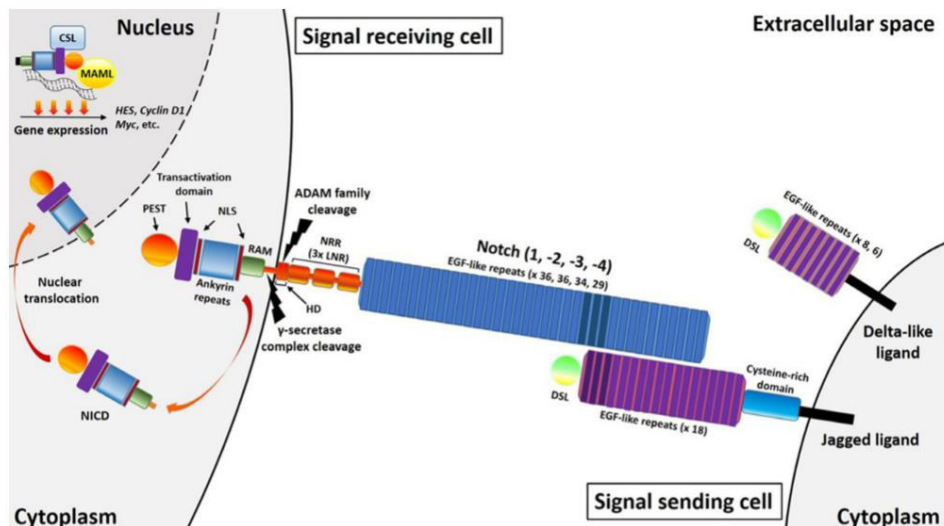


Figura 1. Rappresentazione del pathway NOTCH1 (71).

I due tagli proteolitici mediano l'attivazione di NOTCH1. Innanzitutto, una metalloproteasi extracellulare tipicamente ADAM10 o ADAM17, cliva il recettore nella porzione C-terminale del dominio HD (taglio S2). Questo taglio genera una proteina troncata con una breve stub extracellulare che è riconosciuta e successivamente clivata (taglio S3) dal complesso della γ -secretasi, una aspartil proteasi responsabile del taglio e del rilascio di ICN1 nel citosol.

ICN1 possiede due sequenze di localizzazione nucleare e viene quindi traslocato all'interno del nucleo dove agisce da fattore trascrizionale interagendo col fattore di trascrizione RBP-J (anche conosciuto come CBF1 o CSL) ed altre proteine come MAML1 (mastermindlike 1) e p300 (44).

In particolare, l'attivazione della trascrizione di geni bersaglio *NOTCH1* è accoppiato con un meccanismo attivo che assicura la rapida terminazione del segnale di *NOTCH1*. Quindi, il reclutamento della RNA polimerasi II al complesso ICN-MAML-RBPJ/CSL innesca la fosforilazione del dominio PEST del recettore e la sua degradazione mediata dal proteasoma tramite il complesso ubiquitina ligasi FBXW7-SCF (43).

FBXW7 (F-box and WD repeat domain containing 7) è una ubiquitina ligasi, che interagisce con *NOTCH1* nel nucleo e fa parte del complesso SCF (SKP1-Cullin-1-F-box complesso proteico) che può colpire diversi importanti regolatori del ciclo cellulare, tra cui *MYC*, jun e ciclina E. **FBW7** lega un *degron* (Thr2512) nella parte più distale del dominio PEST di *NOTCH1*. Questo *degron* legante *FBW7* è conservato in tutti i membri della famiglia *NOTCH* nei mammiferi. L'importanza di questo *degron* è dimostrata dal fatto che è delecto in tutte le mutazioni NOTCH1 PEST identificate nelle T-ALL (70).

3.1.2 Il Notch signalling nello sviluppo dei linfociti T

NOTCH è implicato in molte vie che riguardano le fasi dello sviluppo dei linfociti T (128, 129): controlla la generazione di cellule T o cellule B dai progenitori delle cellule linfoidi (130), agisce allo stadio di biforcazione $\alpha\beta$ - $\gamma\delta$, regola la decisione dei timociti di divenire cellule T CD4⁺ helper o CD8⁺ killer; ed infine controlla la suscettibilità delle cellule T all'apoptosi (131, 132).

Lo sviluppo dei linfociti T inizia nel timo, un organo linfoide primario che possiede un microambiente unico per lo sviluppo dei progenitori ematopoietici multipotenti (CLP).

La differenziazione in cellule T mature prevede riarrangiamenti di differenti geni del TCR ed eventi di selezione positiva e negativa che portano poi all'espressione di TCR $\alpha\beta$ -TCR $\gamma\delta$ maturi ed in grado di riconoscere peptidi "*non-self*" presentati dal complesso maggiore di istocompatibilità (MHC). Questo processo passa attraverso una serie discreta di stadi fenotipici che sono distinti per l'espressione di molecole di membrana. I più precoci precursori timici non hanno espressione né di CD4 né di CD8 e sono definiti come doppi negativi (DN). La popolazione di DN può essere ulteriormente divisa in consecutivi stadi di sviluppo, nel topo questo avviene in base all'espressione del CD44 e della catena del recettore dell'IL-2 (CD25): DN1 (CD44⁺ CD25⁻), DN2 (CD44⁺ CD25⁺), DN3 (CD44⁻ CD25⁺), DN4 (CD44⁻ CD25⁻); nell'uomo si usano come marcatori CD34 e CD1a: cellule CD34⁺ CD1a⁻ corrispondono allo stadio DN1-DN2 e cellule CD34⁺ CD1a⁺ sono omologhe a cellule DN3 (133). La popolazione umana DN4 è difficilmente distinguibile dai timociti appartenenti allo stadio differenziativo successivo di singoli positivi (ISP) caratterizzato da CD4⁺ CD3⁻. Poiché il numero di progenitori che entrano nel timo è limitato, c'è un'espansione durante gli stadi DN1 e DN2. Nello stadio DN3 le cellule smettono di proliferare ed incominciano a riarrangiare i loci TCRB attivando i geni che determinano la ricombinazione (RAG1/2), portando ad una catena TCR β completa durante lo stadio DN4/ISP. Quando i timociti si differenziano in cellule ISP, la funzionalità della catena TCR β è consentita dall'assemblaggio sulla superficie cellulare con un surrogato della catena α , detta preTCR α (pTalfa), ed il CD3 a formare un pre-TCR completo: questo processo è chiamato selezione β . L'espressione del pre-TCR promuove la sopravvivenza e la proliferazione dei timociti DN4/ISP, l'inibizione di ulteriori riarrangiamenti dei loci TCRB, l'inizio dei riarrangiamenti dei loci TCRA ed il differenziamento in cellule DP (CD4⁺ CD8⁺).

Circa il 95% dei timociti che si sono differenziati muore per apoptosi, i restanti diventano cellule SP che maturano in linfociti helper CD4⁺ o in linfociti citotossici CD8⁺ e migrano dal timo come linfociti T naive circolanti.

La via di trasduzione del *NOTCH* è variamente coinvolta durante tutte le fasi del differenziamento dei precursori ematopoietici in linfociti T maturi. *NOTCH1* è attivo nel polarizzare il differenziamento dei CLP in precursori delle cellule T piuttosto che delle cellule B, favorisce lo

sviluppo del TCR $\alpha\beta$ rispetto al TCR $\gamma\delta$ ed il passaggio dei timociti DP a linfociti citotossici CD8⁺ (128, 129, 132, 134, 135).

Nell'attivazione del sistema ematopoietico *NOTCH1* gioca un ruolo critico in più fasi di sviluppo delle cellule T. L'alterata funzione di *NOTCH1* nei progenitori ematopoietici si traduce in un blocco completo nelle prime fasi di linfopoiesi delle cellule T a causa del fallimento della specificazione del *lineage* delle cellule T. Così, i topi portatori di una delezione di *NOTCH1* non riescono a sviluppare le cellule T, e mostrano uno sviluppo ectopico delle cellule B nel timo. Al contrario, i topi immunodeficienti che esprimono una forma costitutivamente attiva di *NOTCH1* mostrano lo sviluppo ectopico delle cellule T nel midollo osseo e non riescono a produrre linfociti B (43). Oltre a questo ruolo nelle prime fasi specifiche del destino delle cellule T, il *signaling NOTCH1* è continuamente richiesto a diversi stadi di sviluppo delle cellule T e svolge un ruolo nella progressione attraverso gli stadi di maturazione iniziali dei timociti DN1, DN2 DN3; partecipa alla regolazione del riarrangiamento del gene TCRB; e regola il destino della biforcazione tra $\alpha\beta$ - $\gamma\delta$ (43).

3.1.3 Anomala attivazione del *NOTCH1 signaling* nelle T-ALL

L'attivazione costitutiva di *NOTCH1* nelle T-ALL è stata dimostrata in casi di leucemia con la traslocazione t(7; 9)(q34; q34.3), che giustappone il gene *NOTCH1* troncato in vicinanza del locus del TCRB. A seconda della posizione esatta del punto di rottura della traslocazione e il sito di inizio della traduzione, questi alleli *NOTCH1* troncati codificano per recettori legati alla membrana che sono rapidamente processati dal complesso γ -secretasi a causa della mancanza delle ripetizioni HD-LNRs, o per proteine intracellulari prive di domini transmembrana, che non richiedono il processamento da parte della γ -secretasi per l'attivazione (27). La forte attività oncogenica di *NOTCH1* costitutivamente attivato è stata dimostrata dallo sviluppo di T-ALL nei topi trapiantati con progenitori emopoietici infettati con retrovirus per l'espressione di ICN1 (46).

L'identificazione di mutazioni del gene *NOTCH1* in più del 60% dei pazienti T-ALL (25) ha portato allo sviluppo di farmaci molecolari antileucemici specifici.

Le mutazioni *NOTCH1* caratterizzate nelle T-ALL influenzano domini critici responsabili dell'attivazione spontanea del recettore in assenza del legame con il ligando o importanti nella terminazione del *signaling NOTCH1* nel nucleo. Le principali regioni di *hot spots* di mutazione sono state descritte negli esoni 26 e 27 del gene, che codificano rispettivamente i componenti N-terminale e C-terminale del dominio HD, (25). Tali mutazioni del dominio HD sono presenti in circa il 40% delle T-ALL.

Di seguito sono elencati i diversi tipi di mutazioni caratterizzati a livello del gene *NOTCH1* (Figura 2) (48):

- Mutazioni NOTCH1 HD (classe I, HD1): sono tipicamente sostituzioni di amminoacidi singoli o piccole delezioni e inserzioni in-frame. Queste mutazioni risultano nell'attivazione ligando-indipendente del recettore riducendo la stabilità del complesso LNR-HD;
- Mutazioni NOTCH1 HD (classe II, HD2): sono lunghe inserzioni nella parte distale del dominio HD codificate dall'esone 27. Queste mutazioni, allontanando il sito taglio S2 della metalloproteasi dalla protezione del LNR-HD, si traducono in elevati livelli di attivazione ligando-indipendente;
- Mutazioni JME (*Juxtamembrane expansion mutants*): consistono di duplicazioni in tandem interne all'estremità 3' dell'introne 27 e/o nella regione prossimale dell'esone 28, che spostano il complesso LNR-HD lontano dalla membrana senza alterare la struttura primaria. Tali alterazioni comportano l'attivazione aberrante di *NOTCH1* alla membrana. L'attivazione degli alleli *NOTCH1* JME richiede il processamento da parte di ADAM e della γ -secretasi e si traduce in livelli molto elevati di *NOTCH1*.
- Mutazioni NOTCH1 Δ PEST: presenti nel 20-25% delle T-ALL, sono tipicamente sostituzioni *frameshift* o sostituzioni nucleotidiche nonsense che generano codoni di stop prematuri nella porzione C-terminale del recettore. La perdita del dominio PEST risulta nell'aumento dei livelli della forma attiva di *NOTCH1* a causa dell'alterata degradazione dal proteasoma.
- Mutazioni a livello del gene *FBXW7*: presenti nel 15% delle T-ALL (29), generalmente sono mutazioni o delezioni che coinvolgono il dominio di interazione della proteina F-box con *NOTCH1*. Le proteine codificate dai mutanti di *FBXW7* promuovono una maggiore stabilità della forma attiva di *NOTCH1*, simulando l'effetto delle mutazioni *NOTCH1* Δ PEST. Tuttavia, *FBXW7* media anche la degradazione del proteasoma di altre oncoproteine, come c-myc, Jun, ciclina E e mTOR. Pertanto, le conseguenze biologiche dell'inattivazione mutazionale di *FBXW7* nei linfoblasti delle T-ALL sono più varie di quelle derivanti dalla perdita del dominio PEST e possono implicare un aumento del metabolismo cellulare, della crescita cellulare e la progressione del ciclo cellulare.

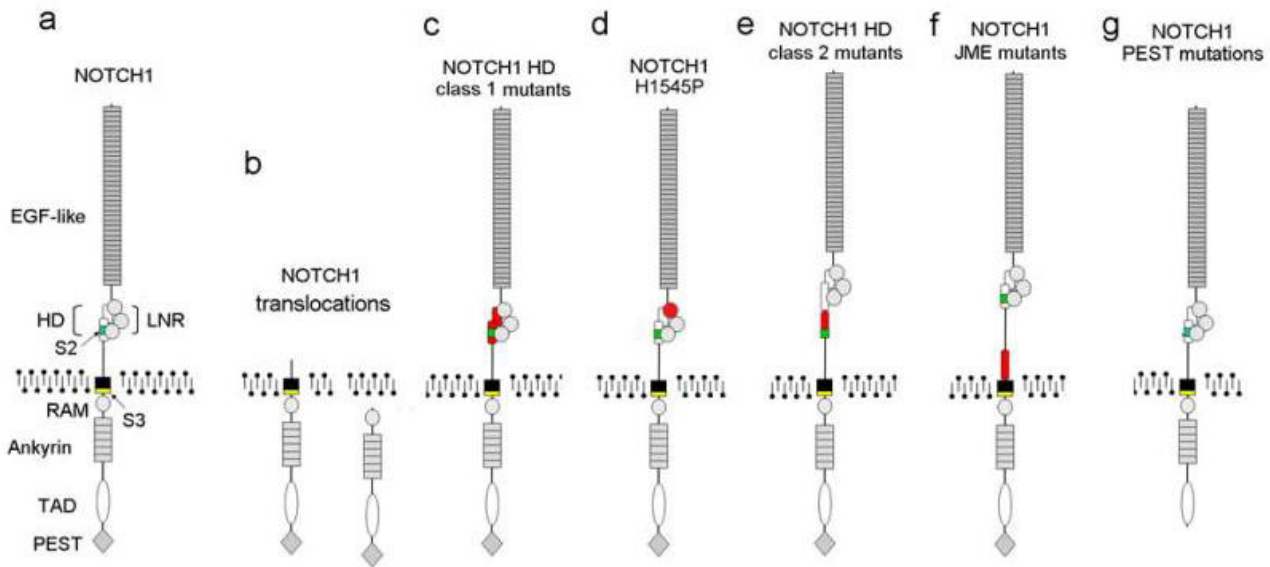


Figura 2. Rappresentazione delle differenti mutazioni identificate nel gene *NOTCH1* nelle T-ALL.

È importante sottolineare che circa il 15% delle T-ALL sono caratterizzate dalla simultanea presenza delle mutazioni *NOTCH1* HD e Δ PEST (25), mentre la concomitante presenza delle mutazioni nel gene *FBXW7* e *NOTCH1* HD si verifica in circa il 5% delle T-ALL (29). La concomitante presenza di tali mutazioni oltre a indurre l'attivazione indipendente da ligando ne impedisce la degradazione della forma attivata con conseguente elevati livelli del *signaling NOTCH1* (25).

Le mutazioni *NOTCH1*, quindi, possono essere molto diverse tra loro e ciò induce un differente potenziale di trasformazione delle cellule T indotta dal *signaling NOTCH1*. Infatti, alleli "forti" di *NOTCH1* possono funzionare come *driver* nella trasformazione delle cellule T, mentre alleli più "deboli" possono avere un ruolo più limitato nel promuovere la specificazione del *lineage* T (43).

3.1.4 Geni e *pathway* controllati da *NOTCH1* nella trasformazione delle cellule T

NOTCH1 è coinvolto nella crescita e nel metabolismo cellulare attraverso la regolazione trascrizionale dei suoi geni *target*. In particolare, promuove la crescita cellulare attraverso la diretta upregolazione trascrizionale di *cMYC* (50), quale è coinvolto in vari processi anabolici cellulari. E' coinvolto nella regolazione cellulare dei progenitori delle cellule T attraverso l'attivazione del *pathway PI3K-AKT-mTOR*. La via di trasduzione del segnale *PI3K-AKT*, la cui funzione è antagonizzata dal gene oncosoppressore *PTEN* (51), media molte risposte cellulari, quali un aumento della crescita cellulare, la proliferazione e la sopravvivenza. *NOTCH1* promuove il *pathway PI3K-AKT-mTOR* attraverso molteplici meccanismi: infatti, può attivare l'*AKT* attraverso la tirosin-chinasi p56^{lck} (52) o la downregolazione di *PTEN* attraverso il repressore trascrizionale

HES1, target diretto di *NOTCH1* (51); può regolare il *pathway PI3K-AKT-mTOR* a monte attraverso il recettore dell'interleuchina 7 (*IL7R*), il *pre-T-cell receptor alpha (PTCRA)* e l'*insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R)* (53, 54, 55).

Oltre a promuovere l'anabolismo cellulare, *NOTCH1* gioca un ruolo diretto nella proliferazione dei precursori delle cellule T promuovendo la progressione G1/S del ciclo cellulare; infatti, l'attivazione di *NOTCH1* comporta un aumento dell'espressione di *CCND3*, *CDK4* e *CDK6* nelle T-ALL. *CCND3* è un gene target diretto di *NOTCH1* (56). In aggiunta, *NOTCH1* induce la trascrizione della *S-phase kinase-associated protein 2 (SKP2)* e la degradazione mediata dal proteasoma di *CDKN1B* e *CDKN1A*, promuovendo l'ingresso prematuro in fase S dei progenitori ematopoietici (57). Inoltre, l'inibizione del *signaling* di *NOTCH* nelle linee cellulari T-ALL induce l'upregolazione degli inibitori *CDKN2D* e *CDKN2B*, promuovendo l'*RB* e la conseguente uscita dal ciclo cellulare (58).

Infine, *NOTCH1* può attivare l'NF-κB, aumentandone l'espressione e promuovendone e l'accumulo nucleare; è in grado di controllare direttamente l'espressione di *IL7Ra* nei progenitori delle cellule T e nelle T-ALL e di regolare l'attività di p53 (43).

3.1.5 Le mutazioni di *NOTCH1* come marker prognostico nelle T-ALL

L'analisi del significato prognostico dell'attivazione del *NOTCH1 signaling* nelle T-ALL ha dimostrato che le mutazioni *NOTCH1* non sono associate ad un *outcome* sfavorevole e che in alcune coorti possono conferire una prognosi favorevole. Nel lavoro di *Breit et al.* (59), le mutazioni di *NOTCH1* sono state associate con una MRD favorevole e un' aumentata sopravvivenza libera da eventi (EFS). Mentre, l'analisi dei pazienti giapponesi che seguono i protocolli ALL-97 e NHL-98 ha mostrato un miglioramento dell'*outcome* per pazienti mutati in *NOTCH1* e/o *FBXW7* (60). Al contrario, l'analisi di una serie di pazienti pediatriche trattati con i protocolli DCOG non ha mostrato una differente prognosi nei pazienti con mutazioni attivanti in *NOTCH1* (61), suggerendo che le differenze nella terapia possono influenzare l'effetto di tali mutazioni sulla prognosi (Tabella 1).

Refs.	Protocollo/Trial	N° di pazienti	Frequenza delle mutazioni NOTCH1 (%)	Rilevanza prognostica di NOTCH1 (EFS)
Breit et al. (59)	ALL-BFM 2000	157	52	+
Kox et al. (62)	ALL-BFM 2000	301	50	+

Zuurbier et al. (63)	DCOG ALL7-8-9/CoALL-97	141	56	=
Van Grotel et al. (61)	DCOG ALL7-8-9	72	56	=
Clappier et al. (64)	EORTIC-CLG	134	57	=
Jenkinson et al. (65)	MRC UKALL 2003	162	62	+
Folgestrand et al. (66)	NOPHO ALL-1992/ALL-2000	79	57	+
Chao Gao et al. (67)	BCH-2003/CCLG-2008	92	42,4	+

Tabella 1. Riassunto dei dati attualmente pubblicati riguardanti l'effetto sulla prognosi in termini di EFS delle mutazioni attivanti *NOTCH1* nelle coorti pediatriche T-ALL che seguono i diversi protocolli terapeutici. + rappresenta un effetto favorevole; = rappresenta un effetto neutrale sulla prognosi.

3.1.6 *NOTCH1* come target terapeutico nelle T-ALL

L'alta frequenza delle mutazioni *NOTCH1* nelle T-ALL ha evidenziato un potenziale ruolo di *NOTCH1* come *target* terapeutico per il trattamento di queste leucemie. In questo contesto, l'importanza delle γ -secretasi per l'attivazione di *NOTCH1* ha portato allo sviluppo di molecole inibitorie (GSI) di tale complesso proteolitico, che abroga l'effetto oncogenico del *NOTCH1 signaling* nelle linee cellulari T-ALL. In particolare, il trattamento con le GSI riduce il livello intracellulare di *NOTCH1* e downregola la trascrizione dei geni target (68). Il più importante effetto antileucemico delle GSI è rappresentato dalla capacità del *COMPOUND E* di bloccare il *NOTCH1 signaling*, indurre l'arresto del ciclo cellulare in fase G1 e diminuire la proliferazione delle linee cellulari T-ALL (68).

Sfortunatamente, risultati discutibili sono stati riscontrati in uno studio condotto per il trattamento di pazienti con recidiva T-ALL (studio DFCI 04-390) in cui oltre ad uno scarso effetto antileucemico è stato evidenziato una tossicità gastrointestinale dose-limitante, dovuta all'inibizione di *NOTCH* nell'intestino (43).

Inoltre, è stato dimostrato che l'inibizione del *NOTCH1 signaling* con GSI può "revertare" la resistenza ai glucocorticoidi nelle T-ALL e annullare l'effetto di tossicità gastrointestinale indotto dagli GSI in animali modello (69).

Di notevole rilevanza, l'analisi di linee di cellule T-ALL sensibili e resistenti agli GSI ha evidenziato che la perdita mutazionale di *PTEN* e la conseguente attivazione costitutiva del *pathway*

PI3K-AKT-mTOR può indurre resistenza ai GSI bypassando il vincolo del *signaling NOTCH1* per la crescita e il metabolismo (51). Infine, l'overespressione di *cMYC* può abbattere l'arresto del ciclo cellulare indotto dall'inibizione di *NOTCH1* in alcune linee cellulari T-ALL. Mentre, le mutazioni in *FBXW7* sono più frequenti nelle linee cellulari T-ALL GSI-resistenti, suggerendo che l'aumento di *C-MYC*, *JUN*, *CICLINA E* e la stabilità della proteina mTOR possono portare ad una ridotta sensibilità dell'inattivazione di *NOTCH1* in questi tumori (29). Questi studi in tutte le linee cellulari T-ALL forniscono un'importante valore del ruolo della perdita di *PTEN*, della overespressione di *MYC* e delle mutazioni in *FBXW7* nella resistenza alla inibizione di *NOTCH1* (43).

3.2 PTEN

3.2.1 Struttura e funzione

PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten)/MMAC (mutated in multiple advanced cancers) è stato identificato recentemente come un gene repressore tumorale situato sul cromosoma umano 10q23.3. Il gene *PTEN* contiene 9 esoni e codifica per una proteina di 403 aminoacidi che si compone di cinque domini funzionali (Figura 3) (72):

- un phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂)-binding domain (PBD);
- un dominio fosfatasico, con attività fosfatasica e siti di acetilazione;
- un dominio C2, in grado di legare le membrane fosfolipidiche in vitro e di associarsi al dominio fosfatasico, suggerendo un ruolo nel posizionamento del dominio catalitico sulla membrana.
- una coda carbossi-terminale, comprendente due sequenze PEST, quale generalmente è il sito per la degradazione delle proteine target
- un dominio DZ, importante per l'interazione proteina-proteina.



Figura 3. Struttura e domini della proteina PTEN.

PTEN è coinvolto nella crescita cellulare, migrazione e adesione e svolge un importante ruolo nello sviluppo embrionale attraverso l'interazione con differenti *signaling pathway*.

In particolare, *PTEN* è il principale regolatore negativo del *pathway PI3K/AKT* ed è implicato nella regolazione degli effetti a valle del *NOTCH1 signaling* come la proliferazione e la sopravvivenza dei progenitori delle cellule T (65).

PTEN funziona anche come una proteina fosfatasi defosforilando proteine come le chinasi di adesione focale nel citosol e Erk, l'istone H1, RAD51, e CENC-P nel nucleo suggerendo quindi un ruolo *PTEN* nella migrazione delle cellule attraverso il *signaling* dell'integrina, nel rimodellamento della cromatina attraverso l'interazione con gli istoni, la progressione del ciclo cellulare e l'arresto indipendente dal *signaling* di *AKT*, la riparazione del DNA tramite la modulazione di RAD51. Inoltre, è responsabile della regolazione dei segnali di una grande varietà di mediatori tra cui citochine, fattori di crescita, integrine e ligandi dei recettori accoppiati alla proteina G (73).

Gli effetti cellulari meccanicistici associati alla funzionalità di *PTEN* e all'inibizione intrinseca di *AKT* includono la modulazione di molti *pathway*. Tra questi, la progressione e l'arresto del ciclo cellulare tramite p27^{Kip1}, WEE1, p21 e la ciclina D; la segnalazione cellulare mediata da mTOR; l'apoptosi e gli effetti sulla sopravvivenza mediati da Bim, MDM2-p53, Bcl-2 e Bax (73).

Interagisce con numerose altre vie di trasduzione quali Erk, p38, il *TGFβ pathway*, la via di *signaling JAK/STAT*. Inoltre, recenti studi hanno dimostrato che modula la risposta al danno e la riparazione del DNA tramite l'inibizione di *AKT* (73).

3.2.2 Regolazione di PTEN e coinvolgimento nella via PI3K/AKT

Come accennato in precedenza, il gene soppressore tumorale *PTEN* svolge un ruolo chiave nel meccanismo di controllo della crescita cellulare. Altri due oncogeni coinvolti in questo meccanismo codificano rispettivamente per la fosfoinositide 3-chinasi (PI3K) e la proteina serina/treonina chinasi (AKT).

PTEN catalizza la conversione di PIP3 (fosfoinositolo-3,4,5- trifosfato) a PIP2 (fosfoinositolo-4,5-difosfato) inibendo così l'attivazione di *AKT* ad opera di PI3K. PI3K, una chinasi lipidica ampiamente espressa nell'organismo, catalizza la reazione inversa a *PTEN* poiché porta alla formazione di PIP3 tramite la fosforilazione in posizione 3 dell'inositolo di PIP2 e di conseguenza all'attivazione di *AKT*. La funzione di *PTEN* è richiesta per un normale sviluppo cellulare e la sua perdita contribuisce alla cancerogenesi. E' stato dimostrato che è frequentemente inattivato in molti tipi di tumore, in seguito ad alterazioni geniche che risultano nella perdita di attività e di espressione proteica di *PTEN* (74).

Tale spettro tumorale osservato nell'uomo è stato dimostrato in topi *PTEN*-deficienti, compresi tumori delle cellule T; inoltre, la delezione specifica di *PTEN* nelle cellule T risulta nella morte indotta da linfoma (75). È importante sottolineare che *PTEN* è coinvolto nel mantenimento delle cellule staminali ematopoietiche e nel prevenire la leucemogenesi (76).

PTEN è assente in diverse linee cellulari umane di T-ALL in seguito a delezioni o mutazioni nel gene, che di conseguenza mostrano una iperattivazione costitutiva della via PI3K/AKT.

Normalmente l'attività di AKT è bassa in assenza di stimolazione indotta da fattori di crescita. Al contrario, linee cellulari tumorali carenti di fattore *PTEN* mostrano elevati livelli basali di fosforilazione AKT. Una delezione o inattivazione di *PTEN* ha come risultato l'attivazione costitutiva di AKT, in quanto viene a mancare una regolazione negativa di questa via e le cellule mostrano anche una ridotta capacità apoptotica. Pertanto, l'espressione forzata di *PTEN* in queste linee cellulari induce l'apoptosi inibendo la via PI3K/AKT (77), suggerendo un ruolo nelle T-ALL. L'inattivazione di *PTEN* e la conseguente iperattivazione della via PI3K/AKT possono derivare da meccanismi diversi dall'integrità del gene *PTEN*. Anche se non è implicati direttamente nel cancro, è stata dimostrata la downregolazione dell'attività di *PTEN* mediante meccanismi come la fosforilazione e l'ossidazione (78). In particolare, la fosforilazione della porzione C-terminale di *PTEN* è implicata nella stabilità della proteina, impedendo la sua degradazione attraverso l'ubiquitinazione o mediante il proteasoma, quali influenzano quindi l'attività della fosfatasi *PTEN* (78). La proteina serin/treonin chinasi caseina 2 (CK2), essenziale per la sopravvivenza delle cellule di mieloma e la cui overespressione è stata osservata in tumori solidi umani è stata associata alla fosforilazione di *PTEN* (79, 80). Inoltre, i topi transgenici con espressione indotta di *CK2* nelle cellule T sviluppano linfomi (81).

L'attivazione costitutiva della PI3K/AKT è un evento comune nelle T-ALL ed è fondamentale per la vitalità delle cellule leucemiche. L'iperattivazione di PI3K/AKT, quindi, deriva non solo da meccanismi canonici che coinvolgono le alterazioni del gene *PTEN* e la conseguente eliminazione della proteina, ma anche dalla stabilizzazione della proteina *PTEN* e la sua inattivazione in seguito ad un'elevata attività di CK2 e ad un'elevata concentrazione intracellulare dei livelli di ROS (specie reattive dell'ossigeno) (74). L'iperattivazione costitutiva della via PI3K/AKT è stata dimostrata non solo nelle cellule T-ALL *PTEN*-nulle, ma anche in quelle che hanno un'alterata espressione di *PTEN* che potrebbe essere utile come *biomarker* per l'identificazione dei pazienti candidati al trattamento con inibitori di PI3K e/o dei *targets* a valle (74).

3.2.3 Le mutazioni di *PTEN* come marker prognostico nelle T-ALL

PTEN può essere influenzato da mutazioni inattivanti, generalmente mutazioni nonsense o puntiformi, delezioni e inserzioni che risultano in *frameshift* e alterazioni dello *splicing*. Nelle T-ALL l'incidenza di mutazioni in *PTEN* è compresa tra l'11% e il 17% e, generalmente sono identificate nell'esone 7 a livello del dominio C2 e portano alla formazione di una proteina troncata (38, 83). Inoltre, è stato dimostrato che la perdita mutazionale di *PTEN* nelle linee cellulari T-ALL induce la resistenza agli inibitori per le GS (51).

Nonostante i numerosi studi attualmente pubblicati, l'analisi del significato prognostico dell'inattivazione di *PTEN* nelle T-ALL è controversa. In particolare, ha dimostrato che le mutazioni a livello del gene non sono associate ad un *outcome* favorevole, tuttavia, i pazienti mutati in *PTEN* e *wild-type* in *NOTCH1* all'interno del gruppo medio rischio che seguono il protocollo BFM-2000 mostrano un'*outcome* sfavorevole (38) (Tabella 2).

Referenza	Protocollo/Trial	N.° di pazienti	Frequenza delle mutazioni in <i>PTEN</i> (%)	Rilevanza prognostica delle mutazioni in <i>PTEN</i> (EFS)	Rilevanza prognostica delle mutazioni in <i>PTEN</i> (CIR)
Bandapalli et al., (38)	ALL-BFM 2000	301	17,3	= *	= *
Jotta et al. (84)	GBTLI ALL 99	62	17,7	=	ND
Jenkinson et al. (85)	MRC UKALL 2003	145	14	=	=
Zuurbier et al. (83)	DCOG ALL7-8-9/CoALL-97	142	11	=	=

Tabella 2. Riassunto dei dati attualmente pubblicati riguardanti l'effetto sulla prognosi in termini di EFS e CIR delle mutazioni attivanti *PTEN* nelle coorti pediatriche T-ALL che seguono i diversi protocolli terapeutici. - rappresenta un effetto favorevole; = rappresenta un effetto neutrale sulla prognosi. * pazienti mutati in *PTEN* e *wild-type* in *NOTCH1* all'interno del gruppo medio rischio che seguono il protocollo BFM-2000 mostrano un'*outcome* sfavorevole (38).

3. SCOPO DEL PROGETTO

La trasformazione delle cellule T è un processo che si sviluppa in più fasi in cui differenti alterazioni genetiche cooperano per alterare i normali meccanismi che controllano la crescita cellulare, la proliferazione, la sopravvivenza e la differenziazione durante lo sviluppo dei timociti. In questo contesto, *NOTCH1* è il *pathway* oncogenico principalmente coinvolto nella trasformazione delle cellule T (43). Mutazioni del *pathway NOTCH1* sono presenti in più del 50% dei pazienti T-ALL (82). Inoltre, le mutazioni di *FBXW7*, presenti in circa il 15% dei casi di leucemia linfoblastica acuta di tipo T (TALL), contribuiscono all'attivazione del *pathway NOTCH1* impedendone la degradazione mediata dal proteasoma (82). Diversi studi hanno recentemente analizzato il significato prognostico delle mutazioni *NOTCH1* e *FBXW7* nelle T-ALL. Complessivamente, questi studi dimostrano che l'attivazione di *NOTCH1* è associata ad una migliore risposta terapeutica iniziale e ad una maggiore sensibilità ai glucocorticoidi, che tuttavia si traduce in un miglioramento della sopravvivenza solo in alcuni studi (30). Dall'analisi di espressione dei geni differenzialmente espressi tra linee cellulari resistenti e linee sensibili agli inibitori per le gammasecretasi, è emerso *PTEN* come gene differenzialmente espresso. In particolare, *PTEN* è risultato essere downregolato o deletato in linee cellulari resistenti agli inibitori per le gammasecretasi (51). Inoltre, *PTEN* è identificato mutato in circa il 15% dei casi pediatrici (38). *PTEN* è un potente repressore tumorale che codifica per una protein-fosfatasi considerata il principale regolatore negativo della fosfoinositide-3-chinasi di classe I (PI3K) (86).

Lo studio si propone di indagare il valore prognostico di mutazioni genetiche ricorrenti nello sviluppo della leucemia, in particolare a livello dei geni *NOTCH1*, *FBXW7* e *PTEN* nei pazienti pediatrici T-ALL che seguono i protocolli AIEOP ALL2000/R2006 e AIEOP ALL2009.

Lo studio si sviluppa in 2 parti:

- A. Correlare la presenza delle mutazioni somatiche a livello dei geni *NOTCH1*, *FBXW7*, *PTEN* con la risposta alla terapia nei pazienti pediatrici T-ALL;
- B. Comprendere l'effetto delle mutazioni somatiche dei geni *NOTCH1*, *FBXW7* e *PTEN* mediante *Gene Expression Profile* e *Reverse Phase Protein Array* al fine di identificare alterazioni di *pathway* specifici e nuovi target terapeutici.

L'influenza delle mutazioni in questi geni sulla risposta al trattamento e al rischio di ricaduta potrebbe contribuire alla nuova stratificazione in classi di rischio dei pazienti pediatrici T-ALL.

A. Correlare la presenza delle mutazioni somatiche a livello dei geni **NOTCH1**, **FBXW7**, **PTEN** con la risposta alla terapia nei pazienti pediatrici T-ALL

3. RISULTATI

3.3 COORTE TOTALE

3.3.1 Analisi mutazionale di *NOTCH1* e *PTEN*

In totale sono stati analizzati 272 campioni di sangue midollare di pazienti pediatrici con diagnosi di leucemia linfoblastica acuta e arruolati nei protocolli AIEOP ALL2000, R2006 e ALL2009 all'esordio per le mutazioni di *NOTCH1* negli esoni 26, 27, 28 e 34 e *PTEN* a livello dell'esone 7.

Sono stati identificati 166 (65,9%) pazienti T-ALL con mutazioni somatiche in *NOTCH1* e 31 (12%) pazienti mutati in *PTEN* (Tabella 3).

Le mutazioni a livello del dominio di eterodimerizzazione di *NOTCH1* (esoni 26 e 27) sono principalmente mutazioni missenso in posizioni aminoacidiche conservate, o piccole inserzioni e delezioni *in-frame*, mentre a livello del dominio PEST (esone 34) si osservano delezioni/inserzioni *frameshift* risultanti nella formazione prematura di *stop codon*. Tutte le mutazioni identificate in *NOTCH1* sono in eterozigosi.

Per quanto riguarda l'analisi mutazionale in *PTEN*, tutte le mutazioni identificate sono delezioni/inserzioni *frameshift* risultanti nella formazione prematura di stop codon. Gli mRNA interessati potrebbero quindi codificare per una proteina tronca a livello della porzione C-terminale e inattiva (84).

	TOTAL	
	N	%
TOTAL	272	
NOTCH1		
WT	86	34.1
Mutated	166	65.9
Not known	20	
PTEN		
WT	227	88.0
Mutated	31	12.0
Not known	14	

Tabella 3. Frequenza totale delle mutazioni identificate nei geni *NOTCH1* e *PTEN* delle coorti in esame.

3.3.2 Correlazione delle mutazioni attivanti *NOTCH1* e inattivi *PTEN* con la risposta alla terapia

Dalla letteratura, l'analisi del significato prognostico dell'attivazione del *NOTCH1 signaling* nelle T-ALL ha dimostrato che le mutazioni *NOTCH1* non sono associate ad un *outcome* sfavorevole e che in alcune coorti possono conferire una prognosi favorevole come verificato nel lavoro di *Breit et al.* (59). Nonostante i numerosi studi attualmente pubblicati, l'analisi del significato prognostico dell'inattivazione di *PTEN* nelle T-ALL è controversa. Al fine di comprendere il significato prognostico nella coorte AIEOP T-ALL è stata comparata l'associazione delle mutazioni *NOTCH1* (Figura 4 A e B) e delle mutazioni *PTEN* (Figura 4 C e D) con la risposta a lungo termine in univariata di tutti i pazienti analizzati nello studio indipendentemente dal tipo di protocollo terapeutico in cui sono stati arruolati. L'impatto delle mutazioni in relazione al tipo di protocollo adottato verrà discusso nei paragrafi successivi.

Come mostrato nella figura seguente, i pazienti mutati in *NOTCH1* mostrano una più alta sopravvivenza libera da eventi (EFS) ($p=0,006$) rispetto ai *wild-type* che non si traduce in una ridotta incidenza di ricaduta (CI) ($p=0,11$). Al contrario, i pazienti mutati in *PTEN* mostrano una più alta incidenza di ricaduta ($p=0,003$) ed una più bassa EFS ($p=0,01$) rispetto ai pazienti non mutati.

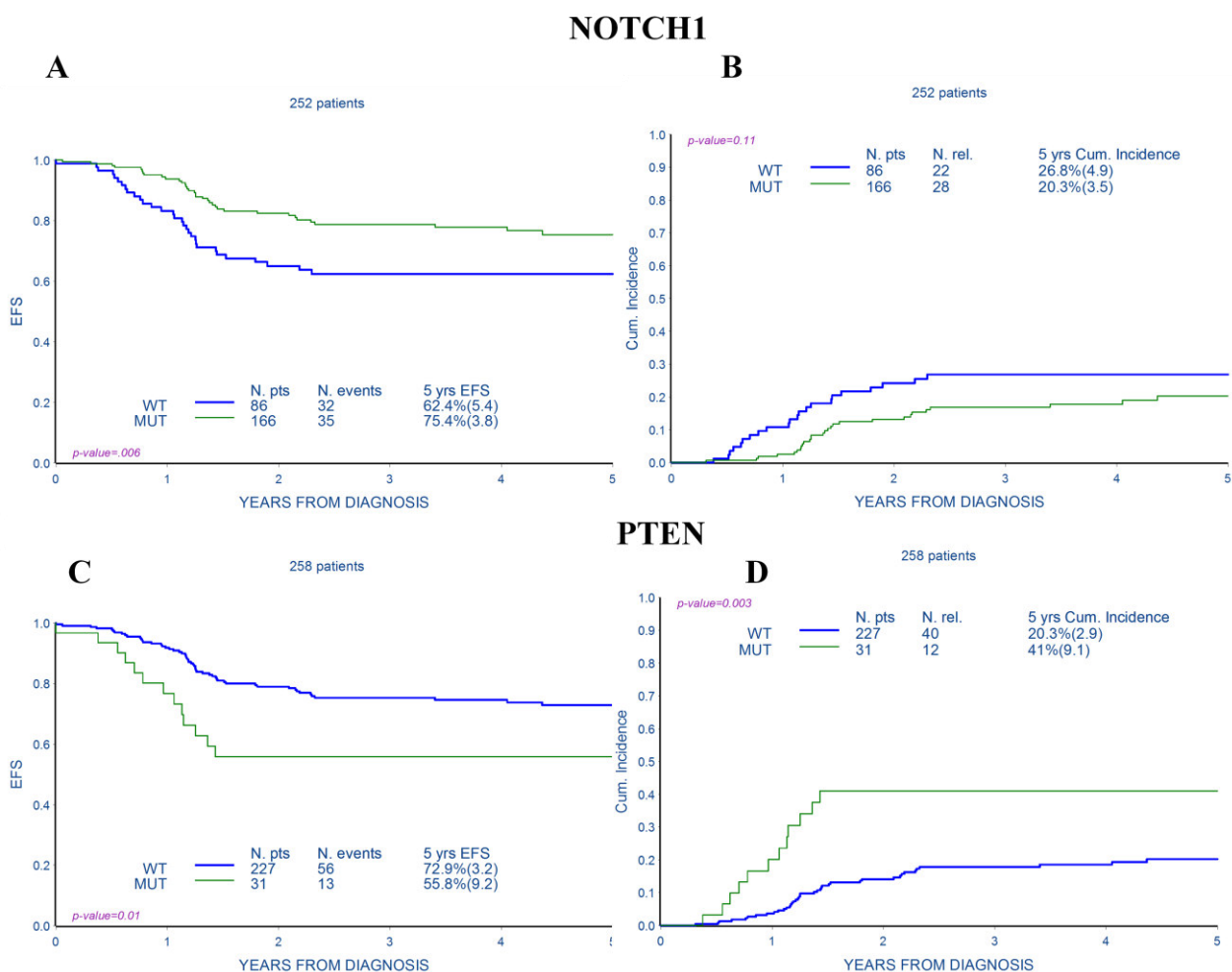


Figura 4. Stima di *Kaplan-Meier* della funzione di sopravvivenza libera da eventi (pEFS) e dalla ricaduta (pCI) tra i pazienti mutati e *wildtype* in *NOTCH1* (A e B) e in *PTEN* (C e D) nella coorte T-ALL AIEOP TOTALE.

3.3.3 Associazione delle mutazioni in *NOTCH1* e *PTEN* con la risposta alla terapia

Da dati di letteratura è noto che *HES1*, il *downstream target* di *NOTCH1*, regola negativamente la trascrizione di *PTEN* e quindi indirettamente può stimolare il *pathway* della via *PI3K-AKT* (51, 88), pertanto ipotizziamo un sinergismo clinico tra le mutazioni inattivanti *PTEN* e quelle attivanti *NOTCH1*. Per testare questa ipotesi, è stata analizzata l'associazione delle mutazioni in *NOTCH1* e *PTEN*. I pazienti della coorte in esame sono stati raggruppati sulla base dello stato mutazionale in *NOTCH1* e *PTEN* e questo è stato comparato con la risposta all'*outcome* in termini di sopravvivenza libera da eventi (EFS) e incidenza di ricaduta (CI) (Figure 5 e 6), ma non è stata osservata alcuna differenza statisticamente significativa.

In particolare, nella coorte totale in EFS i pazienti mutati in *NOTCH1* e *wildtype* in *PTEN* hanno una sopravvivenza libera da eventi del 75,6% rispetto agli altri tre gruppi confrontati. Al contrario, nella coorte totale i pazienti mutati in *PTEN* e *wildtype* in *NOTCH1* hanno una più alta incidenza di ricaduta rispetto agli altri tre gruppi confrontati (42,7%). Quest'ultimo dato risulta ancor più evidente a livello della coorte AIEOP ALL2009 (50%).

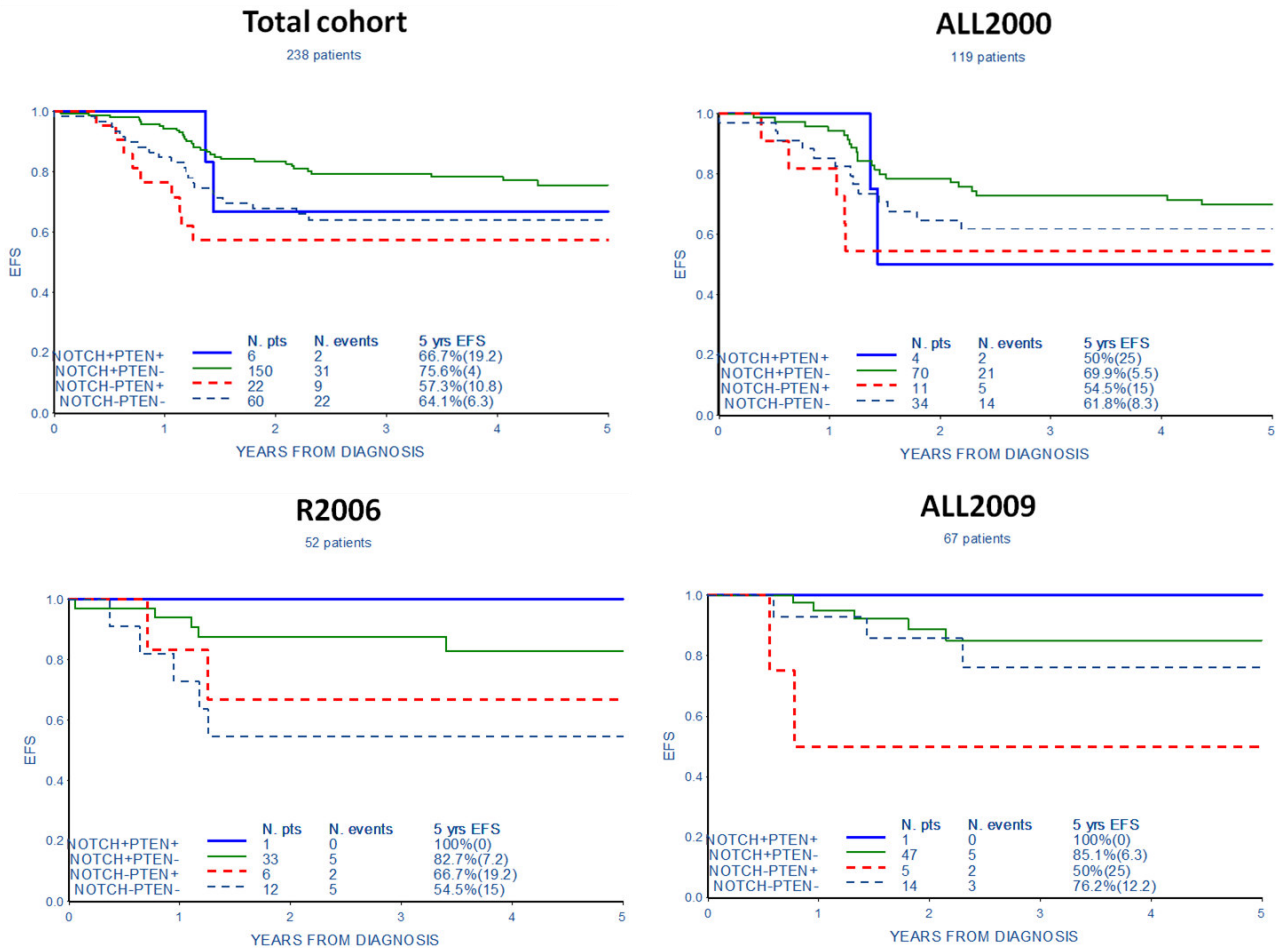


Figura 5. Interazione clinica delle mutazioni in *NOTCH1* e *PTEN* con la risposta alla terapia nella coorte pediatrica T-ALL AIEOP ALL2000, R2006 e ALL2009. Stima di Kaplan-Meier della funzione di sopravvivenza libera da eventi (pEFS).

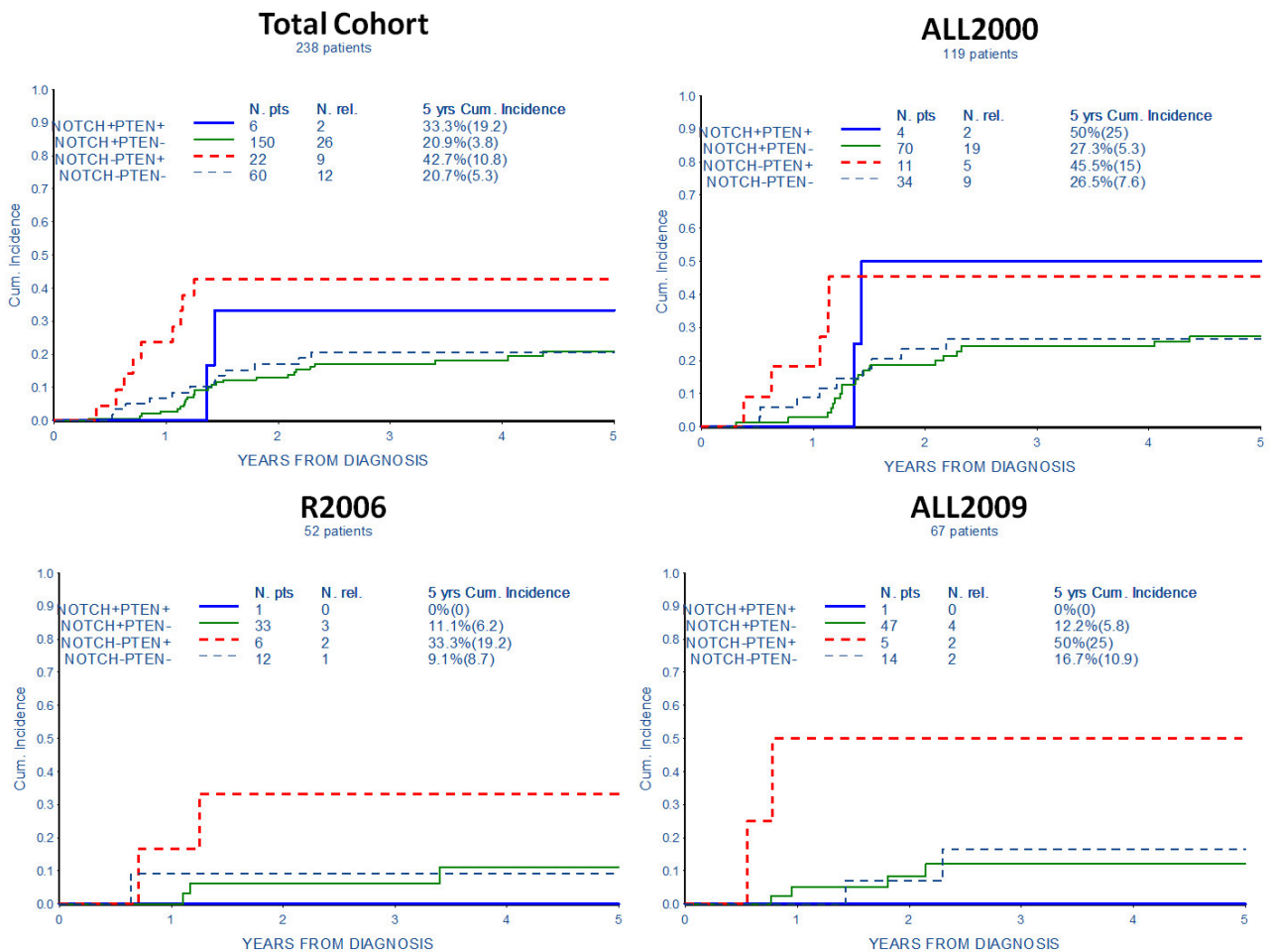


Figura 6. Interazione clinica delle mutazioni in NOTCH1 e PTEN con la risposta alla terapia nella coorte pediatrica T-ALL AIEOP 2000, R2006 e ALL2009. Stima di Kaplan-Meier della incidenza di ricaduta ricaduta (pCI).

3.4 COORTE PEDIATRICA T-ALL AIEOP ALL2000/R2006

3.4.1 Analisi mutazionale del *pathway NOTCH1*

Sono stati analizzati campioni di sangue midollare di 152 pazienti pediatrici con diagnosi di leucemia linfoblastica acuta e arruolati nel protocollo AIEOP ALL2000/R2006 all'esordio per le mutazioni di *NOTCH1* negli esoni 26, 27, 28 e 34 e per gli esoni 9 e 10 di *FBXW7*. Lo stato mutazionale del gene *FBXW7* è stato ricercato solo all'interno della coorte di pazienti che seguono questo protocollo.

Nella coorte AIEOP ALL2000/R2006 sono stati identificati 92 (61%) pazienti T-ALL con mutazioni somatiche in *NOTCH1* (Figura 7A). Le mutazioni a livello del dominio di eterodimerizzazione (esoni 26 e 27) sono principalmente mutazioni missenso in posizioni aminoacidiche conservate, o piccole inserzioni e delezioni *in-frame*, mentre a livello del dominio PEST (esone 34) si osservano delezioni/inserzioni *frameshift* risultanti nella formazione prematura di *stop codon*. Tutte le mutazioni identificate sono in eterozigosi.

Per quanto riguarda l'analisi mutazionale di *FBXW7*, sono stati identificati 30 pazienti con mutazioni somatiche in eterozigosi, e un paziente con mutazione in omozigosi (Figura 7B). Tutte le mutazioni identificate sono mutazioni missenso. La coorte AIEOP ALL2000/ R2006 presenta una frequenza di mutazione del *pathway* di *NOTCH1* del 64% comparabile con la frequenza di mutazione identificata in altre coorti di T-ALL pediatriche (87). Come riportato in altri lavori di letteratura, la maggior parte delle mutazioni che attivano il *pathway NOTCH1* sono state identificate a livello del dominio di eterodimerizzazione (HD, esoni 26 e 27), 40%. Sebbene non mutualmente esclusive, le mutazioni a livello del dominio PEST di *NOTCH1* (esone 34) raramente si identificano in copresenza delle mutazioni in *FBXW7*; generalmente le mutazioni di *FBXW7* si associano con le mutazioni nel dominio di eterodimerizzazione di *NOTCH1*, come riportato in Figura 8.



Figura 7. Frequenza di mutazione in *NOTCH1* (A) e in *FBXW7* (B) nella coorte T-ALL AIEOP ALL2000/R2006.

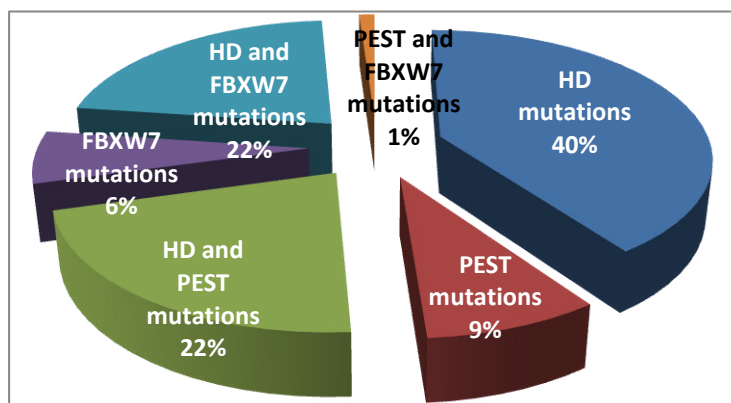


Figura 8. Pattern di mutazione dei geni *NOTCH1* e *FBXW7* nella coorte AIEOP T-ALL ALL2000/R2006.

3.4.2 Correlazione delle mutazioni attivanti *NOTCH1* con la risposta alla terapia

Al fine di indagare il significato prognostico del recettore *NOTCH1* nella coorte pediatrica trattata con protocollo AIEOP ALL2000/R2006 è stato correlato lo stato mutazionale con l'*outcome* in termini di EFS e CI. In analisi univariata è stato osservato un effetto favorevole delle mutazioni

attivanti *NOTCH1* in EFS (*NOTCH1*-mutati 70,2% vs *NOTCH1*-non mutati 58,5%), ma non in ricaduta (*Cumulative Incidence*, CI) (*NOTCH1*-mutati 26,2% vs *NOTCH1*-non mutati 28,3%). In particolare, i pazienti mutati rispetto ai pazienti *wildtype* mostrano una migliore sopravvivenza libera da eventi nel 70% dei casi ($p=0,05$) (Figura 9).

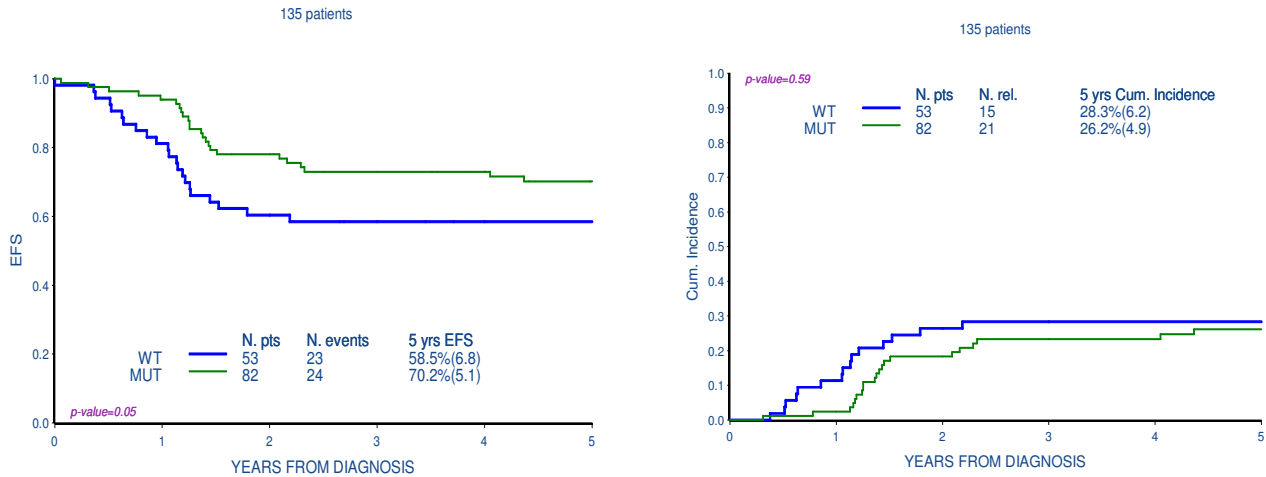


Figura 9. Stima di *Kaplan-Meier* della funzione di sopravvivenza libera da eventi (pEFS) e dalla ricaduta (pCI) tra i pazienti mutati e *wildtype* in *NOTCH1* nella coorte T-ALL AIEOP ALL2000/R2006.

3.4.3 Correlazione delle mutazioni inattivanti *FBXW7* con la risposta alla terapia

Dal momento che le mutazioni inattivanti *FBXW7* concorrono anch'esse nell'attivazione del *pathway NOTCH1*, si ipotizza che abbiano lo stesso effetto clinico delle mutazioni attivanti *NOTCH1* e che entrambe le mutazioni possano agire in sinergia per sensibilizzare la cellula leucemica al trattamento. La maggior parte delle mutazioni note in *FBXW7* si trovano negli esoni 9 e 10 del gene, quali codificano il sito di legame c-terminale tra ligasi e substrato. Tali mutazioni, infatti, perturbano il legame tra *FBXW7* e la forma attiva di *NOTCH1*. Sono stati, quindi, raggruppati i pazienti sulla base dello stato mutazionale in *FBXW7* che è stato comparato con la risposta a lungo termine (Figura 10), ma diversamente dalle mutazioni attivanti *NOTCH1*, non si osserva alcuna significatività nella risposta al trattamento tra i pazienti mutati e *wildtype*.

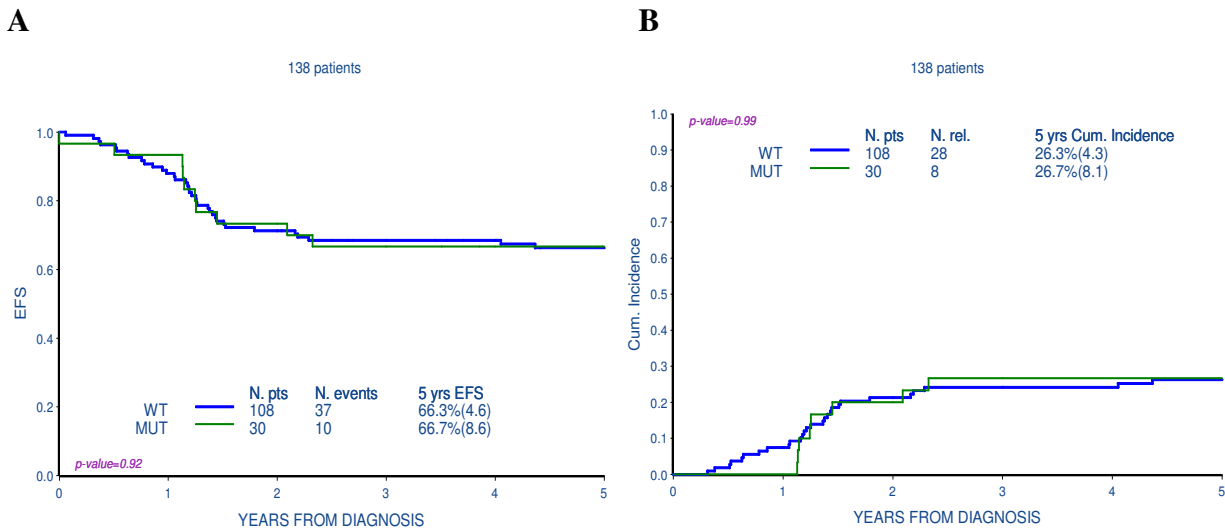


Figura 10. Stima di *Kaplan-Meier* della funzione di sopravvivenza libera da eventi (pEFS) e dalla ricaduta (pCI) tra i pazienti mutati e *wildtype* in *FBXW7*.

Infine, è stata comparata l'associazione delle mutazioni nei geni *FBXW7* e *NOTCH1* con la risposta a lungo termine in univariata (Figura 11) ma non si osserva alcuna differenza statisticamente significativa tra i differenti sottogruppi di pazienti in esame.

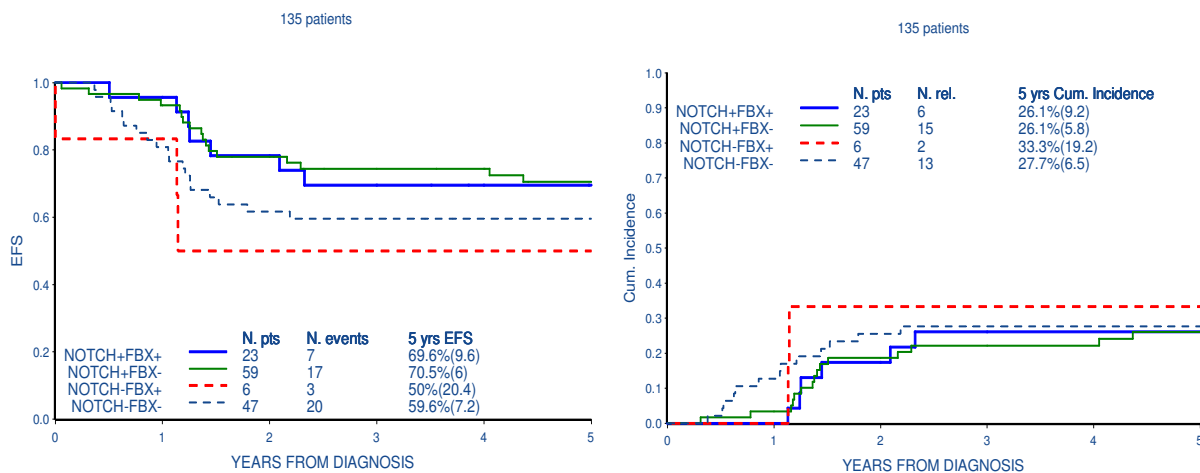


Figura 11. Stima di *Kaplan-Meier* della funzione di sopravvivenza libera da eventi (pEFS) e dalla ricaduta (pCI) tra i pazienti mutati e *wildtype* in *NOTCH1* e *FBXW7*.

3.4.4 Impatto prognostico delle mutazioni *NOTCH1* sui protocolli terapeutici ALL2000 e R2006

Dal momento che dalla letteratura emerge che il tipo di trattamento terapeutico ha un ruolo nel tipo di trattamento nel determinare il significato prognostico dell'attivazione del *NOTCH1 signaling* nelle T-ALL (59-67), è stata comparata l'associazione delle mutazioni *NOTCH1* con la risposta a

lungo termine in univariata dei pazienti trattati con il protocollo ALL2000 (Figura 12A) e confrontata con quella dei pazienti trattati con il protocollo R2006 (Figura 12B).

Come mostrato in Figura 9, a livello dei pazienti trattati con il protocollo R2006 la presenza della mutazione *NOTCH1* comporta una prognosi migliore rispetto agli stessi pazienti *wildtype* (*NOTCH1*-mutati 85,5% vs *NOTCH1*-non mutati 58,8% (p=0,02)), ma lo stesso dato non è stato osservato nei pazienti mutati *NOTCH1* trattati con il protocollo ALL2000 (p=0,11).

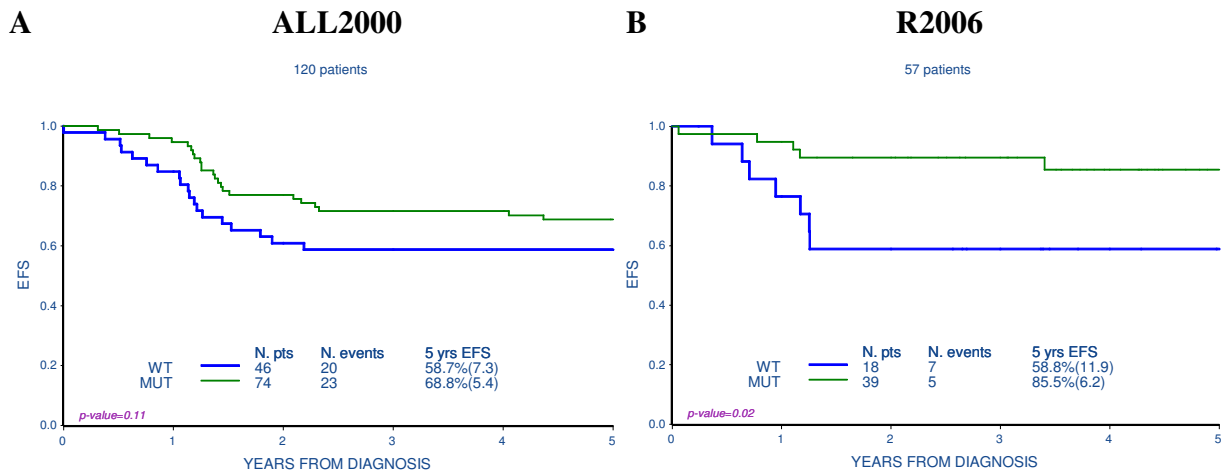


Figura 12. Stima di *Kaplan-Meier* della funzione di sopravvivenza libera da eventi (pEFS) tra i pazienti mutati e wildtype in *NOTCH1* e trattati con i protocolli AIEOP ALL2000 (A) e R2006 (B).

3.4.5 Analisi mutazionale di *PTEN* nella coorte pediatrica T-ALL AIEOP ALL2000/R2006

Gli stessi campioni, sono stati analizzati in 152 pazienti pediatrici con diagnosi di leucemia linfoblastica acuta e arruolati nel protocollo AIEOP ALL2000/R2006 all'esordio per le mutazioni di *PTEN* a livello dell'esone 7.

La coorte AIEOP ALL2000/R2006 presenta una frequenza di mutazione di *PTEN* del 11% (17/152).

Tutte le mutazioni identificate sono delezioni/inserzioni *frameshift* risultanti nella formazione prematura di stop codon. Gli mRNA interessati potrebbero quindi codificare per una proteina tronca a livello della C-terminale e inattiva (84).

Come già riportato in letteratura nella coorte ALL-BFM (38), la presenza di queste mutazioni si associa significativamente con l'assenza di mutazioni attivanti in *NOTCH1* (p=0,0009) (Tabella 4).

Caratteristiche	Coorte Totale	PTEN		P*
		Mutati (%)	Non-mutati (%)	
NOTCH1				
Mutati	91	4 (4)	87 (96)	0,0009
Non-mutati	59	13 (22)	46 (78)	
FBXW7				
Mutati	31	2 (6)	29 (94)	0,34
Non-mutati	121	15 (12)	106 (88)	

Tabella 4. Associazione delle mutazioni di *PTEN* con le mutazioni identificate in *NOTCH1* e *FBXW7* nella coorte AIEOP T-ALL ALL2000/R2006.

3.4.6 Correlazione delle mutazioni inattivanti *PTEN* con la risposta alla terapia

I pazienti della coorte in esame, sono stati raggruppati sulla base dello stato mutazionale in *PTEN* che è stato comparato con la sopravvivenza libera da eventi (EFS) e la incidenza di ricaduta (CI).

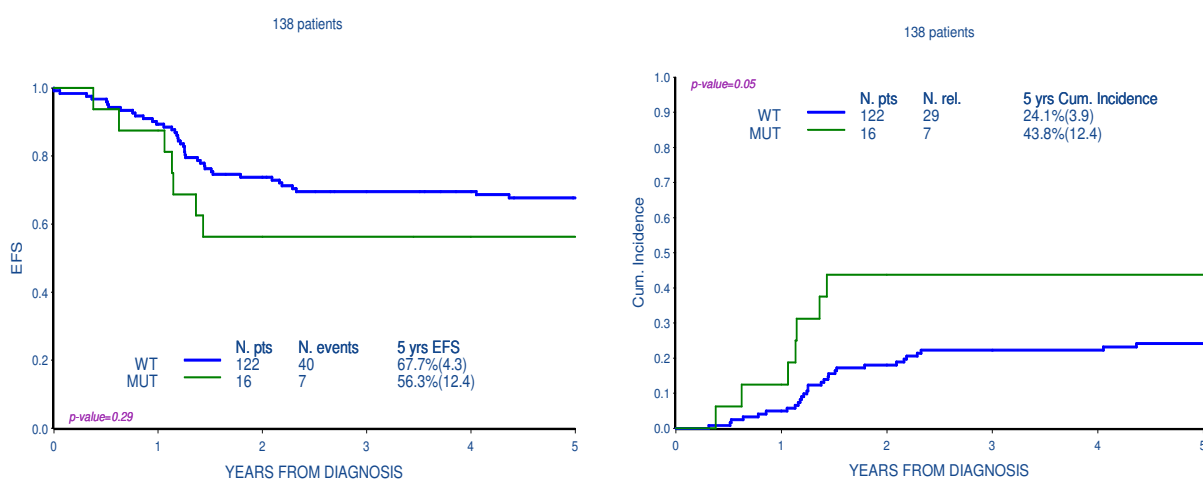


Figura 13. Stima di Kaplan-Meier della funzione di sopravvivenza libera da eventi (pEFS) e dalla ricaduta (pCI) tra i pazienti mutati e wildtype in *PTEN*.

In analisi univariata in termini di EFS non si osserva alcuna differenza statisticamente significativa tra pazienti mutati e *wildtype* (*PTEN*-mutati 56,3% vs *PTEN*-non mutati 67,7% (p=0,29)) ma, come mostrato dalla curva di CI, i pazienti mutati hanno una incidenza di ricaduta più alta rispetto ai non mutati (*PTEN*-mutati 43,8% vs *PTEN*-non mutati 24,1% (p=0,05)) (Figura 13).

3.5 COORTE PEDIATRICA T-ALL AIEOP ALL2009

3.5.1 Analisi mutazionale del *pathway NOTCH1*

Sono stati analizzati 118 campioni di sangue midollare di pazienti pediatrici con diagnosi di leucemia linfoblastica acuta e arruolati nel protocollo AIEOP ALL2009 all'esordio per le mutazioni di *NOTCH1* negli esoni 26, 27, 28 e 34.

Sono stati identificati 83 (70%) pazienti T-ALL con mutazioni somatiche in *NOTCH1*.

Come per la coorte precedente, la maggior parte delle mutazioni che attivano il *pathway NOTCH1* sono state identificate a livello del dominio di eterodimerizzazione (HD, esoni 26 e 27), 87% (Figura 14)

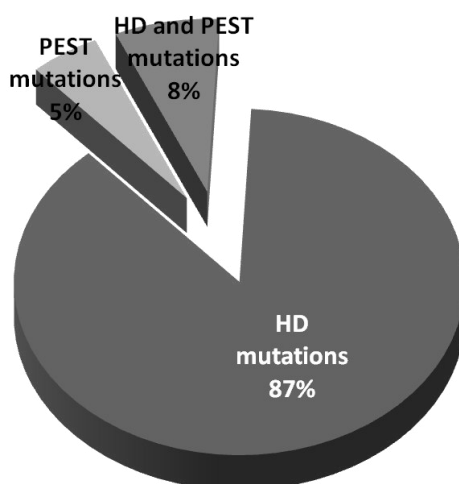


Figura 14. Pattern di mutazione dei domini del gene *NOTCH1* nella coorte AIEOP T-ALL ALL2009.

3.5.2 Correlazione delle mutazioni attivanti *NOTCH1* con la risposta alla terapia

Diversamente dalla coorte analizzata in precedenza, non si osserva alcun effetto favorevole delle mutazioni attivanti *NOTCH1* in analisi univariata sia in termini di EFS, che in ricaduta (CI) (Figura 15).

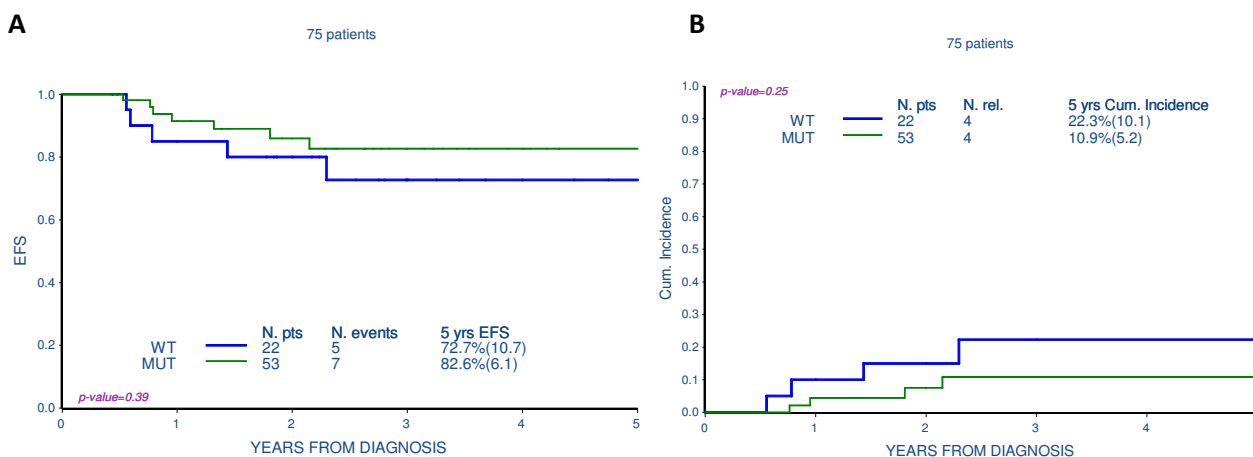


Figura 15. Stima di *Kaplan-Meier* della funzione di sopravvivenza libera da eventi (pEFS) e dalla ricaduta (pCI) tra i pazienti mutati e *wildtype* in *NOTCH1* nella coorte T-ALL AIEOP ALL2009.

3.5.3 Analisi mutazionale di *PTEN*

In seguito sono stati analizzati 121 campioni di sangue midollare di pazienti pediatrici con diagnosi di leucemia linfoblastica acuta e arruolati nel protocollo AIEOP ALL2009 all'esordio per le mutazioni di *PTEN*.

Sono stati identificati 15 (12%) pazienti T-ALL con mutazioni somatiche in *PTEN* (Figura 16). Come verificato in precedenza, tutte le mutazioni identificate sono delezioni/inserzioni *frameshift* risultanti nella formazione prematura di *stop codon*. Gli mRNA interessati potrebbero quindi codificare per una proteina tronca a livello della porzione C-terminale e inattiva (84).

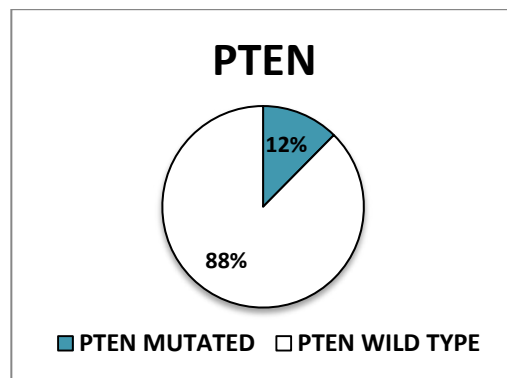


Figura 16. Frequenza di mutazione in *PTEN* nella coorte T-ALL AIEOP ALL2009.

3.5.4 Correlazione delle mutazioni inattivanti *PTEN* con la risposta alla terapia

È stata analizzata l'influenza delle mutazioni di *PTEN* sull'*outcome* (Figura 17). Differentemente dall'analisi della coorte AIEOP R2000/2006 si osserva un effetto sfavorevole della mutazione di *PTEN* in analisi univariata in termini di sopravvivenza libera da eventi e incidenza di ricaduta (CI) nei pazienti mutati rispetto ai *wildtype*. In particolare, i pazienti con mutazione in *PTEN* hanno una più bassa sopravvivenza libera da eventi (*PTEN*-mutati 47,6% vs *PTEN*-non mutati 82% (p=0,002)) e una più alta incidenza di ricaduta (*PTEN*-mutati 41,3% vs *PTEN*-non mutati 13,3% (p=0,006)) rispetto ai non mutati come evidenziato dalle curve di seguito riportate.

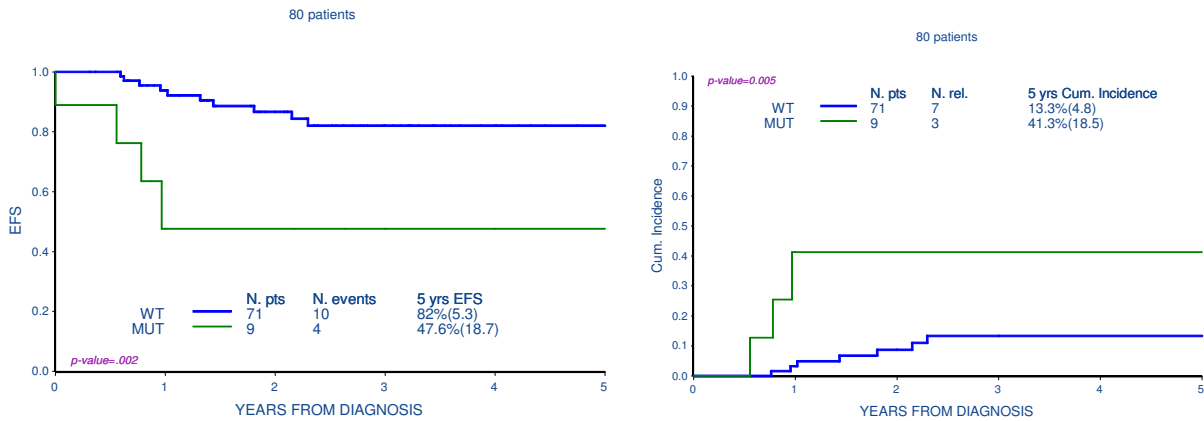


Figura 17. Stima di *Kaplan-Meier* della funzione di sopravvivenza libera da eventi (pEFS) e dalla ricaduta (pCI) tra i pazienti mutati e *wildtype* in *PTEN*.

3.6 ANALISI DI DELEZIONE PER IL GENE *PTEN* MEDIANTE *MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION* (MLPA) NELLE COORTI PEDIATRICHE T-ALL AIEOP ALL2000/R2006 E ALL2009

Gli stessi campioni, sono stati analizzati per la delezione di *PTEN* a livello del cromosoma 10; in particolare, in 151 pazienti pediatriche con diagnosi di leucemia linfoblastica acuta e arruolati nel protocollo AIEOP ALL2000/R2006 e in 143 pazienti pediatriche arruolati nel protocollo AIEOP ALL2009.

La coorte AIEOP ALL2000/R2006 presenta una frequenza di delezione di *PTEN* del 11% (17/151), mentre la coorte AIEOP ALL2009 presenta una frequenza del 8% (12/143).

E' in corso l'analisi del dato di delezione in *PTEN* con la risposta alla terapia.

A. Correlare la presenza delle mutazioni somatiche a livello dei geni NOTCH1, FBXW7, PTEN con la risposta alla terapia nei pazienti pediatrici T-ALL

3. DISCUSSIONE

✓ NOTCH1

La T-ALL è un tumore eterogeneo, e sono state introdotte diverse strategie terapeutiche associate ai gruppi di rischio nel trattamento della T-ALL pediatrica. La stratificazione dei pazienti attualmente si basa principalmente su parametri di risposta al trattamento (prednisone e cinetica MRD). È stato riportato in letteratura che l'overespressione di HOX11, TAL1 e LYL1 è associata ad una prognosi favorevole o sfavorevole in piccole coorti di pazienti. Anche se l'espressione di RNA potrà fornire utili marcatori prognostici in futuro, la quantificazione dell'mRNA nei campioni clinici è tecnicamente laboriosa e dipende criticamente dalla gestione preanalitica del midollo osseo (89, 90). L'immunofenotipo corticale delle cellule T nei primi protocolli ALL-BFM, CoALL e POG è stato precedentemente associato con un *outcome* favorevole rispetto ad altri profili immunofenotipici (91, 92).

Tuttavia, al momento non ci sono marcatori genetici in grado di predire in modo affidabile la risposta al trattamento o l'*outcome* delle T-ALL, sebbene alcuni studi propongono le mutazioni in *NOTCH1* come fattore prognostico (59, 62, 65). Il valore particolare delle mutazioni in *NOTCH1* deriva in primo luogo dall'identificazione di un ampio sottogruppo di pazienti mutati a livello del recettore; in secondo luogo la mutazione si associa con una prognosi migliore in diverse coorti di pazienti descritte in letteratura (59-65), che possono beneficiare di una riduzione dell'intensità di trattamento. Infine, tecnicamente, l'analisi mutazionale *NOTCH1* è vantaggiosa perché si basa sulla tecnologia del sequenziamento del DNA ben consolidata e, di conseguenza, è più affidabile dei marcatori che dipendono dalla quantificazione dell'RNA.

I recettori NOTCH1 sono coinvolti nella regolazione di vari eventi di differenziazione cellulare. Le diverse funzioni sono mediate attraverso un percorso di trasduzione del segnale conservato.

Nell'ematopoiesi, *NOTCH1* è importante per il *commitment* delle cellule staminali in cellule T funzionali ed in particolare per l'assemblaggio di complessi *pre-T-cell-receptor* nei timociti immaturi. Inoltre, è stato dimostrato che l'espressione del frammento attivo ICN1 del recettore nel midollo osseo è sufficiente a indurre la T-ALL nel 100% dei topi trapiantati (93).

In questo studio, le mutazioni in *NOTCH1* sono state identificate nel 65% dei pazienti pediatrici della coorte AIEOP T-ALL, con un incidenza superiore ad alcune delle coorti pubblicate. In

particolare, la coorte T-ALL AIEOP ALL2009 presenta una incidenza di mutazione del 70% che è nettamente superiore alla frequenza di mutazione in letteratura (59-65). La differenza potrebbe essere in parte dovuta alla fase di selezione dei pazienti finali eleggibili per lo studio: sono stati eliminati i pazienti non mutati in tutti gli esoni potenzialmente determinabili ma con almeno un esone non determinabile; al contrario, i pazienti con una mutazione in almeno uno degli esoni in esame sono stati tutti inclusi nelle analisi. Per ovviare a questo *bias* di selezione sono stati nuovamente sequenziati tutti gli esoni che in una prima indagine non erano determinabili ed è attualmente in corso l'analisi di tutti i dati ottenuti.

Le mutazioni *NOTCH1* identificate in questo lavoro sono principalmente localizzate nel dominio HD, seguite da quelle al dominio PEST, in linea con le precedenti coorti (59-65). Le mutazioni in questi domini risultano in un'aberrante up-regolazione del *signaling NOTCH1* (25). In particolare, le mutazioni descritte all'interno del dominio HD possono destabilizzare l'associazione del complesso LNR-HD e aumentare la produzione di ICN1. Al contrario, le mutazioni nonsense e *frameshift* all'interno del 3' terminale dell'esone del gene *NOTCH1* comportano la sintesi di una proteina troncata a livello della porzione C-terminale. Quest'ultima contiene il dominio PEST, implicato nella regolazione del *turnover* proteico (25).

Pertanto, dal momento che mutazioni diverse hanno effetto differente sul *signaling NOTCH1*, la loro associazione con l'*outcome* potrebbe dimostrarsi un valido marcatore prognostico (analisi attualmente in corso). Le mutazioni identificate, in questo studio, nel dominio HD erano puntiformi o inserzioni *in-frame*, mentre le mutazioni PEST erano puntiformi con formazione di *stop codon* o lunghe inserzioni e delezioni *frameshift* (25).

L'effetto di tali mutazioni sulla prognosi della T-ALL è piuttosto dibattuto a partire dal primo *report* del 2006 (59). In questo studio, l'effetto favorevole delle mutazioni attivanti *NOTCH1* è stato confermato a livello della coorte AIEOP T-ALL totale ma sembra dipendere dal tipo di trattamento utilizzato. Infatti, come mostrato in Figura 9, a livello dei pazienti trattati con il protocollo R2006 la presenza della mutazione *NOTCH1* comporta una prognosi migliore rispetto agli stessi pazienti *wildtype* (*NOTCH1*-mutati 85,5% vs *NOTCH1*-non mutati 58,8% (p=0,02)), ma lo stesso dato non è stato osservato nei pazienti mutati *NOTCH1* trattati con il protocollo ALL2000 (p=0,11) e nei pazienti mutati *NOTCH1* e trattati con il protocollo ALL2009 (Figura 15). Questo risultato avvalorava l'ipotesi che l'effetto delle mutazioni può dipendere anche dal tipo di trattamento terapeutico dei pazienti T-ALL. Una possibile spiegazione della perdita di significato prognostico a livello del protocollo AIEOP ALL2009 potrebbe derivare dall'introduzione della nuova stratificazione in MRD al giorno +15 (97), attraverso il quale molti pazienti sono stati stratificati e quindi trattati come alto rischio.

Molto interessante è il dato pubblicato dal gruppo BFM in cui l'effetto favorevole delle mutazioni *NOTCH1* è altamente significativo all'interno dei sottogruppi di rischio standard e intermedio, mentre l'effetto è neutrale all'interno del gruppo di rischio alto (quali sono i pazienti con risposta iniziale al trattamento sfavorevole) (59, 62). Bisognerebbe verificare se questo dato è confermato anche nella coorte AIEOP oggetto di questo studio.

✓ **FBXW7**

Dal momento che le mutazioni inattivanti *FBXW7* concorrono anch'esse nell'attivazione del *pathway NOTCH1*, si ipotizza che abbiano lo stesso effetto clinico delle mutazioni attivanti *NOTCH1* e che entrambe le mutazioni possano agire in sinergia per sensibilizzare la cellula leucemica al trattamento. La maggior parte delle mutazioni note in *FBXW7* si trovano negli esoni 9 e 10 del gene, quali codificano il sito di legame c-terminale tra ligasi e substrato. Tali mutazioni, infatti, perturbano il legame tra *FBXW7* e la forma attiva di *NOTCH1*.

Sono stati identificati 30/152 pazienti con mutazioni somatiche in eterozigosi, e un paziente con mutazione in omozigosi (Figura 7B) all'interno del sottogruppo di pazienti AIEOP T-ALL trattati con il protocollo ALL2000/R2006. Tutte le mutazioni identificate sono mutazioni missenso.

Sono stati, quindi, raggruppati i pazienti sulla base dello stato mutazionale in *FBXW7* ed è stato comparato con la risposta a lungo termine (Figura 10), ma diversamente dalle mutazioni attivanti *NOTCH1*, non si osserva alcuna significatività. Anche nella coorte ALL-BFM le mutazioni in *FBXW7* non erano associate ad un'*outcome* favorevole, sebbene risultavano associarsi ad una miglior risposta al prednisone (62). Infine, è stata comparata l'associazione delle mutazioni nei geni *FBXW7* e *NOTCH1* con la risposta a lungo termine in univariata (Figura 11) ma non si osserva alcuna differenza statisticamente significativa tra i differenti sottogruppi di pazienti in esame, come riportato dal gruppo ALL-BFM (62).

Pertanto, gli effetti dell'attivazione del *NOTCH1 signaling* in seguito alle mutazioni nel recettore o all'inattivazione dell'ubiquitin-ligasi E3 sono differenti e separabili. Infatti, sebbene queste mutazioni sembrano avere effetto simile, l'inattivazione di *FBXW7* non influenza l'*outcome* a lungo termine. Il meccanismo di questo diverso effetto rispetto alle mutazioni attivanti *NOTCH1* è ancora da comprendere. Tuttavia, la differenza potrebbe essere spiegata dal fatto che l'attivazione del recettore è meno pleiotropica rispetto all'inattivazione di *FBXW7*, in quanto questa ubiquitin-ligasi E3 può interferire non solo con il *pathway NOTCH1* ma anche con altri importanti *pathways* di oncogeni e proteine come c-MYC, c-JUN, ciclina E1, mTOR.

✓ PTEN

Molti progressi sono stati fatti di recente verso l'individuazione delle anomalie genetico-molecolari nelle T-ALL. In particolare, è in aumento anche l'individuazione del ruolo svolto dall'inattivazione del soppressore tumorale *PTEN* nelle T-ALL. *PTEN* è una protein-fosfatasi lipidica che regola negativamente il *signaling PI3K/AKT* attraverso la defosforilazione di PIP3 (94). *PTEN* gioca un ruolo critico in numerosi processi quali, crescita, sopravvivenza e migrazione cellulare. Il livello di espressione di *PTEN* è regolato da numerosi meccanismi. Nella leucemia, la perdita di *PTEN* promuove il *self-renewable* delle cellule staminali e la leucemogenesi (72). Nonostante i numerosi dati di letteratura, il valore prognostico delle anomalie in *PTEN* è dibattuto nelle T-ALL. In generale, sembrerebbe emergere un'associazione delle delezioni con una prognosi infausta, mentre le mutazioni di *PTEN* non hanno mostrato un significativo impatto prognostico (95).

In questo studio, sono stati identificati 31 (12%) pazienti mutati in *PTEN* nella corte AIEOP T-ALL, con un'incidenza nettamente inferiore rispetto alla coorte ALL-BFM (frequenza di mutazione del 20%) (38), ma nel *range* di mutazione descritto in altri lavori (83, 85). La differenza potrebbe essere in parte dovuta al fatto che è stato preso in esame solo la regione di *hot spot* a livello dell'esone 7, diversamente dal gruppo ALL-BFM.

Non è stato possibile confermare il dato descritto da *Gutierrez et al.* (95), riguardante il diverso effetto delle delezioni e mutazioni sull'*outcome*, in quanto l'analisi del dato di delezione identificato nella coorte AIEOP T-ALL è attualmente in corso. Pertanto, è disponibile solo il dato dell'effetto della mutazione sull'*outcome* in univariata. In particolare, i pazienti mutati in *PTEN* mostrano una più alta incidenza di ricaduta ($p=0,003$) ed una più bassa EFS ($p=0,01$) rispetto ai pazienti non mutati (Figura 4 C e D) e questo dato è stato osservato anche all'interno dei pazienti trattati con protocollo ALL2009, sottolineandone il significato prognostico negativo. Inoltre, da dati di letteratura è noto che *HES1*, il *downstream target* di *NOTCH1*, regola negativamente la trascrizione di *PTEN* e quindi indirettamente può stimolare il *pathway* della via *PI3K-AKT* (51), pertanto ipotizziamo un sinergismo clinico tra le mutazioni inattivanti *PTEN* e quelle attivanti *NOTCH1*.

Per testare questa ipotesi, è stata analizzata l'associazione delle mutazioni in *NOTCH1* e *PTEN* (Figure 5 e 6), ma, diversamente dal gruppo ALL-BFM in cui l'attivazione di *NOTCH1* antagonizza l'effetto sfavorevole dell'inattivazione di *PTEN* (38), non è stata osservata alcuna differenza statisticamente significativa. Questa osservazione suggerisce che c'è ancora molto da scoprire riguardo al ruolo di questi geni nella leucemogenesi delle T-ALL.

I dati qui presentati hanno implicazioni potenzialmente importanti per la stratificazione dei pazienti T-ALL. Infatti, alla luce dell'impatto prognostico negativo della mutazione in *PTEN*, l'inattivazione

di questo soppressore tumorale e la conseguente iperattivazione costitutiva della via PI3K/AKT potrebbe essere utile come marcatore per l'identificazione dei pazienti candidati al trattamento con inibitori di PI3K e/o dei *targets* a valle (74).

A. Correlare la presenza delle mutazioni somatiche a livello dei geni NOTCH1, FBXW7, PTEN con la risposta alla terapia nei pazienti pediatrici T-ALL

3. CONCLUSIONE

In conclusione i dati mostrano che:

- La coorte utilizzata si conferma essere rappresentativa e utilizzabile per le specifiche successive analisi progettate.
- La prevalenza delle mutazioni di *PTEN* e *NOTCH1* è risultata rispettivamente pari a 12% e 65% a livello dei pazienti della coorte AIEOP T-ALL trattati con i protocolli AIEOP ALL2000, AIEOP R2006 e AIEOP ALL2009.
- L'analisi della sopravvivenza mostra una più alta incidenza di ricaduta ed una sopravvivenza inferiore nei pazienti con mutazioni inattivanti *PTEN* nella coorte AIEOP T-ALL totale analizzata. In particolare, il significato prognostico negativo di *PTEN* nella coorte analizzata persiste anche nell'ultimo protocollo terapeutico analizzato AIEOP ALL2009.
- Al contrario, la correlazione della presenza della mutazione *NOTCH1* con l'*outcome* mediante EFS e CI nella coorte AIEOP T-ALL totale mostra un effetto prognostico positivo che non si mantiene in tutti i protocolli terapeutici. Nel dettaglio, è stato osservata una miglior sopravvivenza libera da eventi nei pazienti mutati *NOTCH1* rispetto ai *wildtype* nella coorte AIEOP R2006, ma tale effetto favorevole della mutazione *NOTCH1* non è stato confermato a livello del protocollo successivo AIEOP ALL2009.

Nella coorte di pazienti analizzata, lo stato mutazionale di *PTEN* incide sull'*outcome* e lo *screening* per le alterazioni di questo soppressore tumorale sembra pertanto utile per la stratificazione dei pazienti in gruppi di rischio alto. Al contrario, lo stato mutazionale di *NOTCH1* non mantiene il suo effetto predittivo sull'*outcome* in tutti i protocolli terapeutici e lo *screening* per le alterazioni di questo recettore non sembra pertanto utile per la stratificazione dei pazienti in gruppi di rischio. Futuri modelli di stratificazione dovranno comunque includere un maggior numero di *marker* genetici.

Poiché l'unica differenza evidenziabile tra questa coorte e quelle descritte in letteratura consta nella tipologia di trattamento, si ipotizza che l'impatto prognostico di *PTEN* e *NOTCH1* dipenda dal protocollo terapeutico utilizzato.

Prospettive future

Poiché l'analisi di MRD è il più importante fattore prognostico nel trattamento delle T-ALL (96), sarà fatta l'analisi multivariata e la presenza delle mutazioni sarà correlata con il dato in MRD al giorno +15 di terapia analizzato mediante citofluorimetria, in quanto questo costituisce il più importante indice di ricaduta (97). Infine, i dati di mutazione saranno combinati con i dati di altre coorti pediatriche.

È attualmente in corso l'analisi dell'effetto sull'*outcome* del dato di delezione al livello del gene *PTEN* nella corte AIEOP T-ALL.

B. Comprendere l'effetto delle mutazioni somatiche dei geni *NOTCH1*, *FBXW7* e *PTEN* mediante *Gene Expression Profile* e *Reverse Phase Protein Array* al fine di identificare attivazione di geni specifici o alterazione di *pathway* e nuovi *target* terapeutici

RISULTATI

3.7 Analisi dell'effetto delle mutazioni somatiche in *NOTCH1* e *FBXW7* nella coorte pediatrica T-ALL AIEOP ALL2000/R2006 mediante *Reverse Phase Protein Array* (RPPA)

I dati mostrati derivano da analisi preliminari.

Come riportato in dati di letteratura su linee cellulari T-ALL, in primo luogo, è stata dimostrata la diversa attivazione del *pathway NOTCH1* nei pazienti con mutazioni attivanti rispetto ai pazienti *wildtype*, attraverso l'analisi del livello della forma attivata di *NOTCH1* (ICN1), mediante *Reverse Phase Protein Array* (RPPA). Come si osserva dal *dot plot* (Figura 18), i pazienti con mutazioni attivanti *NOTCH1* hanno un più alto livello di ICN1 rispetto ai *wildtype*.

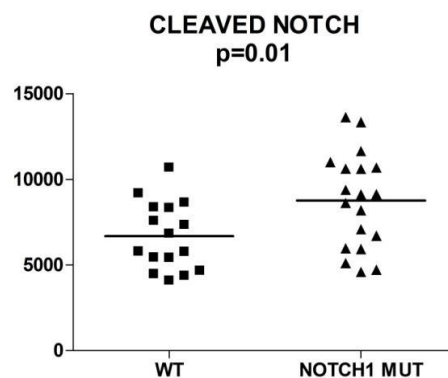


Figura 18. Profilo di espressione proteica del livello di ICN1 tra i pazienti mutati in *NOTCH1* e quelli *wildtype* mediante RPPA.

Tuttavia, il *dot plot* mostra una distribuzione eterogenea in entrambi i gruppi e alcuni dei pazienti *wildtype* presentano un alto livello di ICN1.

In seguito, sulla base dei dati di letteratura e del diverso effetto delle mutazioni *NOTCH1* (43), è stato osservato il diverso profilo di espressione proteica della forma attiva *NOTCH1* e della proteina totale nei differenti sottogruppi mutazionali (Figura 19):

- *only HD* (pazienti con mutazione solo nel dominio HD di *NOTCH1*)
- *only PEST* (pazienti con mutazione solo nel dominio PEST di *NOTCH1*)
- *HD+PEST* (pazienti con mutazione sia nel dominio HD che PEST di *NOTCH1*)
- *HD only+FBXW7* (pazienti con mutazione sia nel dominio HD di *NOTCH1* che in *FBXW7*)
- *NON MUT* (pazienti non mutati in *NOTCH1* e *FBXW7*)

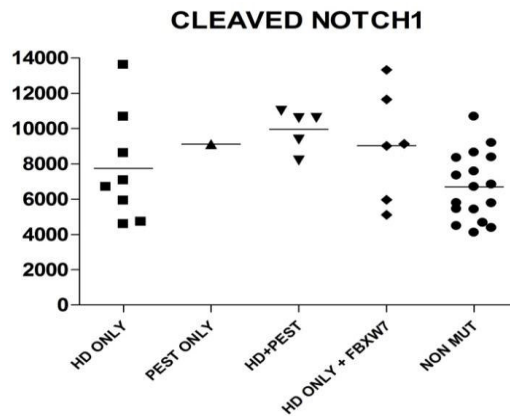


Figura 19. Profilo di espressione proteica del livello di ICN1 tra i pazienti mutati in *NOTCH1* e *FBXW7* e quelli *wildtype* mediante RPPA.

Per quanto riguarda il livello di ICN1, i pazienti *only HD* sono egualmente distribuiti come i *NON MUT* e solo i pazienti *HD+PEST* hanno un più alto livello di ICN1 rispetto ai pazienti *wildtype*. Inoltre, è stata osservata la differente attivazione dei *targets* di *NOTCH1* nei pazienti mutati rispetto ai *wildtype*. Nelle tabelle seguenti sono rappresentate le proteine maggiormente espresse (Tabella 5B) o iperfosforilate (Tabella 5A) nei pazienti mutati in *NOTCH1* rispetto ai *wildtype*.

A	Proteine iperfosforilate nei pazienti NOTCH1-Mutati vs NOTCH1-non mutati	MW PRISM
	SRC Y416	0,008
	4EBP1 S65	0,03
	AMPKa S485	0,03
	AMPKb S108	0,01
	AKT S473	0,001
	ASK1 S83	0,04

ATF2 T71	0,005
CREB S133	0,005
ERa S118	0,003
PRAS40 T426	0,05
eNOSIII S116	0,001
GSK3 ab S21-9	0,01
IRS-1 S612	0,01
LCK Y505	0,0003
MEK1-2 S217-221	0,01
mTOR S2448	0,03
PKCa S667	0,001
pSAPK-JNK	0,003
STAT1 Y701	0,0009

B

Proteine overespresse nei pazienti NOTCH1-Mutati vs NOTCH1-non mutati	MW PRISM
ANNEXIN 2	0,03
BAK	0,003
CYCLIN A	0,004
CYCLIN D1	0,0003
B-CATENIN	0,02
NOTCH1	0,003
TCF4	0,02
c-MYC	0,05
Cleaved NOTCH1	0,01
IL2RA	0,03
PH S6RB	0,05
INTEGRIN B1	0,03

Tabella 5. Profilo di espressione proteica (A) e di fosforilazione (B) tra i pazienti mutati in *NOTCH1* e quelli *wildtype* mediante RPPA.

Tra le proteine differenzialmente espresse tra i pazienti mutati e non mutati vi sono *targets* diretti di *NOTCH1* come c-MYC, STAT1 e la Ciclina D1. Sia la Ciclina D1 che STAT1, come confermato nel *dot plot*, sono presenti con più alto livello nei mutati (Figura 20).

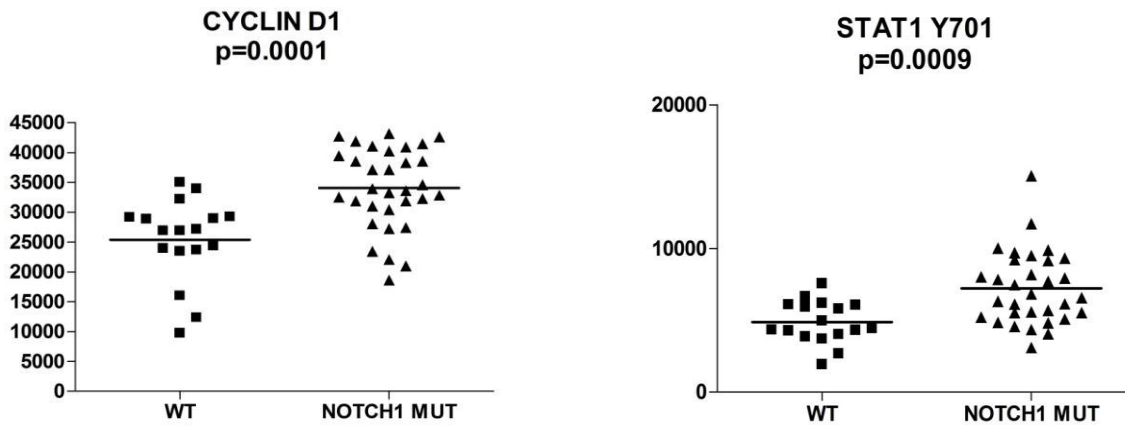


Figura 20. Profilo di espressione proteica del livello di Ciclina D1 tra i pazienti mutati in *NOTCH1* e quelli *wildtype* mediante RPPA.

Tra le proteine iperfosforilate si evidenziano l'AKT S473 ed mTOR S2448 sottolineando il ruolo del PI3K/AKT/mTOR *pathway* nella leucemia indotta da *NOTCH1*.

3.8 Analisi dell'effetto delle mutazioni somatiche in *NOTCH1* nella coorte pediatrica T-ALL AIEOP 2000/R2006 mediante *Gene Expression Profile* (GEP)

Successivamente, è stato analizzato se la differente attivazione di *NOTCH1* tra i pazienti mutati e *wildtype* risulta nell'attivazione di specifici geni mediante l'analisi del profilo di espressione genica (Figura 21). I dati di espressione sono disponibili per 42 pazienti della coorte AIEOP T-ALL trattata con i protocolli ALL2000/R2006 sequenziata, di cui 30 pazienti con mutazioni attivanti *NOTCH1*. Dall'analisi supervisionata del profilo di espressione genica dei pazienti mutati rispetto ai *wildtype* si osserva che i pazienti si suddividono in 2 *cluster*, MUTATI (arancione) e NON MUTATI (blu), eccetto due pazienti mutati che ricadono all'interno del *cluster* dei non mutati. Dall'analisi non supervisionata dei geni differenzialmente espressi tra il gruppo dei mutati e i non mutati, emergono più di 300 geni differenzialmente espressi. In particolare, 170 geni sono upregolati nei mutati rispetto ai *wildtype* e 180 sono downregolati. Tra i geni upregolati vi sono molti *targets* gene di *NOTCH1*, quali *HES1*, *HES4*, *DTX1*, *PTCRA*, *NOTCH3* e *IL7R* confermando, quindi, l'iperattivazione del *pathway* *NOTCH1* dei mutati rispetto ai *wildtype*.

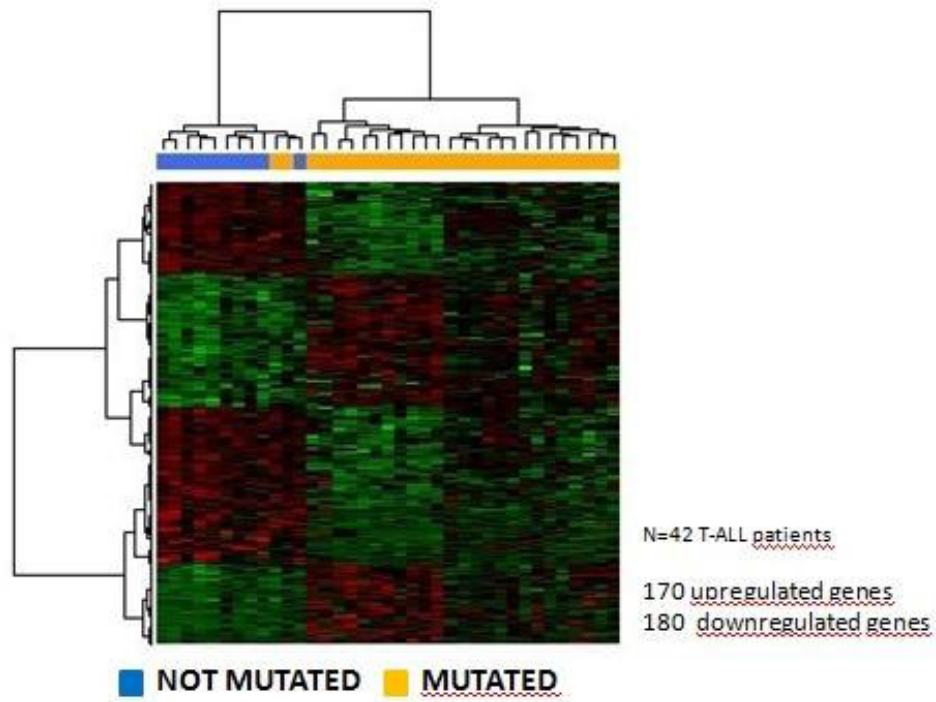


Figura 21. Profilo di espressione genica tra i pazienti mutati in *NOTCH1* e quelli *wildtype* mediante GEP.

B. Comprendere l'effetto delle mutazioni somatiche dei geni *NOTCH1*, *FBXW7* e *PTEN* mediante *Gene Expression Profile* e *Reverse Phase Protein Array* al fine di identificare attivazione di geni specifici o alterazione di *pathway* e nuovi *target* terapeutici

3. DISCUSSIONE

In condizioni fisiologiche, *NOTCH1* è attivato dal legame con il ligando e dal conseguente taglio proteolitico che libera la porzione intracellulare di *NOTCH1* (ICN1) nel citoplasma. ICN1 successivamente trasloca nel nucleo e induce l'espressione di importanti geni *targets*, come *c-MYC*, *HES1*. L'effetto di ICN1 è limitato dall'ubiquitinazione e dalla degradazione. Questo processo è regolato dall'E3 ubiquitin ligasi *FBXW7*, che lega il C-terminale del dominio PEST di ICN1 (28, 29).

Inoltre, le mutazioni a livello dei principali domini di *NOTCH1*, quali il dominio di eterodimerizzazione e il dominio PEST hanno un effetto diverso. In particolare, le mutazioni a livello di HD attivano il recettore in modo costitutivo e quindi indipendente dal legame con il ligando, mentre mutazioni a livello del dominio PEST aumentano la stabilità della forma attiva ICN1, in quanto ne viene impedita la degradazione da parte del proteasoma (87).

Sulla base del ruolo di *NOTCH1* nella leucemogenesi delle T-ALL, dell'identificazione di mutazioni somatiche in più del 60% dei pazienti pediatrici e l'effetto favorevole in termini di EFS in molte coorti pediatriche sono in via di sviluppo farmaci diretti contro noti *downstream targets* di *NOTCH1*, ancora non clinicamente applicabili. In particolare, la perexilina è un farmaco con forte attività antileucemica e antagonista di *HES1*. *HES1*, un repressore trascrizionale controllato da *NOTCH1*, è mediatore fondamentale della leucemogenesi indotta da *NOTCH1*, necessario per la sopravvivenza delle cellule tumorali (88).

Al fine di comprendere l'effetto delle mutazioni somatiche dei geni *NOTCH1* nella coorte in esame e identificare alterazioni di *pathway* specifici e potenziali nuovi *target* terapeutici, i dati ottenuti dalla precedente analisi sono stati analizzati mediante *Gene Expression Profile* e *Reverse Phase Protein Array*.

✓ RPPA

La tecnica di RPPA rappresenta una metodologia innovativa, ad alta sensibilità e specificità, che permette di ottenere informazioni sulle modificazioni post-traduzionali, tra cui la fosforilazione delle proteine, in modo da poter studiare lo stato di attivazione del *network* proteico e, quindi, lo

stato funzionale dei campioni in analisi. Tra i vantaggi di questa tecnica si possono elencare l'elevata efficienza, sensibilità e specificità, il fatto di poter analizzare un ampio numero di pazienti/proteine in tempi brevi, sono necessari volumi minimi di lisato proteico, ed un'elevata riduzione della variabilità sperimentale poichè tutti i campioni sono sottoposti a condizioni identiche, alle stesse quantità e allo stesso tempo di incubazione di reagenti e di anticorpi. Gli RPPA sono già stati applicati allo studio del proteoma in differenti patologie incluse le leucemie acute pediatriche (98).

I risultati preliminari dell'analisi dell'effetto delle mutazioni somatiche a livello del *pathway NOTCH1*, hanno dimostrato l'attivazione costitutiva del *pathway* nei pazienti mutati rispetto ai *wildtype*, sulla base dei livelli di ICN1 e dei suoi *targets*, quali c-MYC, STAT1 e la ciclina D1.

Notevole rilevanza potrebbe derivare dalla diversa fosforilazione di AKT e di mTOR, in quanto coinvolti in uno dei più importanti *pathway* implicati nella leucemogenesi delle T-ALL, per il quale sono noti numerosi studi di inibitori.

✓ GEP

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 trascrizione.

Molti lavori di *Gene Expression Profiling* sono stati finalizzati ad individuare specifici *patterns* di geni che potessero trovare impiego quali "predittori" della resistenza individuale a determinati trattamenti terapeutici o come nuovi bersagli terapeutici verso cui indirizzare terapie innovative ed efficaci.

I dati mostrati in questo studio evidenziano numerosi geni differenzialmente espressi tra i pazienti T-ALL mutati in *NOTCH1* e quelli *wildtype*. In particolare, si osserva una upregolazione dei geni *targets* di *NOTCH1* quali *HES1* e *IL7R*.

Come già anticipato nei paragrafi precedenti, studi di letteratura mostrano che *targets* di *NOTCH1* sono utilizzati come bersaglio terapeutico per lo sviluppo di terapie antitumorali specifiche in pazienti T-ALL (88).

IL7R, cui è noto il coinvolgimento nella patogenesi sia della BCP-ALL che della T-ALL (41) è un *target* trascrizionale di *NOTCH1* e in questo lavoro è stato identificato tra i geni upregolati nei pazienti *NOTCH1* mutati. Studi pubblici recenti mostrano il *pathway* *JAK/STAT*, della via di segnalazione di *IL7R*, come bersaglio terapeutico in molti tumori. In particolare, il *Ruxolitinib* è emerso come efficace inibitore di *JAK1/2* in modelli murini di *xenograft* ETP-T-ALL (99), il cui effetto è testato mediante analisi del livello di fosforilazione dei membri della famiglia *STAT*.

STAT1 è stata identificata tra le proteine iperfosforilate nei pazienti *NOTCH1* mutati rispetto ai *wildtype* mediante RPPA (Figura 20; Tabella 5) ed nel lavoro (99) risulta essere efficace bersaglio del *Ruxolitinib*. Pertanto, l'iperfosforilazione di *STAT1* e l'attivazione di *IL7R* potrebbero essere utilizzati come *target* terapeutico nei pazienti con *NOTCH1* attivato. Quest'ultima osservazione dovrebbe essere verificata e confermata mediante studi funzionali *in vitro* ed *in vivo*.

B. Comprendere l'effetto delle mutazioni somatiche dei geni *NOTCH1*, *FBXW7* e *PTEN* mediante *Gene Expression Profile* e *Reverse Phase Protein Array* al fine di identificare attivazione di geni specifici o alterazione di *pathway* e nuovi *target* terapeutici

3. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Attualmente i dati derivano da analisi preliminari che mostrano l'attivazione costitutiva del *pathway* *NOTCH1* nei pazienti mutati rispetto ai *wildtype* sulla base della diversa espressione dei *targets* del recettore.

Lo studio procederà con l'analisi delle proteine overesprese e iperfosforilate nei pazienti con mutazioni attivanti *NOTCH1* rispetto ai *wildtype* al fine di identificare alterazioni di *pathway* specifici e nuovi possibili *target* terapeutici.

Per quanto riguarda l'analisi dei geni differenzialmente espressi verrà effettuata l'analisi all'interno di particolari sottogruppi mutazionali *NOTCH1* (es. dominio HD, dominio PEST) e l'associazione con i pazienti mutati in *PTEN*.

Inoltre lo studio procederà con l'analisi in GEP dell'intera coorte T-ALL AIEOP sequenziata in questo lavoro sia per *NOTCH1* che per *PTEN* al fine di identificare eventuali bersagli terapeutici.

CAPITOLO 4

Identificazione di nuove mutazioni geniche coinvolte nella patogenesi delle T-ALL (*Whole exome sequencing* di pazienti alto rischio)

4. INTRODUZIONE

Come discusso nel capitolo 1, la ALL è una neoplasia maligna caratterizzata da una proliferazione clonale incontrollata di linfociti immaturi che circolano ed infiltrano il midollo osseo e rappresenta il 25% dei tumori pediatrici. La stratificazione di rischio e la successiva adozione di una terapia sulla base di tale stratificazione ha notevolmente incrementato la sopravvivenza dei pazienti pediatrici. Nonostante ciò, il 20% dei pazienti sviluppa una ricaduta e di questi solo la metà sopravvivrà. Una parte considerevole dei pazienti che ricadono non presenta nessuna delle alterazioni genetiche incluse nei protocolli attuali e associate alla stratificazione di rischio alto (108). Per questo c'è ancora molto da comprendere sull'utilizzo di specifici geni utilizzabili per la stratificazione alla terapia e sulla presenza e cooperazione delle diverse mutazioni causanti il tumore.

Le mutazioni genetiche somatiche che iniziano e guidano la cancerogenesi sono l'*hallmarks* del cancro (109). Le tecniche di biologia molecolare hanno permesso di caratterizzare differenti sottotipi di ALL sulla base delle diverse alterazioni geniche. In aggiunta, studi recenti identificano nuove alterazioni genetiche associate alla prognosi e che possono quindi essere utilizzate per la stratificazione dei pazienti, nonché per una terapia mirata (110). In questo contesto, risulta interessante l'identificazione di nuove mutazioni che potrebbero avere un ruolo nella leucemogenesi.

4.1 NEXT GENERATION SEQUENCING

Negli ultimi anni, le tecnologie di nuova generazione hanno portato alla ribalta il concetto dell'eterogeneità del tumore, cioè il fatto che i distinti sottotipi molecolari siano sostenuti da diverse alterazioni genetiche ed epigenetiche. I profili di espressione basati sui *microarrays* e le tecniche di ibridazione possono garantire una valutazione semiquantitativa dell'espressione genica e sebbene abbiano fornito abbondanti dati relativi alle anomalie del numero di copie geniche, non sono stati in grado di studiare le alterazioni genomiche strutturali e le mutazioni puntiformi. I progressi della tecnologia hanno portato così all'avvento del sequenziamento massivo in parallelo (anche conosciuto come sequenziamento di nuova generazione, NGS) che ha permesso di maturare

informazioni qualitative e quantitative riguardo ogni tipo di acido nucleico in un dato campione con un incredibile produttività e costi relativamente limitati (Figura 1).

Con un diverso approccio, questi metodi di sequenziamento hanno superato la limitata produttività del tradizionale sequenziamento di *Sanger* creando dei micro reattori e/o attaccando le molecole di DNA che devono essere sequenziate a superfici solide o biglie, permettendo il realizzarsi di milioni di reazioni di sequenziamento in parallelo. Ancora più importante della produttività del sequenziamento garantita da questa tecnologia e del suo costo relativamente basso, è il tipo di dati che essa genera. Il sequenziamento di nuova generazione fornisce infatti, rispetto a quello classico, letture molto più corte (da 21 a 400 paia di basi) ma milioni di esse; è possibile in questo modo ottenere il sequenziamento di una singola molecola di DNA, cioè si è in grado di identificare una mutazione somatica all'interno di una piccola sottopopolazione di cellule immerse in una popolazione più grande con sequenze *wildtype*.

Tuttavia, l'accuratezza di ogni lettura (*reads*) può risultare significativamente più bassa rispetto ai risultati generati dal sequenziamento di *Sanger* e per questo motivo viene generalmente richiesta una validazione fisica utilizzando i tradizionali metodi di sequenziamento.

Ad ogni modo, i sequenziamenti di nuova generazione hanno trovato oggi molte applicazioni a partire dall'analisi di specifiche regioni del genoma, per arrivare a sequenziamenti dell'intero esoma passando dallo studio del DNA germinale, dal catalogo dei polimorfismi presenti nella popolazione, dal sequenziamento dell'RNA e dall'analisi dell'espressione genica.

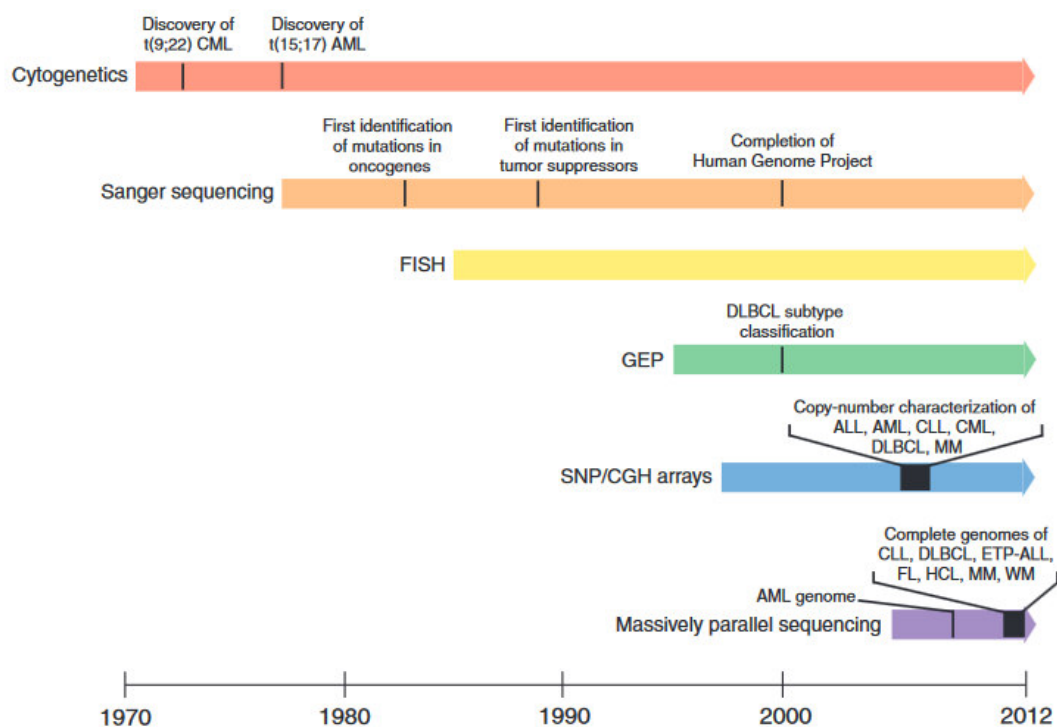


Figura 1. Evoluzione dei metodi di rilevamento molecolari e relative scoperte genetiche (111).

4.1.1 I differenti metodi di sequenziamento NGS: accenni

A seconda delle informazioni richieste possono essere utilizzati diversi tipi di sequenziamento quali, *Whole-Genome Sequencing* (WGS), *Whole-exome Sequencing* (WES) e *Messenger RNA Sequencing* (mRNA Seq). Il WGS richiede la preparazione di librerie di DNA, la quantità di DNA di partenza dipende dal tipo di libreria. Esso consente comunque l'identificazione di varianti all'interno dell'intero genoma.

Il WES è usato per studiare ciò che è contenuto all'interno dell'esoma e delle regioni non tradotte. Dato che l'esoma costituisce solo l'1,4% del genoma permette di sequenziare contemporaneamente più campioni. In particolare, consente il sequenziamento e la successiva analisi accoppiata del campione tumorale e del controllo sano permettendo l'individuazione delle varianti tumore-specifiche. Infine, l'mRNA Seq rileva mutazioni così come rare trascrizioni e permette la quantificazione precisa dell'espressione di queste trascrizioni. In confronto al GEP, il range ica di espressione può essere quantificato più accuratamente, permettendo anche il rilevamento di trascritti rari (112).

4.1.2 Ion Torrent Technology

Le *Personal Genome Machines* (PGMs) sono sequenziatori NGS di dimensioni ridotte che sono state studiate specificamente per piccoli laboratori (sono note anche come soluzioni *benchtop* per richiamare l'idea di una piccola macchina comodamente sistemata su un bancone da laboratorio). Le PGM presentano i vantaggi tipici delle analisi NGS (velocità e costi di analisi ridotti), anche se hanno una resa (*output*) inferiore rispetto ai sequenziatori più grossi come il *454 Roche*, il *Genome Analyzer* o l'*HiSeq* di Illumina o il *SOLiD* di *Applied Biosystems*.

I sequenziatori *benchtop Ion Torrent* erano originariamente prodotti dalla *Ion Torrent*, che è stata poi acquisita da *Life Technologies*. Ne esistono due modelli: la *Ion PGM* e la *Ion Proton*. Entrambe sfruttano la tecnologia del sequenziamento tramite semiconduttore. In questa tecnologia, ogniquale volta un nucleotide viene incorporato nel filamento in crescita, viene rilasciato un protone. La macchina è in grado di "capire" se il nucleotide è stato incorporato percependo le variazioni di pH indotte dal rilascio del protone. Come nel sistema *Roche 454*, anche nella *Ion PGM* ogni nucleotide viene interrogato singolarmente: il supporto con il filamento in crescita viene cioè cimentato con soluzioni contenenti un solo nucleotide per volta. Se il nucleotide cimentato non è complementare, questo non si lega, nessun protone viene rilasciato e non si ha quindi nessuna variazione di pH. Se per caso vengono incorporati due nucleotidi, vi sarà una variazione di pH "doppia", che verrà adeguatamente registrata. *Ion Torrent* non utilizza molecole fluorescenti e non necessita quindi dei dispositivi di cattura e analisi della fluorescenza.

Nello studio è stata impiegata la *Ion Proton*.

La *Ion Proton* è un po' più potente della *Ion PGM* ed è infatti adatta all'*exome* e al *genome sequencing*. Funziona con due tipi di chip: chip Proton I (160 milioni di pozzetti, adatto al sequenziamento di due esomi umani in parallelo) e chip Proton II (660 milioni di pozzetti, adatto al sequenziamento di un intero genoma umano). E' molto veloce e permette di analizzare i campioni in un arco di tempo di circa 16 ore (*single day workflow*).

Ulteriori dettagli sono descritti nel Capitolo 2 (Materiali e Metodi).

4.1.3 NGS nei tumori ematologici

Il NGS è in grado di rilevare anche nuove varianti e senza dubbio in futuro avrà un ruolo di rilievo nella diagnosi. I primi studi hanno dimostrato che la potenzialità di questa tecnologia risiede nella sua capacità di identificare le mutazioni somatiche tumore-specifiche che altre piattaforme non hanno (113). A differenza delle esistenti alternative come GEP, CGH o SNP-array, il sequenziamento può rilevare simultaneamente il numero di copie, gli SNP e le mutazioni di sequenza (114).

Uno studio di casi B-ALL alto rischio mediante *transcriptomic resequencing* ha identificato nuovi riarrangiamenti genici quali *STRN3-JAK2* e *NUP214-ABL1* che erano stati precedentemente riportati solo nelle T-ALL. Entrambi i riarrangiamenti comportano l'attivazione costitutiva della chinasi, pertanto la loro individuazione consente il potenziale trattamento con inibitori di tirosi-chinasi (112). L'NGS ha permesso l'identificazione di alterati livelli di espressione genica di *EZH2* e mutazioni nei geni PCR2-associati (*DNMT3A* e *JARID2*) nelle T-ALL, fornendo una correlazione chiave di tale leucemia con le alterazioni al livello della cromatina (115).

Inoltre, così come è migliorata la tecnologia degli *array* nel corso degli anni, anche la capacità di identificare la varianti mediante sequenziamento migliora. Uno studio di sequenziamento del genoma condotto su un paziente AML adulto con cariotipo normale ha rilevato inserzioni e delezioni in due geni e mutazioni somatiche non-sinonime in otto geni; due anni dopo lo stesso campione è stato ri-sequenziato identificando una delezione *frameshift* in *DNMT3A* che non era stata individuata in precedenza. Successivamente numerosi altri campioni sono stati screenati confermando la presenza di questa delezione nel 22-30% dei pazienti AML. La sua identificazione ha portato allo sviluppo di farmaci mirati alla mutazione nella AML (116).

Nonostante l'identificazione di numerose mutazioni somatiche in geni che codificano per fattori di trascrizione, così come in varie proteine e chinasi ha contribuito ad una migliore comprensione del processo leucemico, la generazione e l'interpretazione dei dati rimane una questione chiave per la diagnostica di laboratorio. Ci sono una serie di algoritmi utilizzati per normalizzare i dati e se non

utilizzati in modo appropriato, possono facilmente essere trascurate nuove importanti varianti. L'introduzione del NGS in diagnostica è principalmente ostacolata dal fatto che c'è ancora moltissimo da imparare.

Infine, mentre è chiara l'importanza dell'identificazione delle mutazioni nella comprensione della fisiopatologia della malattia, non è ancora chiaro il loro effetto sul decorso della malattia e sulla risposta al trattamento. Pertanto, serviranno studi funzionali affinché i pazienti possano beneficiare delle nuove tecnologie disponibili.

4.2 "MEDICINA PERSONALIZZATA"

Nel corso dell'ultimo mezzo secolo, sono state impiegate numerose tecnologie per caratterizzare in modo sistematico, con livelli di risoluzione crescenti, lo stato dei genomi tumorali attraverso i differenti tipi di cancro (Figura 2) (117).

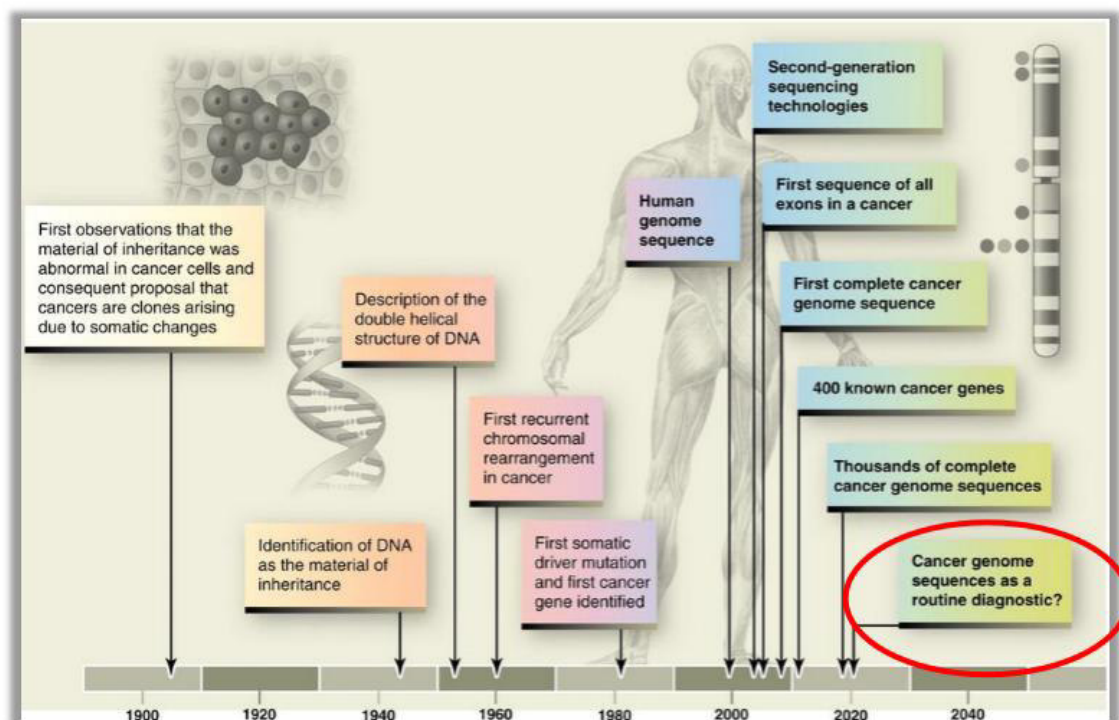


Figura 2. In figura è rappresentato l'asse temporale dalla prima osservazione di mutazioni somatiche in cellule tumorali alla prospettiva futura di utilizzare il sequenziamento del genoma tumorale nella routine diagnostica (117).

Ad oggi la disponibilità di migliaia di sequenze di genomi tumorali, grazie allo sviluppo di tecniche sempre più innovative, ha posto le basi per l'identificazione di tutti gli eventi "drivers" che potrebbero essere il bersaglio di nuovi ed esistenti farmaci. Questo ha permesso lo sviluppo della medicina personalizzata, che mira a fornire una terapia specifica attraverso le caratteristiche

molecolari del tumore del paziente. In questo contesto, *Rubio-Perez et al.* (118) propongono una strategia di predizione in silico di farmaci antitumorali sulla base delle alterazioni *drivers* annotate nei diversi tipi di tumore. La maggior parte dei campioni utilizzati nell'analisi deriva dal *Pan-Cancer Project*, un progetto per l'analisi incrociata di tumori con l'obiettivo di raggruppare i dati derivanti da differenti tipi di tumore, analizzarli, interpretarli e rendere disponibili sia i dati ottenuti che le analisi; fornendo così, un potente strumento statistico per rilevare le anomalie genomiche dei diversi tipi di tumore nonché le anomalie comuni. Nello studio gli autori dimostrano che solo il 6% dei tumori della coorte analizzata (che comprende 4.000 differenti tumori) può attualmente beneficiare di una terapia mirata con farmaci approvati dalla FDA (118).

I grandi progetti di sequenziamento del genoma tumorale, come il recente lavoro di Abel Gonzalez-Perez (119), hanno rilevato poche centinaia di geni *drivers* coinvolti nell'insorgenza dei tumori, in 28 diversi tipi di tumori. Una delle sfide principali emergenti dall'identificazione di questo catalogo di *drivers* è dare un senso all'eterogeneità dei diversi tipi di tumore. Questa è la chiave per comprendere come la carcinogenesi si manifesta e sviluppa nelle neoplasie e per poter effettuare una diagnosi sempre più precoce; inoltre, apre la possibilità di impiegare strategie terapeutiche mirate a proteine *drivers* in grado di contrastare l'interazione di un altro *driver* ad esse connesso (119) (Figura 2).

In questa visione prospettica, i dati di sequenziamento di esoma condotti nel lavoro potrebbero essere interpretati anche come casi leucemici singoli, identificando il potenziale *driver* tumorale della leucemia del paziente in esame, che potrebbe essere utilizzato come bersaglio terapeutico.

4.3 CCND3: GENE CANDIDATO PER L'ANALISI DI RICORRENZA NELLO STUDIO

4.3.1 Il complesso Ciclina D3 - CDK4/6 regola il ciclo cellulare

L'ingresso delle cellule nel ciclo cellulare dipende da numerosi stimoli che promuovono la crescita, e la progressione ordinata delle cellule attraverso le varie fasi del ciclo cellulare dipende dalle chinasi ciclino-dipendenti (CDK), le quali sono attivate dal legame alle cicline, proteine così chiamate per la natura ciclica della loro produzione e degradazione, che svolgono un ruolo essenziale per la regolazione del ciclo cellulare. Pertanto, se la regolazione dei geni deputati al controllo del ciclo cellulare viene alterata in conseguenza a mutazioni o amplificazioni, la proliferazione cellulare viene disregolata e di conseguenza le cellule possono proliferare in maniera incontrollata come accade nei tumori (120). Le cellule proliferano normalmente solo in seguito a segnali mitogeni di sviluppo o in risposta alle esigenze di crescita dei tessuti, invece la proliferazione delle cellule tumorali procede sostanzialmente in maniera incontrollata perché queste cellule non sono più soggette a segnali inibitori di proliferazione oppure in seguito a cambiamenti

nel pattern di espressione genica, e non richiedono necessariamente fattori di crescita estrinseci per mantenere il loro stato proliferativo (120).

Le cicline di tipo D sono gli ultimi destinatari dei segnali mitogeni ed oncogeni e nelle cellule umane ne esistono di 3 tipi (cicline D1, D2, D3) che sono codificate da geni diversi, ma mostrano una sostanziale similarità aminoacidica e sono espresse in modo altamente sovrapposto nelle cellule proliferanti. Una volta indotte, le cicline D legano e attivano le chinasi ciclino-dipendenti CDK4/6 promuovendo l'ingresso nel ciclo cellulare (121). Questi complessi ciclineD-CDK sono regolati da molecole inibitorie che esercitano un controllo negativo sul ciclo cellulare. Gli inibitori delle chinasi ciclino-dipendenti (CKIs) appartengono alla famiglia INK4 che agiscono sull'attività delle chinasi di tipo D (CDK) di cui fanno parte p16 (CDKN2A), p15(CDKN2B), p17; e p21(CDKN1A), p27(CDKN2B), p57, facenti parte della famiglia CIP/KIP, che inibiscono il complesso cicline D/CDK4-6 (120).

L'alterazione del controllo dei *checkpoints* del ciclo cellulare in seguito alla perdita della regolazione negativa della crescita, è un processo fondamentale nel processo di trasformazione tumorale.

I principali punti di controllo del ciclo cellulare sono rappresentati dal *checkpoint* G₁-S che impedisce la replicazione di cellule con danni al DNA e dal *checkpoint* G₂-M che controlla il completamento della replicazione del DNA e l'ingresso in mitosi della cellula.

In condizioni fisiologiche i complessi ciclina D-CDK4/6 regolano la transizione da G₁ a S mediante la fosforilazione della proteina del retinoblastoma (Rb). Quest'ultima è un soppressore tumorale che svolge un ruolo centrale nel controllo negativo del ciclo cellulare e nella progressione del tumore poiché consente il mantenimento delle cellule in fase G₁, bloccando l'ingresso in fase S e la crescita cellulare (Figura 3) (120, 121).

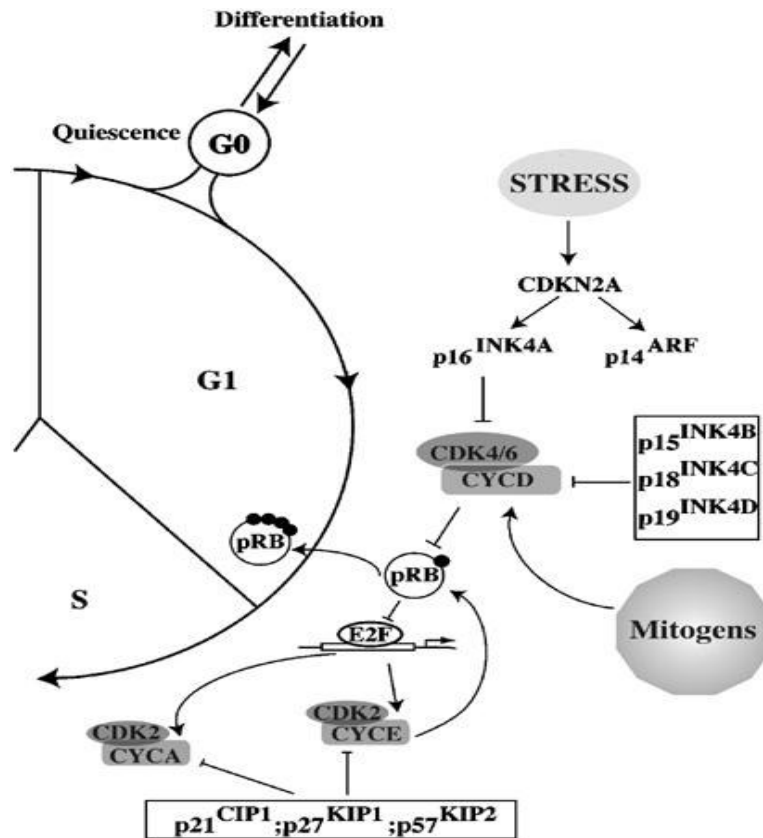


Figura 3. Principali punti di controllo del ciclo cellulare rappresentati dal checkpoint G₁-S (120).

La proteina Rb nella sua forma ipofosforilata attiva, inibisce la trascrizione dei geni richiesti per la transizione dalla fase G₁ alla fase S, in quanto si associa direttamente al dominio transattivo E2F formando un complesso che si lega al promotore dei geni responsivi a E2F, come la ciclina E, impedendo l'interazione con altri attivatori trascrizionali e recluta le proteine rimodellanti la cromatina tra cui l'istone deacetilasi e l'istone metiltransferasi, bloccando in tal modo la trascrizione dei geni necessari per il passaggio alla fase S e quindi la progressione del ciclo cellulare (120).

In risposta a segnali mitogeni vengono attivati i complessi ciclina D-CDK4/6 che fosforilano e inattivano la proteina Rb, la quale non interagisce con i fattori di trascrizione E2F e con gli enzimi rimodellanti la cromatina, consentendo la trascrizione dei geni necessari alla fase S. Infine, la fosforilazione di Rb è regolata dagli inibitori Cdk (CDKIs) che agendo sui complessi ciclina-CDK bloccano la loro azione nei confronti di pRb (120).

4.3.2 Ciclina D3: ruolo nella progressione delle T-ALL

Le ciclina di tipo D hanno la funzione di promuovere la crescita cellulare e sono richieste nel sistema ematopoietico, soprattutto per lo sviluppo iniziale dei linfociti. La funzione della ciclina D3

nello sviluppo è stata dimostrata utilizzando topi *knockout* per la ciclina D3 i quali non vanno incontro alla normale espansione dei linfociti T immaturi e mostrano una ridotta suscettibilità allo sviluppo del tumore (122).

L'espressione della ciclina D3 si manifesta, durante lo sviluppo delle cellule T, tra lo stadio DN e DP. In assenza della ciclina D3, lo sviluppo dei timociti risulta difettoso in seguito ad un'aumentata percentuale di cellule T CD4⁻ e CD8⁻ doppio negative (DN) e ad un corrispondente decremento in cellule CD4⁺ e CD8⁺ doppie positive (DP) (figura 4) (121, 122).

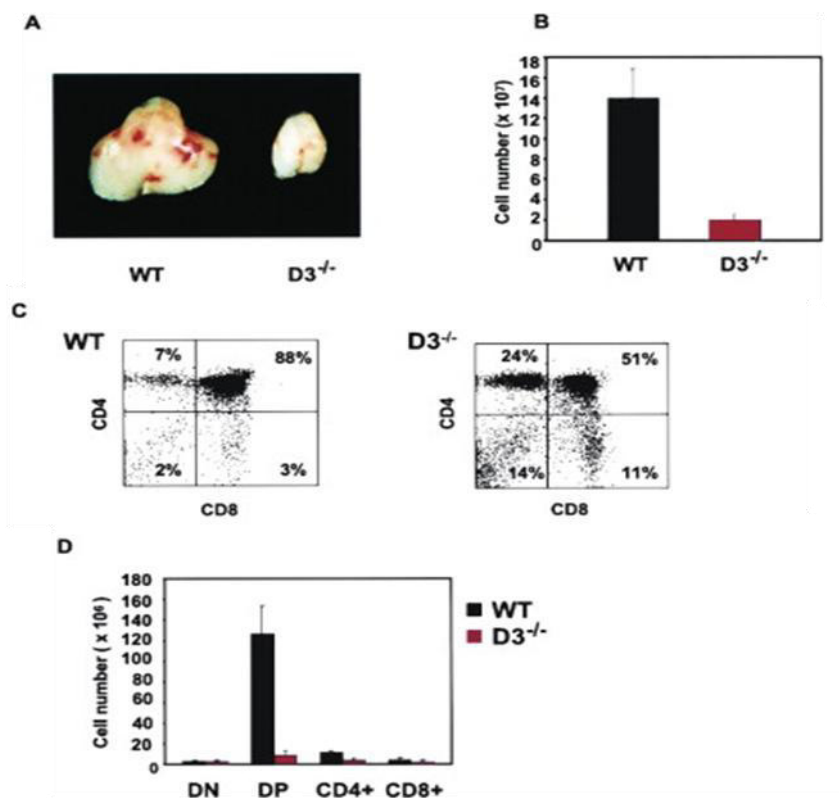


Figura 4. Sviluppo difettoso dei timociti nei topi ciclina D3-deficienti.

A: Timo dissezionato da topi *wildtype* (WT) e topi ciclina D3-deficienti a 5 settimane di età. Ingrandimento ~6 ×.

B: Numero totale dei timociti in topi *wildtype* (n = 11) e topi ciclina D3^{-/-} (n = 11) da 4 a 6 settimane di età.

C: Esempi di profili di citometria a flusso di timociti di topi a 5 settimane di età marcati con anti-CD4 e anti-CD8.

D: Numero totale di timociti CD4⁻ CD8⁻ doppio-negativi (DN), CD4⁺ CD8⁺ doppio-positivi (DP), CD4⁺ e CD8⁺ in topi *wildtype* (n = 8) e topi ciclina D3^{-/-} (n = 9) 4 a 6 settimane di età (121).

La ciclina D3 è anche richiesta nell'indurre la trasformazione oncogena delle cellule T immature. Essa è criticamente richiesta per la proliferazione delle T-ALL umane derivanti dalle cellule T immature poiché la mancanza della ciclina D3 ne blocca la proliferazione (122).

Infine, la funzione della ciclina D3 nello sviluppo e nella trasformazione dei linfociti, dipende dall'interazione con le CDK4/6 con le quali forma un complesso per regolare il ciclo cellulare.

L'interazione tra la ciclina D3 e CDK4/6 nelle cellule T e il suo ruolo nelle T-ALL, è stata dimostrata *in vitro* attraverso un inibitore specifico (PD-0332991) che impedisce l'ingresso delle linee cellulari T-ALL in fase S e la conseguente progressione del ciclo cellulare e provocando l'accumulo delle cellule in fase G₀/G₁. L'inibizione dell'attività del complesso ciclina D3-CDK 4/6 sopprime la fosforilazione della proteina Rb e l'aumentata espressione del p27^{Kip1} causa l'arresto del ciclo cellulare e la morte cellulare dopo trattamento (122).

L'effetto del trattamento farmacologico è reversibile in quanto la rimozione del farmaco porta ad un efficiente rientro nel ciclo cellulare delle cellule T, comportando la lenta ricaduta della malattia. L'inibizione indotta da questo farmaco sulla progressione del ciclo cellulare, suggerisce che PD-0332991 potrebbe esser efficace nel trattamento della recidiva delle T-ALL.

4.3.3 Il *NOTCH signaling* regola l'espressione della ciclina D3

Il *NOTCH signaling* è un potente regolatore del ciclo cellulare che quando disregolato promuove la trasformazione neoplastica alterando la cinetica della crescita cellulare. *NOTCH1* favorisce la progressione attraverso la fase G₁/S del ciclo cellulare regolando l'espressione della ciclina D3 e delle chinasi ciclico-dipendenti (CDK) (56).

Le cicline di tipo D sono le prime ad esser indotte ad entrare nella fase G₁ del ciclo cellulare, quindi essendo regolate dal *NOTCH signaling*, sono molto importanti per il meccanismo di linfomagenesi indotto da *NOTCH*; inoltre, come già più volte affermato, queste cicline si associano alle chinasi ciclico-dipendenti CDK4 e CDK6 e si attivano in specifici *time point* del ciclo cellulare. Esse sono in grado quindi di regolare la fosforilazione e l'inattivazione della proteina Rb e la repressione dei fattori di trascrizione E2F, guidando la cellula nella fase S (120). Nel lavoro di *Joshi et al.* viene identificata la ciclina D3 come un *target* diretto di *NOTCH1* che promuove la progressione del ciclo cellulare e la proliferazione, sia nelle cellule T periferiche che leucemiche. In particolare, viene dimostrato *NOTCH1* favorisce la progressione attraverso la fase G₁/S del ciclo cellulare regolando l'espressione della ciclina D3, in quanto dopo trattamento con GSI (γ -secretase inhibitors) l'espressione della proteina si riduce, sia *in vitro* che *in vivo*, poiché l'azione dell'inibitore blocca il *NOTCH1 signaling* (56).

La ciclina D3 contribuisce alla leucemogenesi della T-ALL poiché l'espressione del dominio intracellulare oncogeno di *NOTCH1* (ICN1) in progenitori del midollo osseo *CCND3^{-/-}*, impedisce l'avvio della malattia (121).

La fosforilazione di entrambi i residui della proteina Rb è abrogata dal trattamento con GSI, indicando che il *signaling* di *NOTCH* regola l'espressione temporale di CDK4/6 e la successiva fosforilazione di pRb, facilitando la progressione del ciclo cellulare nelle cellule T primarie (56).

Questi dati rivelano il potenziale oncogeno del *NOTCH signaling* aberrante nelle cellule T mediante la deregolazione del ciclo cellulare e identificano i componenti del ciclo cellulare come *targets* terapeutici aggiuntivi per designare delle strategie terapeutiche combinate usando inibitori delle γ -secretasi per il trattamento delle T-ALL.

4. SCOPO DEL PROGETTO

Le mutazioni genetiche somatiche che iniziano e guidano la cancerogenesi sono l'*hallmarks* del cancro. Le tecniche di biologia molecolare hanno permesso di caratterizzare differenti sottotipi di ALL sulla base delle diverse alterazioni geniche. In aggiunta, studi recenti identificano nuove alterazioni genetiche associate alla prognosi e che possono quindi essere utilizzate per la stratificazione dei pazienti, nonché per una terapia mirata (110). In questo contesto, risulta interessante l'identificazione di nuove mutazioni che potrebbero avere un ruolo nella leucemogenesi.

Al fine di identificare nuovi geni implicati nella patogenesi della leucemia, è stato sequenziato l'esoma di 8 pazienti T-ALL ad alto rischio alla diagnosi e alla remissione mediante *Ion Proton System technology*. In uno dei pazienti è stata identificata una mutazione missenso nel gene *CCND3*. La ciclina D3 codificata dal gene *CCND3* gioca un ruolo primario nel controllo del ciclo cellulare. Lo scopo del presente studio è stato, quindi, quello di identificare nuovi geni implicati nella leucemogenesi e in particolare di esaminare la presenza di mutazioni somatiche a carico del gene *CCND3* in pazienti pediatriche T-ALL al fine di identificarne l'eventuale ricorrenza e rafforzare il ruolo della ciclina D3 nella trasformazione leucemica.

4. RISULTATI

5.1 WHOLE EXOME SEQUENCING DI 8 PAZIENTI T-ALL HIGH RISK

L'impiego delle tecnologie NGS (*Next-generation Sequencing*) consente il sequenziamento parallelo massivo di molecole di DNA amplificate in modo clonale o di singole molecole di DNA separate spazialmente in una cella a flusso ("*flow cell*"), in un'unica seduta analitica.

In questo studio è stata utilizzata inizialmente la piattaforma *Ion Proton* per il sequenziamento dell'intero esoma di 8 pazienti classificati ad alto rischio (HR) di recidiva, valutati alla diagnosi e alla remissione, per identificare eventuali varianti di natura somatica nelle T-ALL, secondo la *workflow* riportata (Figura 5).

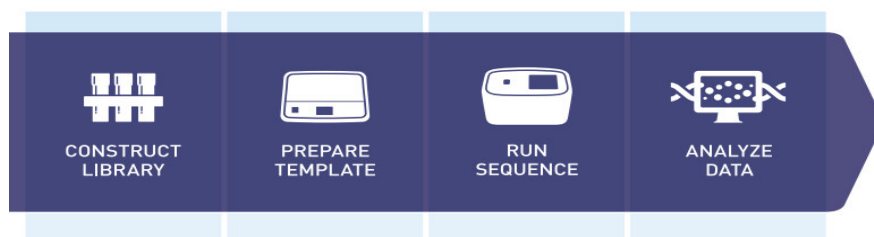


Figura 5. *Workflow* di sequenziamento con *Ion Proton System Technology*.

Per ciascun campione sono stati prodotti almeno 10Gb di dati ottenendo più di 70 milioni di *reads* (Figura 6). Ciascun campione ha più del 90% di *reads on target*, con un coverage medio del 3.5X. Per generare la lista di potenziali varianti identificate, i dati di ciascuna corsa di sequenziamento sono stati analizzati con l'*Ion Reporter standard pipeline*. Per ciascuna corsa di sequenziamento è stato utilizzato il *Proton Run Browser*.

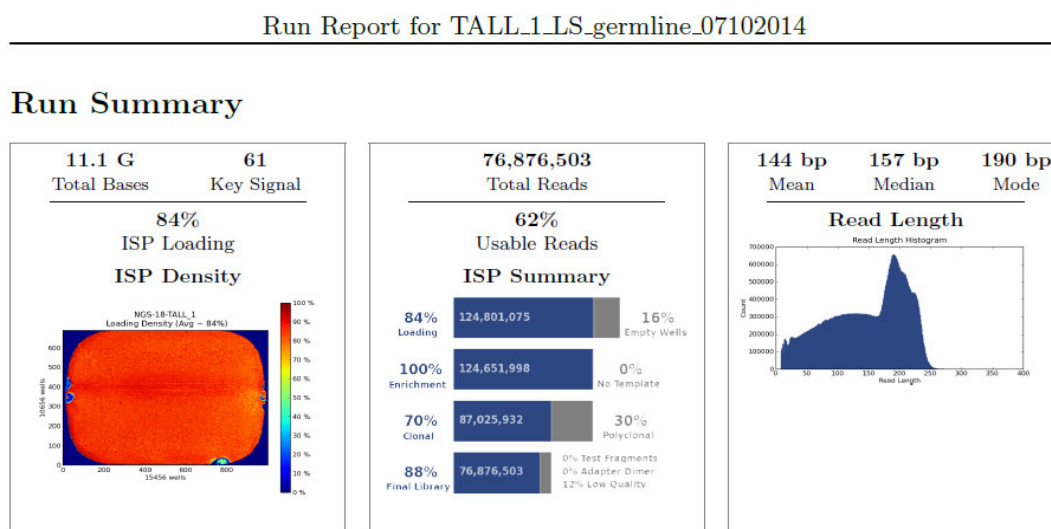


Figura 6. Esempio del report derivante da una corsa di sequenziamento mediante tecnologia *Ion Proton*.

Dalla corsa di sequenziamento sono state ottenute più di 50.000 varianti differenti. Mediante una *flow chart* di filtraggio sulla base della frequenza, del *coverage*, della presenza in dbSNP delle mutazioni sono state selezionate le varianti somatiche.

Le varianti ottenute dopo filtraggio sono successivamente state validate mediante sequenziamento *Sanger* ottenendo 59 varianti somatiche (Figura 7).

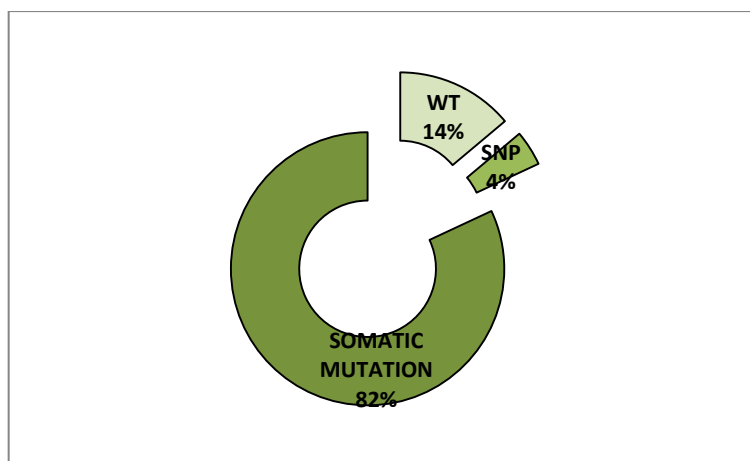


Figura 7. Tasso di validazione delle varianti somatiche mediante sequenziamento *Sanger*.

Alcune delle varianti identificate negli 8 pazienti T-ALL sequenziati sono presenti in geni noti essere già ricorrentemente mutati nelle T-ALL quali, *FBXW7*, *NOTCH1* ed *EZH2*, mentre altri sono mutati in altri tumori ematopoietici come *MED12* (29). Inoltre, all'interno dei pazienti oggetto di studio vi è un'elevata eterogeneità in quanto ad esempio, nel paziente HR-T-ALL4 sono state identificate 41 varianti, mentre nel paziente HR- T-ALL2 è stata validata una singola variante.

Al fin di studiarne l'eventuale ricorrenza di mutazione di uno dei 59 geni identificati e validati in una coorte di T-ALL pediatriche si è deciso di analizzare le mutazioni somatiche validate nel paziente HR-T-ALL4, data l'elevata eterogeneità in esso riscontrata.

Nella tabella 1 sono riportate le 41 varianti trovate nel paziente HR-T-ALL4 ottenute mediante una *flow chart* di filtraggio sulla base della frequenza, del *coverage*, della presenza in dbSNP delle mutazioni.

Gene	Trascritto	Proteina	Codone
ADAMTS17	NM_139057.2	p.Tyr778Cys	c.2333A>G
APCDD1	NM_153000.4	p.Thr72Ala	c.214A>G
ATAD3B	NM_031921.4	p.Ile207Thr	c.620T>C
ATRN	NM_139321.2	p.Arg512Gly	c.1534A>G
C3orf33	NM_173657.1	p.Leu126Pro	c.377T>C
CCNB2	NM_004701.3	p.Leu254Ser	c.761T>C

CCND3	NM_001760.4	p.Lys268Glu	c.802A>G
COPS3	NM_003653.3	p.Asn290Ser	c.869A>G
EPN3	NM_017957.2	p.Ile103Thr	c.308T>C
ETS2	NM_001256295.1	p.Lys551Arg	c.1652A>G
EXOSC10	NM_001001998.1	p.Leu262Pro	c.785T>C
FBXW7	NM_033632.3	p.Arg479Gln	c.1436G>A
FES	NM_002005.3	p.Gln795Arg	c.2384A>G
HSPBP1	NM_001130106.1	p.Val274Ala	c.821T>C
KCTD20	NM_173562.4	p.Ser85Arg	c.253A>C
KRT85	NM_002283.3	p.Ser254Gly	c.760A>G
LAMA5	NM_005560.4	p.Arg2582Lys	c.7745G>A
MAPK1	NM_002745.4	p.Glu322Gly	c.965A>G
MTMR4	NM_004687.4	p.Asp1012Gly	c.3035A>G
NCKAP5	NM_207363.2	p.Leu773Met	c.2317C>A
NOTCH1	NM_017617.3	p.Leu1678Pro	c.5033T>C
PCK2	NM_004563.2	p.Ser567Gly	c.1699A>G
PGK2	NM_138733.4	p.Ala241Asp	c.722C>A
PHC3	NM_024947.3	p.Val826Ala	c.2477T>C
PLCB3	NM_000932.2	p.Leu1220Pro	c.3659T>C
PTGIS	NM_000961.3	p.Leu133Pro	c.398T>C
RABEP2	NM_024816.2	p.Glu147Gly	c.440A>G
RGSL1	NM_001137669.1	p.Met320Thr	c.959T>C
ROR2	NM_004560.3	p.Thr215Met	c.644C>T
ARMC12	NM_145028.4	p.Leu9Pro	c.26T>C
SLC44A4	NM_025257.2	p.Tyr357Cys	c.1070A>G
SMU1	NM_018225.2	p.Phe315Leu	c.943T>C
STAG1	NM_005862.2	p.Lys49Glu	c.145A>G
SVOPL	NM_001139456.1	p.Phe477Leu	c.1429T>C
TM2D2	NM_078473.2	p.Trp61Cys	c.183G>T
TMEM245	NM_032012.3	p.Tyr216His	c.646T>C
TTYH1	NM_001005367.2	p.Leu381Pro	c.1142T>C
UHRF1BP1L	NM_015054.1	p.Thr29Ala	c.85A>G
WEE1	NM_003390.3	p.Thr543Ala	c.1627A>G
XIRP1	NM_194293.2	p.Ala265Thr	c.793G>A
ZFYVE26	NM_015346.3	p.Ser615Pro	c.1843T>C

Tabella 1. Mutazioni identificate in pazienti T-ALL con *Whole Exome Sequencing*.

4.2 ANALISI DI RICORRENZA IN UNA COORTE DI PAZIENTI T-ALL HIGH RISK

Tra le varianti identificate con NGS sul paziente selezionato, è stato deciso di validare con il sequenziamento *Sanger* tre geni: *WEE1*, *MAPK1* e *CCND3*, su una coorte indipendente di 20

pazienti T-ALL HR, al fine di verificare un'eventuale ricorrenza di mutazione nelle T-ALL (Figura 8).

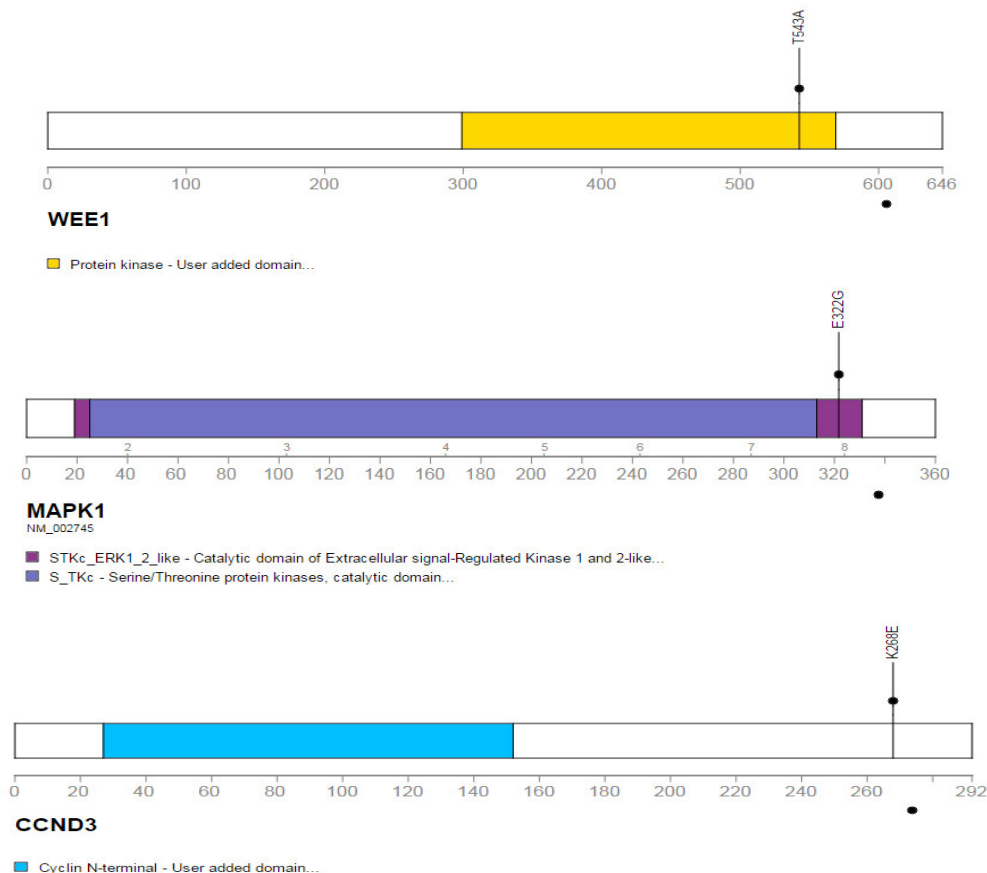


Figura 8. Mutazioni dei geni analizzati per ricorrenza in una coorte T-ALL HR.

Il sequenziamento del gene *WEE1* è stato effettuato a livello degli esoni 4,5,6,7,8,9,10, e tutti i 20 pazienti analizzati hanno mostrato la forma *wildtype* del gene in esame; successivamente è stato sequenziato il gene *MAPK1* a livello dell'esone 7 in cui, anche in questo caso, non è stata riscontrata alcuna mutazione nella coorte di riferimento. Dal sequenziamento del gene *CCND3*, è stata identificata una mutazione nell'esone 5, corrispondente allo stesso esone in cui è stata precedentemente individuata la mutazione con il *Whole Exome Sequencing*. I rimanenti esoni del gene *CCND3* (1,2,3,4) non sono risultati mutati.

Il nuovo paziente individuato presenta nel DNA genomico una mutazione *frameshift* in eterozigosi in cui si verifica una delezione di circa 60 bp (Figura 9).

In seguito all'individuazione di un secondo paziente mutato a livello dell'esone 5 del gene *CCND3* è stata dunque ampliata la coorte di studio analizzando altri pazienti T-ALL.

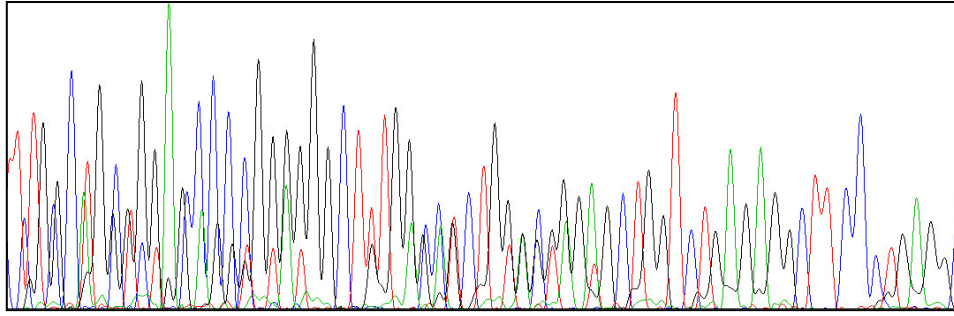


Figura 9. Cromatogramma della nuova mutazione identificata nel DNA genomico di un paziente HR T-ALL a livello dell'esone 5 del gene *CCND3*.

4.3 ANALISI DI FREQUENZA NEI PAZIENTI T-ALL

Per determinare la frequenza di mutazione dell'esone 5 del gene *CCND3* sono stati selezionati 20 nuovi pazienti pediatrici T-ALL appartenenti al gruppo di rischio HR al fine di ampliare la coorte in esame. Da questa analisi è stato individuato un terzo paziente mutato che presenta una mutazione *frameshift* in eterozigosi, caratterizzata dalla delezione di 5 bp e un'inserzione di 21 bp (Figura 10).

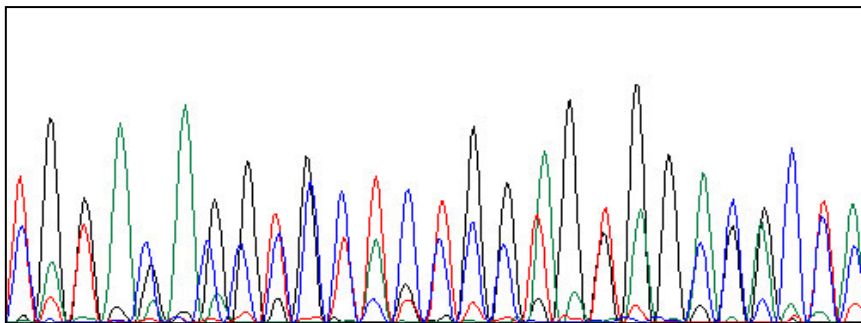


Figura 10. Cromatogramma della nuova mutazione identificata nel DNA genomico di un paziente HR T-ALL a livello dell'esone 5 del gene *CCND3*.

L'identificazione delle mutazioni presenti nell'esone 5 del gene *CCND3* in una coorte complessiva di 48 pazienti HR, ha permesso di calcolare una frequenza di mutazione nel gene *CCND3* del 6% (Figura 11).

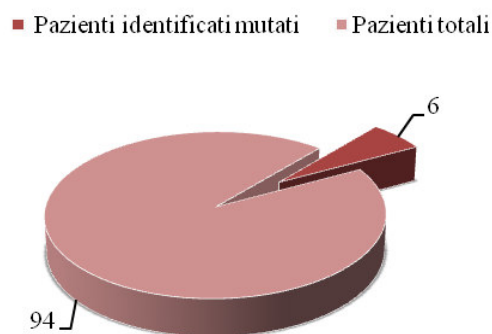


Figura 11. Frequenza di mutazioni in *CCND3* nella coorte T-ALL HR.

Questo risultato suggerisce di accertare una possibile correlazione delle mutazioni a livello dell'esone 5 di *CCND3* con la stratificazione in classi di rischio dei pazienti pediatrici T-ALL. Pertanto, è stata selezionata una nuova coorte di 34 pazienti non alto rischio, la cui analisi ha fornito tre nuovi pazienti mutati che presentano rispettivamente: il primo una delezione di 30 bp (Figura 12A), il secondo un'inserzione di 2 bp (Figura 12B), e il terzo una mutazione di singolo nucleotide C>T (Figura 12C).

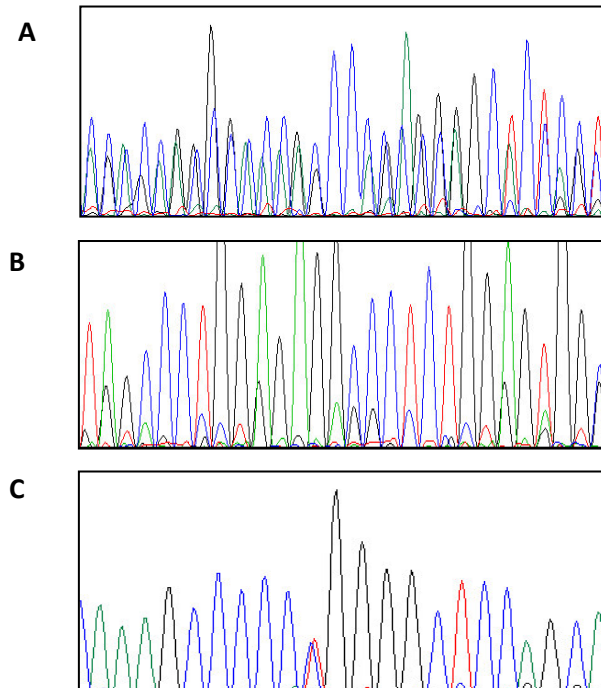


Figura 12. Cromatogrammi delle sequenze dei tre pazienti mutati (A,B,C) per *CCND3* appartenenti alla coorte non HR.

L'identificazione dei tre pazienti mutati nella coorte di 34 pazienti non HR, indica anche in questo caso una frequenza di mutazione somatica per il gene *CCND3* del 6% (Figura 13).

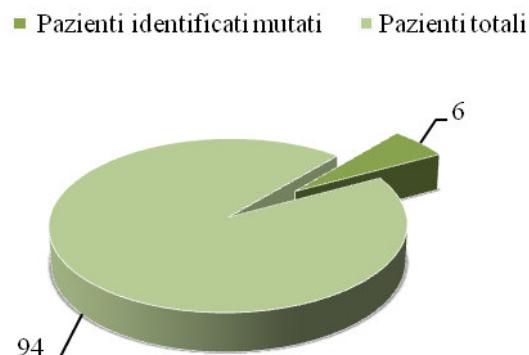


Figura 13. Frequenza di mutazioni in *CCND3* nella coorte T-ALL non HR.

4.4 CONFERMA DELLA NATURA SOMATICA DELLA MUTAZIONE E ANALISI DI ESPRESSIONE

Per verificare la natura somatica delle mutazioni identificate è stato sequenziato il DNA della remissione. In un paziente è stata riscontrata la mutazione anche nel campione della remissione, dunque è di probabile natura germinale. Le altre cinque mutazioni si sono confermate presenti solo nel campione tumorale (Figura 14).

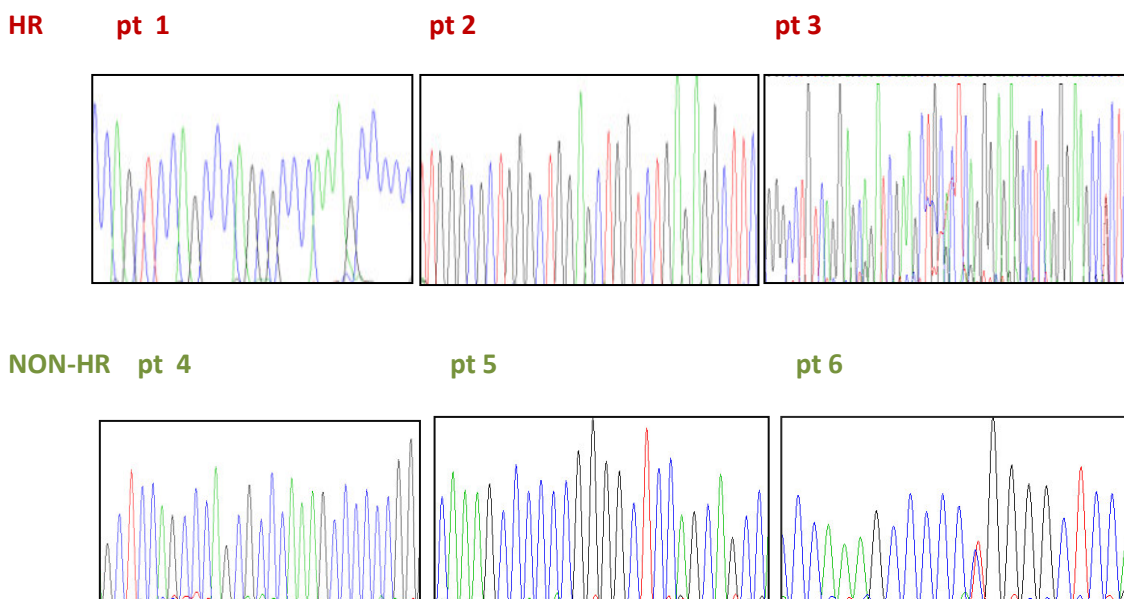


Figura 14. Cromatogrammi dei pazienti mutati HR (1,2,3 in alto) e non HR 4,5,6 (in basso) alla remissione.

Le mutazioni identificate a livello genomico sono state anche confermate nel cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione dell'RNA dei campioni dei singoli pazienti (Figura 15). Questi risultati indicano che le mutazioni in eterozigosi, identificate nel gene *CCND3* vengono espresse a livello dei linfociti T tumorali, e quindi potrebbero produrre una proteina ciclina D3 con funzioni anomale potenzialmente associate al tumore.

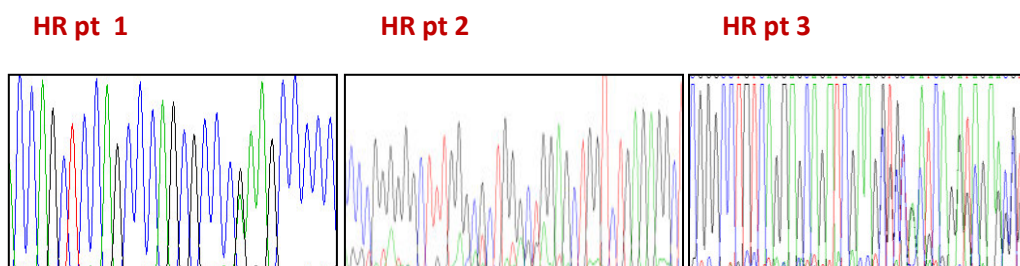


Figura 15. Cromatogrammi dei pazienti mutati HR nel cDNA alla diagnosi.

In conclusione, questo studio ha identificato cinque pazienti con mutazioni somatiche ed un paziente con una mutazione di probabile natura germinale (Tabella 2). Pertanto, le mutazioni somatiche nel gene *CCND3* sono state identificate in modo ricorrente in entrambe le coorti con una frequenza del 6% (Figura 16), escludendo l'appartenenza ad una categoria di rischio, verificando piuttosto una ricorrenza nelle T-ALL.

Paziente	Gene	Trascritto	Proteina	Codone
1	CCND3-001	NM_001760	p. K268E	c.802 A>G
2	CCND3-001	NM_001760	p. T261 fs	c. 783-846 del *
3	CCND3-001	NM_001760	p. A249 fs	c. 745-751 del *c. 745-767 ins*
4	CCND3-001	NM_001760	p. P265 fs	c. 792-822 del*
5	CCND3-001	NM_001760	p. P254 fs	c. 759-762 ins AG
6	CCND3-001	NM_001760	p. R271W	c. 811 C>T

* agctccagcccagcgcctcaaaagccccccggggctccagcagccaagggcccagccagaccagc

* ctgca

* ggctgagcagatcgaagggt

* ccagcgcctcaaaagccccccggggctccagc

Tabella 2. Nuove mutazioni identificate nella coorte totale di pazienti T-ALL.

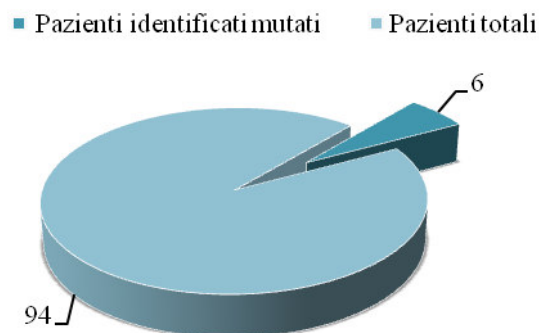


Figura 16. Frequenza totale delle mutazioni somatiche in *CCND3* nella coorte T-ALL analizzata.

Basandosi su dati di letteratura, le mutazioni che sono state identificate si trovano su una regione del gene *CCND3* che è un *hotspot* mutazionale anche in altre patologie linfoblastiche (Figura 17 A e B). Le mutazioni singole base K268E e R271W e le mutazioni *frameshift* presenti nei pazienti mutati si localizzano sul dominio C-terminale della proteina che corrisponde al sito identificato come sede di *frameshift* in vari lavori, prevalentemente associati ai linfomi in cui le mutazioni e

prevalentemente la T283 favoriscono la stabilità della proteina ciclina D3 impedendone la sua degradazione.

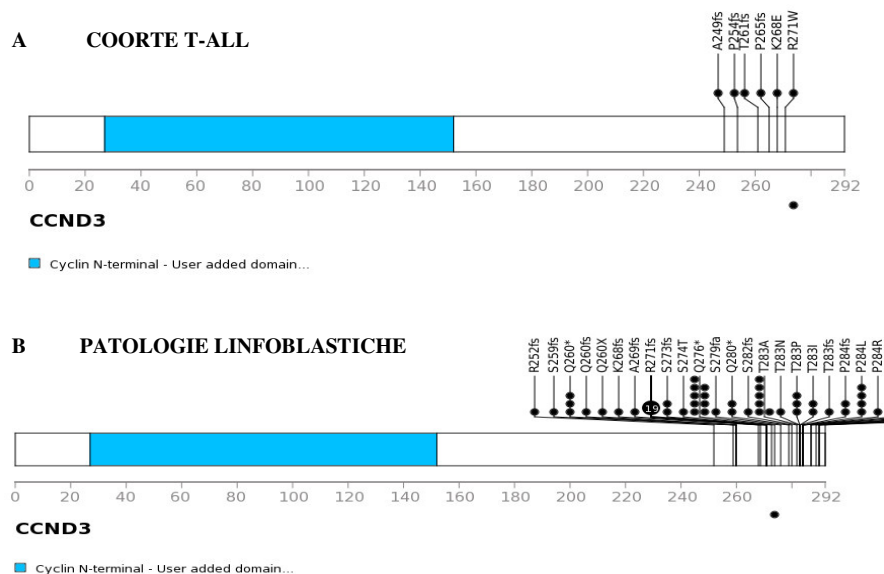


Figura 17. Schema di CCND3 con le alterazioni degli aminoacidi conseguenti alle mutazioni identificate nella coorte T-ALL in esame (A) e in altre patologie linfoblastiche (B).

4.5 ANALISI DELL'EFFETTO DELLA MUTAZIONE

L'identificazione del gene *CCND3* mutato in maniera ricorrente nelle T-ALL e in diversi altri tumori, ha indirizzato lo studio sull'eventuale effetto funzionale che potrebbero avere queste mutazioni nell'ambito leucemico. Infatti, questo gene codifica per un componente cruciale del ciclo cellulare, la ciclina D3, il cui ruolo è quello di regolare la transizione G1/S formando dei complessi con le chinasi CDK4/6. Il complesso ciclina D3–CDK4/6 interagisce e partecipa alla fosforilazione della proteina soppressore tumorale Rb che viene inattivata, favorendo la progressione del ciclo cellulare e la proliferazione.

4.5.1 Studio *in silico* delle mutazione identificate in *CCND3* in pazienti pediatrici T-ALL

Le mutazioni identificate nella coorte analizzata di pazienti pediatrici T-ALL, sono state studiate inizialmente *in silico* per valutare l'effetto di ciascuna mutazione sulla struttura della proteina e quindi sulla sua funzione. A tal scopo, la sequenza genomica *wildtype* del gene *CCND3* e le sequenze dei pazienti identificati mutati, sono state traslate mediante l'impiego del tools informatico *ExPASy* (<https://www.expasy.org/>) nelle rispettive predette sequenze amminoacidiche per consentire il successivo allineamento con il programma *Clustal Omega* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Figura 18).

```

CCND3      RACQEQIEAALRESLREASQTSSSPAPKAPRGSSSQGPSQTSTPTDVTAIHL
pt1        RACQEQIEAALRESLREASQTSSSPAPEAPRGSSSQGPSQTSTPTDVTAIHL
          *****;*****
CCND3      RACQEQIEAALRESLREASQTSSSPAPKAPRGSSSQGPSQTSTPTDVTAIHL
Pt2        RACQEQIEAALRESLREASQTS-----TPTDVTAIHL
          *****
CCND3      RACQEQIEAALRESLREASQTSSSPAPKAPRGSSSQGPSQTSTPTDVTAIHL-----
Pt3        RACQEQIEGLSRKSGSQGEPQGSLSQDLPQAQSPGLQPPRAQPDQHSYRCHSHTPV
          ***** . * . . . * . * . . * . * . : * : :
CCND3      RACQEQIEAALRESLREASQTSSSPAPKAPRGSSSQGPSQTSTPTDVTAIHL
Pt4        RACQEQIEAALRESLREASQTSSSPAKGPARPALLQMSQPYTC-----
          ***** . * : * . . :
CCND3      RACQEQIEAALRESLREASQTSSSPAPKAPRGSSSQGPSQTSTPTDVTAIHL-
Pt5        RACQEQIEAALRERASGKPLRPAPAQRPKPPGAPAAKGPARPALLQMSQPYTC
          ***** . . . . * * : : . . : : : :

```

(*) aminoacido identico al residuo *wildtype*; (:) aminoacido altamente simile al residuo *wildtype*;
 (.) aminoacido simile al residuo *wildtype*.

Figura 18. Allineamento della sequenza aminoacidica della porzione C-terminale della proteina *wildtype* con la sequenza aminoacidica dei pazienti mutati.

Confrontando la sequenza aminoacidica di ciascun paziente con la sequenza aminoacidica *wildtype*, si deduce che il paziente 1 ha una sequenza prevalentemente conservata con un aminoacido basico sostituito con un aminoacido acido; nei pazienti 3,4,5 vi è una chiara variazione della sequenza aminoacidica. A tal proposito, per ottenere una predizione *in silico* dell'effetto di ciascuna mutazione, è stato utilizzato il database PROVEAN (<http://provean.jcvi.org/>), in cui è stata inserita la sequenza in formato *FASTA* della proteina *wildtype* e le rispettive varianti aminoacidiche per valutare, in relazione allo *score* associato alla variante aminoacidica, se la mutazione considerata è probabilmente dannosa o neutrale (Tabella 3). Il *cut-off* fornito dal database è pari a -2,5, considerando deleteria una mutazione il cui valore dello *score* è < -2,5 mentre se lo *score* fornisce un valore > -2,5 la mutazione che colpisce quella regione aminoacidica è neutrale.

Paziente	Variante	Score	Prediction (cutoff = -2,5)
1	K268E	-0,82	Neutral
2	T261_S282 del	-33,464	Deleterious
3	A249_L251 del A249_R255ins	-12,975	Deleterious
4	P265_S274del	-10,746	Deleterious
5	S254_S254 ins	-8,989	Deleterious

Tabella 3. Predizione *in silico* delle mutazioni identificate nel gene *CCND3*.

I risultati illustrati nella tabella predicono un effetto neutrale per la mutazione *singole base* nel primo paziente e un effetto deleterio per i pazienti che presentano le mutazioni *frameshift* nel gene

CCND3. In conclusione, la perdita di numerose paia di basi nell'esone 5 di questo gene potrebbe interferire con la struttura della proteina e quindi con la sua funzione.

Basandosi su questa predizione *in silico*, è stato utilizzato l'algoritmo *RaptorX structure prediction* (<http://raptorx.uchicago.edu/>) mediante il quale è possibile visualizzare a livello strutturale le regioni delle diverse proteine così predette (Figura 19).

CCND3 wildtype

CCND3 pt 2



CCND3 pt 3

CCND3 pt 4

CCND3 pt 5



Figura 19. Struttura *wildtype* della proteina *CCND3* e delle rispettive proteine predette nei pazienti mutati T-ALL.

Attualmente è in corso la produzione dei vettori per l'espressione delle mutazioni di *CCND3* identificate e dei relativi vettori di controllo utilizzando come linea di *packaging* la linea cellulare 293T, in virtù della sua elevata trasfettabilità.

4.6 ANALISI DELLE MUTAZIONI RICORRENTI NELLE T-ALL NEI PAZIENTI MUTATI PER *CCND3*

Dai dati di letteratura emerge che *CCND3* rappresenta un *target* diretto di *NOTCH1*, che viene richiesto per la trasformazione neoplastica delle cellule T-ALL *NOTCH1*-dipendenti. Infatti, sia *in vitro* che *in vivo*, è stato dimostrato che, *NOTCH1* favorisce la progressione attraverso la fase G1/S del ciclo cellulare regolando l'espressione della ciclina D3, in quanto dopo trattamento con GSI (γ -secretase inhibitors) l'espressione della proteina si riduce poiché l'azione dell'inibitore blocca il *NOTCH1* signaling (56).

In questo studio, è stato osservato che 3 dei 5 (60%) pazienti identificati mutati per il gene *CCND3* presentano anche mutazioni a carico del gene *NOTCH1* (Tabella 4), suggerendo una probabile cooperazione tra i due geni nel promuovere la leucemogenesi in questi tre casi analizzati.

Pt	<i>CCND3</i>	<i>NOTCH1</i>
1	p.K268E, c.802A>G	p.L1678P c.5033T>C
2	p.T261fs, c. 783-846 del*	p. F1736fs
3	p.A249fs, c. 745-751 del *c. 745-767 ins*	wt
4	p.P265fs, c. c. 792-822 del*	p.L1678P c.5033T>C
5	p.P254fs, c.759_762delAG	wt

Tabella 4. Mutazioni in *NOTCH1* nei casi di leucemia linfoblastica acuta T e mutati per *CCND3*.

4. DISCUSSIONE

Negli ultimi anni, le tecnologie di nuova generazione hanno portato alla ribalta il concetto dell'eterogeneità del tumore, cioè il fatto che i distinti sottotipi molecolari siano sostenuti da diverse alterazioni genetiche ed epigenetiche. In particolare, i metodi di sequenziamento NGS hanno superato la limitata produttività del tradizionale sequenziamento di *Sanger* permettendo il realizzarsi di milioni di reazioni di sequenziamento in parallelo e il sequenziamento di una singola molecola di DNA, cioè si è in grado di identificare una mutazione somatica all'interno di una piccola sottopopolazione di cellule immerse in una popolazione più grande con sequenze *wildtype*.

Allo stesso tempo, la disponibilità di migliaia di sequenze di genomi tumorali ha posto le basi per l'identificazione di tutti gli eventi “*drivers*” che potrebbero essere il bersaglio di nuovi ed esistenti farmaci. Questo ha permesso lo sviluppo della medicina personalizzata, che mira a fornire una terapia specifica attraverso le caratteristiche molecolari del tumore del paziente.

Nonostante la prognosi dei pazienti con T-ALL è migliorata in modo significativo negli ultimi due decenni grazie all'introduzione di protocolli chemioterapeutici più mirati ed intensivi, le T-ALL sono spesso associate ad una resistenza primaria o recidiva; l'intensificazione dei protocolli terapeutici comporta un'eccessiva tossicità, sottolineando la necessità di sviluppare nuovi farmaci antileucemici più specifici ed efficaci, e contemporaneamente di investigare i meccanismi biologici e molecolari alla base della maggiore aggressività e scarsa risposta alla terapia che ad oggi rimangono poco chiari (123).

La T-ALL è una malattia geneticamente eterogenea in cui numerose lesioni genetiche e cromosomiche cooperano ad alterare i processi regolatori che controllano la proliferazione cellulare, il differenziamento e la sopravvivenza dei normali timociti in via di sviluppo. In questo contesto, come già largamente discusso nei capitoli precedenti, il *NOTCH signaling* svolge un ruolo cruciale, rappresentando un'importante bersaglio terapeutico nelle T-ALL. In particolare, l'inibizione di *NOTCH* tramite il trattamento con un inibitore della γ -secretasi (GSI), riduce la crescita e la proliferazione delle cellule, inducendone l'arresto in fase G₀/G₁ del ciclo cellulare (56).

Al fine di identificare nuovi geni implicati nella patogenesi della leucemia è stato eseguito il *Whole Exome Sequencing* di otto pazienti T-ALL classificati ad alto rischio di recidiva. Dalla corsa di sequenziamento sono state ottenute più di 50.000 varianti differenti. Mediante una *flow chart* di filtraggio sulla base della frequenza, del *coverage*, della presenza in dbSNP delle mutazioni sono state selezionate le varianti somatiche. Le varianti ottenute dopo filtraggio sono successivamente state validate mediante sequenziamento *Sanger* ottenendo 59 varianti somatiche. Tra queste vi sono molti geni noti mutati nelle T-ALL quali *NOTCH1*, *FBXW7* e *EZH2*, mentre altri sono mutati in

altri tumori ematopoietici come *MED12* (29). Inoltre, all'interno dei pazienti oggetto di studio vi è un'elevata eterogeneità. Allo scopo di studiarne l'eventuale ricorrenza di mutazione dei geni identificati e validati in una coorte di T-ALL pediatrici si è deciso di analizzare le mutazioni somatiche validate nel paziente HR-T-ALL4, data la numerosa presenza di mutazioni identificate e validate in geni potenzialmente rilevanti. In particolare è stata ricercata la ricorrenza di mutazione a livello dei geni *WEE1* e *MAPK1* in quanto identificati mutati in altri lavori di sequenziamento di T-ALL (136), ma nella coorte T-ALL analizzata nel lavoro non è stata riscontrata alcuna ricorrenza di mutazione a livello di tali geni. Successivamente si è deciso di indagare un'eventuale ricorrenza di mutazione a livello del gene *CCND3* alla luce del lavoro di *Aifantis et al.* (122), in cui il complesso ciclina D3:CDK4/6 è emerso come importante target terapeutico nelle T-ALL. Durante l'ematopoiesi, la ciclina D3 è richiesta per lo sviluppo dei linfociti come dimostrato in animali *knockout* per il gene *CCND3* che presentano difetti nella differenziazione e proliferazione dei progenitori delle cellule T. Inoltre, è stato dimostrato come la ciclina D3 sia direttamente implicata nello sviluppo della T-ALL in quanto il suo *knockdown* inibisce significativamente la proliferazione delle cellule T-ALL *in vitro* e *in vivo* (56).

Questi risultati suggeriscono che un'aberrante attivazione della ciclina D3 potrebbe essere implicata nel promuovere la proliferazione e la progressione del ciclo cellulare nelle cellule T leucemiche.

Allo stato attuale non ci sono lavori che abbiano messo in relazione la presenza di mutazione del gene *CCND3* nelle T-ALL.

Nello studio in oggetto sono state identificate mutazioni somatiche a livello del gene *CCND3* con una frequenza del 6%.

La natura somatica delle mutazioni e la verificata espressione a livello dei blasti dell'esordio dei pazienti T-ALL fanno supporre che queste mutazioni genetiche possano contribuire alla patologia. Infatti, studi precedenti hanno riportato la presenza di mutazioni del gene *CCND3* anche in altre patologie linfoblastiche specialmente nel linfoma di Burkitt, linfoma a cellule B e linfoma follicolare. Le mutazioni nonsense e *frameshift* identificate si localizzano su una regione della ciclina D3 corrispondente agli aminoacidi del dominio C-terminale (124). In un recente lavoro sul linfoma diffuso a cellule B, il gene *CCND3* è stato identificato tra i geni candidati implicati nella resistenza alla terapia in quanto è risultato frequentemente mutato nei campioni di recidiva con la mutazione I290R (125). Nella stessa patologia sono state identificate altre tre mutazioni ricorrenti: I290K, P289S e Q260X nel gene *CCND3* di cui è stata confermata l'origine somatica (126). Inoltre, numerose altre varianti somatiche quali: V287D, I290K, P289S, Q260X, sono state identificate nei linfomi non Hodgkin che probabilmente potrebbero cooperare all'insorgenza della malattia (127). La funzione della ciclina D3 mutata (T283A) è stata studiata nel Linfoma di Burkitt. Questo studio

dimostrava una maggiore espressione della proteina mutata (>10 volte) ed una emivita più lunga rispetto alla forma *wildtype*. Inoltre, le cellule di linfoma trasdotte con la ciclina D3 mutata mostravano un marcato vantaggio proliferativo rispetto alle cellule controllo confermando il potenziale oncogeno della ciclina D3 (124).

I dati mostrati in questo studio hanno messo in evidenza che anche nei pazienti T-ALL le mutazioni identificate ricadono, come per altre patologie linfoblastiche, nella regione C-terminale della proteina suggerendo che queste mutazioni possano essere di tipo *gain-of-function* e pertanto questi risultati costituiscono il razionale per successivi studi funzionali.

Inoltre, l'analisi *in silico* ha permesso di dimostrare un effetto deleterio per i pazienti che presentano le mutazioni *frameshift* nel gene *CCND3*. In conclusione, la perdita di numerose paia di basi nell'esone 5 di questo gene potrebbe interferire con la struttura della proteina e quindi con la sua funzione.

Dimostrato quindi per la prima volta la ricorrenza delle mutazioni a carico del gene *CCND3* nelle T-ALL è interessante osservare come il complesso Ciclina D3:CDK4/CDK6 rappresenta un potenziale *target* terapeutico per le T-ALL. Questo in qualche modo rafforza l'idea di utilizzare degli inibitori specifici del complesso CDK4/6, come ad esempio il PD-0332991 che è già utilizzato in *trial* clinici per altre patologie come il mieloma multiplo. Infatti, recenti studi hanno dimostrato in linee cellulari T-ALL trattate con l'inibitore PD-0332991 una regressione della malattia e una maggiore sopravvivenza rispetto ai controlli (122).

4. CONCLUSIONE

I dati di sequenziamento NGS hanno permesso l'identificazione di numerose varianti somatiche in un sottogruppo di pazienti pediatrici T-ALL ad alto rischio. La selezione in base a studi di letteratura e l'analisi di ricorrenza in un più ampio gruppo di T-ALL di alcuni dei geni identificati mutati a livello somatico in questo sottogruppo ha dimostrato la presenza di mutazioni ricorrenti a carico del gene *CCND3* nelle T-ALL. Dai dati di letteratura emerge un ruolo primario della ciclina D3 nella trasformazione tumorale e l'utilizzo di composti inibitori del complesso Ciclina D3:CDK4/6 in combinazione con gli attuali trattamenti chemioterapici (inibitori della γ -secretasi) può rappresentare un'attrattiva strategia terapeutica per migliorare la sopravvivenza dei pazienti T-ALL ad alto rischio (122).

Questi risultati e i successivi studi funzionali che saranno effettuati per valutare l'eventuale *gain-of-function* della proteina mutata nei blasti leucemici, potranno fornire un nuovo *target* terapeutico di supporto agli attuali trattamenti utilizzati per la cura di questa malattia.

Pertanto oltre all'analisi di ricorrenza di mutazione, il fine ultimo dei dati di sequenziamento è l'identificazione di un putativo *target gene* da utilizzare come bersaglio terapeutico.

Il lavoro procederà, quindi, con l'analisi di altri geni identificati mutati mediante *whole exome sequencing* al fine di identificare altri geni potenzialmente implicati nella patogenesi delle leucemie.

CAPITOLO 5

Letter to the Editor in preparation

Interleukin-7 receptor mutations in AIEOP T-cell acute lymphoblastic leukemia patients

Based on the evidence that IL7R α gain-of-function mutations are present in pediatric T-ALL and that few studies report the effect of the mutation on the outcome of the patients (2, 3, 6), we performed sequence analysis of the trans-membrane domain of IL7R α gene in the AIEOP T-ALL paediatric cohort treated with LAL2000/R2006 protocol.

Moreover, considering that next generation technologies gave a novel opportunity to increment the sensitivity of detection of mutations in the tumor cell population and that the blast population is not always composed by only a single homogeneous population, we analyzed the distribution of the IL7R mutated clones in the diagnosis detecting also the mutations at subclonal level (<10%).

In the perspective of the future mutation-patient specific therapy we want to understand if it is possible to follow the mutated clone after the initial therapy. We compared minimal residual IL7R mutated clone to the minimal residual disease at day +33.

Screening for mutations of IL7R was performed on DNA by PCR amplification of exons 6 followed by Sanger sequencing or Roche 454-Junior platform with Universal Tailed Amplicon Sequencing approach. The primers are IL7R forward 5'-tgcattggctactgaatgctc-3', IL7R reverse 5'-cccacacaatcaccctcttt-3'. For Sanger Sequencing, denaturing, annealing and extension steps were performed at 94°C for 15 s, 55°C for 45 s, 72°C for 1 m, for a total of 35 cycles on a thermocycler; PCR products were purified and analyzed by ABI310 sequencer, using the BigDye terminator kit v3.1 (Applied Biosystems Inc.). The 454 sequencing was performed according to the manufacturer's recommendations following the Manual for Amplicon Library Preparation.

We performed a first screening in 110 patients, detecting the mutation in 8 samples by Sanger sequencing. We subsequently analyzed other 117 patients in the 454-Junior platform detecting the mutation in 8 samples. Ultra-deep sequencing identified mutations had been validated by Sanger Sequencing, after cloning (Fig.1A). All the clonal and also the subclonal mutations are in frame insertion or insertion-deletion, 13 of 15 with a consequent addition of a cysteine (Fig.1C). Overall, the screening showed that 7% patients, 16 out of 227, were mutated in exon 6 of IL7R gene. Mutated and not-mutated patients had a 5 yrs Event-free survival of 68.8% (11.6) and 70.7% (3.2)

and Cumulative Incidence of 25% (10.8) and 24.1% (3), respectively (Supplementary Fig.1). We find that the presence of IL7R mutations could not predict clinical outcome.

To examine the depth of the mutated clone detected we apply deep-sequencing to all the mutated patients determining the presence of the mutated allele at a frequency that vary from 50% to 0.57% (Figure 1B). In patient 7 the initial Sanger sequencing allow the detection of the mutation present at 35% frequency, only the subsequent deep-sequencing allow the detection of an additional mutated allele at a frequency of 4% (Figure 1B). The ultra-deep sequencing of IL7R showed that a fraction of diagnosis T-ALL had IL7R mutated subclones at a frequency <10%.

To assess the dynamic of IL7R mutated clones during therapy we performed ultra-deep amplicon sequencing at day +33 of therapy in 7 patients with IL7R mutated blasts present at diagnosis.

The average number of sequences per patient was 14880 ± 2741 . As we can see in Figure 2, comparing the minimal residual disease (MRD) value analyzed by IG/TCR gene rearrangement (2, 7) with the percentage of mutated alleles detected by sequencing (Figure 2), we found that in 4 out of 7 patients the minimal residual mutated subclones are present, in accordance with the MRD positivity (pt#5, pt#6, pt#11, pt#12). In 3 patients the MRD value is lower than 1×10^{-4} and we do not detect any IL7R mutated subclone by 454 deep sequencing (pt#4, pt#8, pt#15). This result may be due to a false positive MRD result or to a selection of the blast population at day +33 that do not harbor IL7R mutation.

In patient #13 we detect an high value of MRD at day+33 (4×10^{-2}) but no one mutated clone by IL7R ultra-deep amplicon sequencing analysis. Also in this case the result can indicate a selection of the blast population after the initial therapy, not including the clone with IL7R mutation.

Overall, these data show that ultra-deep-NGS allow to specifically follow the mutated clone during therapy, also at minimal residual disease level ($\sim 10^{-3}$). The detection of residual IL7R mutated subclones by ultra-deep amplicon sequencing is a way of monitoring the response to therapy of the clone with a specific oncogenic mutation.

Based on the evidence that IL7R α gain-of-function mutation are present in pediatric T-ALL, we performed mutation sequence analysis of exon 6 of IL7R α gene with deep-sequencing 454 technique. The mutation frequency in the AIEOP T-ALL pediatric cohort was in the range of published study. The deep-sequencing allow the detection of IL7R gene clonal mutations and add sensitivity for the detection of subclonal mutations also allowing the determination of the frequency of the mutated allele. This result is in accordance with a recently published study reporting the

presence of subclonal mutation of TP53 in chronic lymphoblastic leukemia suggesting that limiting the knowledge of tumor mutation to the main clone may be uninformative (5). We document also that it is possible to follow the IL7R mutated clone during therapy and this pivotal finding may have potential implication for the future tailored-target-therapy: if we will arrive to treat patients with JAK-STAT pathway inhibitors against IL7R mutants cells, it will be important to know how it is responding the specific target cell.

Figure 1. IL7R mutations. Experimental validation of subclonal IL7R mutations identified by 454 sequencing, representative patient result: the first picture is the result of 454 deep-sequencing, the second picture is the chromatogram of the sequence performed after cloning (A). Allele frequency of the IL7R mutations identified by 454 sequencing. Mutations are ordered according to their allelic frequency (B). Scheme of IL7R protein and predicted aminoacid alteration; subclonal alterations are indicated in red.

Figure 2. Analysis of clonal evolution in T-ALL patients with IL7R mutation at day+33 of therapy. Comparison of IL7R mutated allele frequency with minimal residual disease detected by IG/TCR DNA analysis. Graphical illustration of 4 patient in which IL7R mutated allele had been detected (A). Table of the data from 8 patients analyzed.

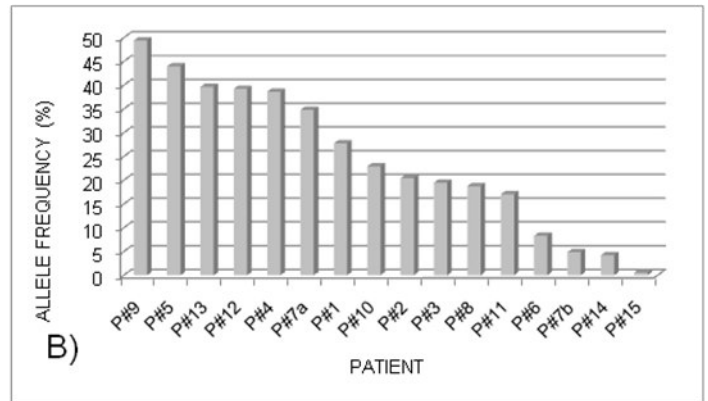
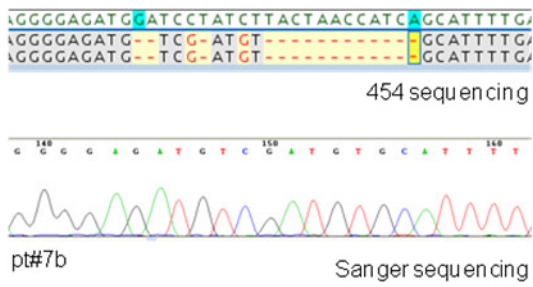
Supplementary Figure 1. Event-free survival (A) and Cumulative Incidence of Relapse. Probabilities of patients with and without IL7R mutations.

References

1. Tzoneva G, Perez-Garcia A, Carpenter Z, Khiabani H, Tosello V, Allegretta M, Paietta E, Racevskis J, Rowe JM, Tallman MS, Paganin M, Basso G, Hof J, Kirschner-Schwabe R, Palomero T, Rabadan R, Ferrando A. **Activating mutations in the NT5C2 nucleotidase gene drive chemotherapy resistance in relapsed ALL.** *Nature Medicine.* 2013 Mar;19(3):368-71.
2. Yokoyama K, Yokoyama N, Izawa K, Kotani A, Harashima A, Hozumi K, Tojo A. **In vivo leukemogenic potential of an interleukin 7 receptor α chain mutant in hematopoietic stem and progenitor cells.** *Blood.* 2013 Dec 19;122(26):4259-63.
3. Zenatti PP, Ribeiro D, Li W, Zuurbier L, Silva MC, Paganin M, Tritapoe J, Hixon JA, Silveira AB, Cardoso BA, Sarmiento LM, Correia N, Toribio ML, Kobarg J, Horstmann M,

- Pieters R, Brandalise SR, Ferrando AA, Meijerink JP, Durum SK, Yunes JA, Barata JT. **Oncogenic IL7R gain-of-function mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia.** *Nature Genetics.* 2011 Sep 4;43(10):932-9.
4. van der Velden VH, Cazzaniga G, Schrauder A, Hancock J, Bader P, Panzer-Grumayer ER, Flohr T, Sutton R, Cave H, Madsen HO, Cayuela JM, Trka J, Eckert C, Foroni L, Zur Stadt U, Beldjord K, Raff T, van der Schoot CE, van Dongen JJ. **Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data.** *Leukemia.* 2007 Apr;21(4):604-11.
 5. Rossi D, Khiabani H, Spina V, Ciardullo C, Brusca A, Famà R, Rasi S, Monti S, Deambrogi C, De Paoli L, Wang J, Gattei V, Guarini A, Foà R, Rabadan R, Gaidano G. **Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia.** *Blood.* 2014 April;123(14):2139-2147.
 6. Shochat C, Tal N, Bandapalli OR, Palmi C, Ganmore I, te Kronnie G, Cario G, Cazzaniga G, Kulozik AE, Stanulla M, Schrappe M, Biondi A, Basso G, Bercovich D, Muckenthaler MU, Izraeli S. **Gain-of-function mutations in interleukin-7 receptor- α (IL7R) in childhood acute lymphoblastic leukemias.** *The Journal of experimental medicine.* 2011 May 9;208(5):901-8.
 7. Schrappe M¹, Valsecchi MG, Bartram CR, Schrauder A, Panzer-Grümayer R, Möricke A, Parasole R, Zimmermann M, Dworzak M, Buldini B, Reiter A, Basso G, Klingebiel T, Messina C, Ratei R, Cazzaniga G, Koehler R, Locatelli F, Schäfer BW, Aricò M, Welte K, van Dongen JJ, Gadner H, Biondi A, Conter V. **Late MRD response determines relapse risk overall and in subsets of childhood T-cell ALL: results of the AIEOP-BFM-ALL 2000 study.** *Blood.* 2011 Aug 25;118(8):2077-84.

Figure 1.

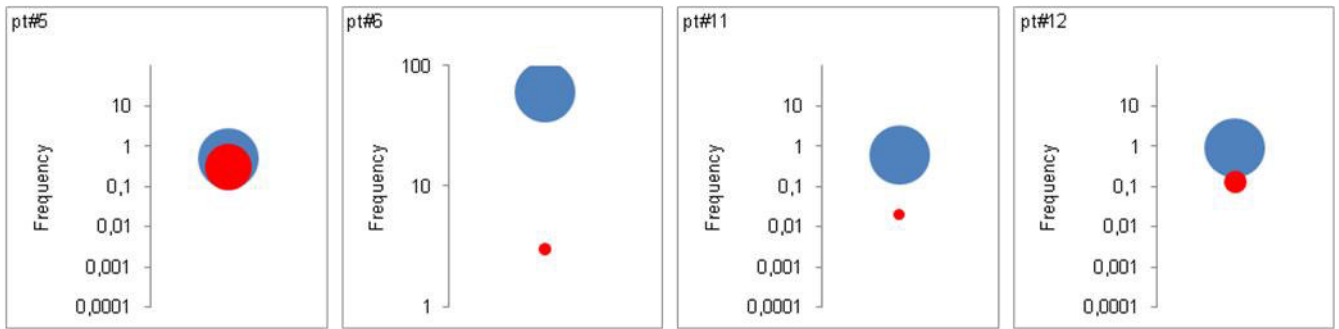


A)



C)

Figure 2.



A)

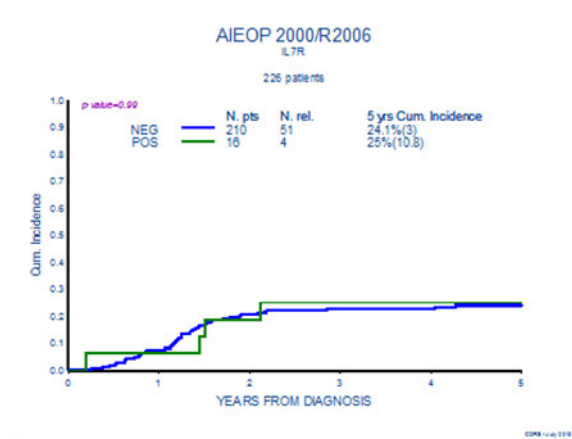
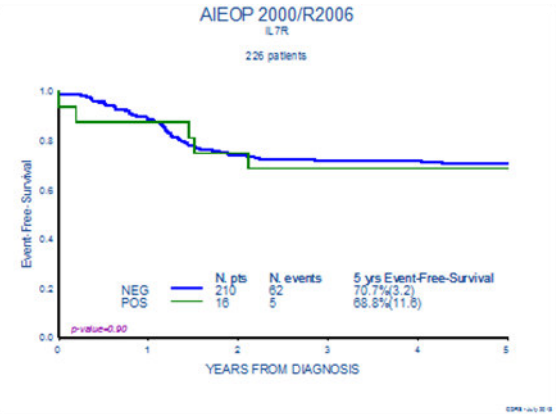
● Mrd Ig/TCR
● IL7R mutated reads

Patient	Mrd Ig/TCR	% of IL7R mutated reads
#4	0.01	0
#5	0.5	0.3
#6	60	3
#8	0.001	0
#11	0.6	0.02
#12*	0.9	0.13
#13	4	0
#15*	0.01	0

* only one run

B)

Supplementary Figure 1.



CONCLUSIONI GENERALI

La leucemia linfoblastica acuta a cellule T (T-ALL) è un tumore ematologico aggressivo che risulta dalla trasformazione maligna dei precursori delle cellule T in seguito all'insorgenza di numerose lesioni genetiche e cromosomiche che alterano diversi processi cellulari. Le mutazioni attivanti a carico del gene *NOTCH1* rappresentano le principali alterazioni coinvolte nella patogenesi delle T-ALL che comportano l'attivazione aberrante del *NOTCH signaling*. *NOTCH1* promuove il *pathway PI3K-AKT-mTOR* attraverso molteplici meccanismi: infatti, può attivare l'*AKT* attraverso la downregolazione di *PTEN* mediante il repressore trascrizionale *HES1* (target diretto di *NOTCH1*) o a monte attraverso *IL7R*.

Il primo obiettivo del lavoro è stato di indagare il valore prognostico di mutazioni genetiche ricorrenti nello sviluppo della leucemia a livello dei geni *NOTCH1* e *PTEN* nei pazienti pediatrici T-ALL che seguono i protocolli AIEOP ALL2000/R2006 e AIEOP ALL2009. L'influenza delle mutazioni in questi geni sulla risposta al trattamento e al rischio di ricaduta potrebbe contribuire alla nuova stratificazione in classi di rischio dei pazienti pediatrici T-ALL. Nella coorte di pazienti analizzata, mediante *Sanger sequencing* è stato dimostrato che lo stato mutazionale di *PTEN* incide sull'*outcome* e lo *screening* per le alterazioni di questo gene sembra pertanto utile per la stratificazione dei pazienti in gruppi di rischio alto. Al contrario, il significato prognostico positivo della presenza della mutazione *NOTCH1* nella coorte AIEOP T-ALL sembra dipendere dal tipo di protocollo terapeutico. Pertanto, lo *screening* per le alterazioni di questo recettore non sembra utile per la stratificazione dei pazienti in gruppi di rischio.

C'è ancora molto da comprendere sull'utilizzo di specifici geni utilizzabili per la stratificazione alla terapia e sulla presenza e cooperazione delle diverse mutazioni causanti il tumore. In questo contesto, risulta interessante l'identificazione di nuove mutazioni che potrebbero avere un ruolo nella leucemogenesi. A tale scopo è stato sequenziato l'esoma di pazienti pediatrici T-ALL alto rischio. In uno dei pazienti sequenziati con WES è stata identificata una mutazione puntiforme a livello del gene *CCND3*, quale codifica per una ciclina coinvolta nello sviluppo dei linfociti.

Il secondo obiettivo di questo lavoro di tesi è stato, quindi, quello di indagare la ricorrenza delle mutazioni a carico del gene *CCND3* in pazienti pediatrici T-ALL. Nella coorte analizzata, è stata identificata una frequenza di mutazione del 6% a carico del gene *CCND3* sulla regione codificante il dominio C-terminale della proteina, che corrisponde ad un *hotspot* mutazionale in cui si verificano numerose altre mutazioni somatiche, già identificate in altre patologie linfoblastiche. Questi risultati e i successivi studi funzionali che saranno effettuati per valutare l'eventuale *gain-of-*

function della proteina mutata nei blasti leucemici, potranno fornire un nuovo *target* terapeutico di supporto agli attuali trattamenti utilizzati per la cura di questa malattia.

Infine, l'ultimo obiettivo oggetto di studio è stato l'utilizzo delle mutazioni somatiche come marcatore genetico specifico della cellula tumorale utilizzando le tecniche di sequenziamento di nuova generazione per identificare la presenza di cellule residue nel midollo osseo durante la terapia. Nei pazienti con leucemia linfoblastica acuta, la risposta al trattamento viene valutata mediante l'analisi della Malattia Minima Residua (MRD), la quale è una condizione post-trattamento che si riferisce a quella frazione di cellule cancerose che non sono eradiccate dal trattamento.

In particolare, è stato utilizzato il *deep amplicon sequencing* con tecnologia 454 de la *Roche* per il sequenziamento di *IL7R*, tenendo conto del fatto che tale metodica permette di sequenziare singole molecole di DNA precedentemente amplificate in modo clonale attraverso una PCR in emulsione divenendo, quindi, uno strumento in grado di identificare la frequenza di mutazione con sensibilità potenzialmente infinita all'aumentare del numero di sequenze allineate.

I dati ottenuti dimostrano che, in alcuni pazienti, il *deep-sequencing* permette di identificare le mutazioni clonali di *IL7R* anche quando la frequenza di mutazione è inferiore al 10% e di seguirne il decorso durante la terapia.

BIBLIOGRAFIA

1. Madon E, Gabutti V, Miniero R. *Ematologia ed Oncoematologia Pediatrica*. Mc Graw-Hill Publication. 1998.
2. Basso G, Buldini B, De Zen L, Orfao A. New methodologic approaches for immunophenotyping acute leukemias. *Haematologica*. 2001.
3. Pui CH, Sandlund JT, Pei D, Campana D, Rivera GK, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Razzouk BI, Howard SC, Hudson MM, Cheng C, Kun LE, Raimondi SC, Behm FG, Downing JR, Relling MV, Evans WE. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIII B at St Jude Children's Research Hospital. *Blood*. 2004.
4. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. 1976.
5. Szczepanski T, van der Velden VH, van Dongen JJ. Flow cytometric immunophenotyping of normal and malignant lymphocytes. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2006.
6. Chiaretti S, Brugnoletti F, Tavolaro S, Bonina S, Paoloni F, Marinelli M, Patten N, Bonifacio M, Kropp MG, Sica S, Guarini A, Foà R. TP53 mutations are frequent in adult acute lymphoblastic leukemia cases negative for recurrent fusion genes and correlate with poor response to induction therapy. *Haematologica*. 2013.
7. Chiaretti S, Zini G, Bassan R. Diagnosis and subclassification of acute lymphoblastic leukemia. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*. 2014.
8. Castoldi G. *Disordini linfoproliferativi*. In: *Malattie del sangue e degli organi ematopoietici*. McGraw-Hill. 2013.
9. Greaves M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nature Reviews Cancer*. 2006.
10. Belson M, Kingsley B, Holmes A. Risk factors for Acute Leukemia: A Review. *Environmental health perspectives*. 2007.
11. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukemia. *Lancet*. 2013.
12. Burmeister T, Bartels G, Gröger D, Trautmann H, Schwartz S, Lenz K, Tietze-Bürger C, Viardot A, Wäsch R, Horst HA, Reinhardt R, Gökbuget N, Hoelzer D, Kneba M, Brüggemann M. Germline variants in IKZF1, ARID5B, and CEBPE as risk factors for adult-onset acute lymphoblastic leukemia: an analysis from the GMALL study group. *Haematologica*. 2014.
13. Horwitz M. The genetics of familial leukemia. *Leukemia*. 1997.

14. Burkitt DP. The discovery of Burkitt's lymphoma. *Cancer*. 1983.
15. Jabbour EJ, Faderl S, Kantarjian HM. Adult Acute lymphoblastic leukemia. *Mayo Clin Proceedings*. 2005.
16. Vitale A, Guarini A, Chiaretti S, Foà R. The changing scene of adult acute lymphoblastic leukemia. *Current Opinion Oncology*. 2006.
17. Mc Mally RJ, Eden TO. An infectious aetiology for childhood acute leukemia: a review of the evidence. *British journal of haematology*. 2004.
18. Ching-Hon Pui, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2004.
19. Schrappe M. Prognostic factors in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Indian Journal of Pediatrics*. 2003.
20. Möricke A, Reiter A, Zimmermann M, Gadner H, Stanulla M, Dördelmann M, Löning L, Beier R, Ludwig WD, Ratei R, Harbott J, Boos J, Mann G, Niggli F, Feldges A, Henze G, Welte K, Beck JD, Klingebiel T, Niemeyer C, Zintl F, Bode U, Urban C, Wehinger H, Niethammer D, Riehm H, Schrappe M; German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. *Blood*. 2008.
21. Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2006.
22. Simone JV. Childhood leukemia--successes and challenges for survivors. *New England Journal of Medicine*. 2003.
23. Barrett AJ, Horowitz MM, Pollock BH, Zhang MJ, Bortin MM, Buchanan GR, Camitta BM, Ochs J, Graham-Pole J, Rowlings PA, Rimm AA, Klein JP, Shuster JJ, Sobocinski KA, Gale RP. Bone marrow transplants from HLA identical siblings as compared with chemotherapy for children with acute lymphoblastic leukemia in a second remission. *New England Journal of Medicine*. 1994.
24. Ferrando AA, Neuberg DS, Staunton J, Loh ML, Huard C, Raimondi SC, Behm FG, Pui CH, Downing JR, Gilliland DG, Lander ES, Golub TR, Look AT. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*. 2002.
25. Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP 4th, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, Blacklow SC, Look AT, Aster JC. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*. 2004.

26. Hebert J, Cayuela JM, Berkeley J, Sigaux F. Candidate tumor-suppressor genes MTS1 (p16INK4A) and MTS2 (p15INK4B) display frequent homozygous deletions in primary cells from T- but not from B-cell lineage acute lymphoblastic leukemias. *Blood*. 1994.
27. Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, Sklar J. TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell*. 1991.
28. O'Neil J, Grim J, Strack P, Rao S, Tibbitts D, Winter C, Hardwick J, Welcker M, Meijerink JP, Pieters R, Draetta G, Sears R, Clurman BE, Look AT. FBW7 mutations in leukemic cells mediate NOTCH pathway activation and resistance to gamma-secretase inhibitors. *The Journal of experimental medicine*. 2007.
29. Thompson BJ, Buonamici S, Sulis ML, Palomero T, Vilimas T, Basso G, Ferrando A, Aifantis I. The SCFFBW7 ubiquitin ligase complex as a tumor suppressor in T cell leukemia. *The Journal of experimental medicine*. 2007.
30. Van Vlierberghe P, Ferrando A. The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. *The Journal of Clinical Investigation*. 2012.
31. Bash RO, Hall S, Timmons CF, Crist WM, Amylon M, Smith RG, Baer R. Does activation of the TAL1 gene occur in a majority of patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia? A pediatric oncology group study. *Blood*. 1995.
32. Condorelli GL, Tocci A, Botta R, Facchiano F, Testa U, Vitelli L, Valtieri M, Croce CM, Peschle C. Ectopic TAL-1/SCL expression in phenotypically normal or leukemic myeloid precursors: proliferative and antiapoptotic effects coupled with a differentiation blockade. *Molecular and Cellular Biology*. 1997.
33. Renneville A, Kaltenbach S, Clappier E, Collette S, Micol JB, Nelken B, Lepelley P, Dastugue N, Benoît Y, Bertrand Y, Preudhomme C, Cavé H. Wilms tumor 1 (WT1) gene mutations in pediatric T-cell malignancies. *Leukemia*. 2010.
34. Gutierrez A, Sanda T, Ma W, Zhang J, Grebliunaite R, Dahlberg S, Neuberg D, Protopopov A, Winter SS, Larson RS, Borowitz MJ, Silverman LB, Chin L, Hunger SP, Jamieson C, Sallan SE, Look AT. Inactivation of LEF1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2010.
35. Van Vlierberghe P, Ambesi-Impiombato A, Perez-Garcia A, Haydu JE, Rigo I, Hadler M, Tosello V, Della Gatta G, Paietta E, Racevskis J, Wiernik PH, Luger SM, Rowe JM, Rue M, Ferrando AA. ETV6 mutations in early immature human T cell leukemias. *The Journal of experimental medicine*. 2011.

36. Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, Wu G, Heatley SL, Payne-Turner D, Easton J, Chen X, Wang J, Rusch M, Lu C, Chen SC, Wei L, Collins-Underwood JR, Ma J, Roberts KG, Pounds SB, Ulyanov A, Becksfort J, Gupta P, Huether R, Kriwacki RW, Parker M, McGoldrick DJ, Zhao D, Alford D, Espy S, Bobba KC, Song G, Pei D, Cheng C, Roberts S, Barbato MI, Campana D, Coustan-Smith E, Shurtleff SA, Raimondi SC, Kleppe M, Cools J, Shimano KA, Hermiston ML, Doulatov S, Eppert K, Laurenti E, Notta F, Dick JE, Basso G, Hunger SP, Loh ML, Devidas M, Wood B, Winter S, Dunsmore KP, Fulton RS, Fulton LL, Hong X, Harris CC, Dooling DJ, Ochoa K, Johnson KJ, Obenauer JC, Evans WE, Pui CH, Naeve CW, Ley TJ, Mardis ER, Wilson RK, Downing JR, Mullighan CG. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2012.
37. Della Gatta G, Palomero T, Perez-Garcia A, Ambesi-Impiombato A, Bansal M, Carpenter ZW, De Keersmaecker K, Sole X, Xu L, Paietta E, Racevskis J, Wiernik PH, Rowe JM, Meijerink JP, Califano A, Ferrando AA. Reverse engineering of TLX oncogenic transcriptional networks identifies RUNX1 as tumor suppressor in T-ALL. *Nature Medicine*. 2012.
38. Bandapalli O, Zimmermann M, Kox C, Stanulla M, Schrappe M, Ludwig WD, Koehler R, Muckenthaler M, Kulozik A. NOTCH1 activation clinically antagonizes the unfavorable effect of PTEN inactivation in BFM-treated children with precursor T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2013.
39. Silva A, Yunes JA, Cardoso BA, Martins LR, Jotta PY, Abecasis M, Nowill AE, Leslie NR, Cardoso AA, Barata JT. PTEN posttranslational inactivation and hyperactivation of the PI3K/Akt pathway sustain primary T cell leukemia viability. *Journal of Clinical Investigation*. 2008.
40. Van Vlierberghe P, Palomero T, Khiabani H, Van der Meulen J, Castillo M, Van Roy N, De Moerloose B, Philippé J, González-García S, Toribio ML, Taghon T, Zurbier L, Cauwelier B, Harrison CJ, Schwab C, Pisecker M, Strehl S, Langerak AW, Gecz J, Sonneveld E, Pieters R, Paietta E, Rowe JM, Wiernik PH, Benoit Y, Soulier J, Poppe B, Yao X, Cordon-Cardo C, Meijerink J, Rabadan R, Speleman F, Ferrando A. PHF6 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics*. 2010.
41. Zenatti PP, Ribeiro D, Li W, Zurbier L, Silva MC, Paganin M, Tritapoe J, Hixon JA, Silveira AB, Cardoso BA, Sarmiento LM, Correia N, Toribio ML, Kobarg J, Horstmann M, Pieters R, Brandalise SR, Ferrando AA, Meijerink JP, Durum SK, Yunes JA, Barata JT. Oncogenic IL7R gain-of-function mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics*. 2011.

42. Sanchez-Irizarry C, Carpenter AC, Weng AP, Pear WS, Aster JC, Blacklow SC. Notch subunit heterodimerization and prevention of ligand-independent proteolytic activation depend, respectively, on a novel domain and the LNR repeats. *Molecular and Cellular Biology*. 2004.
43. Ferrando AA. The role of Notch1 signaling in T-ALL. *Hematology*. 2009.
44. Barrick, D. & Kopan, R. The Notch transcription activation complex makes its move. *Cell*. 2006.
45. Uderzo C, Valsecchi MG, Bacigalupo A, Meloni G, Messina C, Polchi P, Di Girolamo G, Dini G, Miniero R, Locatelli F. Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia in second remission with allogeneic bone marrow transplantation and chemotherapy: ten-year experience of the Italian Bone Marrow Transplantation Group and the Italian Pediatric Hematology Oncology Association. *Journal of Clinical Oncology*. 1995.
46. Aster JC, Pear WS, Blacklow SC. Notch signaling in leukemia. *Annual review of pathology*. 2008.
47. AIEOP-BFM ALL 2009 Internationales kooperatives Behandlungsprotokoll für Kinder und Jugendliche mit akuter lymphoblastischer Leukämie, EudraCT Number AIEOP-BFM ALL 2009: 2007-004270-43. 2013.
48. Paganin M, Ferrando A. Molecular pathogenesis and targeted therapies for NOTCH1-induced T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Reviews*. 2011.
49. Litzow MR, Ferrando AA. ALL. *Blood*. 2015.
50. Weng AP, Millholland JM, Yashiro-Ohtani Y, Arcangeli ML, Lau A, Wai C, Del Bianco C, Rodriguez CG, Sai H, Tobias J, Li Y, Wolfe MS, Shachaf C, Felsher D, Blacklow SC, Pear WS, Aster JC. c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes & development*. 2006.
51. Palomero T, Sulis ML, Cortina M, Real PJ, Barnes K, Ciofani M, Caparros E, Buteau J, Brown K, Perkins SL, Bhagat G, Agarwal AM, Basso G, Castillo M, Nagase S, Cordon-Cardo C, Parsons R, Zúñiga-Pflücker JC, Dominguez M, Ferrando AA. Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia. *Nature Medicine*. 2007.
52. Sade H, Krishna S, Sarin A. The anti-apoptotic effect of Notch-1 requires p53-dependent, Akt/PKB-mediated signaling in T cells. *The Journal of biological chemistry*. 2004.
53. González-García S, García-Peydró M, Martín-Gayo E, Ballestar E, Esteller M, Bornstein R, de la Pompa JL, Ferrando AA, Toribio ML. CSL-MAML-dependent Notch1 signaling controls T lineage-specific IL-7R α gene expression in early human thymopoiesis and leukemia. *The Journal of experimental medicine*. 2009.

54. Reizis B, Leder P. Direct induction of T lymphocyte-specific gene expression by the mammalian Notch signaling pathway. *Genes & development*. 2002.
55. Medyouf H, Gusscott S, Wang H, Tseng JC, Wai C, Nemirovsky O, Trumpp A, Pflumio F, Carboni J, Gottardis M, Pollak M, Kung AL, Aster JC, Holzenberger M, Weng AP. High-level IGF1R expression is required for leukemia-initiating cell activity in T-ALL and is supported by Notch signaling. *The Journal of experimental medicine*. 2011.
56. Joshi I, Minter LM, Telfer J, Demarest RM, Capobianco AJ, Aster JC, Sicinski P, Fauq A, Golde TE, Osborne BA. Notch signaling mediates G1/S cell-cycle progression in T cells via cyclin D3 and its dependent kinases. *Blood*. 2009.
57. Dohda T, Maljukova A, Liu L, Heyman M, Grandér D, Brodin D, Sangfelt O, Lendahl U. Notch signaling induces SKP2 expression and promotes reduction of p27Kip1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Experimental cell research*. 2007.
58. Rao SS, O'Neil J, Liberator CD, Hardwick JS, Dai X, Zhang T, Tyminski E, Yuan J, Kohl NE, Richon VM, Van der Ploeg LH, Carroll PM, Draetta GF, Look AT, Strack PR, Winter CG. Inhibition of NOTCH signaling by gamma secretase inhibitor engages the RB pathway and elicits cell cycle exit in T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Cancer Research*. 2009.
59. Breit S, Stanulla M, Flohr T, Schrappe M, Ludwig WD, Tolle G, Happich M, Muckenthaler MU, Kulozik AE. Activating NOTCH1 mutations predict favorable early treatment response and long-term outcome in childhood precursor T-cell lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2006.
60. Park MJ, Taki T, Oda M, Watanabe T, Yumura-Yagi K, Kobayashi R, Suzuki N, Hara J, Horibe K, Hayashi Y. FBXW7 and NOTCH1 mutations in childhood T cell acute lymphoblastic leukaemia and T cell non-Hodgkin lymphoma. *British journal of haematology*. 2009.
61. van Grotel M, Meijerink JP, Beverloo HB, Langerak AW, Buys-Gladdines JG, Schneider P, Poulsen TS, den Boer ML, Horstmann M, Kamps WA, Veerman AJ, van Wering ER, van Noesel MM, Pieters R. The outcome of molecular-cytogenetic subgroups in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia: a retrospective study of patients treated according to DCOG or COALL protocols. *Haematologica*. 2006.
62. Kox C, Zimmermann M, Stanulla M, Leible S, Schrappe M, Ludwig W-D, Koehler R, Tolle G, Bandapalli OR, Breit S, Muckenthaler MU, Kulozik AE. The favorable effect of activating NOTCH1 receptor mutations on long-term outcome in T-ALL patients treated on the ALL-BFM 2000 protocol can be separated from FBXW7 loss of function. *Leukemia*. 2010.

63. Zuurbier L, Petricoin EF, Vuerhard MJ, Calvert V, Kooi C, Buijs-Gladdines JGCAM, Smits WK, Sonneveld E, Veerman AJP, Kamps WA, Horstmann M, Pieters R, Meijerink JPP. The significance of PTEN and AKT aberrations in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2012.
64. Clappier E, Collette S, Grardel N, Girard S, Suarez L, Brunie G, Kaltenbach S, Yakouben K, Mazingue F, Robert A, Boutard P, Plantaz D, Rohrlich P, van Vlierberghe P, Preudhomme C, Otten J, Speleman F, Dastugue N, Suciu S, Benoit Y, Bertrand Y, Cave H. NOTCH1 and FBXW7 mutations have a favorable impact on early response to treatment, but not on outcome, in children with T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) treated on EORTC trials 58881 and 58951. *Leukemia*. 2010.
65. Jenkinson S, Koo K, Mansour MR, Goulden N, Vora A, Mitchell C, Wade R, Richards S, Hancock J, Moorman AV, Linch DC, Gale RE. Impact of NOTCH1/FBXW7 mutations on outcome in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia patients treated on the MRC UKALL 2003 trial. *Leukemia*. 2013.
66. Fogelstrand L, Staffas A, Wasslavik C, Sjögren H, Söderhäll S, Frost BM, Forestier E, Degerman S, Behrendtz M, Heldrup J, Karrman K, Johansson B, Heyman M, Abrahamsson J, Palmqvist L. Prognostic Implications of Mutations in NOTCH1 and FBXW7 in Childhood T-ALL Treated According to the NOPHO ALL-1992 and ALL-2000 Protocols. *Pediatric Blood Cancer*. 2014.
67. Gao C, Liu SG, Zhang RD, Li WJ, Zhao XX, Cui L, Wu MY, Zheng HY, Li ZG. NOTCH1 mutations are associated with favourable long-term prognosis in paediatric T-cell acute lymphoblastic leukaemia: a retrospective study of patients treated on BCH-2003 and CCLG-2008 protocol in China. *British journal of haematology*. 2014.
68. Palomero T, Lim WK, Odom DT, Sulis ML, Real PJ, Margolin A, Barnes KC, O'Neil J, Neuberg D, Weng AP, Aster JC, Sigaux F, Soulier J, Look AT, Young RA, Califano A, Ferrando AA. NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006.
69. Real PJ, Tosello V, Palomero T, Castillo M, Hernando E, de Stanchina E, Sulis ML, Barnes K, Sawai C, Homminga I, Meijerink J, Aifantis I, Basso G, Cordon-Cardo C, Ai W, Ferrando A. Gamma-secretase inhibitors reverse glucocorticoid resistance in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nature Medicine*. 2009.
70. Aifantis I, Raetz E, Buonamici S. Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. *Nature Reviews Immunology*. 2008.

71. Gu Y, Masiero M, Banham AH. Notch signaling: its roles and therapeutic potential in hematological malignancies. *Oncotarget*. 2016.
72. Song MS, Salmena L, Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2012.
73. Travis JJ. Phosphatase and Tensin Homologue: Novel Regulation by Developmental Signaling. *Journal of signal transduction*. 2015.
74. Silva A, Yunes JA, Cardoso BA, Martins LR, Jotta PY, Abecasis M, Nowill AE, Leslie NR, Cardoso AA, Barata JT . PTEN posttranslational inactivation and hyperactivation of the PI3K/Akt pathway sustain primary T cell leukemia viability. *Journal of Clinical Investigation*. 2008.
75. Suzuki, A, Yamaguchi MT, Ohteki T, Sasaki T, Kaisho T, Kimura Y, Yoshida R, Wakeham A, Higuchi T, Fukumoto M, Tsubata T, Ohashi PS, Koyasu S, Penninger JM, Nakano T, Mak TW. T cell-specific loss of Pten leads to defects in central and peripheral tolerance. *Immunity*. 2001.
76. Hang J, Grindley JC, Yin T, Jayasinghe S, He XC, Ross JT, Haug JS, Rupp D, Porter-Westpfahl KS, Wiedemann LM, Wu H, Li L. PTEN maintains haematopoietic stem cells and acts in lineage choice and leukaemia prevention. *Nature*. 2006.
77. Xu Z, Stokoe D, Kane LP, Weiss A. The inducible expression of the tumor suppressor gene PTEN promotes apoptosis and decreases cell size by inhibiting the PI3K/Akt pathway in Jurkat T cells. *Cell growth & differentiation*. 2002.
78. Vazquez, F, Ramaswamy S, Nakamura N, Sellers WR. Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Molecular and Cellular Biology*. 2000.
79. Torres J, Pulido R. The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation. *The Journal of biological chemistry*. 2001.
80. Piazza FA, Ruzzene M, Gurrieri C, Montini B, Bonanni L, Chioetto G, Di Maira G, Barbon F, Cabrelle A, Zambello R, Adami F, Trentin L, Pinna LA, Semenzato G. Multiple myeloma cell survival relies on high activity of protein kinase CK2. *Blood*. 2006.
81. Seldin DC, Leder P. Casein kinase II alpha transgene-induced murine lymphoma: relation to theileriosis in cattle. *Science*. 1995.
82. Kraszewska MD, Dawidowska M, Szczepański T, Witt M. T-cell acute lymphoblastic leukaemia: recent molecular biology findings. *British journal of haematology*. 2012.
83. Zuurbier L, Petricoin EF, Vuerhard MJ, Calvert V, Kooi C, Buijs-Gladdines JG, Smits WK, Sonneveld E, Veerman AJ, Kamps WA, Horstmann M, Pieters R, Meijerink JP. The

- significance of PTEN and AKT aberrations in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2012.
84. Jotta PY, Ganazza MA, Silva A, Viana MB, da Silva MJ, Zambaldi LJ, Barata JT, Brandalise SR, Yunes JA. Negative prognostic impact of PTEN mutation in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2010.
 85. Jenkinson S, Kirkwood AA, Goulden N, Vora A, Linch DC, Gale RE. Impact of PTEN abnormalities on outcome in pediatric patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia treated on the MRC UKALL2003 trial. *Leukemia*. 2016.
 86. Brito MB, Goulielmaki E, Papakonstanti EA. Focus on PTEN regulation. *Frontiers in Oncology*. 2015.
 87. Gallo Llorente L, Luther H, Schneppenheim R, Zimmermann M, Felice M, Horstmann MA. Identification of novel NOTCH1 mutations: Increasing our knowledge of the NOTCH signaling pathway. *Pediatric Blood Cancer*. 2013.
 88. Schnell SA, Ambesi-Impiombato A, Sanchez-Martin M, Belder L, Xu L, Qin Y, Kageyama R, Ferrando AA. Therapeutic targeting of HES1 transcriptional programs in T-ALL. *Blood*. 2015.
 89. Breit S, Nees M, Schaefer U, Pfoersich M, Hagemeyer C, Muckenthaler M, Kulozik AE. Impact of preanalytical handling on bone marrow mRNA gene expression. *British journal of haematology*. 2004.
 90. Cario G, Stanulla M, Fine BM, Teuffel O, Neuhoff NV, Schrauder A, Flohr T, Schäfer BW, Bartram CR, Welte K, Schlegelberger B, Schrappe M. Distinct gene expression profiles determine molecular treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2005.
 91. Ludwig WD, Harbott J, Bartram CR, Komischke B, Sperling C, Nehemer A, Teichmann JV, Seibt-Jung H, Notter M, Odenwald E, Thiel E, Riehm H. Incidence and prognostic significance of immunophenotypic subgroups in childhood acute lymphoblastic leukemia: experience of the BFM study 86. *Recent Results Cancer Research*. 1993.
 92. Niehues T, Kapaun P, Harms DO, Burdach S, Kramm C, Körholz D, Janka-Schaub G, Göbel U. A classification based on T cell selection-related phenotypes identifies a subgroup of childhood T-ALL with favorable outcome in the COALL studies. *Leukemia*. 1999.
 93. Zweidler-McKay PA, Pear WS. Notch and T cell malignancy. *Seminars in cancer biology*. 2004.
 94. Leslie NR, Downes CP. PTEN: The down side of PI 3-kinase signalling. *Cell Signaling*. 2002.

95. Gutierrez A, Sanda T, Grebliunaite R, Carracedo A, Salmena L, Ahn Y, Dahlberg S, Neuberg D, Moreau LA, Winter SS, Larson R, Zhang J, Protopopov A, Chin L, Pandolfi PP, Silverman LB, Hunger SP, Sallan SE, Look AT. High frequency of PTEN, PI3K, and AKT abnormalities in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2009.
96. Schrappe M, Valsecchi MG, Bartram CR, Schrauder A, Panzer-Grümayer R, Möricke A, Parasole R, Zimmermann M, Dworzak M, Buldini B, Reiter A, Basso G, Klingebiel T, Messina C, Ratei R, Cazzaniga G, Koehler R, Locatelli F, Schäfer BW, Aricò M, Welte K, van Dongen JJ, Gadner H, Biondi A, Conter V. Late MRD response determines relapse risk overall and in subsets of childhood T-cell ALL: results of the AIEOP-BFM-ALL 2000 study. *Blood*. 2011.
97. Basso G, Veltroni M, Valsecchi MG, Dworzak MN, Ratei R, Silvestri D, Benetello A, Buldini B, Maglia O, Masera G, Conter V, Arico M, Biondi A, Gaipa G. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. *Journal of Clinical Oncology*. 2009.
98. Accordi B, Espina V, Giordan M, VanMeter A, Milani G, Galla L, Ruzzene M, Sciro M, Trentin L, De Maria R, te Kronnie G, Petricoin E, Liotta L, Basso G. Functional Protein Network Activation Mapping Reveals New Potential Molecular Drug Targets for Poor Prognosis Pediatric BCP-ALL. *PLOS*. 2010.
99. Maude SL, Dolai S, Delgado-Martin C, Vincent C, Robbins A, Selvanathan A, Ryan T, Hall J, Woods AC, Tasian SK, Hunger SP, Loh ML, Mullighan CG, Wood BL, Hermiston ML, Grupp SA, Lock RB, Teachey DT. Efficacy of JAK/STAT pathway inhibition in murine xenograft models of early T-cell precursor (ETP) acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2015.
100. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*. 1995.
101. Riehm H, Reiter A, Schrappe M, Berthold F, Dopfer R, Gerein V, Ludwig R, Ritter J, Stollmann B, Henze G. Corticosteroid-dependent reduction of leukocyte count in blood as a prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia in childhood (therapy study ALL-BFM 83). *Klinische Pädiatrie Journal*. 1987.
102. Flohr T, Schrauder A, Cazzaniga G, Panzer-Grumayer R, van der Velden V, Fischer S, Stanulla M, Basso G, Niggli FK, Schäfer BW, Sutton R, Koehler R, Zimmermann M, Valsecchi MG, Gadner H, Masera G, Schrappe M, van Dongen JJ, Biondi A, Bartram CR. Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR

- analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*.2008.
103. Hansen-Hagge TE, Yokota S, Bartram CR. Detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia by in vitro amplification of rearranged T-cell receptor delta chain sequences. *Blood*. 1989.
 104. Mendes RD, Sarmento LM, Canté-Barrett K, Zuurbier L, Buijs-Gladdines JG, Póvoa V, Smits WK, Abecasis M, Yunes JA, Sonneveld E, Horstmann MA, Pieters R, Barata JT, Meijerink JP. PTEN microdeletions in T-cell acute lymphoblastic leukemia are caused by illegitimate RAG-mediated recombination events. *Blood*. 2014.
 105. MRC-Holland. MLPA General Protocol. 2014.
 106. Leamon JH, Braverman MS, Rothberg JM. High throughput, massively parallel DNA sequencing technology for the era of personalized medicine. *Gene therapy and regulation*. 2007.
 107. Applied Biosystems: ABI Prism 7700 Sequence Detection Systems. User Bulletin #2. Relative Quantitation of Gene Expression.
 108. Izraeli S. Application of genomics for risk stratification of childhood acute lymphoblastic leukaemia: from bench to bedside? *British journal of haematology*. 2010.
 109. Moorman V, Enshaei A, Schwab C, Wade R, Chilton L, Elliott A, Richardson S, Hancock J, Kinsey S, Mitchell C, Goulden N, Vora A, Harrison C. A novel integrated cytogenetic and genomic classification refines risk stratification in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2014.
 110. Kyung Duk Park. How do we prepare ourselves for a new paradigm of medicine to advance the treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia? *Blood Research*. 2014.
 111. Braggio E, Egan JB, Fonseca R, Stewart AK. Lessons from next-generation sequencing analysis in hematological malignancies *Blood Cancer Journal*. 2013.
 112. Dixon-McIver A. Emerging technologies in paediatric leukaemia. *Translational pediatrics*. 2015.
 113. Ley TJ, Mardis ER, Ding L, Fulton B, McLellan MD, Chen K, Dooling D, Dunford-Shore BH, McGrath S, Hickenbotham M, Cook L, Abbott R, Larson DE, Koboldt DC, Pohl C, Smith S, Hawkins A, Abbott S, Locke D, Hillier LW, Miner T, Fulton L, Magrini V, Wylie T, Glasscock J, Conyers J, Sander N, Shi X, Osborne JR, Minx P, Gordon D, Chinwalla A, Zhao Y, Ries RE, Payton JE, Westervelt P, Tomasson MH, Watson M, Baty J, Ivanovich J, Heath S, Shannon WD, Nagarajan R, Walter MJ, Link DC, Graubert TA,

- DiPersio JF, Wilson RK. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature*. 2008.
114. Campbell PJ, Stephens PJ, Pleasance ED, O'Meara S, Li H, Santarius T, Stebbings LA, Leroy C, Edkins S, Hardy C, Teague JW, Menzies A, Goodhead I, Turner DJ, Clee CM, Quail MA, Cox A, Brown C, Durbin R, Hurler ME, Edwards PA, Bignell GR, Stratton MR, Futreal PA. Identification of somatically acquired rearrangements in cancer using genome-wide massively parallel paired-end sequencing. *Nature Genetics*. 2008.
115. Simon C, Chagraoui J, Kros J, Gendron P, Wilhelm B, Lemieux S, Boucher G, Chagnon P, Drouin S, Lambert R, Rondeau C, Bilodeau A, Lavallée S, Sauvageau M, Hébert J, Sauvageau G. A key role for EZH2 and associated genes in mouse and human adult T-cell acute leukemia. *Genes & development*. 2012.
116. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, Kandoth C, Payton JE, Baty J, Welch J, Harris CC, Lichti CF, Townsend RR, Fulton RS, Dooling DJ, Koboldt DC, Schmidt H, Zhang Q, Osborne JR, Lin L, O'Laughlin M, McMichael JF, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Magrini VJ, Vickery TL, Hundal J, Cook LL, Conyers JJ, Swift GW, Reed JP, Alldredge PA, Wylie T, Walker J, Kalicki J, Watson MA, Heath S, Shannon WD, Varghese N, Nagarajan R, Westervelt P, Tomasson MH, Link DC, Graubert TA, DiPersio JF, Mardis ER, Wilson RK. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2010.
117. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011.
118. Rubio-Perez C, Tamborero D, Schroeder MP, Antolín AA, Deu-Pons J, Perez-Llomas C, Mestres J, Gonzalez-Perez A, Lopez-Bigas N. In silico prescription of anticancer drugs to cohorts of 28 tumor types reveals targeting opportunities. *Cancer Cell*. 2015.
119. Gonzalez-Perez A. Circuits of cancer drivers revealed by convergent misregulation of transcription factor targets across tumor types. *Genome Medicine*. 2016.
120. Deshpande A, Sicinski P, Hinds PW. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene*. 2005.
121. Sicinska E, Aifantis I, Le Cam L, Swat W, Borowski C, Yu Q, Ferrando AA, Levin SD, Geng Y, von Boehmer H, Sicinski P. Requirement for cyclin D3 in lymphocyte development and T cell leukemias. *Cancer Cell*. 2003.
122. Sawai CM, Freund J, Oh P, Ndiaye-Lobry D, Bretz JC, Strikoudis A, Genesca L, Trimarchi T, Kelliher MA, Clark M, Soulier J, Chen-Kiang S, Aifantis I. Therapeutic targeting of the cyclin D3:CDK4/6 complex in T cell leukemia. *Cancer Cell*. 2012.

123. Moorman V, Enshaei A, Schwab C, Wade R, Chilton L, Elliott A, Richardson S, Hancock J, Kinsey S, Mitchell C, Goulden N, Vora A, Harrison C. A novel integrated cytogenetic and genomic classification refines risk stratification in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2014.
124. Schmitz R, Young RM, Ceribelli M, Jhavar S, Xiao W, Zhang M, Wright G, Shaffer AL, Hodson DJ, Buras E, Liu X, Powell J, Yang Y, Xu W, Zhao H, Kohlhammer H, Rosenwald A, Kluin P, Müller-Hermelink HK, Ott G, Gascoyne RD, Connors JM, Rimsza LM, Campo E, Jaffe ES, Delabie J, Smeland EB, Ogwang MD, Reynolds SJ, Fisher RI, Braziel RM, Tubbs RR, Cook JR, Weisenburger DD, Chan WC, Pittaluga S, Wilson W, Waldmann TA, Rowe M, Mbulaiteye SM, Rickinson AB, Staudt LM. Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature*. 2012.
125. Morin RD, Assouline S, Alcaide M, Mohajeri A, Johnston RL, Chong L, Grewal J, Yu S, Fornika D, Bushell K, Nielsen TH, Petrogiannis-Haliotis T, Crump M, Tosikyan A, Grande BM, MacDonald D, Rousseau C, Bayat M, Sesques P, Froment R, Albuquerque M, Monczak Y, Oros KK, Greenwood C, Riazalhosseini Y, Arseneault M, Camlioglu E, Constantin A, Pan-Hammarstrom Q, Peng R, Mann KK, Johnson NA. Genetic Landscapes of Relapsed and Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphomas. *Clinical Cancer Research*. 2016.
126. Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, Ma J, Rossi D, Chiarenza A, Wells VA, Grunn A, Messina M, Elliot O, Chan J, Bhagat G, Chadburn A, Gaidano G, Mullighan CG, Rabadan R, Dalla-Favera R. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nature Genetics*. 2011.
127. Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, Goya R, Mungall KL, Corbett RD, Johnson NA, Severson TM, Chiu R, Field M, Jackman S, Krzywinski M, Scott DW, Trinh DL, Tamura-Wells J, Li S, Firme MR, Rogic S, Griffith M, Chan S, Yakovenko O, Meyer IM, Zhao EY, Smailus D, Moksa M, Chittaranjan S, Rimsza L, Brooks-Wilson A, Spinelli JJ, Ben-Neriah S, Meissner B, Woolcock B, Boyle M, McDonald H, Tam A, Zhao Y, Delaney A, Zeng T, Tse K, Butterfield Y, Birol I, Holt R, Schein J, Horsman DE, Moore R, Jones SJ, Connors JM, Hirst M, Gascoyne RD, Marra MA. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature*. 2011.
128. Zuniga-Pflucke JC, T-cell development made simple. *Nature reviews. Immunology*. 2004.
129. Radtke F, Wilson A, Mancini SJ, MacDonald HR. Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nature Immunology*. 2004.

130. Sambandam A, Maillard I, Zediak VP, Xu L, Gerstein RM, Aster JC, Pear WS, Bhandoola A. Notch signaling controls the generation and differentiation of early T lineage progenitors. *Nature Immunology*. 2005.
131. Rothenberg EV. Notchless T cell maturation? *Nature Immunology*. 2001.
132. Schnell S, Demolliere C, van den Berk P, Kirberg J, Jacobs H. Constitutive expression of the pre-TCR enables development of mature T cells. *International Immunology*. 2006.
133. Spits, H. Development of alphabeta T cells in the human thymus. *Nature reviews. Immunology*. 2002.
134. Ciofani M, Schmitt TM, Ciofani A, Michie AM, Cuburu N, Aublin A, Maryanski JL, Zúñiga-Pflücker JC. Obligatory role for cooperative signaling by pre-TCR and Notch during thymocyte differentiation. *Journal of immunology*. 2004.
135. Ciofani M, Zuniga-Pflucker JC. Notch promotes survival of pre-T cells at the beta-selection checkpoint by regulating cellular metabolism. *Nature Immunology*. 2005.
136. Downing JR, Wilson RK, Zhang J, Mardis ER, Pui CH, Ding L, Ley TJ, Evans WE. The Pediatric Cancer Genome Project. *Nature Genetics*. 2012.

PUBBLICAZIONI

A Case of T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia Relapsed As Myeloid Acute Leukemia.

Maddalena Paganin, Barbara Buldini, Giuseppe Germano, Elena Seganfredo, Annamaria di Meglio, Elisa Magrin, Francesca Grillo, Martina Pigazzi, Carmelo Rizzari, Giovanni Cazzaniga, Hossein Khiabanian, Teresa Palomero, Raul Rabadan, Adolfo A. Ferrando, Giuseppe Basso.

BRIEF REPORT

A Case of T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia Relapsed As Myeloid Acute Leukemia

Maddalena Paganin, PhD,¹ Barbara Buldini, MD,² Giuseppe Germano, PhD,^{3*} Elena Seganfredo, PhD,² Annamaria di Meglio, PhD,³ Elisa Magrin, MS,² Francesca Grillo, MS,² Martina Pigazzi, PhD,^{2,3} Carmelo Rizzari, MD,⁴ Giovanni Cazzaniga, PhD,⁴ Hossein Khiabani, PhD,^{5,6} Teresa Palomero, PhD,^{7,8} Raul Rabadan, PhD,^{5,6} Adolfo A. Ferrando, MD,^{7,8,9} and Giuseppe Basso, MD²

A 4-year-old male with the diagnosis of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) relapsed after 19 months with an acute myeloid leukemia (AML). Immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements analyses reveal that both leukemias were rearranged with a clonal relationship between them. Comparative genomic hybridization (Array-CGH) and whole-exome sequencing analyses of both samples suggest that this leukemia may have originated from a

common T/myeloid progenitor. The presence of homozygous deletion of p16/INK4A, p14/ARF, p15/INK4B, and heterozygous deletion of WT1 locus remained stable in the leukemia throughout phenotypic switch, revealing that this AML can be genetically associated to T-ALL. *Pediatr Blood Cancer* 0000;00:000–000. © 2016 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: switch lineage; T-ALL; whole-exome sequencing

INTRODUCTION

In leukemia, lineage switch is recognized by the conversion of the lineage at initial diagnosis to another lineage upon relapse. This is an uncommon event that may occur from acute lymphoblastic leukemia (ALL) to acute myeloid leukemia (AML) and most rarely in the opposite direction.[1] Lineage switch accounts for 6–9% of relapsed cases, and is more often observed in childhood patients, for whom an appropriate standard treatment is not available. Such cases have been documented in the literature,[2–6] however the mechanisms involved in the lineage switch remain unclear.[7]

Here, we report the case of a child with T-cell ALL (T-ALL) who relapsed 1.7 years after the initial diagnosis with blast cells of myeloid phenotype. To investigate the mechanism underlying this leukemia switch, we performed a detailed molecular analysis on matched diagnosis and relapse samples.

CASE DESCRIPTION

A 4-year-old male was hospitalized after diagnosis with T-ALL. Wright–Giemsa stained bone marrow (BM) aspirate smear showed 94% blasts that were myeloperoxidase (MPO) negative; flow cytometry immunophenotype revealed leukemic cells that were positive for CD7, cyCD3, CD5, CD45, and negative for MPO supporting the T-ALL diagnosis according to WHO criteria.[8] Cytogenetic analysis showed a 46 XY del(12)(p12) karyotype in 20/20 metaphases. The patient was enrolled in the Ematologia Oncologia Pediatrica-Berlin-Frankfurt-Münster (AIEOP-BFM) ALL2000 protocol[9] and stratified as intermediate risk according to response to treatment, evaluated by minimal residual disease analysis of two sensitive T-cell receptor (TCR) targets ($V\gamma 8-J\gamma 1.3/2.3$ and $V\gamma 3-J\gamma 1.3/2.3$) identified using BIOMED protocols.[10,11] The patient achieved complete remission at the end of induction, and chemotherapy was continued according to the protocol. Nine-

teen months later, the patient presented with a medullary relapse while in continuation treatment; relapse was characterized by the presence of 86% blasts cells that displayed monoblastic morphology and cytochemical staining positive for MPO; the immunophenotype was negative for T antigens (CD7, cyCD3, CD5) and positive for MPO, compatible with AML.[8] Moreover, blasts expressed antigens related to the myelo-monocyte lineage such as CD33, CD64, CD11b. Cytogenetic analysis performed on the BM at relapse revealed a translocation 45,X,-Y,t(11;17)(q13;p12)[7]/46,XY[13]. A summary of biological features of diagnosis and relapse is shown in Table I. Treatment

Abbreviations: AIEOP, Associazione Italiana Ematologia Oncologica Pediatrica; AML, acute myeloid leukemia; Array-CGH, comparative genomic hybridization; BFM, Berlin-Frankfurt-Muenster; BM, bone marrow; Ig, Immunoglobulin; MPO, myeloperoxidase; MRD, minimal residual disease; T-ALL, T-cell acute lymphoblastic leukemia; TCR, T-cell receptor

¹Clinica di Oncoematologia Pediatrica dell’Azienda Ospedaliera di Padova, Padova, Italy; ²Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino, Università di Padova, Padova, Italy; ³Laboratorio di Oncoematologia Pediatrica, Istituto di Ricerca Pediatrica, Fondazione Città della Speranza, Padova, Italy; ⁴Centro di Ricerca Tetamanti, Clinica Pediatrica, Università di Milano, Bicocca, Milano, Italy; ⁵Systems Biology Department, Columbia University, New York; ⁶Department of Biomedical Informatics, Columbia University, New York; ⁷Institute for Cancer Genetics, Columbia University, New York; ⁸Department of Pathology, Columbia University, New York; ⁹Department of Pediatrics, Columbia University, New York

Conflict of interest: Nothing to declare.

*Correspondence to: Giuseppe Germano, Laboratorio di Oncoematologia Pediatrica, Istituto di Ricerca Pediatrica, Fondazione Città della Speranza, Fifth Floor, Corso Stati Uniti 4, 35127, Padova, Italy.

E-mail: giuseppe.germano@unipd.it

Received 18 February 2016; Accepted 17 April 2016

TABLE I. Summary of Clinical and Biological Features of Diagnosis and Relapse

	Diagnosis	Relapse
Bone marrow blasts (%)	94	86
Morphology and immunophenotype	T-ALL CD5+, CD7+, cyCD3+, CD3-, CD2-, CD45+, CD19-, CD10-, CD13-, CD14-, CD15-, CD33-, CD34-, MPO-, CD117-, CD56-	AML (FAB M0) CD5-, CD7-, cyCD3-, CD3-, CD2-, CD45+, CD19-, CD10-, CD13-, CD14-, CD15-, CD33+, CD34-, MPO+, CD117-, CD56+, CD11b+, CD64+
Cytochemical MPO (%)	Negative	Positive
Cytogenetics (G-banding)	46,XY,del(12)(p12)	45,X,-Y,t(11;17)(q13;p12)[7]/46,XY[13]
Ig/TCR rearrangements	TCRG V γ 8(2/4/2)J γ 1 TCRG V γ 3(3/11/0)J γ 1 TCRB D β 1(0/4/4)J β 1 TCRB V β 10(3/16/0)J β 2	TCRG V γ 8(2/4/2)J γ 1 TCRG V γ 3(3/11/0)J γ 1 TCRB D β 1(0/4/4)J β 1 TCRB D β 2(1/9/2)J β 2
MRD markers	V γ 8(2/4/2)J γ 1 V γ 3(3/11/0)J γ 1	
MRD classification	Medium risk	

T-ALL, T-acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; MRD, minimal residual disease; Ig, immunoglobulin.

consisted of intensive chemotherapy blocks derived from an AML front-line protocol (AIEOP AML 2002/01).[12] After complete remission was achieved and maintained for 3 months, the patient presented with a central nervous system relapse, which was treated with local chemotherapy. Two months later, the patient underwent a BM transplantation from a partially matched unrelated donor. Unfortunately, he developed a further marrow relapse and died of progressive disease 10 months after the diagnosis of secondary AML.

DISCUSSION

By studying the paired diagnostic and relapse specimens, we sought to determine the clonal relationship occurring in the lineage switch. The TCR gene rearrangement analysis at relapse revealed that seven of eight rearrangements were similar to the rearrangements found at diagnosis, including the sequenced N-region in the joining site (see Table II). In contrast, an incomplete D β -J β rearrangement was detected in the leukemic sample of the lineage switch, but not at the time of onset (Table II). Although the presence of identical TCR rearrangements at diagnosis and relapse supports their clonal relationship, to provide insight into the molecular basis of relapse and explore whether the lineage switch may arise from a common T-cell/myeloid progenitor, we performed Array-CGH (comparative genomic hybridization; Agilent Technologies, Santa Clara, CA) on genomic DNA samples obtained from BM at diagnosis and relapse. Copy number variations were obtained on the human genome CGH Microarray 244A and analyzed in Array-CGH analytic software v3.1.28 (Agilent Technologies), as previously described.[13] Array-CGH detected three genomic alterations involving three different chromosome regions in both diagnostic and relapse samples (Table II). These included a heterozygous deletion of 2.7 Mb accompanied by a small homozygous deletion (0.4 Mb), both encompassing chromosome band 9p21.3 at the *CDKN2A* and *CDKN2B* tumor suppressor loci, and two heterozygous deletions involving the *TCR γ* locus (7q34, 0.7 Mb) and the *WT1*

gene (11p13, 0.9 Mb). Of note, the *CDKN2A/B* deletions maintained at the myeloid relapse seem to relate to the abnormal genetic background most often associated with T-ALL.[14] On the other hand, genomic divergence between diagnosis and relapse was evidenced by heterozygous deletions in chromosome 7 (*TCR β* , q34, 0.4 Mb) and 12 (*ETV6*, *CDKN1B*, *KRAS*, p13.31-p11.23; p12.1; 18.3 Mb) found in the diagnostic sample, as well as heterozygous deletions in chromosome 17 (*TP53*, p13.3-p13.1, 7.9 Mb) and 11 (*ATM*, *PICALM*, q14.1-q23.2, 33.5 Mb), which was accompanied by a small homozygous deletion involving the *PICALM* gene (q14.1-q14-2, 0.7 Mb), and amplification of 41.4 Mb of chromosome 17q found in the relapse sample (Table II). The genetic alteration shared at diagnosis and relapse underlines their close clonal relationship. Moreover, the partial genetic divergence of clonal rearrangements and copy number variations indicates that myeloid relapse may arise via divergent clonal evolution from a preleukemic ancestral clone.[15]

Next, to gain insight into the genetic variations involved in lineage switch from T-ALL to AML, we performed whole-exome sequencing (SureSelect 50 Mb All Exon kit [Agilent Technologies] on a HiSeq2000 sequencing instrument [Centrillion Biosciences, Palo Alto, CA]) of diagnostic, remission, and relapse DNA samples. We identified sites that differed from the reference (called variants) in each sample independently after mapping the reads to the hg19 reference genome using the Burrows-Wheeler Aligner alignment tool version 0.5.9. We identified candidate somatic mutations using the SAVI algorithm as previously described[16] and validated selected somatic variant calls by direct Sanger sequencing. These analyses identified sequence mutations in 32 genes (Table II), of which one mutation in two genes (*ACVR1C* and *VWF*) was found to be clonal at diagnosis and relapse. This case showed single mutations in four genes (*NRAS*, *TRHDE*, *COL5A2*, and *NOTCH1*), which switched from diagnosis to wild-type in relapse (Table II). Notably, these included a *NOTCH1* L1678P activating allele and prototypical *NRAS* Q61K mutation.

In addition, a total of 27 new somatic mutations observed in 26 genes were relapse-specific (Table II). These involved genes

TABLE II. Genetic Aberrations and Mutations Identified at Diagnosis and Relapse

Cytoband	Start	End	Genes	Gain/loss/mutation
Mutations present at the diagnostic clone				
7p14.1	38262701	38336023	<i>TCRγ</i>	Loss
9p21.3	20011931	22712685	<i>p16/INK4A, p14/ARF, p15/INK4B</i>	Loss
9p21.3	21698371	22115464	<i>p16/INK4A, p14/ARF, p15/INK4B</i>	Loss
11p13	31998955	32969083	<i>WT1</i>	Loss
7p13	31998955	22115464	<i>TCRβ</i>	Loss
12p13.31-p11.23	9178167	27444989	<i>ETV6, CDKN1B, KRAS</i>	Loss
1p13.2	115256530	115256530	<i>NRAS</i>	Mutation, Q61K
2q24.1	58390507	58390507	<i>ACVR1C</i>	Mutation, G469R
2q32.2	189910626	189910626	<i>COL5A2</i>	Mutation, R1070H
9q34.3	139397768	139397768	<i>NOTCH1</i>	Mutation, L1678P
12p13.31	6128448	6128448	<i>VWF</i>	Mutation, R1379H
12q21.1	72866866	72866866	<i>TRHDE</i>	Mutation, T452M
12p12.1	22161737	23305796	unknown	
Mutations present at the relapse clone				
7p14.1	38262701	38336023	<i>TCRγ</i>	Loss
9p21.3	20011931	22712685	<i>p16/INK4A, p14/ARF, p15/INK4B</i>	Loss
9p21.3	21698371	22115464	<i>p16/INK4A, p14/ARF, p15/INK4B</i>	Loss
11p13	31998955	32969083	<i>WT1</i>	Loss
11q14.1-q23.2	79781213	113298058	<i>ATM, PICALM</i>	Loss
11q14.1-q14.2	85180436	85844698	<i>PICALM</i>	Loss
17p13.3-p13.1	59739	7992625	<i>TP53</i>	Loss
17q21.2-q25.3	37225568	78653589	Unknown	Gain
1p34.3	39924129	39924129	<i>MACF1</i>	Mutation, A5498S
11q12.1	58482842	58482842	<i>GLYAT</i>	Mutation, V46M
11q14.3	88301029	88301029	<i>GRM5</i>	Mutation, P608S
11q23.3	117780590	117780590	<i>TMPRSS13</i>	Mutation, T347I
12p13.31	9254042	9254042	<i>A2M</i>	Splice-site mutation
12q13.11	48529071	48529071	<i>PFKM</i>	Splice-site mutation
12p13.31	6128448	6128448	<i>VWF</i>	Mutation, R1379H
14q22.3	57268626	57268626	<i>OTX2</i>	Mutation, Q241
15q14	34130111	34130111	<i>RYR3</i>	Mutation, V3977A
17p13.2	6368072	6368072	<i>PITPNM3</i>	Mutation, R637Q
17q21.31	40939464	40939464	<i>WNK4</i>	Mutation, G549S
2q24.1	58390507	58390507	<i>ACVR1C</i>	Mutation, G469R
2q35	215855717	215855717	<i>ABCA12</i>	Mutation, F793L
2p12	8008513	8008513	<i>CTNNA2</i>	Mutation, R125W
22q13.2	41895779	41895779	<i>ACO2</i>	Mutation, R29Q
3q12.2	100387950	100387950	<i>GPR126</i>	Splice-site mutation
4q13.3	71201298	71201298	<i>CABS1</i>	Mutation, R181H
4p16.3	4285355	4285355	<i>LYAR</i>	Mutation, D39N
4q25	110756579	110756579	<i>RRH</i>	Mutation, V119M
5p15.2	13859640	13859640	<i>DNAH5</i>	Mutation, S1624N
5q31.3	140772384	140772384	<i>PCDHGA8</i>	Mutation, A2S
5q35.3	178310250	178310250	<i>ZNF354B</i>	Mutation, G266E
8p11.21	41555643	41555643	<i>ANK1</i>	Splice-site mutation
9q34	137721840	137721840	<i>COL5A1</i>	Mutation, P1696S
9q22.33	99795327	99795327	<i>CTSL2</i>	Mutation, W303C
9q22.33	99795326	99795326	<i>CTSL2</i>	Mutation, G304C
9q34.11	131029549	131029549	<i>GOLGA2</i>	Mutation, R162Q
9q34.11	131446263	131446263	<i>SET</i>	Mutation, S30F
Xq26.1	130215791	130215791	<i>ARHGAP36</i>	Mutation, S51L

The gray underlining shows the conserved genetic alterations of diagnosis and relapse.

encoding cytoskeleton and cell adhesion proteins (*CTNNA2*, *DNAH5*, *PCDHGA8*, *ANK1*, *MACF1*), transcription factors (*LYAR*, *OTX2*, *ZNF354B*), protein receptors (*GRM5*, *RYR3*, *GPR126*), and enzymes (*GLYAT*, *TMPRSS13*, *PFKM*, *WNK4*, *CTSL2*, *ACO2*). Of note, we observed a mutation in the *SET* gene, mostly observed at diagnosis in *SET-NUP214* T-ALL.[17]

Based on these results, we established a clear clonal relationship between diagnosis and relapse. In fact, the maintenance of *TCR* rearrangements, presence of *CDKN2A/B* deletions, and persistence of *ACVR1C* and *VWF* variants at relapse support a common clonal identity. However, the new lesions at relapse also suggest the possibility that these anomalies were acquired

during the evolution of the relapse clone; also, we cannot exclude the emergence of minor clones. Moreover, the number of genetic mutations acquired at the time of relapse, which involve genes with different functions, suggests that many events are implicated in the relapse process. Finally, the divergent pattern of genetic abnormalities between the two phases of the disease encourages the idea that a common T lymphoid and myeloid precursor may have the ability to drive the conversion to differential cell fates.[18] In conclusion, these findings complement the findings of previous studies of lineage switch observed between T-ALL and AML, and provide new insights into the series of genetic lesions that may underline this phenomenon.

REFERENCES

1. Stass S, Mirro J, Melvin S, Pui CH, Murphy SB, Williams D. Lineage switch in acute leukemia. *Blood* 1984;64:701–706.
2. Della Starza I, Ceglie G, Nunes V, Gianfelici V, Marinelli M, Fuligni F, De Novi LA, De Propriis MS, Vitale A, Chiaretti S GA, Foà R. A case of lineage switch from B-cell acute lymphoblastic leukaemia to acute myeloid leukaemia. Role of subclonal/clonal gene mutations. *Br J Haematol* 2015.
3. Germano G, Pigazzi M, del Giudice L, Campo Dell'Orto M, Spinelli M, Zangrando A, Paolucci P, Ladogana S, Basso G. Two consecutive immunophenotypic switches in a child with MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2006;91:ECR09.
4. Imataki O, Ohnishi H, Yamaoka G, Arai T, Kitanaka A, Kubota Y, Kushida Y, Ishida T, Tanaka T. Lineage switch from precursor B cell acute lymphoblastic leukemia to acute monocytic leukemia at relapse. *Int J Clin Oncol* 2010;15:112–115.
5. Mantadakis E, Danilidou V, Stiakaki E, Paterakis G, Papadimitriou S, Kalmanti M. T-cell acute lymphoblastic leukemia relapsing as acute myelogenous leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2007;48:354–357.
6. Palomero T, McKenna K, O-Neil J, Galinsky I, Stone R, Suzukawa K, Stiakaki E, Kalmanti M, Fox EA, Caligiuri MA, Aster JC, Look AT, Ferrando AA. Activating mutations in NOTCH1 in acute myeloid leukemia and lineage switch leukemias. *Leukemia* 2006;20:1963–1966.
7. Dorantes-Acosta E, Pelayo R. Lineage switching in acute leukemias: A consequence of stem cell plasticity? *Bone Marrow Res* 2012;2012:1–18.
8. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of tumors of Haematopoietic and lymphoid tissue, 4th edition, Volume 2, Geneva: WHO Press; 2008. 439 p.
9. Conter V, Valsecchi MG, Parasole R, Putti MC, Locatelli F, Barisone E, Lo Nigro L, Santoro N, Arico M, Ziino O, Pession A, Testi AM, Micalizzi C, Casale F, Zecca M, Casazza G, Tamaro P, La Barba G, Notarangelo LD, Silvestri D, et al. Childhood high-risk acute lymphoblastic leukemia in first remission: Results after chemotherapy or transplant from the AIEOP ALL 2000 study. *Blood* 2014;123:1470–1478.
10. van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, Gottardi E, Rambaldi A, Dotti G, Griesinger F, Parreira A, Gameiro P, Diaz MG, Malec M, Langerak AW, San Miguel JF, Biondi A. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: Investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999;13:1901–1928.
11. van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PAS, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuurink E, Garcia-Sanz R, van Krieken JHJM, Droese J, Gonzalez D, Bastard C, White HE, Spaargaren M, Gonzalez M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003;17:2257–2317.
12. Pession A, Masetti R, Rizzari C, Putti MC, Casale F, Fagioli F, Luciani M, Lo Nigro L, Menna G, Micalizzi C, Santoro N, Testi AM, Zecca M, Biondi A, Pigazzi M, Rutella S, Rondelli R, Basso G, Locatelli F. Results of the AIEOP AML 2002/01 multicenter prospective trial for the treatment of children with acute myeloid leukemia. *Blood* 2013;122:170–178.
13. Cesaro S, De Filippi P, Di Meglio A, Leszl A, Donska S, Zaccaron A, Cagioni C, Galavotti R, Danesino C, Aprilì F, Cugno C, Te Kronnie G, Zecca M, Bresolin S. Different outcomes of allogeneic hematopoietic stem cell transplant in a pair of twins affected by juvenile myelomonocytic leukemia. *Int J Hematol* 2014;99:208–212.
14. Van Vlierbergh P, Ferrando A. The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest* 2012;122:3398–3406.
15. Mullighan CG, Phillips LA, Su X, Ma J, Miller CB, Shurtleff SA, Downing JR. Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science* 2008;322:1377–1380.
16. Tzoneva G, Perez-Garcia A, Carpenter Z, Khiabanian H, Tosello V, Allegretta M, Paietta E, Racevskis J, Rowe JM, Tallman MS, Paganin M, Basso G, Hof J, Kirschner-Schwabe R, Palomero T, Rabadan R, Ferrando A. Activating mutations in the NT5C2 nucleotidase gene drive chemotherapy resistance in relapsed ALL. *Nat Med* 2013;19:368–371.
17. Van Vlierbergh P, Van Grotel M, Tchinda J, Lee C, Beverloo HB, Van Der Spek PJ, Stubbs A, Cools J, Nagata K, Fornerod M, Buijs-Gladdines J, Horstmann M, Van Wering ER, Soulier J, Pieters R, Meijerink JPP. The recurrent SET-NUP214 fusion as a new HOXA activation mechanism in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2008;111:4668–4680.
18. Weerkamp F, Baert MRM, Brugman MH, Dik WA, De Haas EFE, Visser TP, De Groot CJM, Wagemaker G, Van Dongen JJM, Staal FJT. Human thymus contains multipotent progenitors with T/B lymphoid, myeloid, and erythroid lineage potential. *Blood* 2006;107:3131–3137.

Di seguito allego un progetto a cui ho partecipato e attualmente in fase di sottomissione a Leukemia.

Phosphoproteomic analysis reveals hyperactivation of mTOR/STAT3 and LCK/Calcineurin axes in pediatric Early T-cell Precursor ALL

Letter to the Editor

Early T-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia (ETP-ALL), first described in 2009, accounts for about the 10-15% of T-ALL in children.¹ Normal ETP cells, also known as double negative 1 (DN1), the most primitive progenitor T-cells in the thymus, retain the ability to differentiate in both T lymphocytes and myeloid cells but not in B lymphocytes.² ETP-ALL blasts display unique immunophenotype features with lack of T-lineage markers CD1a and CD8, weak or absent CD5, and expression of at least one myeloid or hematopoietic stem cell marker such as CD13, CD33, CD34, CD11b, CD65, HLADR or CD117.¹ This disease was initially associated with a very poor prognosis,^{1,3} but recent studies report that with intensified protocols, as indicated after a poor early response to induction treatment, the ETP-ALL outcome is not significantly worse than in the other T-ALL subtypes.^{4,5,6} The consolidation phase IB of contemporary AIEOP-BFM protocols, based on cyclophosphamide, 6-mercaptopurine and conventional doses of Ara-C, was effective in clearing disease in most patients,⁶ supporting the hypothesis that ETP-ALL patients might benefit from some elements of acute myeloid leukemia therapy, as suggested by the similarity to acute myeloid leukemia stem cell subtype gene expression profiling.^{2,6} Whole-genome sequencing studies revealed that ETP-ALL patients often display recurrent activating mutations targeting genes involved in the regulation of cytokine receptors and RAS signaling, inactivating lesions of genes implicated in hematopoietic development, and mutations affecting epigenetic regulation.² On the other hand, although hyperactivation of the JAK/STAT pathway was observed^{2,7,8} with particular high levels of phospho-STAT1, phospho-STAT3 and phospho-STAT5, proteomic aberrancies of ETP-ALL cells are still poorly understood.

To address this question, we analyzed bone marrow aspirates of 78 AIEOP (Italian Association of Pediatric Hematology and Oncology) T-ALL patients at diagnosis (16 ETP-ALL and 62 other T-

ALLs of which 22 Early-T, 31 Thymic, 9 Mature T-ALL, diagnosed in the period September 2009 – April 2014) through Reverse Phase Protein Arrays (RPPA). RPPA analysis was performed as previously described,⁹ and the activation and/or expression of 49 different proteins was studied (**Supplementary Table S1**) with a particular focus on AKT/mTOR, JAK/STAT, RAS/MAPK and TCR signaling pathways. Statistical analyses were performed using Prism (GraphPad Software, Inc) and identification of differentially activated or expressed proteins in ETP-ALL patients was obtained through Mann-Whitney test. The activation status of selected pathways was evaluated through Global test analysis¹⁰ performed with R (www.r-project.org).

This latter analysis revealed that the AKT/mTOR and the JAK/STAT pathways are hyperactivated in ETP-ALL compared to both the whole cohort of analyzed T-ALL (**Figure 1a**) and the subgroup of Early-T ALL only, not ETP (**Figure 1b**). Besides, ETP-ALL patients showed also the RAS/MAPK pathway more activated when compared to the Early-T ALL subgroup (**Figure 1b**). This comprehensive analysis well supports the RAS/MAPK and JAK/STAT signaling deregulation reported by other groups.^{2,7,8} Moreover, in ETP-ALL patients we also found the hyperactivation of the RAS/MAPK pathway members B-RAF, the main ERK activator, phosphorylated in S445 (**Figure 1c**) and ERK1/2 phosphorylated in T202/Y204 (**Figure 1d**), while their total forms do not differ between patients groups (**Supplementary Figure S1a and b**). Somatic mutations in the *NRAS* and *FLT3* genes were detected respectively in 3 and 5 of the 16 ETP patients (**Supplementary Table S2**), a result which correlates very well with the observed hyperactivation of downstream signaling in the same patients. However, somewhat unexpectedly, we also found a similar hyperactivation in non mutated patients. Importantly, no differences were observed between *FLT3* mutated and non mutated patients at the level of AKT/mTOR signaling. Although this may be due to the limited number of patients analyzed, these data allow to hypothesize that the high signaling observed in ETP-ALL has grounds other than the solely somatic mutations, in keeping with the observation that the AKT/mTOR hyperactivation is neither ascribable to the presence of *PTEN* mutations, and that the JAK/STAT pathway hyperactivation cannot be associated to somatic mutations in *IL7R*, *JAK1* or *JAK3* genes (**Supplementary Table S2**).

A striking finding, then, concerned the SRC family non-receptor tyrosine kinase LCK, which resulted dramatically underexpressed in ETP-ALL respect to non-ETP T-ALL or just Early-T ALL only cases (**Figure 2a**). This is in accordance with *LCK* mRNA downregulation observed in ETP-ALL patients by Zhang *et al.*² However, activated LCK (measured through SRC Y416) normalized on total LCK clearly indicated that LCK activity is significantly higher in ETP-ALL patients (**Figure 2b** and **Supplementary Figure S1c**). A well known function of LCK is to trigger, upon TCR engagement, the release of Ca^{2+} from the endoplasmic reticulum, which in turn activates the calcium- and calmodulin-activated serine/threonine phosphatase Calcineurin. We therefore analyzed the expression of this phosphatase in the same patients, and found that Calcineurin A is indeed overexpressed in ETP-ALL patients, in good agreement with LCK activity (**Figure 2c**). Among Calcineurin substrates are the NFAT transcription factors, which upon dephosphorylation redistribute to the nucleus and modulate the expression of target genes involved in the pathogenesis of cancer and in many aspects of the immune response. All together, these findings are particularly interesting as the activation of the Calcineurin-NFAT pathway was already demonstrated to be crucial for the maintenance of the T-cell leukemic phenotype *in vivo*,¹¹ and suggest that in ETP-ALL the upregulation of the LCK/Calcineurin pathway contributes to leukemogenesis.

mTOR signaling was also investigated. Remarkably, while expression of total mTOR protein did not differ between patients groups (**Supplementary Figure S1d**), we noticed a dramatic increase of mTOR phosphorylation at S2448 in ETP-ALL patients (**Figure 2d**). Cellular mTOR can form two distinct complexes, called mTORC1 and mTORC2, which display substrate specificity. Phosphorylation at S2448 is known to be a marker of mTORC1, rather than mTORC2, integrity/activity.¹² mTORC1 keeps tight control of initiation of translation, protein synthesis and cell cycle progression through its specific target, the Ribosomal Protein S6 kinase (p70 S6K). Consistently with the above result, p70 S6K was also found hyperphosphorylated, and therefore activated, at the mTORC1 site T389 in ETP-ALL patients (**Figure 2e**). In turn, phosphorylation by p70 S6K of the 40S ribosomal protein S6 at S235/236 was boosted in ETP-ALL patients (**Figure 2f**). Since p70 S6K has been identified as the mTOR S2448 kinase, it is tempting to speculate that

in ETP-ALL patients a permanent circuit is at work, where p70 S6K may mediate phosphorylation of mTOR at S2448 once it has been activated by mTOR phosphorylation at T389 in a possible feedback loop.

In keeping with the observed constitutive activation of mTOR signaling is also the striking phosphorylation of STAT3 at two well known mTOR phosphorylation sites, namely S727 (**Figure 2g**) and, to a lesser extent, S705 (**Supplementary Figure S1e**), whereas total STAT3 protein level was unaffected (**Supplementary Figure S1f**). Interestingly, mTOR-driven phosphorylation of STAT3 at both sites has been reported in human cancer cells and monocytes,¹³ and has been claimed to promote viability and maintenance of cancer stem cells while counteracting differentiation.^{14,15} It is therefore conceivable that mTOR and STAT3 work in tandem to maintain a markedly undifferentiated phenotype of ETP-ALL patient cells, while sustaining cell proliferation and survival.

In conclusion, our study demonstrates that ETP-ALL patients display a peculiar proteomic activation pattern which differs from that of the other pediatric T-ALL patients. Indeed, not only we confirmed that the JAK/STAT and the RAS/MAPK signaling pathways are upregulated, but we also demonstrated for the first time that the LCK/Calcineurin and the AKT/mTOR axes are boosted. In particular, the hyperactivation of LCK triggers the Calcineurin/NFAT-mediated transcription which is critical for T cell leukemogenesis. Moreover, the hyperactivation of mTOR, probably not a consequence of *FLT3* mutations but of an aberrant feedback loop through p70 S6K, increases STAT3 phosphorylation which in turn promotes cancer cells viability and inhibition of differentiation. The abnormal signaling activation observed in ETP-ALL will be extremely helpful to elucidate the mechanism behind the poor response to induction treatment of these patients, and might also suggest new druggable targets for personalized and less toxic therapies (i.e. mTOR or STAT3 inhibitors).

Authors: Valentina Serafin¹, Valentina Lissandron¹, Barbara Buldini¹, Silvia Bresolin¹, Maddalena Paganin¹, Francesca Grillo¹, Nellina Andriano^{2#}, Giovanni Cazzaniga², Sandra Marmioli³, Valentino Conter⁴, Giuseppe Basso¹, Benedetta Accordi¹

¹Department of Woman's and Child's Health, University of Padova, Padova, Italy; ²Centro Ricerca Tettamanti, University of Milano-Bicocca, Ospedale San Gerardo, Monza, Italy; ³Department of Surgery, Medicine, Dentistry and Morphology, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy; ⁴ Center of Hemato-Oncology, Fondazione MBBM, University of Milano-Bicocca, Ospedale San Gerardo, Monza, Italy.

[#]present address: Department of Pediatric Hemato-Oncology, Azienda Policlinico-Ospedale Vittorio Emanuele, Catania, Italy.

Corresponding author: Benedetta Accordi, Department of Woman's and Child's Health, University of Padova, via Giustiniani 3, 35128 Padova, Italy. Phone: +39-049-8215485. E-mail: benedetta.accordi@unipd.it;

Acknowledgments: This work was supported by grants from Fondazione CARIPARO-Istituto di Ricerca Pediatrica Città della Speranza (n.13/05); V.S. is supported by a fellowship from Fondazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (n.16616).

Author contributions: V.S., V.L. and B.A. conceived the experiments; V.S. and V.L. performed experiments; V.S. and B.A. analyzed the data; B.A. and S.B. performed statistical analyses; B.B. provided patients data and classification; M.P., F.G., N.A. and G.C. performed mutational screening; B.A., V.S., V.C. and S.M. interpreted data; B.A. and S.M. wrote the manuscript; V.C., G.B. and B.A. supervised the research.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Supplementary information is available at *Leukemia's* website.

References

1. Coustan-Smith E, Mullighan CG, Onciu M, Behm FG, Raimondi SC, Pei D *et al.* Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol* 2009; **10**: 147-156.
2. Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, Wu G, Heatley SL, Payne-Turner D *et al.* The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2012; **481**: 157-163.
3. Ma M, Wang X, Tang J, Xue H, Chen J, Pan C *et al.* Early T-cell precursor leukemia: a subtype of high risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *Front Med* 2012; **6**: 416-420.
4. Patrick K, Wade R, Goulden N, Mitchell C, Moorman AV, Rowntree C *et al.* Outcome for children and young people with Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia treated on a contemporary protocol, UKALL 2003. *Br J Haematol* 2014; **166**: 421-424.
5. Wood BL, Winter SS, Dunsmore KP, Devidas M, Chen S, Asselin B *et al.* T-lymphoblastic leukemia (T-ALL) shows excellent outcome, lack of significance of the early thymic precursor (ETP) immunophenotype, and validation of the prognostic value of end-induction minimal residual disease (MRD) in Children's Oncology Group (COG) Study AALL0434. *ASH Annu Mtg Abstr.* 2014; **124**: 1.
6. Conter V, Valsecchi MG, Buldini B, Parasole R, Locatelli F, Colombini A *et al.* Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in children treated in AIEOP centres with AIEOP-BFM protocols: a retrospective analysis. *Lancet Haematol* 2016 ; **3**: e80-6.
7. Maude SL, Dolai S, Delgado-Martin C, Vincent T, Robbins A, Selvanathan A *et al.* Efficacy of JAK/STAT pathway inhibition in murine xenograft models of early T-cell precursor (ETP) acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2015; **125**: 1759-1767.
8. Goossens S, Radaelli E, Blanchet O, Durinck K, Van der Meulen J, Peirs S *et al.* ZEB2 drives immature T-cell lymphoblastic leukaemia development via enhanced tumour-initiating potential and IL-7 receptor signalling. *Nat Commun* 2015; **6**: 5794.
9. Milani G, Rebora P, Accordi B, Galla L, Bresolin S, Cazzaniga G *et al.* Low PKC α expression within the MRD-HR stratum defines a new subgroup of childhood T-ALL with very poor outcome. *Oncotarget* 2014; **5**: 5234-5245.

10. Goeman JJ, van de Geer SA, de Kort F, van Houwelingen HC. A global test for groups of genes: testing association with a clinical outcome. *Bioinformatics* 2004; **20**: 93-9.
11. Medyouf H, Alcalde H, Berthier C, Guillemin MC, dos Santos NR, Janin A *et al.* Targeting calcineurin activation as a therapeutic strategy for T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* 2007; **13**: 736-741.
12. Copp J, Manning G, Hunter T. TORC-specific phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR): phospho-Ser2481 is a marker for intact mTOR signaling complex 2. *Cancer Res* 2009; **69**:1821-7.
13. Ren W, Yin J, Duan J, Liu G, Tan B, Yang G *et al.* mTORC1 signaling and IL-17 expression: Defining pathways and possible therapeutic targets. *Eur J Immunol* 2016; **46**: 291-299.
14. Zhou J, Wulfschlegel J, Zhang H, Gu P, Yang Y, Deng J *et al.* Activation of the PTEN/mTOR/STAT3 pathway in breast cancer stem-like cells is required for viability and maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**: 16158-16163.
15. Ma J, Meng Y, Kwiatkowski DJ, Chen X, Peng H, Sun Q *et al.* Mammalian target of rapamycin regulates murine and human cell differentiation through STAT3/p63/Jagged/Notch cascade. *J Clin Invest* 2010; **120**: 103-114.

Figure Legends

Figure 1. Global analysis of pathway activation in ETP-ALL patients. **(a-b)** Heatmaps showing the activation status of the indicated signalling pathways in ETP-ALL vs T-ALL patients (a) or vs Early-T ALL patients only (b). Activation status of these pathways was evaluated by Global Test analysis which revealed that the AKT/mTOR ($p=0.005$) and the JAK/STAT ($p=0.01$) pathways are differentially activated in ETP-ALL compared with other T-ALL, and that the AKT/mTOR ($p=0.004$), the JAK/STAT ($p=0.004$) and the RAS/MAPK ($p=0.0008$) pathways are differentially activated in ETP-ALL compared with “Early-T ALL only” cases..

RAS/MAPK proteins in ETP-ALL patients. **(c)** B-RAF is hyperactivated at S445 in ETP-ALL patients (mean 26730 ± 1363) compared to the other T-ALL (mean 20770 ± 1291) ($p=0.008$) and Early-T ALL only (mean 19060 ± 1710) ($p=0.004$). **(d)** ERK1/2 is hyperactivated at T202/Y204 in ETP-ALL patients (mean 6702 ± 787.3) compared to the other T-ALL (mean 4177 ± 326.3) ($p=0.003$) and Early-T ALL only (mean 3637 ± 374.1) ($p=0.002$).

Figure 2. Protein expression/activation in ETP-ALL patients vs T-ALL and Early T-ALL only. **(a)** LCK is downregulated in ETP-ALL patients ($n=16$, mean 26260 ± 2418) compared to the other T-ALL ($n=62$, mean 47340 ± 2309) ($p<0.0001$) and Early-T ALL only ($n=22$, mean 41430 ± 3681) ($p=0.002$). Values are expressed in Arbitrary units \pm SEM. **(b)** The SRC Y416/LCK ratio is higher in ETP-ALL patients (mean 0.55 ± 0.09) compared to the other T-ALL (mean 0.37 ± 0.03) ($p=0.01$) and Early T-ALL only (mean 0.31 ± 0.04) ($p=0.005$). **(c)** Calcineurin A is overexpressed in ETP-ALL patients (mean 72280 ± 6486) compared to the other T-ALL (mean 49210 ± 2762) ($p=0.005$) and Early-T ALL only (mean 48290 ± 4776) ($p=0.002$). **(d)** mTOR is hyperphosphorylated at S2448 in ETP-ALL patients (mean 37320 ± 2512) compared to the other T-ALL (mean 29240 ± 1188) ($p=0.009$) and Early-T ALL only (mean 27690 ± 1594) ($p=0.005$). **(e)** p70 S6K is hyperactivated at T389 in ETP-ALL patients (mean 2799 ± 217.2) compared to the other T-ALL (mean 1949 ± 96.9) ($p=0.0005$) and Early-T ALL only (mean 1775 ± 120.7) ($p=0.0003$). **(f)** S6 Ribosomal Protein is hyperactivated at S235/236 in ETP-ALL patients (mean 2595 ± 275.3) compared to the other T-ALL (mean 1799 ± 143.6) ($p=0.004$) and Early-T ALL only (mean 1607 ± 196.4) ($p=0.003$). **(g)**

STAT3 is hyperactivated at S727 in ETP-ALL patients (mean 17790 ± 1570) compared to the other T-ALL (mean 10620 ± 761.1) ($p < 0.0001$) and Early-T ALL only (mean 9555 ± 776.8) ($p < 0.0001$).

Figure 1.

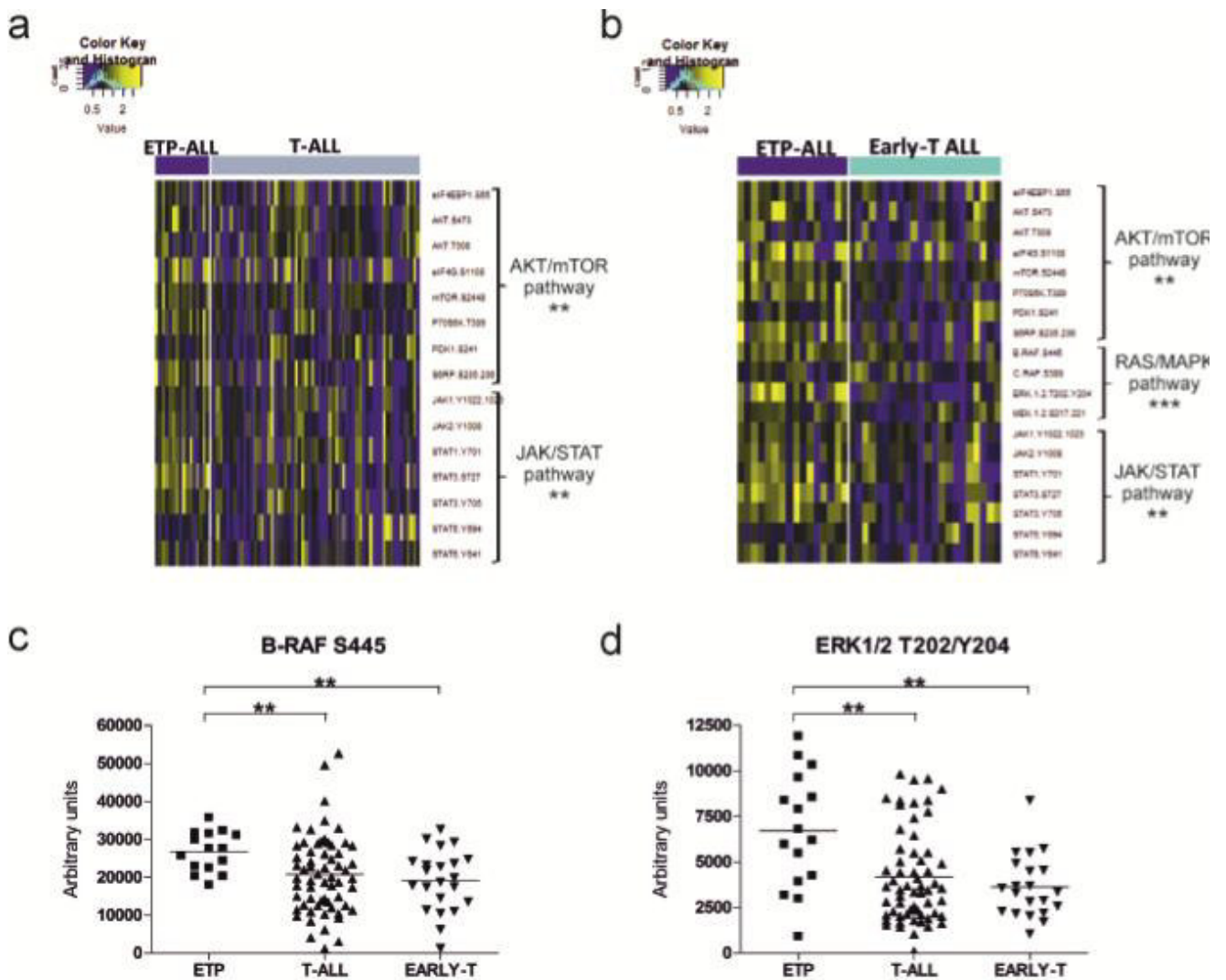
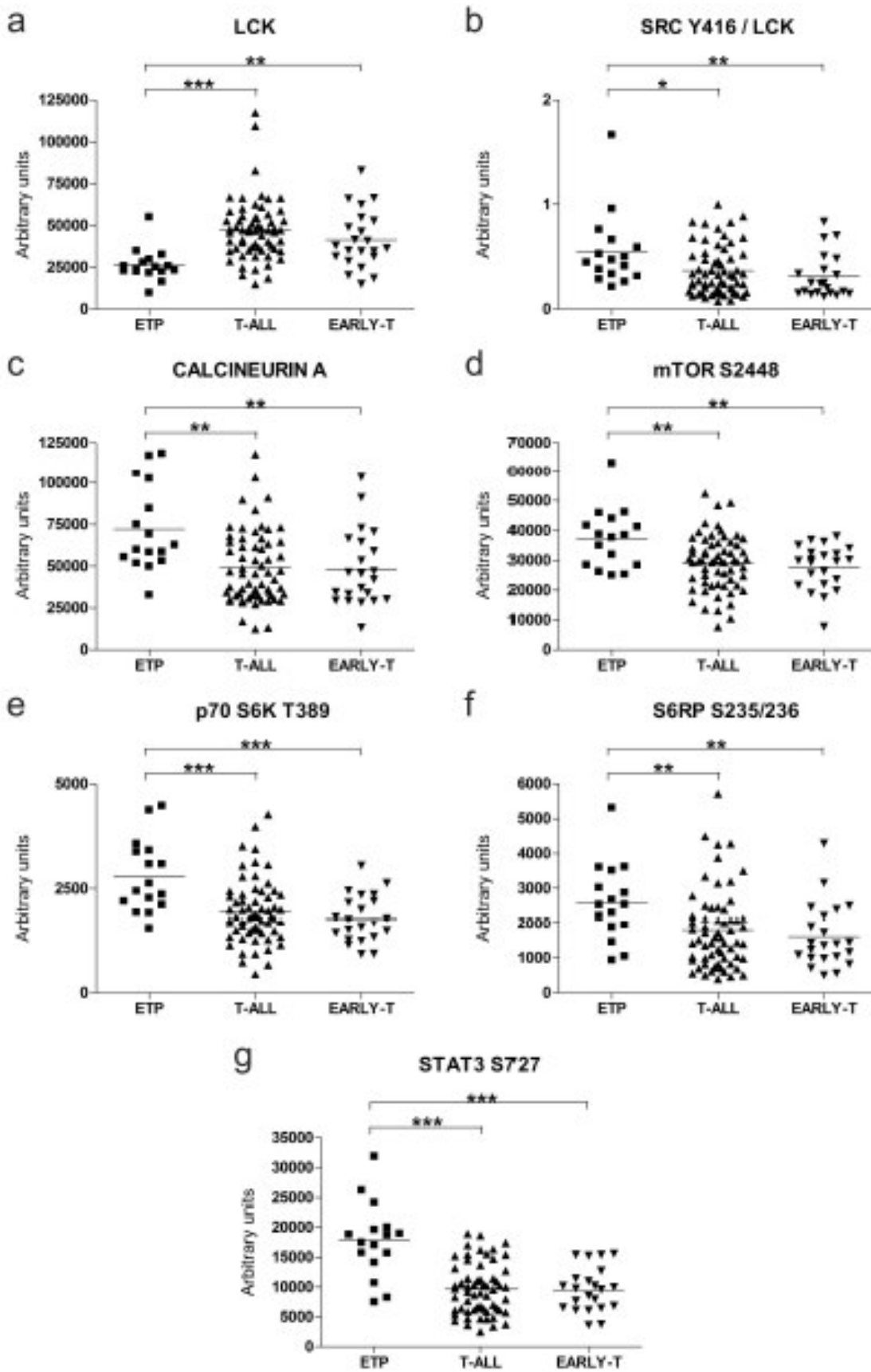


Figure 2.



SUPPLEMENTARY INFORMATION

Table S1. Primary antibodies for RPPA staining.

Each antibody was previously validated for single band specificity by Western Blot. Proteins to be analyzed in this study were chosen because belonging to the AKT/mTOR, JAK/STAT, RAS/MAPK and T-Cell Receptor signalling pathways, or based on data in the literature concerning NOTCH1¹ and miRNA expression² in ETP-ALL.

<i>Antibody</i>	<i>Company</i>
AKT	R&D Systems
AKT S473	Abcam
AKT T308	Cell Signaling Technology
BETA CATENIN ACTIVE	Millipore
Pan-CALCINEURIN A	Cell Signaling Technology
c-KIT Y703	Zymed Laboratories
CSK	Cell Signaling Technology
eIF4EBP1 S65	Abcam
eIF4G S1108	Cell Signaling Technology
ERK1/2	Millipore
ERK1/2 T202/Y204	Cell Signaling Technology
FADD S194	Cell Signaling Technology
FKBP5	GeneTex
FOS B	Cell Signaling Technology
FOXO 3A S318/321	Cell Signaling Technology
GRB2	Cell Signaling Technology
IL-17RA	Abcam
INTEGRIN β 1	Cell Signaling Technology
IRS-1 S612	Cell Signaling Technology
JAK1 Y1022/1023	Cell Signaling Technology
JAK2 Y1008	Cell Signaling Technology
LCK	Cell Signaling Technology
LCK Y505	Cell Signaling Technology
MEK1/2	Cell Signaling Technology
MEK1/2 S217/221	Cell Signaling Technology
mTOR	Cell Signaling Technology
mTOR S2448	Cell Signaling Technology
NOTCH1 Cleaved V1744	Cell Signaling Technology
p21	Cell Signaling Technology
p38 MAPK T180/Y182	Cell Signaling Technology
p70 S6 T389	Cell Signaling Technology
PDGFR β Y751	Cell Signaling Technology
PDK1 S241	Cell Signaling Technology
PI3K P85 Y467	GeneTex
PTEN S380	Cell Signaling Technology
B-RAF	Millipore
B-RAF S445	Cell Signaling Technology
C-RAF S338	Cell Signaling Technology
PAN RAS	Millipore
RASA1 Y460	GeneTex

S6 Ribosomal Protein S235/236	Cell Signaling Technology
SRC Y416	Cell Signaling Technology
STAT1 Y701	Cell Signaling Technology
STAT3	Cell Signaling Technology
STAT3 S727	Cell Signaling Technology
STAT3 Y705	Cell Signaling Technology
STAT5 Y694	Cell Signaling Technology
STAT6 Y641	Millipore
ZAP70 Y319	Millipore

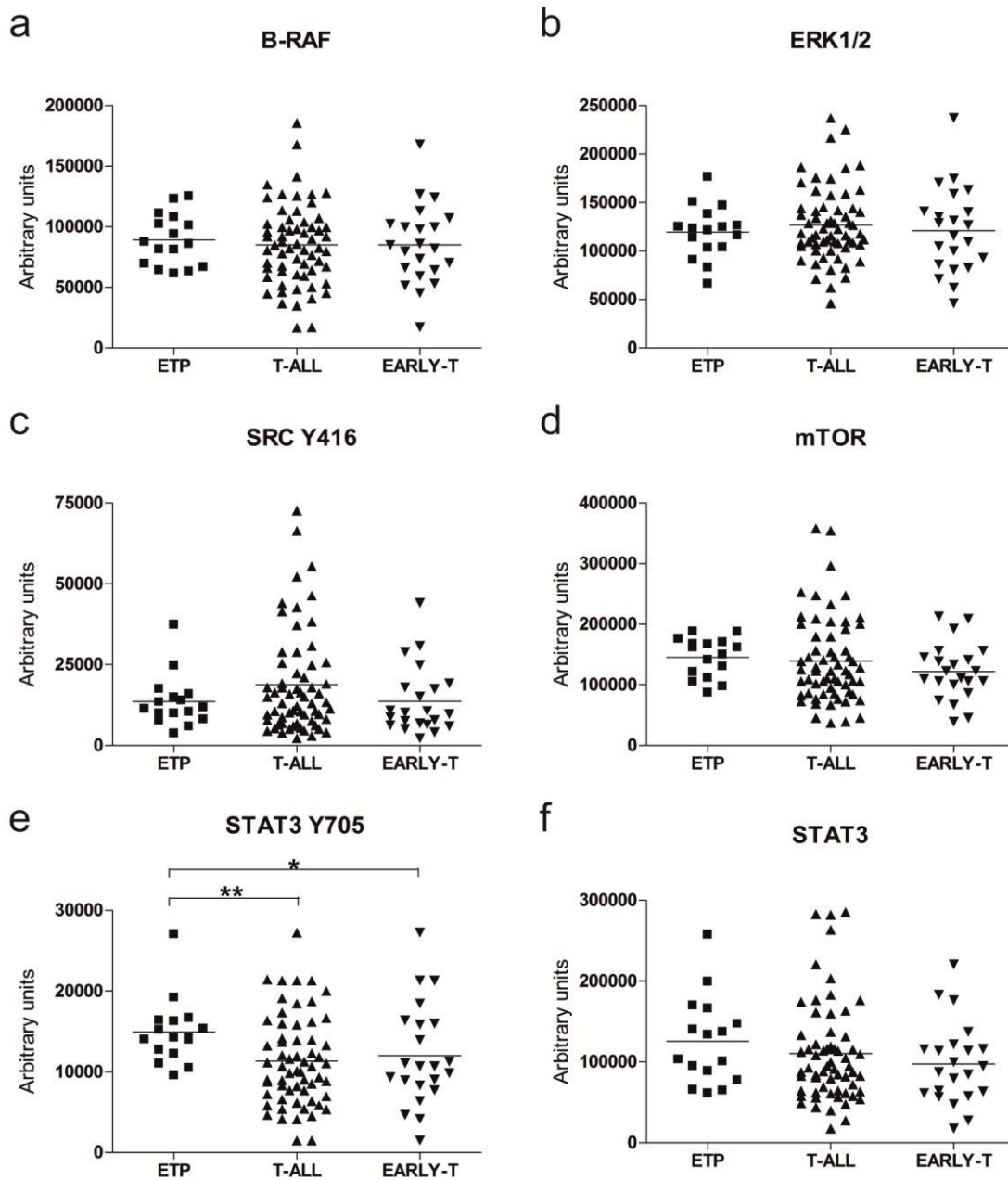


Figure S1. Expression/activation of other proteins in ETP-ALL patients vs T-ALL and Early T-ALL only. (a) The total form of B-RAF is equally expressed between ETP-ALL patients (mean 89210 ± 5281) and the other T-ALL (mean 85050 ± 4219) or Early-T ALL only (mean 85110 ± 6976). (b) The total form of ERK1/2 is equally expressed in ETP-ALL patients (mean 119500 ± 6758) compared to the other T-ALL (mean 126700 ± 4820) and Early-T ALL only (mean 120900 ± 9383). (c) SRC phosphorylated at Y416 is commonly assimilated to activated LCK for which reliable antibodies are not available. We observed that SRC activated at Y416 is not different between ETP-ALL patients (mean 13570 ± 2021) and the other T-ALL (mean 18740 ± 2026) or Early-T ALL only (mean 13670 ± 2230). (d) The total form of mTOR is equally expressed in ETP-ALL patients (mean 145500 ± 8158) compared to the other T-ALL (mean 139600 ± 8960) and Early-T ALL only (mean 121900 ± 9895). (e) STAT3 is more activated at Y705 in ETP-ALL patients (mean 14920 ± 1022) compared to the other T-ALL (mean 11300 ± 709.6) ($p=0.006$) and Early-T ALL only (mean 11990 ± 1337) ($p=0.05$). (f) The expression of the total form of STAT3 is not different between ETP-ALL patients (mean 125600 ± 13620) and the other T-ALL (mean 110300 ± 7877) or Early-T ALL only (mean 97330 ± 10740).

Table S2. Mutational screening of ETP-ALL patients.

Mutations in *BRAF* (ENST00000288602, exon11 and 15), *NRAS* (ENST00000369535, exon2 and 3), *KRAS* (ENST00000311936, exon2 and 3), *IL7R* (ENST00000303115, exon6), *JAK1* (ENST00000342505, exon12,13,14,15,16,17,18,19), *JAK3* (ENST00000458235, exon11) and *PTEN* (ENST00000371953, exon7) were detected by DNA Sanger sequencing. Internal tandem duplications of the *FLT3* gene (*FLT3*-ITD) were screened on diagnostic DNA by standard PCR analysis, as previously described.³ After analysis on agarose gel, PCR aberrant bands suggestive for *FLT3*-ITD were sequenced for validation.

	<i>BRAF</i>	<i>NRAS</i>	<i>KRAS</i>	<i>FLT3</i>	<i>IL7R</i>	<i>JAK1</i>	<i>JAK3</i>	<i>PTEN</i>
ETP-1	WT	WT	WT	mutated	WT	WT	WT	WT
ETP-2	WT	WT	WT	mutated	WT	WT	WT	WT
ETP-3	WT	mutated	WT	WT	WT	WT	WT	WT
ETP-4	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
ETP-5	WT	WT	WT	mutated	WT	WT	WT	WT
ETP-6	WT	WT	WT	mutated	WT	WT	WT	WT
ETP-7	WT	mutated	WT	WT	WT	WT	WT	WT
ETP-8	WT	mutated	WT	WT	WT	WT	WT*	WT
ETP-9	WT	WT	WT	WT	WT	WT	mutated	WT
ETP-10	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT*	WT
ETP-11	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
ETP-12	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
ETP-13	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT*	WT
ETP-14	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
ETP-15	ND	ND	ND	mutated	ND	ND	ND	ND
ETP-16	ND	ND	ND	WT	ND	ND	ND	ND

WT= wild type

ND= No Data

*= No data on Exon 14

Supplementary References

1. Neumann M, Heesch S, Gökbuget N, Schwartz S, Schlee C, Benlasfer O *et al.* Clinical and molecular characterization of early T-cell precursor leukemia: a high-risk subgroup in adult T-ALL with a high frequency of FLT3 mutations. *Blood Cancer J* 2012; **2**: e55.
2. Coskun E, Neumann M, Schlee C, Liebertz F, Heesch S, Goekbuget N *et al.* MicroRNA profiling reveals aberrant microRNA expression in adult ETP-ALL and functional studies implicate a role for miR-222 in acute leukemia. *Leuk Res* 2013; **37**: 647-56.
3. Arrigoni P, Beretta C, Silvestri D, Rossi V, Rizzari C, Valsecchi MG *et al.* FLT3 internal tandem duplication in childhood acute myeloid leukaemia: association with hyperleucocytosis in acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2003; **120**: 89-92.

RINGRAZIAMENTI

Innanzitutto vorrei ringraziare i miei genitori per aver creduto in me e per avermi sostenuto in tutte le scelte più importanti della mia vita.

Grazie alle mie sorelle Alice e Valeria per esserci sempre.

Un immenso grazie alla persona più importante nella mia vita, Giuseppe, che da 13 anni mi sopporta, mi consiglia, mi coccola, mi consola e mi fa sorridere anche nei momenti più tristi.

Grazie alla mia Zietta Patrizia e a Sara ed Elia che con il loro entusiasmo rallegrano la nostra famiglia.

Ringrazio il Prof. Basso per avermi dato l'opportunità di conoscere persone meravigliose che mi hanno trasmesso un pò del loro Sapere.

Grazie, quindi, a tutto il laboratorio di Oncoematologia di Padova per gli insegnamenti ricevuti, per la disponibilità e per avermi aiutato, in particolare a Maddalena, Beppe, Valeria, Elena, Sanja, Claudia.

Un grazie di cuore a tutti coloro che mi stanno vicino in questo periodo della mia vita.