

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO - BICOCCA

Dipartimento di Medicina e Chirurgia

Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Mediche



Musashi-2: un potenziale nuovo target terapeutico per la Leucemia Linfoblastica Acuta infantile MLL-riarrangiata

Relatore: Prof. Giovanni Cazzaniga

Correlatore: Dott.ssa Michela Bardini

Tesi di laurea di:

Simona Procopio

Matricola n. 873581

Anno accademico 2021-2022

Indice	
Riassunto	1
Abstract	2
Introduzione	3
Leucemia linfoblastica acuta infantile MLL-riarrangiata	3
Il gene MLL: riarrangiamento e meccanismo di leucemogenesi	4
Approcci terapeutici	6
Resistenza ai glucocorticoidi	8
L'RNA-binding protein Musashi-2	10
Struttura e funzione di Musashi	11
Musashi-2 nell'ematopoiesi	12
MSI2: un potenziale marcatore e <i>target</i> terapeutico nelle leucemie	13
Scopo della tesi	16
Materiali e metodi	17
Colture cellulari <i>in vitro</i>	17
Conta cellulare	17
Congelamento e scongelamento delle cellule	17
Microscopia confocale	18
Analisi della risposta ai farmaci	18
Trattamenti farmacologici <i>in vitro</i>	18
Analisi della vitalità cellulare	19
Analisi dell'apoptosi cellulare	19
Esperimenti <i>in vivo</i>	20
Xenotrapianto di cellule leucemiche	20
Trattamenti <i>in vivo</i>	21
Aspirati midollari	21
Prelievo di organi e processamento delle cellule leucemiche	21
Analisi dell' <i>engraftment</i>	22
Analisi statistica	22
Risultati e Discussione	23
Risultati preliminari: MSI2 nella leucemia linfoblastica acuta infantile MLL-r	23
L'inibizione farmacologica di MSI2 sensibilizza le cellule di LLA MLL-r all'azione dei GC <i>in vitro</i> ed <i>ex vivo</i> e il trattamento in combinazione ha effetto sinergico	26
L'abrogazione di MSI2 rende le cellule LLA MLL-r più vulnerabili a perturbazioni metaboliche	30

L'attività mitocondriale delle cellule MSI2 KO è alterata	32
Efficacia del co-trattamento con inibitori <i>Oxphos</i> e GC <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	35
Ro 08-2750 ha un effetto sinergico in combinazione con Venetoclax	40
Il triplo trattamento con Ro 08-2750, Venetoclax e Desametasone eradica le cellule di LLA MLL-r <i>in vitro</i> ed <i>ex vivo</i>	42
Conclusione	44
Bibliografia	45

Riassunto

La leucemia linfoblastica acuta a cellule B (LLA-B) è il tumore più diffuso in età pediatrica. Seppur raramente essa può manifestarsi in pazienti sotto l'anno di età (*Infant*). L'80% dei pazienti *infant* presentano il riarrangiamento del gene MLL (MLL-r). Se da un lato ad oggi quasi il 90% dei bambini con LLA-B guarisce, la prognosi degli *infant* con LLA MLL-r è spesso infausta (solo il 20% sopravvive) e perciò questi pazienti sono classificati come "high risk". La refrattarietà alle convenzionali terapie e l'alto rischio di ricaduta di malattia sono le principali cause del fallimento degli attuali protocolli clinici. Pertanto, è necessario identificare nuovi *target* terapeutici che ci consentano di implementare valide alternative terapeutiche per questo sottogruppo di pazienti.

Il mio progetto di tesi si è focalizzato sullo studio del ruolo funzionale dell'RNA *binding protein* Musashi-2 (MSI2) nella LLA infantile MLL-r. È noto l'importante ruolo che questo gene svolge sia nei tumori solidi che nelle malattie maligne del sangue (come la leucemia mieloide acuta, la linfoblastica cronica, e il linfoma a cellule B), mentre ad oggi non ci sono dati relativi alla LLA.

Il nostro studio fornisce chiare evidenze del ruolo cruciale di MSI2 nella LLA infantile MLL-r e propone Musashi-2 come nuovo potenziale *target* terapeutico. L'ablazione del gene (tramite *editing* genomico CRISPR/CAS9) in un modello cellulare *in vitro* o l'inibizione farmacologica di MSI2 (tramite l'utilizzo dell'inibitore Ro 08-2750) sia sulle linee cellulari *in vitro* che sui blasti primari *ex vivo* sensibilizza le cellule all'azione dei Glucocorticoidi.

Inoltre, abbiamo osservato che il trattamento con Ro 08-2750 ha un potente effetto sinergico anche in combinazione con l'inibitore di BCL-2 Venetoclax e il triplo trattamento con Ro 08-2750, Venetoclax e Desametasone eradica la malattia sia *in vitro* che *ex vivo*. Il nostro studio mette anche in luce un nuovo possibile ruolo di MSI2 nel metabolismo energetico (in particolare nella respirazione mitocondriale) delle cellule di LLA MLL-r. Il metabolismo mitocondriale sostiene la plasticità metabolica ed è coinvolto nella resistenza ai farmaci, ma rappresenta anche una potenziale vulnerabilità per la cellula leucemica. I nostri risultati dimostrano infatti che bersagliare l'attività mitocondriale (tramite l'uso di inibitori Oxphos) ha un potente effetto anti-leucemico in combinazione con il Desametasone, sia *in vitro* che *in vivo*.

In conclusione, i risultati prodotti dal nostro studio gettano le basi per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche per bersagliare la malattia e che potrebbero in futuro essere traslate in clinica per il trattamento dei pazienti *infant* con LLA MLL-r, al fine di migliorare la prognosi e l'aspettativa di vita di questi giovani pazienti.

Abstract

B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL) is the most common cancer in children. In some rare cases BCP-ALL occur in infant patients younger than one year. In 80% of those cases, infant ALL patients carry the 11q23 translocation involving the MLL gene (MLL-r). In contrast to other paediatric ALL occurring in older children (who nowadays have an event-free survival (EFS) of almost 90%), infants with MLL-r ALL suffer from a poor outcome and a dismal prognosis (with an EFS of 20%) and therefore classified as “high risk” patients. The resistance to conventional therapies and the high incidence of relapse represent indeed the main causes for the failure of current clinical protocols. Therefore, the identification of novel therapeutic targets is urgently needed, for the development of more effective targeted therapies for this subgroup of patients.

The project in which I was involved during my thesis was focused on unravelling the functional role of the RNA binding protein Musashi-2 (MSI2) in MLL-r infant ALL. The crucial involvement of MSI2 in both solid tumors and hematologic diseases (such as acute myeloid leukemia, chronic lymphoblastic leukemia and B cell lymphoma) is well known; however, its function in MLL-r infant ALL was not characterized yet.

Our study provides clear evidences of the crucial role of MSI2 in MLL-r infant ALL, and proposes Musashi-2 as a novel biomarkers and druggable therapeutic target. MSI2 ablation (through CRISPR/CAS9 genomic editing) in a human cell line model or its pharmacological inhibition (through the use of Ro 08-2750 small molecule inhibitor) both in cell lines *in vitro* as well as in patients-derived primary blasts *ex vivo* were shown to sensitize MLL-r infant ALL cells to Glucocorticoids.

In addition, we observed that treatment with Ro 08-2750 acts synergistically also in combination with the BCL-2 inhibitor Venetoclax and the triple combination with Ro 08-2750, Venetoclax and Dexamethasone eradicates the disease both *in vitro* and *ex vivo*. Our results also shed light onto the involvement of MSI2 in the regulation of the bioenergetic metabolism (especially mitochondrial respiration) of MLL-r infant ALL. Mitochondrial metabolism sustains the metabolic plasticity of leukemia and is involved in drug resistance, but also it may represent a targetable vulnerability for leukemic cells. Our results show indeed that targeting the mitochondrial activity (with Oxphos inhibitors) has a strong anti-leukemic effect in combination with Dexamethasone and eradicates the disease both *in vitro* and *in vivo*.

In conclusion, our study paves the way for the future development of novel therapeutic strategies potentially translatable to the clinic for the treatment of infant patients with MLL-r ALL, in order to improve the clinical outcome and the life expectancy of these young patients.

Introduzione

Leucemia linfoblastica acuta infantile MLL-riarrangiata

Le leucemie sono un gruppo eterogeneo di neoplasie del sangue, derivanti dalla proliferazione clonale e incontrollata di cellule ematopoietiche bloccate ad uno stadio precoce del differenziamento e per questo incapaci di dare origine a cellule mature. Dal midollo osseo le cellule leucemiche possono poi riversarsi nel flusso sanguigno e invadere i tessuti extra midollari quali meningi, gonadi, timo, fegato, milza e linfonodi ¹.

La leucemia linfoblastica acuta (LLA) è il tumore più comune in età pediatrica. Rappresenta il 75% di tutti i casi di leucemia, con un picco di incidenza tra l'1 e i 4 anni di età. A seconda delle caratteristiche della cellula leucemica, la malattia viene classificata come leucemia linfoblastica acuta (LLA): da precursori delle cellule B (PCB), a cellule T, a cellule B mature. I quali rappresentano rispettivamente l'80%, il 15% e il 5% dei casi ². Il tasso di sopravvivenza a 5 anni dei bambini affetti da LLA-PCB è di gran lunga migliorato negli ultimi decenni, grazie al miglioramento delle terapie, fino a raggiungere oggi l'85%. Tuttavia, una prognosi particolarmente infausta si registra tutt'oggi per i pazienti *infant* ovvero quei pazienti con età inferiore ad 1 anno alla diagnosi, dove il tasso di sopravvivenza libera da malattia a 5 anni rimane ancora inferiore al 40% (**Fig. 1A**). Sebbene si tratti di una forma di leucemia piuttosto rara (90 nuovi casi all'anno negli Stati Uniti, mentre in Italia circa 10-12) i pazienti *infant*, se paragonati ai bambini più grandi, presentano delle caratteristiche cliniche e biologiche molto più aggressive tra cui: un elevato numero di globuli bianchi, epato-splenomegalia, metastasi al sistema nervoso centrale e la presenza di infiltrati leucocitari neoplastici a livello cutaneo (*leucemia cutis*). Curiosamente, le femmine sembrano avere un rischio maggiore di sviluppare questo tipo di leucemia rispetto ai maschi, ma questa tendenza si inverte una volta compiuto l'anno di età ³. Anche se i meccanismi patogenetici che portano all'insorgenza della malattia non sono ancora completamente noti, le anomalie genetiche rappresentano senza dubbio uno dei segni distintivi. Tra queste, le traslocazioni cromosomiche bilanciate sono quelle più frequenti, nello specifico si tratta di scambi di materiale genetico tra due cromosomi non omologhi da cui si generano geni di fusione codificanti per oncoproteine. La causa genetica più comune (80% dei casi) della leucemia infantile è la traslocazione cromosomica bilanciata del gene MLL (*mixed lineage leukemia*) sul cromosoma 11q23, anche conosciuto come KMT2A (*histone-lysine N-methyltransferase 2A*). I pazienti *infant* con riarrangiamento del gene MLL (MLL-r) sono noti per essere resistenti alla chemioterapia convenzionale e per avere un alto tasso di ricaduta, con una prognosi spesso sfavorevole, motivo per cui vengono definiti "ad alto rischio" ⁴. Gli *infant* presentano inoltre un particolare immunofenotipo

mielo/linfoide per cui i blasti leucemici esprimono l'antigene CD19 (pan-B leucocitario), presentano un fenotipo immaturo poiché non esprimono l'antigene CD10 e contemporaneamente presentano antigeni tipici della linea mieloide come il CD13, CD15, CD33 e CD65. Il "fenotipo misto" (*mixed lineage*) rappresenta una delle principali peculiarità della LLA *infant* MLL-r, da cui deriva l'acronimo del gene coinvolto nella traslocazione. Inoltre, si pensa che la LLA infantile abbia origine da un precursore ematopoietico immaturo che ritiene il potenziale di differenziamento per entrambi i *lineage* linfoide o mieloide. Quello che talvolta si osserva, infatti, è che i pazienti possono andare incontro a *lineage switch* durante il decorso della malattia (ad esempio nel caso in cui la malattia si presenti come LLA alla diagnosi, ma alla successiva ricaduta mostra un fenotipo mieloide) ⁵.

Diverse sono le evidenze scientifiche a suggerire che la malattia ha origine prenatale in utero. Gli studi retrospettivi eseguiti sui campioni di sangue neonatale (*Guthrie cards*) hanno dimostrato la presenza del clone leucemico già alla nascita, inoltre, studi condotti sui gemelli monocorionici che in età neonatale hanno sviluppato la LLA infantile hanno rilevato la presenza dello stesso identico *breakpoint* genomico nel gene MLL. Si pensa dunque che il riarrangiamento cromosomico avvenga in una cellula staminale di un gemello, poi la progenie di cellule trasformate che ne deriva si diffonda all'altro gemello tramite la circolazione placentare. Inoltre, il tasso di concordanza (ovvero la contemporaneità temporale di insorgenza della malattia) nei gemelli *infant* è quasi del 100%, mentre nei gemelli monocorionici in cui la LLA pediatrica insorge dopo l'anno, la concordanza è solo del 10%. Quindi, è altamente probabile che il classico modello della *two hits hypothesis*, secondo cui per la manifestazione conclamata della malattia serve un primo *hit* seguito da un (o molteplici) secondo *hit*, non sia valido per la LLA infantile poiché un singolo *hit*, ovvero il solo riarrangiamento di MLL, sembrerebbe essere di *per se* sufficiente ad indurre una rapida manifestazione clinica della malattia senza la necessità che ulteriori eventi genetici aggiuntivi si accumulino in un secondo momento ⁶. A supporto di questa ipotesi, le mutazioni addizionali nei pazienti *infant* con LLA MLL-r sono di fatto più rare rispetto a quelle riscontrate nei pazienti pediatrici ⁷⁻⁹.

Il gene MLL: riarrangiamento e meccanismo di leucemogenesi

Il gene MLL appartiene alla famiglia delle proteine *Trirhorax Group* (Trx-G) ed è un ortologo funzionale del gene *Drosophila melanogaster trithorax* (trx). Esso è localizzato sul braccio lungo (q) del cromosoma 11q23.3, dove codifica per una istone lisina N-metiltransferasi coinvolta nella modifica e rimodellamento della cromatina ed è espresso nelle cellule ematopoietiche in modo ubiquitario, inclusi i progenitori ematopoietici e le cellule staminali ¹⁰. MLL, tramite la sua attività di regolatore epigenetico (*epigenetic writer*), regola positivamente l'espressione di diversi geni *target* tra cui i geni HOX, ovvero fattori di trascrizione altamente conservati e coinvolti nello sviluppo di

molteplici tessuti compreso il sistema ematopoietico. Quando il gene MLL è riarrangiato si osservano un'alterata espressione dei geni HOX e difetti nell'ematopoiesi embrionale con riduzione sia della proliferazione che della sopravvivenza dei progenitori ematopoietici ¹¹.

Diverse sono le lesioni genomiche in cui è coinvolto il gene MLL, tra queste le più frequenti nei pazienti leucemici sono le traslocazioni cromosomiche bilanciate, più raramente si osservano duplicazioni in tandem, delezioni o amplificazioni. Ad oggi sono state descritte più di 135 fusioni del gene MLL, tra queste le più frequenti (riscontrate nel 92% dei casi in pazienti con LLA infantile) sono: t(4;11)(q21;q23)/KMT2A-AFF1 [MLL::AF4], t(9;11)(p22;q23)/KMT2A-MLLT3 [MLL::AF9] e t(11;19)(q23;p13.1)/ KMT2A-MLLT1 [MLL::ENL] ¹². Si pensa che l'insorgenza della LLA infantile MLL-r sia riconducibile ad un meccanismo di tipo epigenetico, poiché le fusioni di MLL (in virtù dell'alterata attività di regolazione della cromatina del gene KMT2A) sono responsabili dell'attivazione di un programma di espressione genica alterato che la rendono una vera e propria oncoproteina attiva. Infatti, in conseguenza della traslocazione genica l'estremità N-terminale di MLL si fonde con l'estremità C-terminale del gene partner di traslocazione; quindi, il gene di fusione perde il dominio funzionale KMT2A con attività metil-transferasica (che risiede al C-terminale del gene), ma guadagna i domini funzionali posti al C-terminale del gene partner che prende parte alla fusione (es AF4, AF9, AF10 e ENL). Tali geni partner sono fattori trascrizionali, i quali si legano ad altri regolatori epigenetici come DOT1L o BRD4 e al cofattore MENIN formando un complesso multiproteico (*MLL complex*) alterato (**Fig. 1B**). Ad esempio, il reclutamento aberrante di DOT1L, una H3K79 istone metil-transferasi, è responsabile del mantenimento della conformazione aperta e trascrizionalmente attiva della cromatina (detta eucromatina, a differenza della forma condensata detta eterocromatina), accessibile all'apparato di trascrizione, che determina l'overespressione dei geni chiave coinvolti nel processo di trasformazione leucemica ¹³.

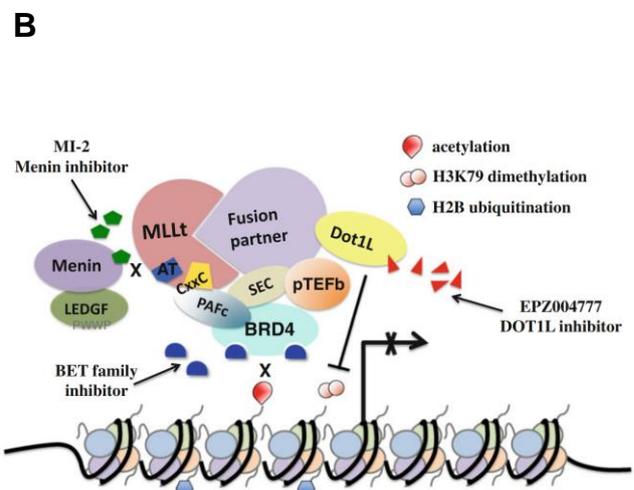
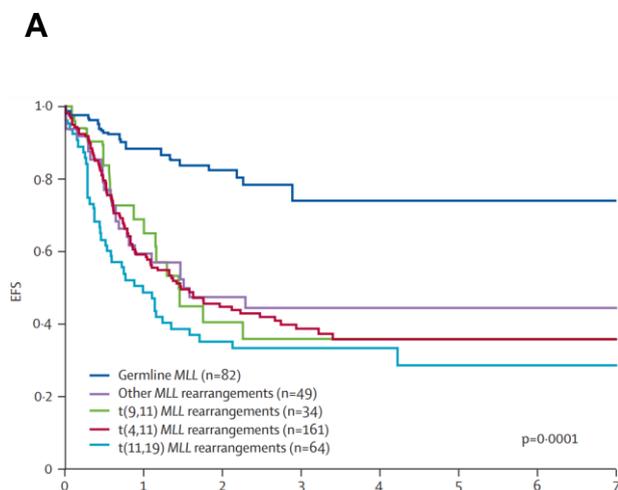


Figura 1. LLA *infant* MLL-r: caratteristiche cliniche e biologiche

(A) *Outcome* clinico (EFS: *event free survival*) dei pazienti affetti da leucemia linfoblastica acuta con riarrangiamento di MLL (Pieters R. et al, *Lancet*, 2007). (B) Complesso proteico del gene di fusione MLL (*MLL complex*) aberrante che si forma a seguito della fusione con il gene partner di traslocazione (Zhang Y., *Int J Hematol*, 2012).

Approcci terapeutici

Trattandosi di un sottotipo di leucemia altamente aggressiva, la LLA *infant* MLL-r rappresenta oggi una delle forme più difficile da curare. Vista la rarità della malattia, la collaborazione internazionale risulta fondamentale, per questo attualmente tre sono i gruppi in tutto il mondo a condurre studi clinici specifici per la LLA *infant*: Interfant (Europa), Children's Oncology Group (COG, Nord America), e il Japan Children's Cancer Group (JCCG). Il gruppo europeo, *Interfant*, classifica come “*high-risk*” i pazienti affetti da LLA con riarrangiamento di MLL che presentano età compresa tra 6 e 12 mesi e conta dei globuli bianchi $\geq 300000/\mu\text{L}$ alla diagnosi. La scarsa risposta dei pazienti al prednisone somministrato in monoterapia per 7 giorni (numero di blasti $> 1000/\mu\text{L}$ nel sangue periferico al giorno 8 dopo l'inizio del trattamento) era considerata nel primo protocollo *Interfant-99* un ulteriore indicatore prognostico sfavorevole. Nella maggior parte dei pazienti *infant* (90%) la fase iniziale di induzione della terapia consente di ottenere una remissione completa della malattia, che tuttavia è transiente e non duratura. Infatti, nella fase di post-induzione in due terzi dei casi la malattia riemerge (4-5 mesi dopo la remissione precoce) rivelandosi nella maggior parte dei casi fatale¹⁴. Data l'ipotesi che la LLA *infant* derivi da un precursore ematopoietico precoce con la possibilità di shiftare verso la linea mieloide, i protocolli *Interfant-06* e *-99* hanno valutato l'efficacia di un regime terapeutico “ibrido” che combina il protocollo standard per la leucemia linfoblastica acuta a farmaci in uso nel trattamento per la leucemia mieloide acuta¹⁵. Nonostante la messa a punto di specifici protocolli clinici dedicati ai pazienti sotto l'anno di vita, l'*outcome* non ha visto significativi miglioramenti. Per questo motivo, dopo il completamento dell'ultimo protocollo *Interfant-06*, a partire dal 2017 gli *infant* sono attualmente arruolati nel protocollo clinico internazionale AIEOP/I-BFM 2017, insieme agli altri pazienti pediatrici affetti da LLA-PCB, ma sono classificati nel gruppo ad alto rischio a causa della presenza del riarrangiamento del gene MLL. (AIEOP-BFM ALL 2017, www.clinicaltrialsregister.eu EudraCT 2016-001935-12). Dal 2023 è iniziato il nuovo protocollo clinico *Interfant-21*, e in futuro (a partire dal 2024, a completamento dell'attuale protocollo AIEOP 2017) anche i pazienti *infant* italiani verranno arruolati in questo nuovo trial, che prevede l'introduzione dell'immunoterapia, in associazione alla terapia standard utilizzata nei protocolli *Interfant* precedenti.

L'immunoterapia prevede l'uso di anticorpi monoclonali (mAbs) o di cellule T ingegnerizzate che esprimono sulla loro superficie un Chimeric Antigen Receptor (CAR-T) diretto verso un antigene tumorale (come, ad esempio, l'antigene pan-B linfocitario CD19). Tale approccio si pone attualmente come una valida alternativa terapeutica per i pazienti LLA ad alto rischio. Il gruppo *Interfant* ha avviato una sperimentazione pilota volta a valutare la sicurezza e l'efficacia del Blinatumomab in combinazione con il protocollo terapeutico adottato nell'*Interfant-06*. Il Blinatumomab è un anticorpo bi-specifico capace di riconoscere sia l'antigene CD19 sulla cellula tumorale che l'antigene CD3 sulla cellula T; quindi, agisce bersagliando direttamente i blasti leucemici e dirigendo la risposta del sistema immunitario contro la leucemia stessa. Dal momento che nei pazienti *infant* MLL-r sono stati ottenuti risultati molto promettenti (con un incremento dell'EFS a 1 anno fino al 90% rispetto al 54,8% dell'*Interfant-06*), il Blinatumomab sarà inserito nel *backbone* della terapia combinata linfo-mieloide del protocollo *Interfant-21* ¹⁶.

In futuro è auspicabile arrivare a identificare un approccio di terapia personalizzata, specifica per i pazienti *infant* affetti da LLA MLL-r. Alcuni geni chiave nel processo di leucemogenesi di MLL sono stati oggetto di specifici studi preclinici e clinici, volti a validare l'importanza di questi potenziali *target* tumorali e valutare l'efficacia terapeutica di specifici farmaci inibitori. Ad esempio, nel *trial* clinico COG AALL0631 americano è stato valutato se l'uso dell'inibitore della tirosina chinasi FLT3 (*Lestaurinib*), in combinazione alla chemioterapia, migliorasse la *EFS* (*event free survival*). Il gene FLT3 è overespresso nella LLA infantile MLL-r ed è associato a prognosi infausta ¹⁴. Tuttavia, è stato osservato che i pazienti *infant* non hanno tratto alcun beneficio da questi protocolli terapeutici e la sopravvivenza di questi ultimi rimane da anni un plateau. Poiché il meccanismo di leucemogenesi sembra essere legato ad un'aberrante regolazione epigenetica del complesso di fusione *MLL*, diverse molecole ad azione epigenetica hanno dimostrato attività antileucemica *in vitro* e *in vivo*. Nello specifico questi farmaci epigenetici fungono da agenti inibitori delle varie proteine che compongono il complesso MLL-r, quali ad esempio: l'inibitore di DOT1L (EPZ-5676), l'inibitore di BRD4 (I-BET-151), gli inibitori di HDAC (Panobinostat e Romidepsin), o i farmaci inibitori del co-fattore trascrizionale MENIN (SNDX-5613 o KO-539). Alcuni dei farmaci menzionati sono già in fase clinica di sperimentazione e/o già approvati dagli enti regolatori del farmaco (FDA o EMA) e rappresentano pertanto promettenti strategie terapeutiche ¹⁷. Il riarrangiamento di MLL induce inoltre l'overespressione di BCL-2 nelle cellule di LLA attraverso la metilazione H3K79 mediata da DOT1L ¹⁸. Pertanto, l'inibizione di BCL-2, tramite il farmaco BH3 mimetico Venetoclax (ABT-199) ha mostrato una potente attività *in vitro* e *in vivo*, sinergizzando con la chemioterapia di induzione standard. Per questo motivo, il Venetoclax è stato introdotto nel *backbone* della terapia classica

dell'*Interfant*, nel nuovo trial clinico americano AALL2123 per gli *infant* affetti da leucemia linfoblastica acuta MLL-r.

Resistenza ai glucocorticoidi

I pazienti *infant* sono tipicamente resistenti ai farmaci Glucocorticoidi (GC) ¹⁹, e tale resistenza rappresenta oggi uno dei principali ostacoli da affrontare. I glucocorticoidi naturali, o corticosteroidi, sono ormoni steroidei derivati dal colesterolo e secreti dalle ghiandole surrenali. Diversi sono i processi biologici in cui i GC sono coinvolti, tra cui: la risposta immunitaria, il metabolismo, la crescita cellulare, lo sviluppo e la riproduzione. Dato la loro attività antinfiammatoria e immunosoppressiva, esiste oggi un'ampia classe di glucocorticoidi sintetici utilizzati nel trattamento delle infezioni, nelle malattie autoimmuni e nella prima fase (induzione) della terapia antileucemica. La maggior parte degli effetti (fisiologici o terapeutici) dei GC sono mediati dal recettore dei glucocorticoidi (GR), un fattore di trascrizione appartenente alla superfamiglia dei recettori nucleari ligando-dipendenti. Il GR è localizzato nel citoplasma associato ad un complesso multiproteico. A seguito del legame con il ligando, il complesso GC/GR si attiva andando incontro ad un cambio conformazionale e trasloca nel nucleo, dove interagisce con il DNA tramite il legame ai *glucocorticoid response elements* (GREs), localizzate nel *promoter* dei geni *target*. Il legame del complesso GC/GR ai GRE determina un aumento o una riduzione della trascrizione genica dei *target* ²⁰.

L'effetto terapeutico dei glucocorticoidi si articola in due step: un iniziale arresto del ciclo cellulare in G1 ²¹, che dura circa 24 ore e la successiva induzione della morte cellulare programmata. In particolare, i GC agiscono attraverso la via apoptotica intrinseca mitocondriale, inducendo la morte cellulare programmata attraverso l'attivazione di membri pro-apoptotici della famiglia Bcl-2 (come Bim, Bid e Bad) e/o viceversa inducendo la repressione di membri anti-apoptotici (come Bcl-2, Mcl-1 e Bcl-xL) ²². È stato visto, inoltre, che il primo step di arresto della crescita coinvolge la regolazione di geni fondamentali nella sopravvivenza cellulare, come il fattore di trascrizione (proto-oncogene) c-MYC e la chinasi ciclina-dipendente CDK4 responsabile della progressione del ciclo cellulare ²¹.

Il Desametasone e il Metilprednisolone, due glucocorticoidi di sintesi derivanti dal cortisolo, hanno di fatto un ruolo fondamentale all'interno degli attuali regimi chemioterapici per le leucemie linfoblastiche acute e attualmente non possono essere esclusi o sostituiti. Ad oggi non si conoscono a pieno i meccanismi molecolari alla base della resistenza ai GC, ma è probabile che diversi fattori possano contribuire, come: un'espressione alterata delle isoforme o dei livelli di espressione del GR, mutazioni geniche del GR, disregolazione delle proteine pro o anti-apoptotiche implicate nella via

apoptotica mitocondriale, o interazioni alterate con altre proteine chinasi ²³. Ad esempio, nel contesto della LLA infantile MLL-r, è stato osservato che la resistenza ai glucocorticoidi si associa ad un'overespressione di MCL-1 (membro anti-apoptotico della famiglia Bcl2). La downregolazione di MCL-1 reverte, anche se non in modo completo, la resistenza ai GC rendendo le cellule più sensibili al trattamento ²⁴.

L'esposizione ai GC ha anche effetti sul metabolismo cellulare. Il trattamento con Desametasone, in tutte le linee cellulari di LLA e nei blasti leucemici primari, provoca una significativa inibizione della glicolisi. Questa è dovuta alla riduzione dell'espressione del trasportatore del glucosio GLUT1 che determina un ridotto assorbimento del glucosio, a cui consegue una significativa inibizione della via glicolitica. La down-regolazione di GLUT1 da parte dei GC non sembra essere un effetto diretto, ma è mediato dal fattore di trascrizione c-MYC che a sua volta modula l'espressione dei trasportatori del glucosio. Per ovviare all'inibizione della glicolisi, che rappresenta di fatto una delle principali vie metaboliche per produrre energia, la cellula mette in atto delle "strategie di compensazione", incrementando la fosforilazione ossidativa (OXPHOS) tramite l'attività mitocondriale accoppiata al ciclo di Krebs per la produzione di ATP ²⁵. Questo "effetto Pasteur" assicura alla cellula di mantenere la produzione di ATP necessaria per poter sopravvivere, e potrebbe essere un possibile meccanismo di resistenza.

Alcuni importanti studi hanno indagato in dettaglio la resistenza ai GC nella LLA infantile MLL-r, per far luce sugli aspetti molecolari e trascrizionali. Mousavian et al. hanno intrapreso un approccio innovativo integrando la strategia di *differential co-expression* con la *protein-protein interaction* al fine di valutare la correlazione tra la resistenza ai GC nei pazienti *infant* e l'attivazione di specifici "moduli" proteici. Quattro moduli distinti, implicati nella resistenza ai GC sono stati identificati: il complesso del proteasoma, la catena di trasporto degli elettroni (ovvero l'attività Oxphos, respirazione mitocondriale), il perossisoma e la biosintesi degli amminoacil t-RNA. Tra i geni arricchiti vi sono: diverse subunità del complesso I (NADH:ubiquinone) della catena di trasporto degli elettroni, in particolar modo la subunità NDUFA9; e altri geni coinvolti nella fosforilazione ossidativa. Questi dati avvalorano con l'ipotesi secondo cui l'upregolazione della fosforilazione ossidativa è associata alla resistenza ai GC. Inoltre, è altamente probabile che la sottopopolazione di cloni leucemici refrattari alla terapia sia direttamente responsabile dell'insorgenza delle recidive. In un recente studio del gruppo di Ronald Stam gli autori hanno messo a punto un modello di previsione di ricaduta basato su un approccio di *RNA-sequencing* a singola cellula. Questo ha permesso di discriminare le cellule sensibili da quelle resistenti alla terapia (che presumibilmente daranno origine alla ricaduta). Queste ultime in particolare, oltre ad essere risultate più piccole e quiescenti, mostrano

uno specifico profilo di espressione genica: rispondono solo parzialmente ai GC e mostrano un'elevata capacità di sopravvivenza grazie alla modulazione di proteine anti-apoptotiche (MCL-1) e di marcatori di staminalità (CD44 ed EPC1) per mantenere il potenziale replicativo ²⁶.

Ulteriori studi funzionali sono fondamentali per comprendere a fondo i meccanismi molecolari alla base della resistenza ai GC in modo da poter individuare strategie di intervento efficaci per migliorare la prognosi dei pazienti affetti da LLA infantile MLL-r. Nel campo dell'onco-ematologia pediatrica, la prognosi della leucemia infantile MLL-r è una delle più drammatiche. La *event free survival* (EFS) è di circa il 36% e purtroppo negli anni non è cambiata, nonostante la messa a punto di protocolli dedicati. Gli approcci terapeutici standard applicati fino ad oggi sono risultati fallimentari a causa dell'elevato tasso di recidive e di mortalità. Di fatto oggi non esiste ancora una terapia mirata (*personalized targeted therapy*) per questi piccoli pazienti. Vista la complessità biologica che caratterizza la leucemia infantile MLL-r, è necessario comprenderne a fondo i meccanismi patogenetici e identificare nuovi *target* specifici e potenzialmente bersagliabili per sviluppare nuove strategie terapeutiche. Inoltre, la messa a punto di *screening* farmacologici potrà identificare nuovi farmaci potenzialmente applicabili alla clinica, per fornire alternative terapeutiche più efficaci per questi piccoli pazienti.

L'RNA-binding protein Musashi-2

Le proteine che legano l'RNA (dette *RNA-binding proteins* - RBPs) svolgono un ruolo importante nel controllo dell'espressione genica a livello post-trascrizionale. Le RBPs sono in grado di riconoscere e legare gli mRNA *target* in corrispondenza di sequenze di riconoscimento specifiche, tramite i loro domini funzionali di *RNA-binding* detti *RNA-recognition Motif* (RRM). Molte di esse sono note oggi per essere espresse in modo aberrante in un'ampia varietà di tumori. Nel 1994 lo scienziato Nakamura scoprì il gene *Musashi* (MSI) ²⁷, una RBP coinvolta nello sviluppo neuronale, in particolare nella regolazione della divisione asimmetrica delle cellule neuronali precursori degli organi sensoriali della *Drosophila*. Normalmente queste cellule si dividono generando un precursore non neuronale (da cui originano bulbo e setola) e un precursore neuronale propriamente detto (il quale dà origine a neuroni e glia). Tuttavia, se il gene MSI è mutato si sviluppa un particolare fenotipo dell'organo sensoriale definito "a doppia setola" (*double shafted bristles*) ²⁸. Il nome del gene fu ispirato proprio da questo particolare fenotipo, che ricordava il famoso e iconico samurai giapponese Miyamoto Musashi che combatteva con due spade.

Struttura e funzione di Musashi

Il gene MSI è altamente conservato tra le specie. Nell'uomo esistono due geni paraloghi: Musashi-1 (MSI1) e Musashi-2 (MSI2), i quali condividono il 75% della sequenza amminoacidica²⁹. MSI1 è localizzato sul cromosoma 12q24.31, mentre MSI2 è localizzato sul cromosoma 17q22. Dalla trascrizione di MSI2 originano 4 mRNA corrispondenti a 4 isoforme proteiche: MSI2a, MSI2b, MSI2c ed MSI2d. All'estremità N-terminale si trovano i due domini funzionali di RNA-binding (RRM1 e RRM2) separati da una *short linker region* (**Fig. 2A**). RRM1 è responsabile dell'affinità e della specificità del legame all'mRNA *target*, mentre RRM2 ha principalmente una funzione di supporto. MSI2 lega l'estremità 3' non tradotta (3'-UTR) degli mRNA *target* interagendo principalmente con le sequenze di riconoscimento ACCUUUUAGAA, poli-U oppure UAG³⁰. Oltre agli RRM sono presenti delle sequenze di localizzazione nucleare (NLS) responsabili del transito della proteina dal citoplasma al nucleo. Musashi è infatti principalmente localizzato nel citoplasma, ma a volte lo si trova anche nel nucleo. Inoltre, un recente lavoro riporta che MSI2 è espresso a bassi livelli anche nel mitocondrio delle cellule endoteliali e che la distribuzione del gene tra il compartimento citoplasmatico e mitocondriale è influenzata dall'accumulo di radicali liberi dell'ossigeno in conseguenza a stress ossidativo indotto dall'esposizione ad acqua ossigenata³¹.

Poiché gli RRM di MSI1 e MSI2 presentano un'elevata omologia di sequenza, gli mRNA *target* riconosciuti e legati sono perlopiù i medesimi. Entrambi MSI1 e MSI2 possono agire sia da repressori che da promotori della traduzione degli mRNA *target* (**Fig. 2B**). All'estremità C-terminale di MSI1 e adiacente al RRM2, è presente un dominio di interazione con la *poly(A)-binding protein* (PABP); quando MSI1 lega PABP il legame da parte del fattore di inizio della trascrizione (eIF4G) è impedito; quindi, la traduzione degli mRNA *target* non può avvenire²⁸. Alcuni studi hanno dimostrato che diversi regolatori del ciclo cellulare come Numb e p21 (inibitore della chinasi ciclina-dipendente) sono *target* di MSI1 il quale agisce regolandone negativamente la traduzione³². Al contrario due membri della famiglia della poly(A)-binding protein, PABC1 e ePABP interagiscono con MSI1 per promuovere l'inizio della traduzione dei *target*³⁰. Inoltre, la *poly-A polymerase Germline Development 2* (GLD2) è capace di interagire con l'estremità C-terminale di MSI1 stabilizzando gli mRNA *target* e promuovendo il processo di traduzione. MSI1 è coinvolto anche nella maturazione dei micro-RNA (miRNA o miR), attraverso il legame con LIN-28 che ne inibisce il processamento. Rispetto a MSI1, MSI2 non possiede i domini regolatori PABP e il dominio di legame a LIN-28 al C-terminale (**Fig. 2A**). L'attività regolatoria post-trascrizionale (positiva o negativa) da parte di MSI2 dipende da diversi fattori, tra cui: l'isoforma proteica, lo stato di fosforilazione e il contesto cellulare. Li et al. hanno infatti dimostrato che l'overespressione di MSI2a in cellule di cancro al seno triplo

negativo è capace di inibire la transizione epitelio-mesenchimale, mentre l'isoforma MSI2b sembra non avere alcun effetto sulla progressione della malattia³³. Msi2 possiede un importante sito di regolazione posto al C-terminale dell'isoforma canonica (*full length*), la cui fosforilazione ne modula l'attività. Si tratta di una fosforilazione sito-specifica che avviene su residui di serina: S356 e S381 e necessita delle chinasi *Ringo/CDK e* della via di segnale delle MAP chinasi. Solo nella forma fosforilata, MSI2 viene convertito in un attivatore della traduzione degli mRNA *target*³⁴.

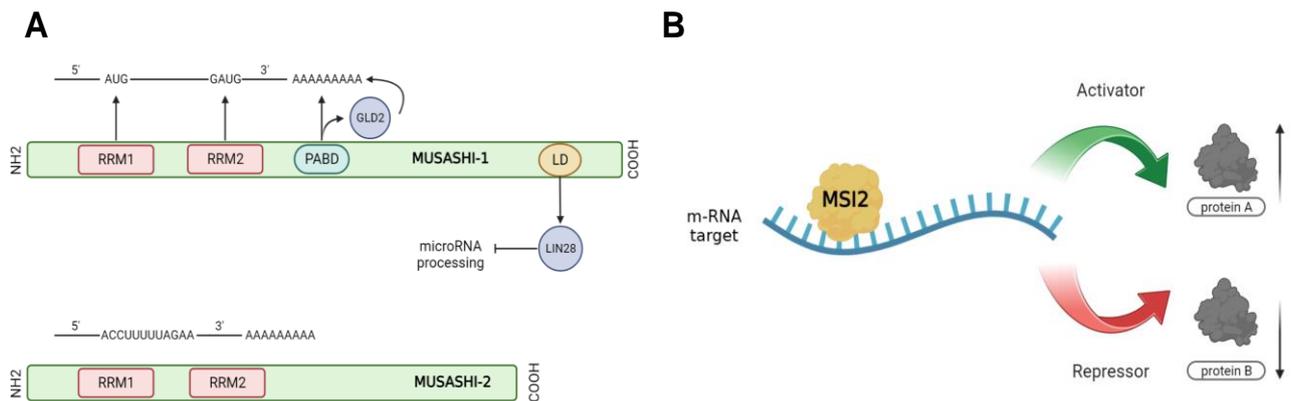


Figura 2. Struttura e funzione dell'RNA-binding protein Musashi

(A) Rappresentazione schematica della struttura di Musashi-1 e Musashi-2 (modificata da *Kudinov A., Clinical Cancer Research, 2017*) (B) Attività funzionale post-trascrizionale di MSI2: può funzionare sia come attivatore sia come repressore della traduzione degli m-RNA *target*.

Musashi-2 nell'ematopoiesi

Le RBPs stanno oggi emergendo come importanti regolatori di molteplici processi biologici cellulari associati alla trasformazione neoplastica come l'insorgenza, la progressione e la prognosi della malattia, la resistenza ai farmaci e la capacità di disseminazione delle cellule tumorali (metastasi)³⁵. Il sistema ematopoietico esprime in modo prevalente MSI2 (mentre MSI1 non è espresso), in particolare sono le cellule staminali ematopoietiche long-term (LT-HSCs), short-term (ST-HSCs) e i progenitori multipotenti (MPPs) ad esprimerlo a livelli più elevati. Nelle cellule del sistema ematopoietico normale l'espressione di MSI2 è inversamente proporzionale allo stato di maturazione: è elevato nelle cellule staminali ematopoietiche e nei precursori immaturi, per poi diminuire durante il progressivo differenziamento nelle cellule mature del sangue²⁸. Nel sistema ematopoietico MSI2 svolge una funzione cruciale nel regolare la proliferazione, il differenziamento e la capacità di autorinnovamento (*self-renewal*) delle HSCs. L'ablazione del gene MSI2 comporta infatti una

riduzione delle cellule progenitrici ematopoietiche (ST-HSC e MPPs) con possibili conseguenze anche sul numero di progenitori mieloidi e linfoidi e di cellule mature ³².

MSI2: un potenziale marcatore e *target* terapeutico nelle leucemie

I primi dati a mettere in luce una possibile correlazione tra Musashi e il cancro risalgono al 2001, quando diversi gruppi osservarono un'overespressione di MSI1 in diversi tipi di tumori solidi, tra cui il glioblastoma, il tumore al colon-retto e polmonare ²⁷. Due anni dopo venne dimostrato il nesso casuale tra MSI2 e leucemia, quando in due pazienti affetti da leucemia mieloide cronica (LMC) fu identificata la fusione t(7;17)/MSI2::HOXA9 (in aggiunta al cromosoma Philadelphia) associata alla progressione della malattia dalla fase cronica (silente) alla fase acuta (crisi blastica) a prognosi infausta. Da qui gli studi di Ito et al. e Kharas et al. sono stati fondamentali nel dimostrare il ruolo funzionale di MSI2 nella leucemia. In particolare, nella LMC i livelli di MSI2 sono aumentati nella crisi blastica rispetto alla fase cronica. La proteina di fusione NUP98::HOXA9, tipicamente associata alla crisi blastica, induce l'espressione di MSI2, il quale è a sua volta essenziale per la soppressione di Numb, una proteina della via di segnale di NOTCH coinvolta nella modulazione della divisione asimmetrica delle cellule staminali e nei progenitori immaturi, determinando così una riduzione del differenziamento cellulare ³⁶. Gli studi del gruppo di M. Kharas et al. sono stati pionieri nell'ambito della leucemia mieloide acuta (LMA). L'elevata espressione di MSI2 correla con una prognosi peggiore nei i pazienti LMA. In seguito all'inibizione di MSI2 si osserva un blocco della propagazione delle cellule leucemiche, che vanno maggiormente incontro ad apoptosi ³⁷. Poiché l'overespressione di MSI2, sia nella LMA che nella LMC, è associata ad un *outcome* sfavorevole nei pazienti, MSI2 rappresenta di fatto un biomarcatore predittivo di malattia e un potenziale *target* terapeutico. Diversi sono i pathway coinvolti nell'induzione della proliferazione e nella soppressione dell'apoptosi cellulare che possono essere modulati da MSI2, tra questi troviamo ERK/MAPK e PI3K/AKT/MTOR per la LMA e NOTCH per la LMC ³⁸.

Le leucemie, così come altri tipi di tumori, sono capaci di riprogrammare il loro metabolismo cellulare per adattarsi alle condizioni di stress o a diversi microambienti, questa caratteristica è detta "plasticità metabolica". Nella LMC è stato osservato che MSI2 lega l'mRNA di BCAT1 (Branched Chain Ammino Acid Transaminase 1), un enzima citosolico coinvolto nel metabolismo degli amminoacidi a catena ramificata (BCAAs), promuovendone la traduzione e l'attivazione di mTORC1. Evidenze sperimentali dimostrano che l'asse MSI2-BCAT1-mTORC1 è implicato nella progressione della malattia da fase cronica a crisi blastica ³⁹. Nel contesto della LMA MLL-riarrangiata, un importante lavoro di Park et al. ha dimostrato che MSI2 è responsabile del mantenimento del programma di *self-renewal* nella LMA con t(9;11)/MLL::AF9+ poiché regola la traduzione di alcuni mRNA *target* come

IFZF2, c-MYC e HOXA9 che hanno un ruolo cruciale nella leucemogenesi⁴⁰. Oltre al contesto della LMA e della LMC, il ruolo di MSI2 è stato studiato anche nella leucemia linfoblastica cronica (LLC) e nel linfoma a cellule B. Nella LLC, MSI2 oltre ad essere overespresso (soprattutto nelle cellule in fase S e G2-M) sembrerebbe avere un importante ruolo nella sopravvivenza cellulare; se downregolato, infatti, il ciclo cellulare si arresta e aumenta l'espressione di induttori apoptotici quali citocromo C, FADD, *caspase 3* e p27kip1⁴¹. Elevati livelli di espressione di MSI2 sono stati ritrovati anche in pazienti affetti da linfoma a cellule B. MSI2 sembrerebbe essere uno dei principali geni coinvolti nella resistenza al GSK-591 (inibitore di PRMT5, proteina essenziale per la sopravvivenza del linfoma a cellule B)⁴².

Se il ruolo di MSI2 è stato studiato perlopiù nel contesto della LMA e della LMC, per quanto riguarda la LLA le nostre attuali conoscenze sono molto più limitate. Alcuni lavori riportano la correlazione tra l'elevata espressione di MSI2 e la prognosi peggiore nei pazienti LLA-B, sia adulti che pediatrici⁴³⁻⁴⁵. Tuttavia, il ruolo funzionale di MSI2 nella LLA-B rimane ad oggi sconosciuto. In conclusione, Musashi-2 rappresenta oggi un promettente biomarcatore di leucemia e *target* terapeutico.

Numerosi studi hanno riportato gli effetti terapeutici in seguito al silenziamento di MSI2 o al trattamento con farmaci inibitori. Nella LMA, a seguito del silenziamento di MSI2 tramite short hairpin RNA interference (shRNAi), si osserva una riduzione della proliferazione cellulare sia *in vitro* che *in vivo*, un arresto del ciclo cellulare in fase G0/G1 e un'induzione dell'apoptosi. L'abrogazione di MSI2 determina, inoltre, l'aumento della sensibilità delle cellule leucemiche alla Daunorubicina⁴⁶, un farmaco antitumorale appartiene alla classe delle antracicline che blocca la sintesi del DNA e dell'RNA.

Minuesa et al. hanno identificato e caratterizzato l'inibitore Ro 08-2750, una molecola di sintesi che agisce legando l'RRM1 e impedendo il legame di MSI2 agli mRNA *target*. Il trattamento *in vitro* di cellule di LMA MLL::AF9+ con Ro 08-2750 ha un effetto anti-proliferativo, a cui si accompagna un aumento del differenziamento e dell'apoptosi. A seguito del trattamento con Ro 08-2750 si osserva inoltre una riduzione dell'espressione dei *target* diretti di MSI2, tra cui TGFβR1, c-MYC, SMAD3 e HOXA9. Tuttavia, in un modello murino di LMA MLL::AF9+, il farmaco ha mostrato un'efficacia limitata nel ridurre il potenziale leucemogenico *in vivo*⁴⁷. Nella LLC, il trattamento con Ro 08-2750 riduce significativamente il numero di cellule B proliferanti, a cui si accompagna l'arresto del ciclo cellulare e un'aumentata apoptosi. Inoltre, l'azione di Ro 08-2750 è limitata alle cellule B leucemiche, senza alcun effetto sulle cellule T autologhe normali, e non sono state evidenziate potenziali tossicità dovute all'uso del farmaco. La somministrazione *in vivo* ha dimostrato effetti antileucemici tra cui: diminuzione del numero globale di globuli bianchi e di cellule B leucemiche circolanti e riduzione

della splenomegalia nei topi ⁴¹. Un altro recente lavoro ha utilizzato l'inibitore di MSI2 Ro 08-2750 nel contesto del linfoma a cellule B. Ro 08-2750 ha un effetto sinergico con l'inibitore di PRMT5, (GSK-591), ed è responsabile dell'arresto del ciclo cellulare nelle cellule di linfoma B mediante la down-regolazione di c-MYC e BCL-2 e l'up-regolazione di TP53 ⁴².

Per quanto riguarda la LLA-B, che rappresenta la forma di leucemia più comune nei bambini, ad oggi non esistono dati relativi agli effetti terapeutici dell'inibizione di MSI2. Il nostro gruppo di ricerca, per primo, si è occupato di indagare il ruolo funzionale di questa *RNA-binding protein* e gli effetti dell'abrogazione della sua attività in un modello preclinico di LLA-B infantile MLL-riarrangiata. Questo rappresenta il focus principale del progetto di ricerca a cui ho preso parte durante la mia tesi di laurea.

Scopo della tesi

I pazienti affetti da leucemia linfoblastica acuta infantile MLL-r hanno un tasso di sopravvivenza libera da malattia a 5 anni inferiore al 40% e hanno una prognosi infausta. I trials clinici condotti fino ad ora sono risultati fallimentari, e di fatto non hanno portato a un miglioramento della prognosi dei pazienti. Risulta dunque necessario identificare i geni chiave (direttamente coinvolti nell'insorgenza e nella progressione della malattia) potenzialmente bersagliabili, che possano quindi rappresentare nuovi *target* per lo sviluppo di strategie terapeutiche alternative al fine di migliorare l'aspettativa di vita di questi piccoli pazienti.

Lo scopo del progetto della mia tesi di laurea verte sullo studio del ruolo funzionale dell'*RNA-binding protein* MSI2 nella LLA infantile MLL-riarrangiata.

Nello specifico ci siamo proposti di:

- Validare sperimentalmente il coinvolgimento di MSI2 nella resistenza delle cellule di LLA MLL-r all'azione dei farmaci Glucocorticoidi (Desametasone e Metilprednisolone);
- Studiare i meccanismi molecolari potenzialmente coinvolti nella resistenza o nella sensibilizzazione delle cellule di LLA MLL-r ai Glucocorticoidi;
- Far luce sul potenziale ruolo di MSI2 nel metabolismo energetico delle cellule leucemiche e sulla possibilità di bersagliare le vulnerabilità metaboliche della leucemia come nuova strategia terapeutica;
- Proporre MSI2 come biomarcatore leucemico, e potenziale nuovo *target* terapeutico per il trattamento dei pazienti *infant* con LLA MLL-r tramite l'uso di un inibitore specifico (Ro 08-2750) in combinazione con altri farmaci già in uso nella pratica clinica.

Materiali e metodi

Colture cellulari *in vitro*

In questo studio sono state utilizzate le linee cellulari umane di leucemia linfoblastica acuta (LLA) a cellule B: SEM e RS4;11 (t(4;11)/MLL::AF4+); KOPN8 (t(11;19)/MLL::ENL+) acquistate dalla banca cellulare DSMZ (<https://www.dsmz.de/dsmz>);. I cloni Musashi-2 knock out (SEM MSI2 KO) ed una linea controllo (SEM CNTRL) sono stati precedentemente ottenuti nel mio laboratorio mediante tecnologia CRISPR/CAS9 *genome editing* a partire dalla linea cellulare SEM wild-type, usando rispettivamente un RNA guida (gRNA) complementare a regioni esoniche del dominio RRM1 di MSI2 o una sequenza aspecifica *scramble*. Tutte le linee cellulari sono state mantenute in coltura in *flask* da 25 cm² (T25, Corning Incorporated) ad una concentrazione iniziale di 3x10⁵ cellule/ml in incubatore a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂ passandole due/tre volte a settimana. Il terreno completo è costituito da RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), addizionato con 10% di Siero bovino fetale (FBS, Sigma Aldrich), 1% di Penicillina/Streptomicina (Cambrex Bio Science) e 1% di L-1-Glutammina (Cambrex Bio Science).

Conta cellulare

La conta cellulare è stata effettuata tramite analisi al microscopio ottico. La sospensione cellulare è stata diluita 1:2 con *Trypan Blue*, un colorante vitale in grado di penetrare nelle cellule morte che presentano la membrana cellulare degradata. Dopo aver posizionato il vetrino copri-oggetto sull'emocitometro si caricano 10 µl di campione diluito in una delle due camere di *Burker* presenti, permettendone il riempimento per capillarità. Si procede con la conta delle cellule vive, che appaiono traslucide e tondeggianti. La concentrazione di cellule/ml si ottiene moltiplicando la media del numero di cellule totali presenti in un quadrante della camera per il fattore di diluizione usato (FD=2) per il volume del quadrante stesso (10⁴).

Congelamento e scongelamento delle cellule

Le cellule possono essere conservate per lungo tempo in azoto liquido a -196 °C. Per la criopreservazione le cellule vengono centrifugate per 5 min a 1800 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810 R), risospese in FBS addizionato con 10% di Dimetilsulfossido (DMSO) e trasferite in apposite criovials (Nalgene, Rochester). Queste vengono poi lasciate *overnight* a -80 °C all'interno di un contenitore con isopropanolo, che impedisce lo *shock* termico e permette una lenta e graduale riduzione della temperatura; mentre il crioprotettore DMSO previene la lisi delle membrane. Le cellule vengono in seguito depositate nel *tank* di azoto liquido per essere poi scongelate quando

necessario. Per lo scongelamento, le cellule all'interno delle *cryovials* vengono scongelate in bagnetto termostatico a 37°C e poi trasferite goccia a goccia in una *falcon* da 50 ml contenente terreno RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) preriscaldato. Segue una centrifuga di 5 min a 1800 rpm per eliminare il DMSO ed una seconda centrifuga in PBS (10 min a 1000 rpm) per eliminare le cellule morte. Il pellet ottenuto viene risospeso in terreno completo, le cellule vengono contate e messe in coltura alla concentrazione desiderata.

Microscopia confocale

Le analisi in microscopia confocale sono state eseguite per valutare la massa mitocondriale e il potenziale di membrana (MMP). Dopo 24 ore di trattamento con Desametasone (5 µg/ml), le cellule sono state raccolte (1×10^6 cellule per ogni condizione), lavate in PBS e colorate con 50 nM MitoTrackerTM Red CMXRos e 25nM MitoTrackerTM Green FM (Thermo Fisher Scientific) per 30 minuti in terreno completo. Successivamente, i nuclei sono stati colorati con Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific). Le cellule sono state lavate due volte in PBS, montate su vetrini con una soluzione di glicerolo/PBS al 90% (v/v) e analizzate in microscopia confocale. Le immagini sono state acquisite con il microscopio confocale a scansione laser Zeiss LSM 710 (Zeiss) utilizzando un obiettivo a immersione d'olio 63x, 1,4 N/A. L'intensità del laser e i parametri di acquisizione sono stati mantenuti costanti durante ogni esperimento. I campi della microscopia confocale sono stati analizzati utilizzando una macro-specifica progettata in casa con il software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). La quantifica delle dimensioni mitocondriali è stata eseguita misurando la densità integrata (ID) del segnale verde normalizzata sul numero totale di nuclei analizzati. L'attività mitocondriale è stata analizzata misurando il rapporto tra la densità integrata (ID) del segnale rosso relativo al MMP sul segnale verde relativo alla massa, normalizzata sul numero dei nuclei (segnale blu del colorante nucleare Hoechst 33342). Tutti i dati ottenuti derivano dall'acquisizione di almeno dieci campi per ogni campione (circa 200 cellule ciascuno).

Analisi della risposta ai farmaci

Trattamenti farmacologici *in vitro*

I trattamenti farmacologici sono stati eseguiti su linee cellulari (cloni SEM MSI2 KO, SEM CNTRL, SEM WT, KOPN-8, RS4;11) o sui campioni di patient derived xenograft (PDX) espansi *in vivo*. Le linee cellulari di MLL-r LLA sono state seminate in piastra *multiwell* da 96 pozzetti *round bottom* ad una concentrazione iniziale di $0,3 \times 10^6$ c/ml in terreno RPMI completo; mentre i PDX alla concentrazione di $2,4 \times 10^6$ c/ml in terreno StemSpan (Stemcell Technologies) *serum-free* a cui è stato

addizionato l'1% di GlutaMAX (Gibco), 1% di Penicillina/Streptomicina (Cambrex, Bio Science) e le citochine ricombinanti hSCF e hG-CSF (10 ng/ml, Peprotech). Per ciascuna dose di farmaco sono stati eseguiti triplicati sperimentali.

Le cellule sono state trattate con: Metilprednisolone (Urbason), Desametasone (Decadron), Ro 08-2750 (Tocris), 2-DG (Sigma Aldrich), Tigeciclina (Sigma Aldrich), Metformina e Venetoclax (Selleckchem). Per ogni dose utilizzata si preparano delle *working solution* 10X, che vengono poi piastrate nella *multiwell* (10 µl di farmaco per pozzetto). Le cellule vengono contate e risospese in terreno completo alla concentrazione iniziale di 375.000 c/ml, in modo che seminando 80 µl di sospensione cellulare in ogni pozzetto (contenente 10 µl di farmaco precedentemente piastrato) si ottenga la concentrazione finale del farmaco desiderata sul volume di sospensione cellulare. In ogni piastra si include un triplicato per il controllo negativo (*untreated*: terreno completo o *vehicle*: DMSO 0.1%). All'interno dei pozzetti rimasti vuoti vengono aggiunti 200 µl di PBS in modo da mantenere l'umidità della piastra ed evitare l'evaporazione dei campioni. La *multiwell* è mantenuta in incubatore a 37 °C fino a 72h.

Analisi della vitalità cellulare

La vitalità cellulare è stata valutata dopo 48-72h di trattamento tramite *CellTiterGlo*, un saggio metabolico che quantifica l'ATP totale prodotta dalla cellula. Per effettuare il test viene utilizzata una *multiwell* da 96 pozzetti a fondo bianco. All'interno di ogni pozzetto si aggiunge (al buio) la stessa quantità di sospensione cellulare e di *CellTiter-Glo Reagent*. In questo modo viene generato un segnale luminescente proporzionale alla quantità di ATP presente, che è direttamente proporzionale al numero di cellule proliferanti in coltura. Lo strumento utilizzato per leggere la luminescenza è il *Tecan Spark multimode reader* usando il software *Magellan*.

Analisi dell'apoptosi cellulare

Dopo 72h di trattamento, l'apoptosi è stata valutata tramite marcatura con Annessina V-PE e 7-AAD (GFP-certified Apoptosis/Necrosis detection kit, Enzo) e analisi al FACS per discriminare le cellule allo stadio di apoptosi precoce (*early apoptosis*: Annessina V + / 7-AAD -), tardiva o necrosi (*late apoptosis*: Annessina V + / 7-AAD +) e vive (Annessina V - / 7-AAD -). Per effettuare la marcatura, i campioni vengono trasferiti in tubi da FACS, lavati in PBS (centrifugati per 5 min a 1800 rpm), risospesi in 200 µl di mix (2 µl di Annessina V-PE, 2 µl di 7-AAD, 20 µl di *staining* buffer 10 X e 180 µl di H₂O per campione), incubati a temperatura ambiente per 15 min al buio e analizzati al citofluorimetro FACS BD LSR Fortessa X-20. I dati sono stati acquisiti con il software FACSDiva, da cui sono state estrapolate le percentuali di cellule vive e morte (normalizzate sul controllo non trattato) e successivamente analizzate con il software Graphpad Prism 9.0. Il calcolo dell'EC₅₀ (la

concentrazione efficace 50, ovvero la concentrazione di farmaco che determina un effetto nel 50% delle cellule trattate) e del Combination Index (CI) è stato effettuato tramite il *software* Compusyn sulla media dei triplicati sperimentali. In base al valore del CI ottenuto i farmaci sono definiti: antagonisti (CI > 1,2), additivi (CI = 0,9 - 1,1) o sinergici (lievemente sinergici CI = 0,85 - 0,9; moderatamente sinergici CI = 0,7 - 0,85; sinergici CI = 0,3 - 0,7; fortemente sinergici CI = < 0,3).

Per ogni combinazione è stato calcolato il Bliss Score, ovvero la stima dell'effetto atteso qualora i farmaci usati nella combinazione fossero additivi. Il Bliss score per la combinazione di due farmaci è stato calcolato con la seguente formula: $(Fa_{Drug1} + Fa_{Drug2}) - (Fa_{Drug1} \times Fa_{Drug2})$, dove Fa è la *fraction affected*, calcolata come il rapporto tra la percentuale di cellule morte trattate normalizzata sul controllo non trattato.

Il Bliss score per la combinazione di tre farmaci è stato calcolato con la seguente formula: $(Fa_{Drug1} + Fa_{Drug2} + Fa_{Drug3}) - (Fa_{Drug1} \times Fa_{Drug2}) - (Fa_{Drug1} \times Fa_{Drug3}) - (Fa_{Drug2} \times Fa_{Drug3}) - (Fa_{Drug1} \times Fa_{Drug2} \times Fa_{Drug3})$. Se l'effetto misurato della combinazione di farmaci (EFF_{combo}) è superiore al Bliss stimato ($\Delta[EFF_{combo}-Bliss]>0$) i farmaci sono sinergici; se è inferiore ($\Delta[EFF_{combo}-Bliss]<0$) i farmaci sono antagonisti; (se $\Delta[EFF_{combo}-Bliss]=0$) i farmaci sono additivi.

Esperimenti *in vivo*

Per gli esperimenti *in vivo* sono stati utilizzati topi immunodeficienti NSG (NOD.Cg-Prkdc scid Il2rg tm1Wjl /SzJ, The Jackson Laboratory) stabulati nei locali semi-barrierati dedicati dello stabulario dell'Università di Milano-Bicocca. Gli animali sono alloggiati in un sistema di gabbie IVC (*individually ventilated cage*), che fornisce aria sterile e mantiene controllata la temperatura, sono inoltre mantenuti cicli circadiani luce/buio di 12h. Cibo ed acqua sterili vengono forniti ad libitum. Il benessere degli animali viene valutato quotidianamente; alla comparsa di segni generici di sofferenza (postura ricurva, perdita di peso >15%, pelo arruffato, cachessia, letargia etc...) e/o dei sintomi conclamati di malattia (es. *engraftment* >80% nel sangue periferico, paralisi degli arti inferiori, comparsa di masse tumorali extramidollari) i topi sono stati sacrificati secondo i principi etici stabiliti dalla legge in materia di sperimentazione animale (*human endpoints*).

Xenotrapianto di cellule leucemiche

I topi sono stati trapiantati con la linea cellulare SEM o con blasti primari di pazienti LLA MLL-r alla diagnosi. Le cellule vengono contate, pellettate, risospese in PBS sterile e mantenute in ghiaccio. Prima dell'iniezione, i topi vengono scaldati con una lampada a infrarossi il tempo sufficiente a indurre la dilatazione delle vene nella coda. Il trapianto si effettua tramite iniezione intravenosa nella

vena caudale (2×10^6 cellule in 200 μ l per topo) utilizzando siringhe da 1mL con ago da 27 gauge. Durante la preparazione della siringa bisogna assicurarsi di eliminare eventuali bolle d'aria che potrebbero causare embolia.

Trattamenti *in vivo*

I topi sono stati trattati, dal terzo giorno dopo il trapianto per tre settimane, con: Desametasone (5-10 mg/kg, somministrazione tramite iniezione intraperitoneale, una volta al giorno per 5 giorni su 7), IACS-010759 (7,5 mg/kg, somministrazione per os tramite *oral gavage*, una volta al giorno, per 3 volte a settimana), o una combinazione dei due farmaci.

Aspirati midollari

Per controllare il livello di *engraftment* delle cellule leucemiche, si effettuano periodicamente dei prelievi di midollo osseo (BM) tramite aspirazione intrafemorale. Questa procedura viene eseguita sotto anestesia gassosa mediante la somministrazione di una miscela di isofluorano ed ossigeno. Per indurre l'anestesia il topo è alloggiato in una apposita scatola chiusa saturata ed in seguito si passa alla somministrazione in maschera. Per l'aspirato midollare si utilizza una siringa da insulina Micro-Fine da 0.3ml con ago da 23.5 gauge (BD Bioscience) contenente 100 μ l di PBS sterile. Dopo aver depilato l'area attorno al ginocchio, la zona dell'iniezione viene disinfettata con EtOH 70% e si penetra con l'ago nel canale midollare del femore esercitando una leggera pressione e ruotando l'ago. Una volta entrati nella cavità femorale si iniettano circa 50 μ l di PBS, quindi, si passa all'aspirazione del midollo osseo. I campioni vengono raccolti in provette contenenti 500 μ L di PBS. Per la lisi dei globuli rossi a ciascun campione si aggiungono 500 μ L di NH_4Cl . Dopo un'incubazione per 20 minuti a temperatura ambiente, i campioni vengono lavati per eliminare i globuli rossi, quindi si procede all'analisi dell'*engraftment*.

Prelievo di organi e processamento delle cellule leucemiche

Il prelievo di sangue periferico viene effettuato all'*endpoint* dalla guancia (plesso mandibolare) tramite una puntura con un ago sterile; le gocce di sangue che fuoriescono si raccolgono in apposite provette contenenti anticoagulante. Gli animali vengono poi sacrificati mediante CO_2 o dislocazione cervicale, disinfettati con EtOH 70% e vengono prelevati femore, tibia, milza e plesso meningeo (utilizzando forbici e pinzette sterili). Dopo il prelievo, il sangue periferico e gli organi sono mantenuti in PBS 2% FBS sterile e riposti in ghiaccio in attesa del processamento:

- Femore e tibia: dopo essere state ripulite dal tessuto muscolare, le ossa vengono frantumate con l'aiuto di un apposito pestello e mortaio di marmo in 20 ml di PBS 2% FBS sterile. Le cellule così processate vengono poi filtrate e trasferite in Falcon da 50 ml;

- Milza: dopo averla pesata e valutato la presenza di eventuali masse leucemiche visibili, la milza viene processata aiutandosi con lo stantuffo di una siringa ed un filtro posizionato sopra un tubo Falcon da 50ml, aggiungendo poco alla volta 20 ml di PBS 2% FBS sterile con una pasteur;
- Meningi: le cellule leucemiche che hanno invaso il plesso dei vasi meningei vengono recuperate utilizzando il retro del pistone della siringa e filtrate attraverso un filtro posizionato su un tubo Falcon da 50ml, aggiungendo gradualmente 10 ml di PBS 2% FBS sterile con una pasteur;
- Sangue periferico: viene risospeso in 1ml di NH_4Cl e incubato per 20 minuti a temperatura ambiente per la lisi dei globuli rossi.

Dopo aver valutato la cellularità dei campioni (ovvero il numero di globuli bianchi) mediante *cell counter* si procede all'analisi dell'*engraftment* ed eventualmente alla crio-conservazione dei campioni positivi.

Analisi dell'*engraftment*

Per l'analisi dell'*engraftment* sui campioni di aspirati midollari, sangue periferico e sospensioni cellulari ottenuti dal midollo osseo, milza, plesso meningei dei topi, il campione (circa 1×10^6 cellule) viene marcato (30 min a 4°C) con una mix contenente gli anticorpi murini e umani coniugati: mCD45-PE, hCD45-APC (il CD45 è l'antigene pan-leucocitario) e hCD19-PECy5 (antigene pan-linfociti B) e analizzati tramite citofluorimetria a flusso (FACS). Questo permette di discriminare le cellule murine da quelle umane presenti nei campioni, perciò di rilevare l'attecchimento (*engraftment*) della leucemia ($\text{hCD45}^+/\text{hCD19}^+$) nei topi trapiantati.

Analisi statistica

Per valutare la significatività statistica dei dati ottenuti abbiamo applicato l'analisi della varianza (One way o Two way Anova con la correzione di Bonferroni per confronti multipli). Per ogni grafico riportato in figura la significatività statistica (*p value*) e il tipo di test statistico applicato sono specificati in legenda.

Risultati e Discussione

Risultati preliminari: MSI2 nella leucemia linfoblastica acuta infantile MLL-r

Per studiare il ruolo funzionale di MSI2 nella LLA infantile MLL-r in un modello cellulare *in vitro*, nel mio laboratorio sono state precedentemente generate delle cellule *knock-out* (KO) per il gene MSI2. La linea cellulare umana di LLA t(4;11)/MLL::AF4+ SEM è stata ingegnerizzata tramite CRISPR/CAS9 *genome editing* per ottenere cloni SEM MSI2 KO, usando un RNA guida (gRNA) diretto contro il dominio funzionale di RNA-binding RRM1 di MSI2 (**Fig. 3A**). L'editing genomico ha determinato l'inserimento di 80 nucleotidi *random* nella sequenza del gene MSI2 (in corrispondenza della regione dell'RRM1 riconosciuta dal gRNA) che ha alterato il *frame* dell'mRNA. Questo ha causato l'inserimento di un codone di stop anticipato e la generazione di un trascritto troncato, quindi la completa assenza della proteina funzionale nelle cellule SEM MSI2 KO (**Fig. 3B**). Un gRNA di controllo (con sequenza nucleotidica *scramble* aspecifica) è stato utilizzato come controllo negativo di *editing* nelle cellule SEM CNTRL (in cui di fatto l'espressione del gene *target* MSI2 non risulta alterata).

Tramite l'utilizzo di questo modello cellulare MSI2 KO il mio gruppo di ricerca ha precedentemente dimostrato che:

- MSI2 promuove la crescita delle cellule di LLA MLL::AF4+ *in vitro*
In un saggio di competizione clonale a lungo termine *in vitro*, le cellule SEM CNTRL e MSI2 KO sono state unite in un rapporto iniziale di 90:10 KO:CNTRL (nettamente a favore delle cellule MSI2 KO) e seminate *in vitro*; dopo 20 passaggi in coltura, le cellule CNTRL prendono il sopravvento a discapito delle MSI2 KO che si estinguono (**Fig. 3C**).
- MSI2 sostiene il potenziale leucemogenico *in vivo* delle cellule di LLA MLL::AF4+.
In esperimenti di xenotrapianto *in vivo*, in cui le cellule SEM CNTRL o MSI2 KO sono state trapiantate in topi immunodeficienti NSG, è stato osservato che l'assenza del gene MSI2 nelle cellule MLL::AF4+ LLA determina un ridotto *engraftment* (**Fig. 3D**), cioè una minor capacità di rigenerare la leucemia *in vivo*; infatti nei topi trapiantati con le cellule SEM MSI2 KO si osserva una percentuale di malattia minore e una sopravvivenza prolungata (**Fig. 3E**).
- MSI2 è coinvolto nella resistenza ai Glucocorticoidi nella LLA MLL::AF4+.
Il profilo di risposta ai farmaci delle cellule SEM WT, CNTRL e MSI2 KO è stato valutato tramite una piattaforma di *High-Throughput drug screening* usando una libreria di 174

farmaci attualmente utilizzati in clinica o in studi preclinici in campo onco-ematologico (**Fig. 3F**). Dalle analisi è emerso che le cellule SEM MSI2 KO hanno un diverso profilo di risposta a 4 farmaci appartenenti a due categorie di farmaci: i glucocorticoidi (Desametasone e Metilprednisolone) (**Fig. 3G**) e alcuni antimetaboliti (Citarabina, Ciclocitidina). Desametasone e Metilprednisolone sono farmaci molto importanti, utilizzati in prima linea per il trattamento delle leucemie e hanno un buon profilo di sicurezza per le cellule ematopoietiche. Tuttavia, la resistenza ai farmaci glucocorticoidi (GC) è una caratteristica tipica dei pazienti *infant* con LLA MLL-r rispetto a quelli pediatrici. Al contrario, gli antimetaboliti (Citarabina e Ciclotidina) hanno invece un potente effetto citotossico aspecifico anche sulle cellule normali del sistema ematopoietico, in virtù della loro funzione di inibitori della sintesi di DNA e RNA. Per queste ragioni il focus del progetto di ricerca si è focalizzato sui glucocorticoidi, al fine di determinare in che modo MSI2 possa essere coinvolto nella resistenza ai GC tipica degli *infant* affetti da LLA MLL-r e se quindi strategie terapeutiche volte a bersagliare MSI2 possano rendere le cellule più sensibili al trattamento.

- MSI2 potrebbe essere implicato nel metabolismo bioenergetico della cellula leucemica. I saggi effettuati mediante Seahorse XF hanno valutato il profilo bioenergetico delle cellule MSI2 KO e CNTRL trattate con GC misurando il flusso di ossigeno (OCR: *oxygen consumption rate*), e di protoni (ECAR: *extracellular acidification rate*) che sono direttamente proporzionali rispettivamente alla respirazione mitocondriale e alla glicolisi. In particolare, a seguito del trattamento con GC nelle cellule CNTRL e nelle MSI2 KO la produzione di ATP tramite glicolisi si riduce in entrambi i due tipi di cellule, mentre l'ATP prodotto tramite la respirazione mitocondriale si riduce in modo significativo solo nelle cellule MSI2 KO (**Fig. 3H**), mentre rimane invariato nelle CNTRL dove MSI2 è invece espresso. Questi dati preliminari suggeriscono che MSI2 potrebbe essere implicato nel metabolismo cellulare della LLA MLL-r. Tuttavia, studi più approfonditi si rendono necessari per avvalorare questa ipotesi.

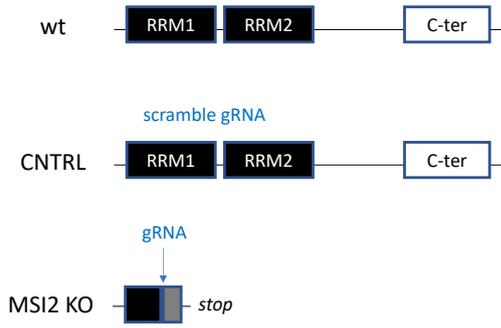
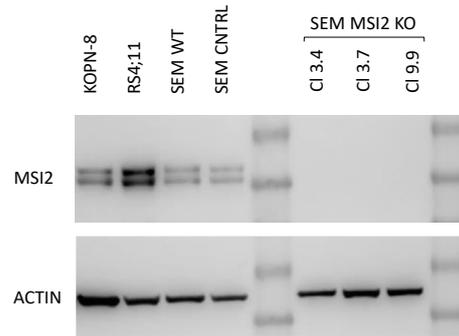
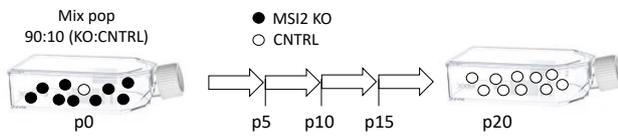
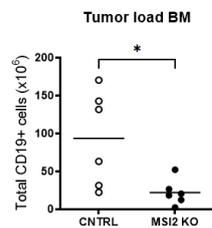
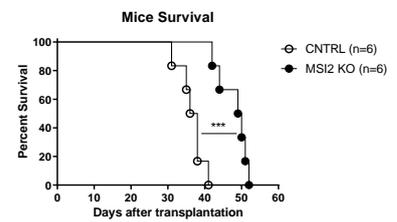
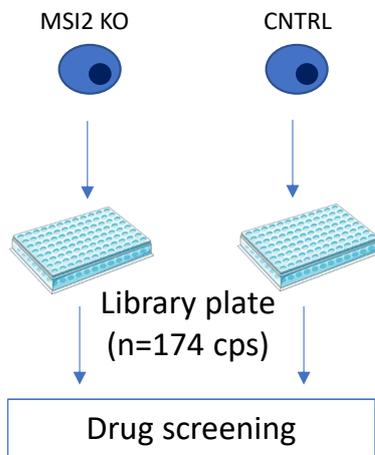
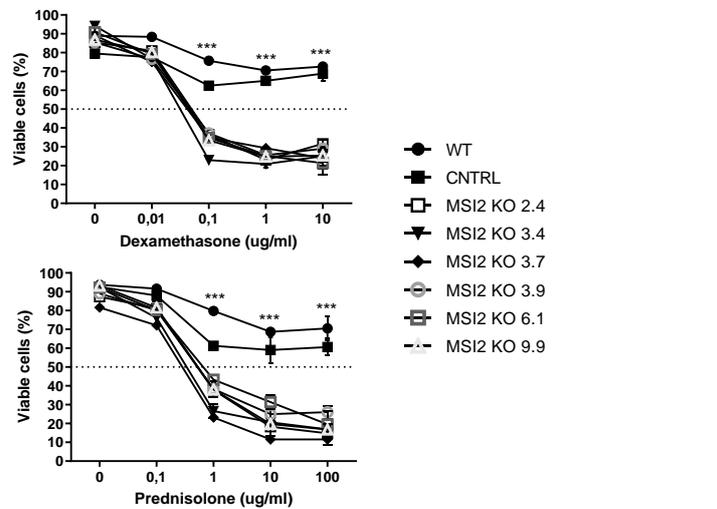
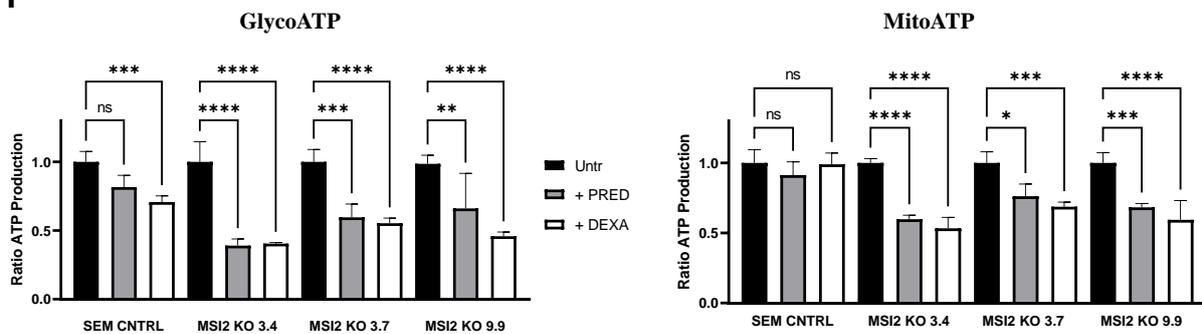
A**B****C****D****E****F****G****H**

Figura 3. Ruolo di MSI2 nella LLA infantile MLL-r: stato dell'arte

(A) Struttura del gene MSI2 nelle cellule SEM wild type (wt) nelle SEM CNTRL e MSI2 KO editate mediante tecnologia CRISPR/CAS9. (B) Analisi Western Blot dell'espressione di MSI2 nelle linee cellulari di LLA MLL::ENL+ (KOPN-8) ed MLL::AF4+ (RS4;11 e SEM), nelle SEM CNTRL e in tre cloni MSI2 KO editati. (C) Rappresentazione grafica del saggio di competizione clonale a lungo termine *in vitro*. (D) Analisi dell'*engraftment* leucemico in topi trapiantati con cellule SEM CNTRL e MSI2 KO, il grafico riporta il numero totale di cellule CD19⁺ (*tumor load*) nel midollo (BM) dei topi. (E) Curva di sopravvivenza (Kaplan-Meier) dei topi trapiantati con le cellule SEM CNTRL e MSI2 KO. (F) Rappresentazione schematica dell'*high-throughput drug screening* effettuato sulle cellule SEM MSI2 KO e CNTRL, utilizzando una libreria di 174 farmaci. (G) Analisi della vitalità cellulare dopo 72h di trattamento con dosi scalari di Metilprednisolone (0,1-1-10-100 µg/ml) o Desametasone (0,01-0,1-1-10 µg/ml) nelle cellule SEM WT, CNTRL e MSI2 KO. (H) Analisi della produzione di ATP per via glicolitica (GlycoATP) o mitocondriale (MitoATP) dopo 24h di trattamento con Metilprednisolone (50 µg/ml) o Desametasone (5 µg/ml) nelle SEM CNTRL e nei cloni SEM MSI2 KO effettuata mediante Seahorse XF Analyzer). ns: non significativo; *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001.

L'inibizione farmacologica di MSI2 sensibilizza le cellule di LLA MLL-r all'azione dei GC *in vitro* ed *ex vivo* e il trattamento in combinazione ha effetto sinergico

La resistenza alle attuali terapie standard rappresenta il motivo principale per cui i pazienti *infant* affetti da LLA con riarrangiamento di MLL spesso ricadono, seppur dopo aver raggiunto una fase di remissione iniziale transitoria. La refrattarietà alla terapia convenzionale e l'alto rischio di ricaduta determinano la prognosi infausta. L'analisi del profilo di risposta ai farmaci delle cellule SEM CNTRL e MSI2 KO, condotto su una piattaforma di *high-throughput drug screening* farmacologico usando una libreria di 174 farmaci, ha messo in luce una maggiore sensibilità delle cellule MSI2 KO ai glucocorticoidi (GC) e ad alcuni antimetaboliti. Poiché i pazienti *infant* con LLA MLL-r sono tipicamente più resistenti ai GC rispetto ai pazienti pediatrici con LLA¹⁹, il nostro interesse si è focalizzato principalmente su questa categoria di farmaci. Trovare una strategia per superare la resistenza ai farmaci, rimane una delle principali *challenge* nel trattamento dei pazienti *infant* con LLA MLL-r. Pertanto, abbiamo ritenuto opportuno studiare più approfonditamente il potenziale coinvolgimento di MSI2 nella resistenza ai GC.

Il Desametasone e il Metilprednisolone sono due GC utilizzati in prima linea nel trattamento delle leucemie. Il Metilprednisolone viene somministrato nella fase iniziale di induzione della terapia,

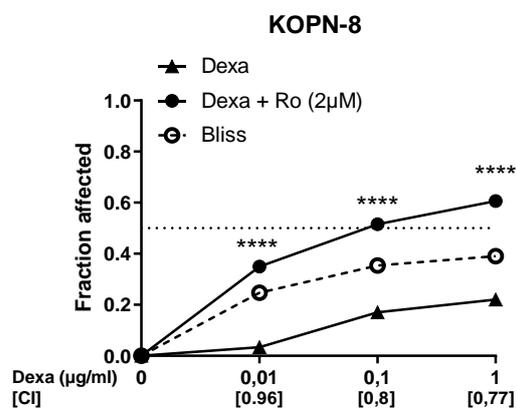
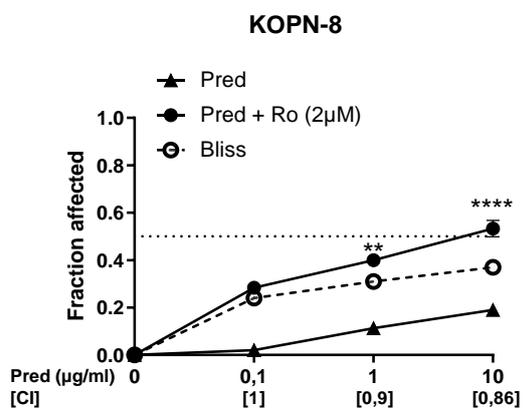
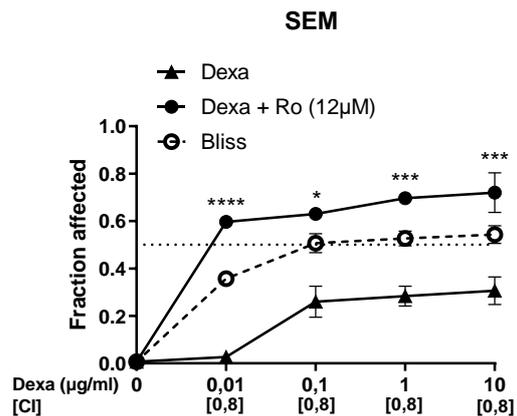
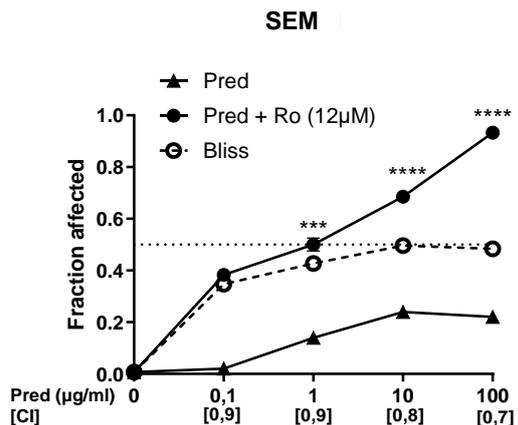
mentre il Desametasone, nonostante abbia una maggiore efficacia anti-leucemica e una potenza d'azione più elevata, viene somministrato solo nei casi più resistenti a causa dei suoi effetti collaterali (come infezioni, fratture ossee, osteonecrosi e tossicità neuronale).

Per validare i dati ottenuti dallo screening, due linee cellulari umane di LLA MLL-r (tipicamente resistenti ai GC), la linea t(4;11)/MLL::AF4+ SEM e la linea t(11;19)/MLL::ENL+ KOPN-8 (**Fig. 4A**) sono state trattate con dosi scalari di Desametasone o Metilprednisolone in combinazione con l'inibitore di MSI2, Ro 08-2750. Di quest'ultimo abbiamo utilizzato una dose costante sub-citotossica (12 μ M o 2 μ M rispettivamente per SEM e KOPN8) precedentemente definita mediante titolazione preliminare su entrambe le linee. L'effetto anti-leucemico è stato valutato dopo 72h di trattamento mediante analisi dell'apoptosi cellulare (al FACS, dopo marcatura con Annessina V/7-AAD). Poiché le linee cellulari SEM e KOPN-8 sono resistenti, l'effetto citotossico del Desametasone o del Metilprednisolone usati singolarmente risulta sempre inferiore al 50% anche alla massima dose utilizzata. Invece, il trattamento con GC in combinazione con Ro 08-2750 aumenta in modo significativo la mortalità cellulare in entrambe le linee cellulari. In particolare, l'effetto ottenuto dal trattamento in combinazione è significativamente superiore rispetto a quello stimato del *Bliss Score*; Ro 08-2750 risulta avere effetto sinergico se usato in combinazione con i GC, come anche indicato dal Combination Index (CI<0,9 alle dosi più alte di GC).

Gli effetti terapeutici del trattamento con GC in combinazione con Ro 08-2750 ottenuti sulle linee cellulari *in vitro*, sono anche stati confermati su campioni di PDX (*patient-derived xenograft*) *ex vivo* (**Fig. 4B**). I modelli murini di xenotrapianto rappresentano ad oggi l'*assay gold standard* per testare l'efficacia terapeutica in modelli preclinici *in vivo*. Nel nostro caso specifico, i topi immunodeficienti NSG sono stati trapiantati con blasti primari all'esordio di pazienti *infant* affetti da LLA MLL-r: un paziente con la fusione t(4;11)/MLL::AF4+ (PDX1), l'altro con la fusione t(11;19)/MLL::ENL+ (PDX2). I topi sono stati poi sacrificati nel momento della manifestazione conclamata della malattia, e le cellule leucemiche sono state recuperate dal midollo osseo. Questi campioni, detti PDX (*patient-derived xenografts*) sono stati trattati *ex-vivo* con GC e Ro 08-2750. Come per le linee cellulari, sui due campioni di PDX testati, sono state utilizzate le stesse dosi scalari di Desametasone e Metilprednisolone in combinazione con una dose costante di Ro 08-2750 (12 μ M, definita mediante esperimenti preliminari di titolazione). Il trattamento farmacologico è stato valutato dopo 72h di trattamento tramite l'analisi dell'apoptosi cellulare. Anche sui campioni di PDX *ex vivo* abbiamo osservato che l'inibizione farmacologica di MSI2 rende i blasti primari *infant* con LLA MLL-r più sensibili all'azione dei GC e il trattamento in combinazione ha un effetto sinergico.

Da questi risultati si deduce che l'inibizione farmacologica di MSI2 tramite l'uso dell'inibitore Ro 08-2750 sensibilizza le linee cellulari umane di MLL-r LLA *in vitro* e i campioni di PDX *ex vivo* all'azione dei GC, avvalorando quindi l'ipotesi secondo cui *l'RNA-binding protein* MSI2 è direttamente implicato nella resistenza ai GC e potrebbe quindi rappresentare un potenziale *target* terapeutico per gli *infant* affetti da LLA MLL-r.

A



B

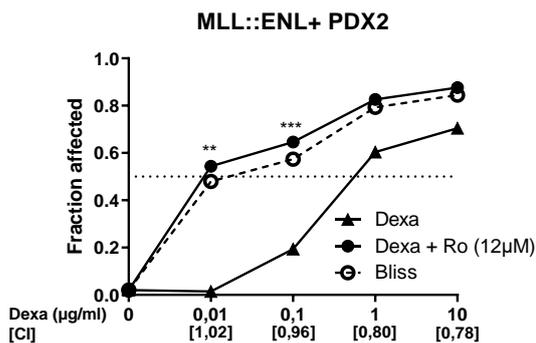
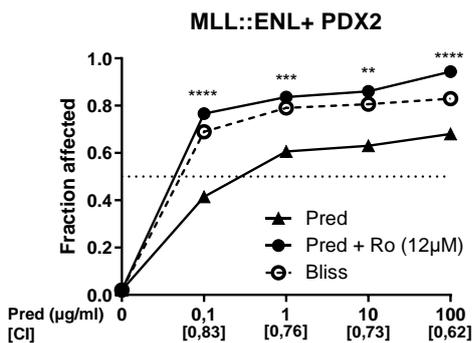
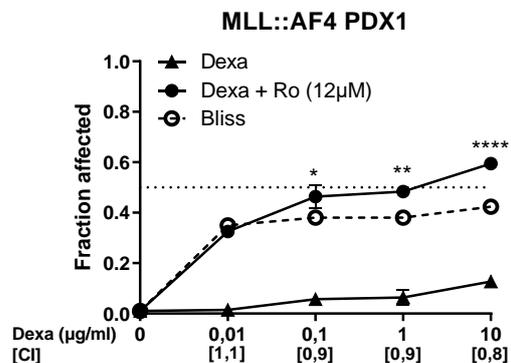
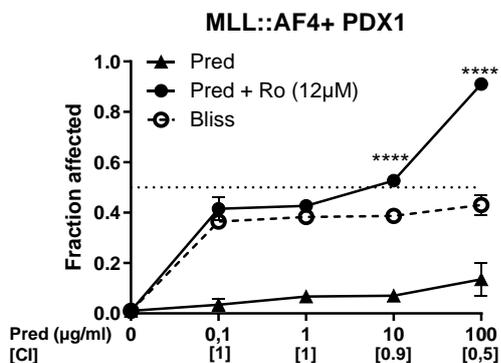


Figura 4. Trattamento in combinazione con GC e Ro 08-2750 su linee cellulari *in vitro* e su campioni di PDX infant LLA MLL-r *ex vivo*.

Analisi dell'apoptosi sulle linee cellulari SEM e KOPN-8 *in vitro* (A) e su campioni di PDX derivati da pazienti *infant* con LLA MLL-r *ex vivo* (B) Le dosi dosi scalari di Metilprednisolone (Pred) o Desametasone (Dexa) sono riportate in figura. Una dose sub-citotossica costante di Ro 08-2750 (Ro, 12 μ M o 2 μ M per SEM, PDX e KOPN-8, rispettivamente) è stata usata per gli esperimenti di combinazione. *Fraction affected*: percentuale di cellule morte (Annessina V/7-AAD positive valutata mediante analisi al FACS) dopo 72h di trattamento. I valori si riferiscono alla media di triplicati sperimentali, normalizzati sul controllo non trattato. Bliss: Bliss Score. CI: Combination index. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$ (Two-way Anova, combo vs. Bliss).

L'abrogazione di MSI2 rende le cellule LLA MLL-r più vulnerabili a perturbazioni metaboliche

Precedenti analisi del profilo bioenergetico cellulare (tramite saggi Seahorse), hanno valutato l'impatto metabolico del trattamento con i GC sulle cellule di LLA MLL-r. E' stato osservato che la produzione di ATP tramite la via glicolitica è compromessa a seguito del trattamento con GC in entrambe le cellule SEM CNTRL e MSI2 KO (in accordo con quanto già noto in letteratura)²⁵. Mentre l'effetto sulle cellule SEM CNTRL è limitato all'inibizione della glicolisi (ma non inficia la respirazione mitocondriale), nelle cellule SEM MSI2 KO a seguito del trattamento con GC si osserva una drammatica riduzione sia della glicolisi, sia della respirazione mitocondriale.

Da queste osservazioni abbiamo ipotizzato che le cellule MSI2 KO potrebbero essere maggiormente sensibili a perturbazioni metaboliche. Per confermare quest'ipotesi, abbiamo trattato le cellule *in vitro* con il 2-deossiglucosio (2-DG), un analogo sintetico del glucosio in cui il gruppo 2-idrossile è sostituito dall'idrogeno. Una volta all'interno delle cellule, il 2-DG viene fosforilato a 2-deossi-d-glucosio-6-fosfato (2-DG-6-P) il quale, poiché privo del gruppo 2-OH, non è in grado di essere metabolizzato a fruttosio-6-P. L'accumulo di 2-DG-6-P a livello intracellulare determina l'inibizione della glicolisi e del metabolismo del glucosio. Perciò, abbiamo usato il 2-DG per valutare l'effetto dell'inibizione della glicolisi sulle cellule CNTRL o MSI2 KO.

Le cellule sono state coltivate *in vitro* in presenza di diverse dosi di 2-DG (0,5-1-1,5-2 mM). La vitalità cellulare è stata valutata sia tramite un saggio metabolico che misura l'ATP totale prodotta dalla cellula (CellTiterGlo) dopo 48h di trattamento, sia tramite analisi dell'apoptosi cellulare (Annessina V/7-AAD al FACS) dopo 72h di trattamento. I nostri risultati dimostrano che le cellule MSI2 KO sono molto più suscettibili rispetto alle CNTRL all'inibizione della glicolisi indotta da

2-DG, il quale, già a basse dosi (1mM) induce morte cellulare programmata nell'80% delle cellule MSI2 KO (Fig. 5A). Questi esperimenti dimostrano quindi che la mancanza di MSI2 rende le cellule più suscettibili all'inibizione della glicolisi indotta da 2-DG e che tale perturbazione metabolica ha effetti letali sulle cellule MSI2 KO.

Per avvalorare ulteriormente questa ipotesi, in un secondo esperimento abbiamo trattato le due linee cellulari SEM e KOPN-8 con l'analogo del glucosio 2-DG in combinazione con una dose costante sub-citotossica di Ro 08-2750. L'inibizione della glicolisi con il 2-DG in combinazione con l'inibitore di MSI2 Ro 08-2750 ha effetto sinergico e induce apoptosi in entrambe le linee cellulari LLA MLL-r (Fig. 5B).

Questi risultati indicano che la mancanza o l'inibizione di MSI2 rende le cellule più sensibili a perturbazioni metaboliche, come l'inibizione della glicolisi indotta dal 2-DG (o causata dal trattamento con GC). MSI2 potrebbe quindi avere un ruolo nella regolazione del metabolismo bioenergetico della cellula leucemica, in particolare nelle condizioni in cui l'omeostasi è alterata.

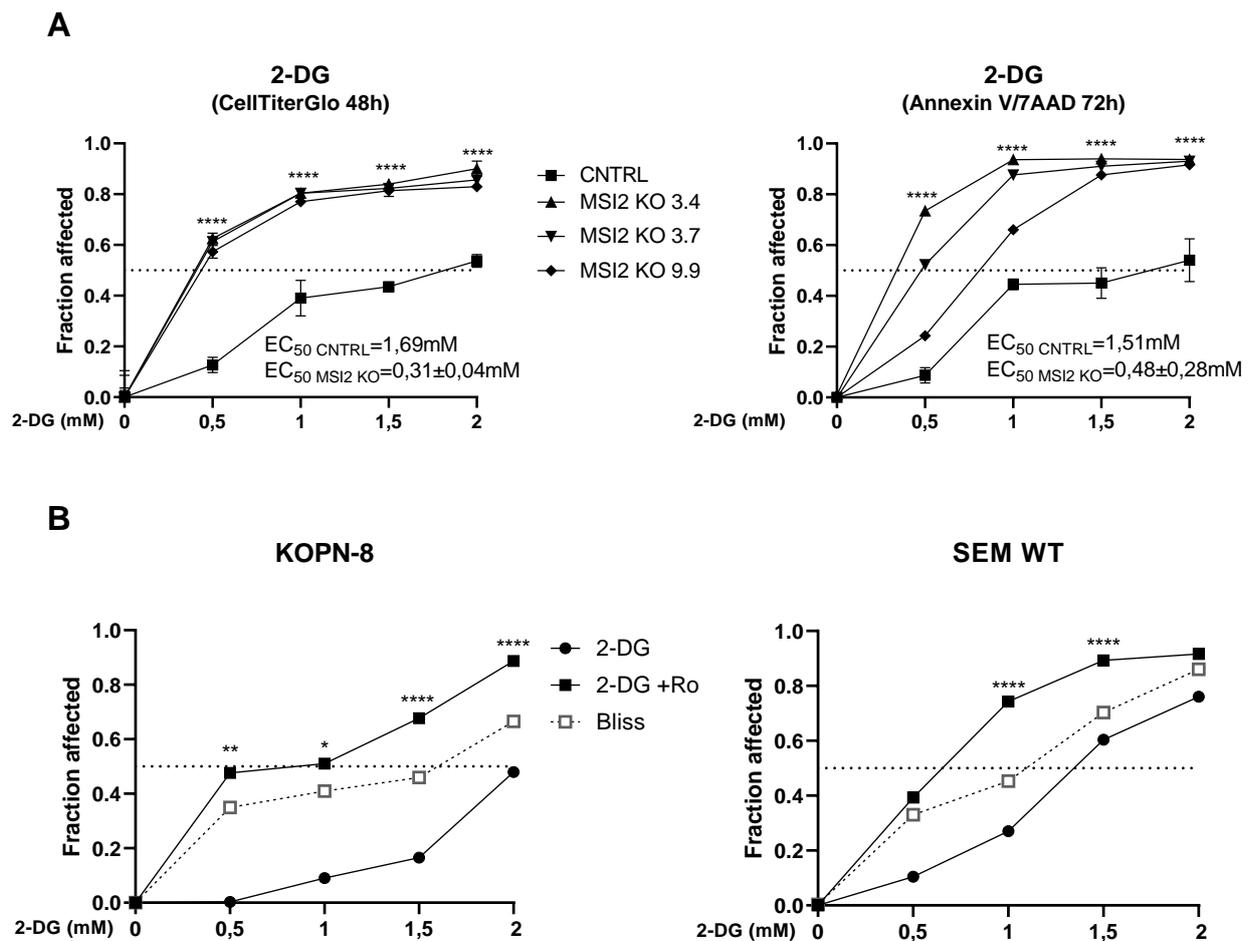


Figura 5. Effetto dell'inibizione della glicolisi tramite 2-DG

(A) Effetto del trattamento con 2-DG sulle cellule SEM CNTRL e MSI2 KO. Analisi della vitalità delle cellule SEM CNTRL e dei cloni MSI2 KO trattati con il 2-DG (0,5-1-1,5-2 mM). La vitalità cellulare è stata determinata mediante CellTiterglo dopo 48h di trattamento, oppure tramite analisi dell'apoptosi (Annexina V//AAD al FACS) dopo 72h di trattamento. EC_{50} = Dose efficace 50 (mean±SD, Calcolata con Compusyn)

(B) Effetto del co-trattamento con Ro 08-2750 e 2-DG su due linee cellulari MLL-r LLA. Analisi dell'apoptosi dopo 72h di trattamento sulle linee cellulari KOPN-8 e SEM WT trattate con 2-DG in combinazione con Ro 08-2750 (dose subcitotossica costante: 2µM o 12µM per KOPN-8 e SEM rispettivamente). *Fraction affected*: percentuale di cellule morte (media calcolata su triplicati sperimentali, normalizzata sul controllo non trattato). Bliss: Bliss score. * p<0,05 ** p<0,01 **** p<0,0001 (Two-way Anova, CNTRL vs MSI2 KO e combo vs. Bliss).

L'attività mitocondriale delle cellule MSI2 KO è alterata

La maggiore suscettibilità all'inibizione della glicolisi non è l'unico effetto metabolico che si riscontra nelle cellule MSI2 KO. I saggi Seahorse precedentemente condotti nel mio laboratorio hanno dimostrato che, il trattamento con GC sulle cellule SEM MSI2 KO ha un forte impatto sulla produzione di ATP mitocondriale, ovvero sulla fosforilazione ossidativa (attività OXPHOS). Inoltre, sempre tramite saggi Seahorse, precedenti studi hanno inoltre dimostrato che il trattamento con Ro 08-2750 sulle cellule SEM abbatta la respirazione mitocondriale (basale e massimale).

Per studiare più approfonditamente l'attività mitocondriale, abbiamo condotto analisi di microscopia confocale per misurare: il potenziale di membrana mitocondriale (MMP) e la biomassa mitocondriale usando rispettivamente il MitoTracker Red e Green.

Per prima cosa abbiamo osservato che allo stato basale (in omeostasi) le cellule MSI2 KO mostrano un potenziale di membrana notevolmente più elevato rispetto alle cellule CNTRL (**Fig. 6A-B**). Questo suggerisce che i mitocondri delle cellule MSI2 KO sono già iperattivi in condizioni basali. Dopo 24h di trattamento con Desametasone (5 µg/ml), nelle cellule CNTRL si osserva un incremento del MMP rispetto al non trattato; al contrario, nelle cellule MSI2 KO il MMP decade (**Fig. 6A-B**). Non si osservano tuttavia cambiamenti significativi nella massa mitocondriale né nelle CNTRL né nelle MSI2 KO a significare che il numero di mitocondri è invariato (**Fig. 6C**).

Quindi, a seguito del trattamento con GC per 24h, si osservano due tendenze opposte: un aumento del MMP (attivazione mitocondriale) nelle cellule CNTRL e un decadimento del MMP nelle cellule MSI2 KO, che presumibilmente determinerà la morte cellulare programmata (rilevabile però soltanto più tardivamente dopo 72h di trattamento). Quindi, per far fronte all'inibizione della glicolisi indotta dal GC (come osservato al Seahorse), le cellule SEM CNTRL mettono in atto un meccanismo di

“compensazione” iperattivando il mitocondrio, che tramite la respirazione mitocondriale garantisce la produzione di ATP per poter sopravvivere. Le cellule MSI2 KO invece non riescono a mantenere un livello adeguato di produzione di ATP che consenta loro di sopravvivere e vanno incontro a morte cellulare per deficit energetico. E’ plausibile che l’assenza di MSI2 causi un difetto funzionale sull’attività mitocondriale della cellula, la quale non riesce ad attivare la respirazione mitocondriale come meccanismo compensatorio per garantire un adeguato fabbisogno energetico necessario per sopravvivere.

La plasticità metabolica (ovvero la capacità di riprogrammarsi in base a stimoli esogeni o necessità intrinseche) è una caratteristica essenziale delle cellule tumorali. La via glicolitica (anerobica) e la respirazione mitocondriale sono le due vie principali di produzione di ATP per la cellula. Dalla scoperta del Dr. Otto Warburg nel 1930, secondo cui la cellula tumorale predilige la glicolisi come principale via per la produzione di ATP, numerosissimi studi hanno studiato vari aspetti del metabolismo energetico della cellula tumorale. Sebbene l’ipotesi di Warburg postuli che la cellula tumorale è fortemente dipendente dal glucosio (*“glucose-addicted”*), studi più recenti hanno dimostrato che l’attività mitocondriale è essenziale per la cellula tumorale, soprattutto in condizioni di stress o in cui l’omeostasi è perturbata, o per far fronte a una richiesta energetica più elevata. Ad esempio, in condizioni in cui la glicolisi è inibita, o se il glucosio è scarso nel microambiente cellulare, la respirazione mitocondriale aumenta per “effetto Pasteur”. La plasticità metabolica è implicata ad esempio, nella capacità della cellula tumorale di metastatizzare, e potrebbe avere un ruolo nella resistenza alle terapie e nella ricaduta di malattia. Comprendere i fini meccanismi molecolari che regolano il metabolismo cellulare e poter agire su essi potrebbe rappresentare quindi una strategia efficace per bersagliare la cellula tumorale.

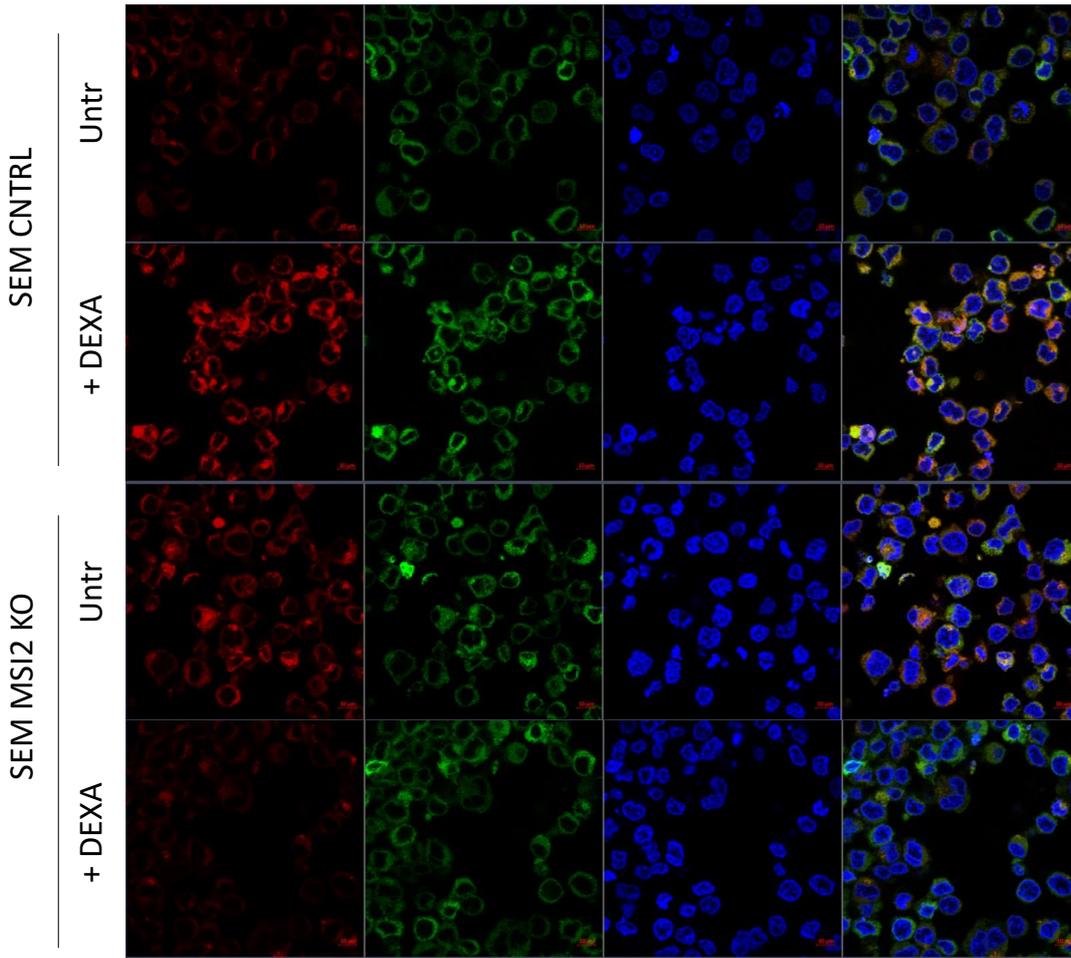
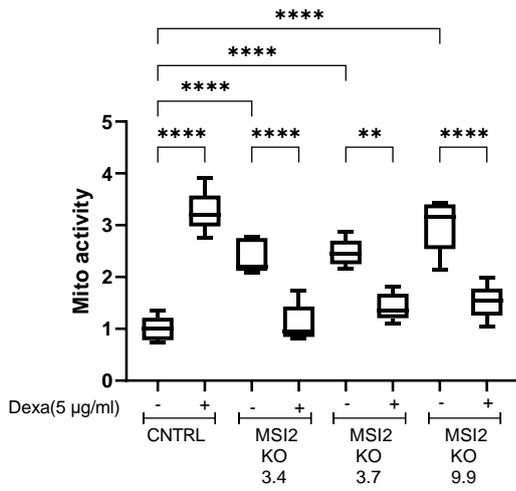
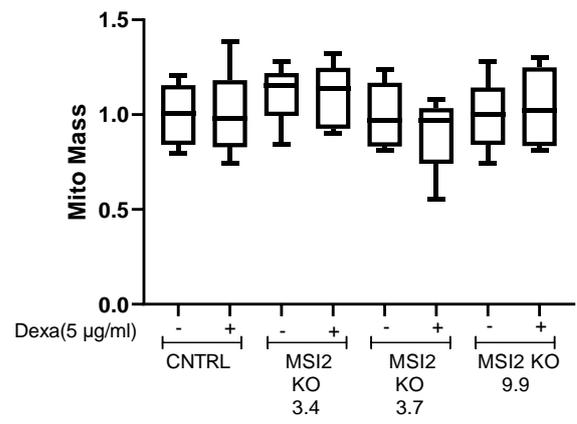
A**B****C**

Figura 6. Analisi dell'attività mitocondriale tramite microscopia confocale

(A) Analisi del potenziale di membrana mitocondriale (MMP) delle cellule SEM CNTRL e MSI2 KO a livello basale e dopo trattamento con Desametasone (5 µg/ml per 24h). Segnale Rosso: MitoTracker *red* (misura il potenziale di membrana mitocondriale, MMP); Segnale verde: Mitotracker *green* (misura la massa mitocondriale); Segnale Blu: Hoechst 33342 (*staining* dei nuclei). Le immagini riportate sono relative ad un esperimento rappresentativo. (B) Quantificazione dell'attività mitocondriale. I valori riportati nell'istogramma si riferiscono al rapporto tra la media del segnale rosso (attività) e la media del segnale verde (massa) normalizzato sul segnale blu (nuclei), rapportati sul campione SEM CNTRL non trattato. (C) Quantificazione della massa mitocondriale. I valori si riferiscono al rapporto tra la media del segnale verde (biomassa) e la media del segnale blu (nuclei), rapportati al campione SEM CNTRL non trattato. Per ogni campo sono state catturate 10 immagini (circa 200 cellule). **p<0,01 ****p<0,0001 (One-way Anova).

Efficacia del co-trattamento con inibitori *Oxphos* e GC *in vitro* e *in vivo*

I dati ottenuti nel nostro studio (microscopia confocale e analisi dei profili metabolici tramite Seahorse) suggeriscono che il metabolismo mitocondriale possa essere responsabile della resistenza delle cellule di LLA MLL-r ai GC. Per testare questa ipotesi, abbiamo utilizzato agenti che bloccano l'attività mitocondriale agendo da *Oxphos inhibitors*: Metformina e Tigeciclina (entrambi approvati FDA). Gli inibitori della fosforilazione ossidativa sono una classe di farmaci che recentemente sta riscuotendo un notevole interesse nella pratica clinica per la cura dei tumori. Le cellule tumorali sfruttano oltremodo la fosforilazione ossidativa per la produzione di ATP mitocondriale, per progredire *in vivo*. In diversi tumori, infatti, tra cui le leucemie, è stato osservato un incremento della fosforilazione ossidativa⁴⁸. La Metformina è un biguanide utilizzato in clinica per il trattamento del diabete che agisce inibendo il complesso I della catena di trasporto degli elettroni. La Tigeciclina è un antibiotico utilizzato per trattare infezioni microbiche, inibisce la traduzione proteica mitocondriale poiché lega la subunità 30S del ribosoma e impedisce all'amminoacil tRNA di entrare nel sito A; possiede quindi un'attività (indiretta) di inibizione della respirazione mitocondriale.

Le cellule SEM (resistenti ai GC) sono state trattate *in vitro* con le medesime dosi scalari di Desametasone e Metilprednisolone usate in precedenza, da solo o in combinazione con un inibitore Oxphos (Metformina 10 mM o Tigeciclina 3 µM). L'analisi della vitalità cellulare dopo 72h di trattamento dimostra che l'uso di inibitori Oxphos (Metformina o Tigeciclina) aumenta l'efficacia del trattamento con GC (Desametasone o Metilprednisolone) e l'effetto della combinazione è sinergico (**Fig. 7A**). Risultati analoghi sono stati ottenuti anche in una seconda linea GC-resistente, le KOPN8,

sottoposte a trattamento *in vitro* con Metilprednisolone o Desametasone in combinazione con la Tigeciclina (3 μ M) (**Fig. 7B**).

E' importante notare che gli effetti citotossici del trattamento con inibitori Oxphos in combinazione con GC riproducono quelli ottenuti combinando Ro 08-2750 in combinazione con GC e rafforzano l'ipotesi secondo cui MSI2 possa avere un ruolo nella resistenza ai GC, attraverso la regolazione della respirazione mitocondriale.

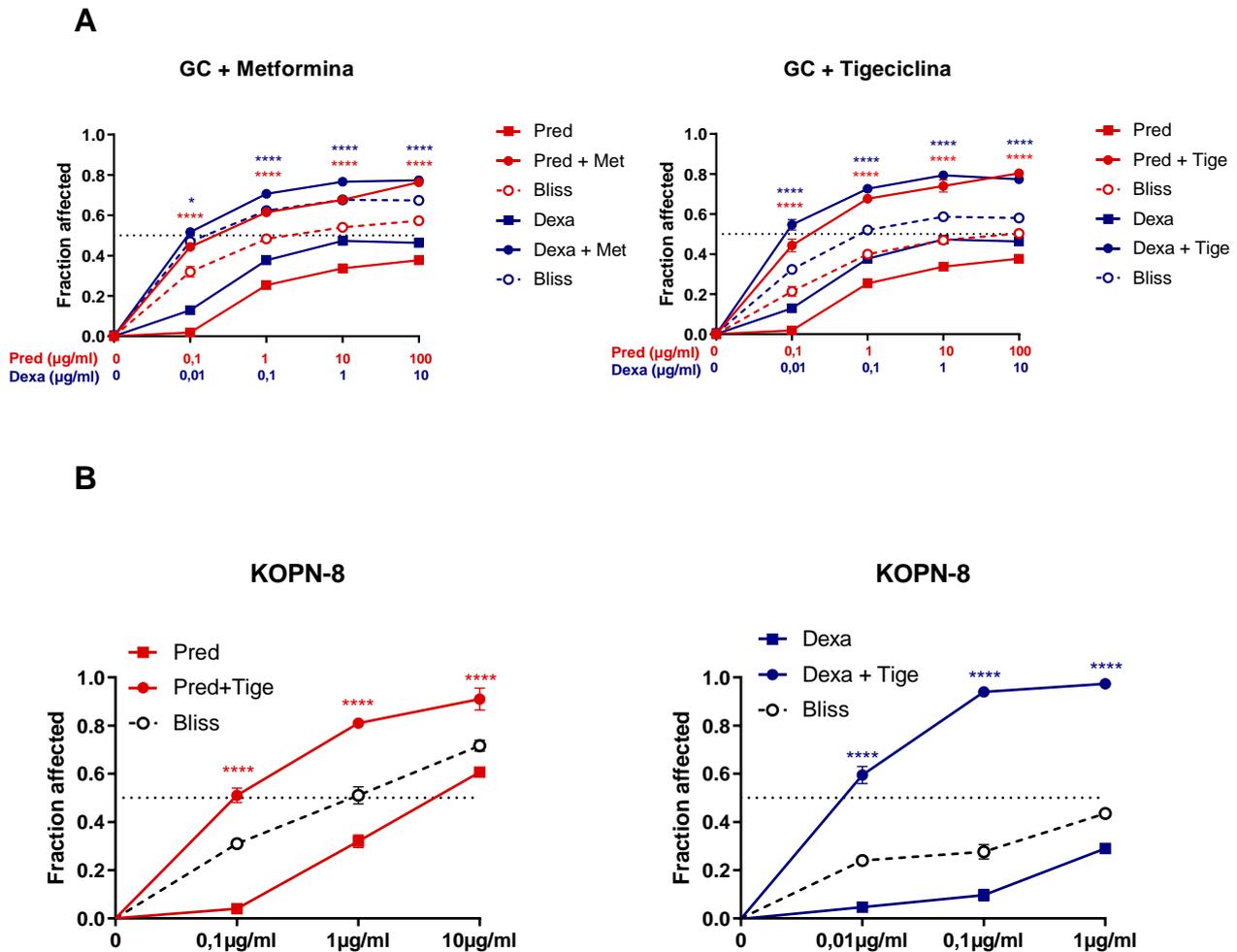


Figura 7. Effetto del co-trattamento con inibitori Oxphos e GC sulle linee cellulari *in vitro*

(A) Analisi della vitalità cellulare sulla linea cellulare SEM trattate *in vitro* con quattro dosi scalari di Metilprednisolone (Pred, in rosso) o Desametasone (Dexa, in blu) in combinazione con una dose sub-citotossica costante di Metformina (Met, 10mM) o Tigeciclina (Tige, 3 μ M). *Fraction affected*: la vitalità cellulare è stata determinata dopo 72h di trattamento tramite CellTiterGlo. I valori (media del triplicato sperimentale) sono normalizzati sul controllo non trattato. (B) Analisi dell'apoptosi nella linea cellulare KOPN-8 trattate *in vitro* con tre dosi scalari di Metilprednisolone (Pred, in rosso) o Desametasone (Desa, in

blu) in combinazione con una dose sub-citotossica costante di Tigeciclina (Tige, 3 μ M). *Fraction affected*: la mortalità cellulare dopo 72h di trattamento è stata valutata tramite marcatura Annessina V/7-AAD al FACS. I valori (media del triplicato sperimentale) sono normalizzati sul controllo non trattato. Bliss: Bliss score. * $p < 0,05$ **** $p < 0,0001$ (Two-way Anova, combo vs. Bliss).

Per avvalorare i risultati *in vitro*, abbiamo condotto esperimenti *in vivo* in cui le cellule SEM sono state trapiantate in topi NSG immunodeficienti (2×10^6 per topo, in 12 topi). Dopo tre giorni dal trapianto i topi sono stati randomizzati in 4 gruppi sperimentali: veicoli, trattati solo con Desametasone (5 mg/kg somministrazione intraperitoneale una a volta al giorno, 5 giorni su 7), trattati solo con IACS-010759 (un analogo della Metformina, 7,5 mg/kg, somministrazione per os tramite *oral gavage*, 3 volte a settimana) oppure trattati con una combinazione dei due farmaci (**Fig. 8A**). La dose ottimale di Desametasone da usare per gli esperimenti di combinazione è stata determinata empiricamente in un esperimento preliminare di *dose finding in vivo*. La dose di 5 mg/kg è risultata essere la dose efficace che inibisce l'*engraftment* al midollo del 50% nei topi trattati (**Fig. 8B**). Negli esperimenti di combinazione *in vivo*, l'analisi dell'*engraftment* dopo tre settimane di trattamento dimostra una significativa riduzione della percentuale di cellule leucemiche umane hCD19⁺/hCD45⁺ nel midollo dei topi trattati con Desametasone + IACS-010759 rispetto ai topi controllo che hanno ricevuto solo il veicolo o trattati con i due singoli farmaci (**Fig. 8C**). La percentuale di cellule leucemiche è stata valutata anche negli organi ematopoietici secondari, ovvero il sistema nervoso centrale (plesso meningeo) e la milza. IACS-010759 non sembra avere effetto sulla metastatizzazione al CNS, mentre il trattamento con Desametasone, da solo e (ancor più) in combinazione con IACS-010759 riducono significativamente la diffusione delle cellule leucemiche al CNS (**Fig. 8D**). Inoltre, il trattamento con Desametasone o IACS-010759 in singolo e in combinazione riducono significativamente l'*engraftment* nella milza (**Fig. 8E**). Anche la cellularità e il peso della milza appaiono nettamente inferiori dopo trattamento con Desametasone da solo o in combinazione con IACS-010759 (**Fig. 8F**). In conclusione, il trattamento in combinazione con Desametasone e IACS-010759 ha un potente effetto anti-leucemico sui topi e determina la completa eradicazione della leucemia *in vivo*.

Il nostro studio mette quindi in luce nuove vulnerabilità metaboliche della LLA infantile MLL-r che possono essere sfruttate e bersagliate al fine di superare la resistenza farmacologica e migliorare la prognosi dei pazienti. Ulteriori esperimenti *in vivo* con blasti primari di pazienti *infant* con LLA MLL-r saranno necessari per confermare i dati preliminari ottenuti usando la linea cellulare SEM.

In linea con i nostri risultati, altri recenti studi preclinici in letteratura riportano l'efficacia del trattamento con *Oxphos inhibitor*, avvalorando ulteriormente l'ipotesi secondo cui il metabolismo mitocondriale della cellula leucemica è implicato nella resistenza ai farmaci. Nell'ambito della LLA-T ad esempio alcuni gruppi hanno già dimostrato che l'inibizione della glicolisi e della fosforilazione ossidativa può aumentare l'efficacia del trattamento con GC ⁴⁹.

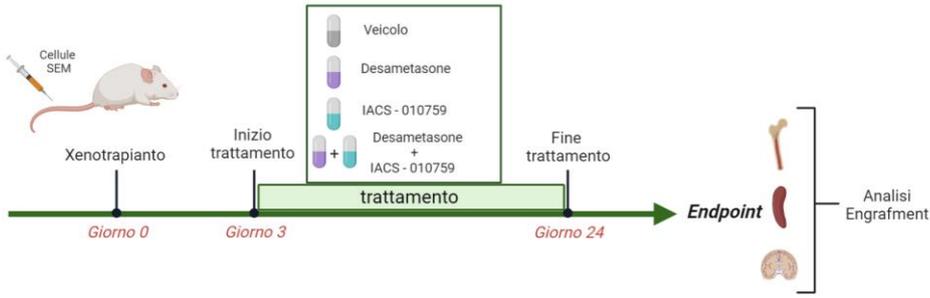
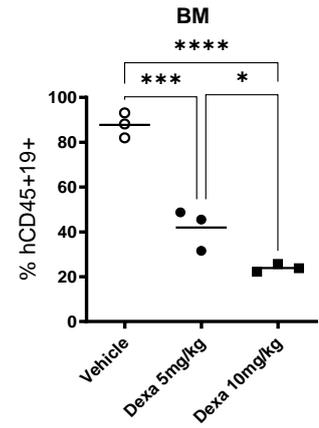
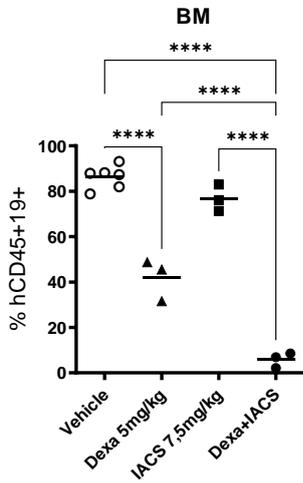
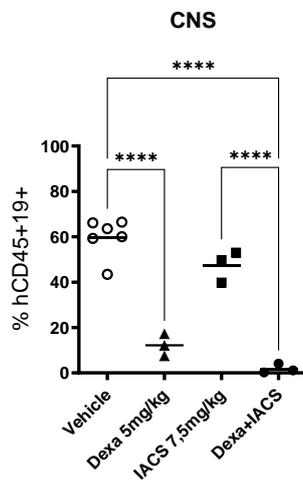
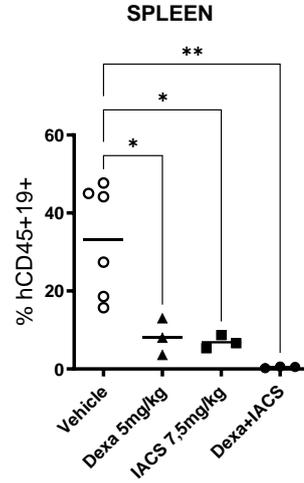
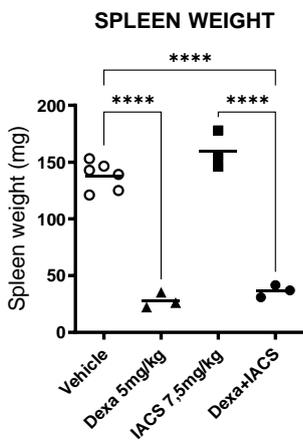
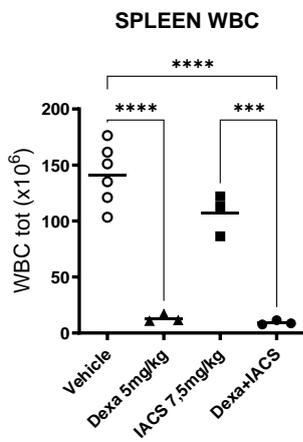
A**B****C****D****E****F**

Figura 8. Trattamento *in vivo* con Desametasone in combinazione con IACS-010759

(A) Rappresentazione schematica dell'esperimento *in vivo*. (B) *Dose finding in vivo*. Analisi dell'*engraftment* leucemico (% di cellule hCD45/hCD19 positive) nei topi trapiantati con la linea cellulare SEM e trattati con Desametasone (5 mg/Kg o 10 mg/Kg i.p. una volta al giorno per 5 giorni su 7) valutato nel midollo osseo (BM) dopo 3 settimane di trattamento. (C-E) Analisi dell'*engraftment* leucemico (% di cellule hCD45 /hCD19 positive) nei topi trapiantati con la linea cellulare SEM e trattati con Desametasone (5 mg/Kg i.p. una volta al giorno per 5 giorni su 7) IACS-010759 (7,5 mg/Kg per os una volta al giorno per 3 volte a settimana), o una combinazione dei due farmaci. I topi sono stati sacrificati dopo 3 settimana di trattamento e l'*engraftment* leucemico è stato valutato nel midollo osseo (BM) (C), nel plesso meningeo del sistema nervoso centrale (CNS) (D) e nella milza (SPLEEN) (E). (F) Analisi della cellularità (WBC: numero totale di globuli bianchi) e del peso della milza (SPLEEN WEIGHT) nei topi trattati valutata all'*endpoint*. *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 (One-way Anova)

Ro 08-2750 ha un effetto sinergico in combinazione con Venetoclax

Da un precedente esperimento di screening condotto sulle cellule SEM trattate con Ro 08-2750 è emerso che diversi farmaci appartenenti alla famiglia di inibitori di BCL-2 sembrano agire in modo sinergico con Ro 08-2750. In quest'ultima parte del mio progetto di tesi mi sono occupata di validare questo dato. In particolare, la nostra attenzione si è focalizzata sul Venetoclax (ABT-199) un inibitore selettivo di Bcl2, già in uso in molti trial clinici per pazienti affetti da leucemia. Questo farmaco è stato recentemente introdotto in un nuovo trial clinico del *St.Jude Children Hospital* per pazienti *infant* con LLA MLL-r (COG AALL2122) in combinazione con il Blinatumomab e la chemioterapia standard adottata dal protocollo *Interfant-06*.

Il trattamento con Venetoclax in combinazione con Ro 08-2750 è stato testato su tre linee cellulari di LLA MLL-r *in vitro* (Fig. 9A) o in campioni di PDX derivati da tre pazienti con LLA *infant* MLL::AF4+ *ex vivo* (Fig. 9B). A seconda della sensibilità delle cellule (linee o PDX) ai due farmaci (precedentemente valutata tramite esperimenti preliminari di titolazione) sono state utilizzate diverse concentrazioni di Venetoclax e di Ro 08-2750 nel range dell' EC_{50} specifico di ciascun farmaco. Dopo 72h di trattamento, l'effetto antileucemico del trattamento è stato valutato al FACS tramite marcatura con Annessina V/7-AAD. I nostri risultati rivelano un significativo effetto sinergico della combinazione dei due farmaci, osservabile sia nelle linee cellulari che nei campioni di PDX (Fig. 9).

In linea con i nostri dati, un importante studio condotto sul linfoma a cellule B identifica BCL-2 quale *target* diretto di MSI2. In questo studio il trattamento delle cellule di linfoma con Ro 08-2750 riduce significativamente i livelli proteici di BCL-2⁴². Inoltre, uno studio (attualmente in corso) condotto dal gruppo del Dr. Meyer, università di Ulm, ha dimostrato che il metabolismo mitocondriale della

LLA sembrerebbe avere un ruolo di rilievo anche nella resistenza al Venetoclax. Nello specifico, nelle cellule di LLA in cui è stata indotta la resistenza acquisita al Venetoclax, i mitocondri sembrano essere più attivi, e il trattamento con Oligomicina (inibitore OXPHOS) insieme a Venetoclax sembrerebbe revertire questa resistenza⁵⁰. In conclusione, dunque, l'uso degli inibitori Oxphos potrebbe essere applicato alla pratica clinica, in combinazione con altri farmaci anti-leucemici.

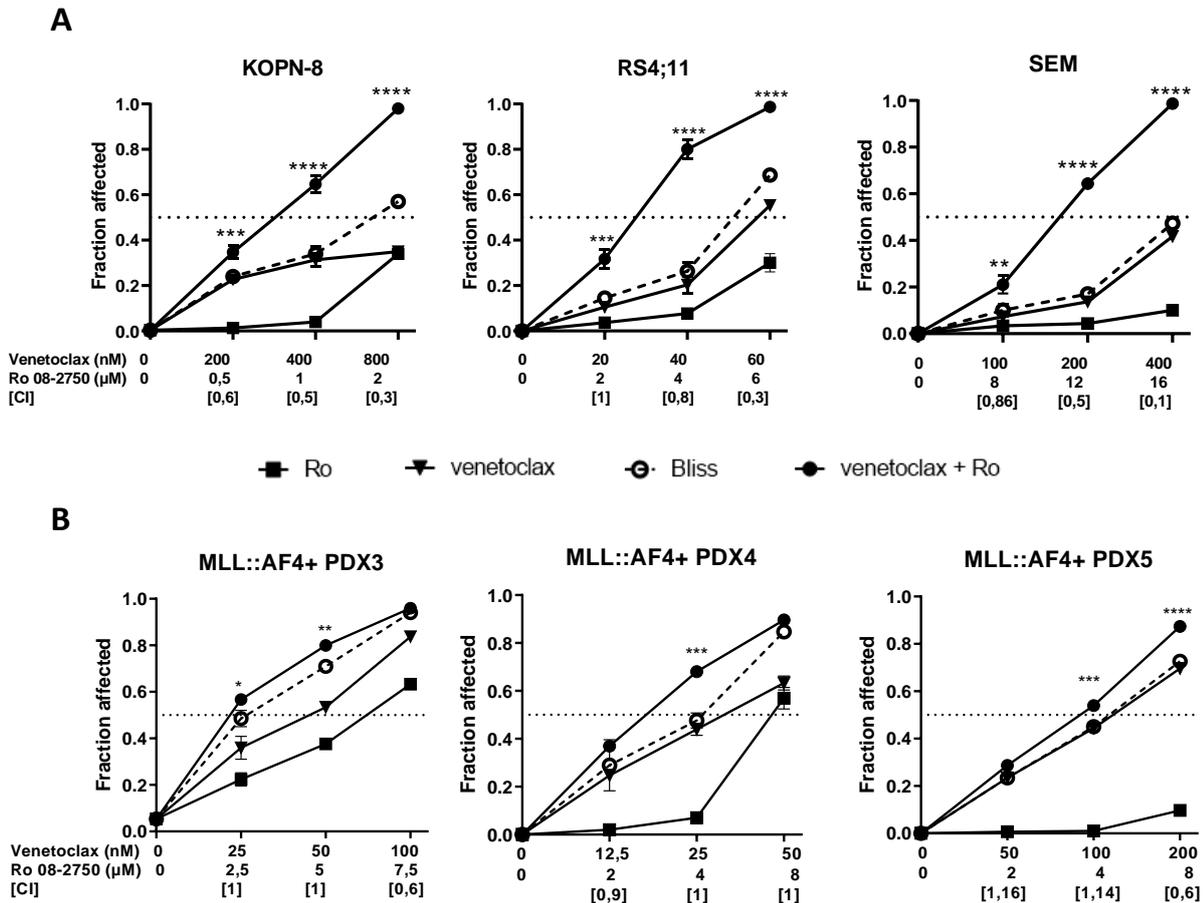


Figura 9. Effetto del trattamento con Ro 08-2750 in combinazione con Venetoclax

Analisi della mortalità cellulare su tre linee cellulari LLA MLL-r *in vitro*: KOPN-8, RS4;11, SEM (A) e su tre campioni di PDX derivati da LLA infantile MLL-r *ex vivo* (B) dopo trattamento con Venetoclax e Ro 08-2750. *Fraction affected*: percentuale di cellule morte (Annessina V/7-AAD positive al FACS) dopo 72h di trattamento. I valori si riferiscono alla media di triplicati sperimentali, normalizzata su controlli non trattati. Bliss: Bliss score CI: Combination index. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$ (Two-way Anova, combo vs. Bliss).

Il triplo trattamento con Ro 08-2750, Venetoclax e Desametasone eradica le cellule di LLA MLL-r *in vitro* ed *ex vivo*

Date le evidenze finora ottenute riguardo l'effetto benefico del trattamento con l'inibitore di MSI2 Ro 08-2750 in combinazione sia con farmaci GC sia con l'inibitore di Bcl2 Venetoclax, in ultima analisi abbiamo provato ad effettuare un triplo trattamento con Ro 08-2750, Venetoclax e Desametasone. L'uso di una mono-terapia si è di fatto rivelata scarsamente efficace nella pratica clinica per curare i tumori; bensì è di fondamentale importanza implementare combinazioni farmacologiche efficaci, per bersagliare il tumore su diversi fronti, aumentando così l'efficacia terapeutica e diminuendo il rischio di sviluppare resistenza.

Il triplo trattamento per 72h con Ro 08-2750, Venetoclax e Desametasone sulla linea cellulare SEM *in vitro* (**Fig. 10A**) o su un campione di PDX di LLA *infant* MLL::AFF4+ *ex vivo* (**Fig. 10B**) risulta avere un forte effetto antileucemico se comparato all'effetto dei singoli farmaci e porta alla completa eradicazione della leucemia. Inoltre, poiché l'effetto ottenuto dalla combinazione dei tre farmaci è superiore rispetto al Bliss Score stimato (effetto stimato che si otterrebbe sommando l'effetto dei tre singoli farmaci), questa tripla combinazione risulta avere un effetto sinergico.

Pertanto, i nostri risultati mettono in luce la possibilità di combinare l'uso di un inibitore di MSI2 (come Ro 08-2750) in associazione alla terapia con Venetoclax e i glucocorticoidi come futura strategia terapeutica per trattare i pazienti *infant*.

Tuttavia, l'applicazione di Ro 08-2750 alla pratica clinica presenta delle limitazioni. Innanzitutto, si tratta di un farmaco sperimentale, non ancora approvato dagli enti regolatori FDA/EMA e di cui ad oggi non si conosce l'eventuale tossicità nell'uomo. Inoltre, i dati riportati negli attuali studi preclinici su modelli murini di AML, CLL, e B-linfoma ad oggi disponibili in letteratura, fanno trapelare gli effetti limitati del farmaco *in vivo*, principalmente dovuti alla scarsa solubilità del farmaco in DMSO che limita la massima dose amministrabile nel topo. Per ovviare a queste limitazioni, una valida alternativa potrebbe essere quella di usare IACS-010759 (al posto di Ro 08-2750) nel triplo trattamento in combinazione con Venetoclax e GC, dato che MSI2 sembra avere un ruolo nel metabolismo mitocondriale responsabile della resistenza ai farmaci. Ovviamente, serviranno ulteriori studi per confermare l'efficacia terapeutica di questo approccio farmacologico proposto.

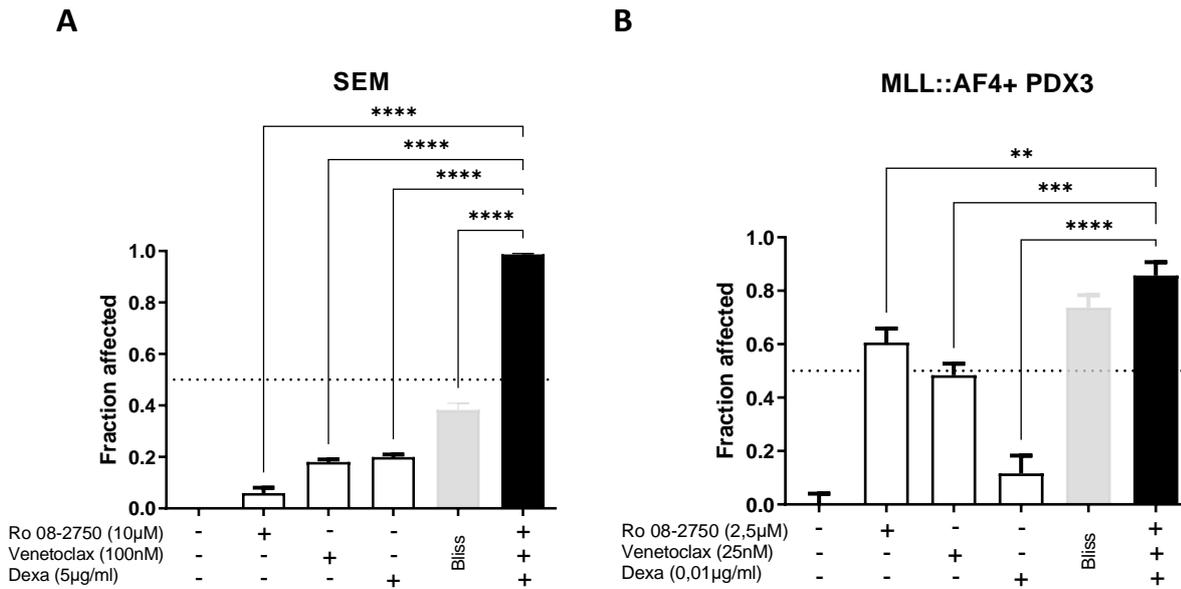


Figura 10. Effetto del triplo trattamento con Ro 08-27750 + Venetoclax + Desametasona *in vitro* ed *ex vivo*

Analisi della mortalità cellulare sulla linea cellulare SEM *in vitro* (A) e su un campione PDX di LLA infantile MLL::AF4+ *ex vivo* (B), trattati con Ro 08-2750, Venetoclax, Desametasona o una combinazione dei tre farmaci. Le dosi (subcitotossiche) usate per ciascun farmaco singolarmente sono state determinate in esperimenti preliminari di titolazione. *Fraction affected*: percentuale di cellule morte (Annessina V/7-AAD positive al FACS) dopo 72h di trattamento. La media è calcolata su triplicati sperimentali, e normalizzata sul controllo non trattato. Bliss: Bliss score **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 (One-way Anova)

Conclusioni

Il nostro studio ha indagato il ruolo funzionale, che fino ad oggi rimaneva inesplorato, di Musashi-2 (MSI2) nella leucemia linfoblastica acuta infantile MLL-riarrangiata (LLA *infant* MLL-r).

In particolare, abbiamo dimostrato che:

- MSI2 è direttamente coinvolto nella resistenza ai farmaci glucocorticoidi (Metilprednisolone e Desametasone), caratteristica tipica dei pazienti *infant* affetti da LLA MLL-r. L'inibizione farmacologica di MSI2 tramite l'uso dell'inibitore di MSI2 Ro 08-2750, sensibilizza le linee cellulari umane di LLA MLL-r *in vitro* e i campioni di PDX *ex-vivo* all'azione dei glucocorticoidi. Questi risultati corroborano l'ipotesi secondo cui MSI2 rappresenta un nuovo potenziale *target* terapeutico per la LLA infantile MLL-r e aprono la strada per l'applicazione degli inibitori di MSI2 in clinica.
- Le cellule in cui MSI2 è abrogato sono più suscettibili a perturbazioni metaboliche. L'inibizione della glicolisi mediante l'uso del 2-DG nei cloni MSI2 KO e nelle linee cellulari di LLA MLL-r in cui MSI2 è inibito farmacologicamente con Ro 08-2750, ha un potente effetto citotossico. Sarà interessante in futuro approfondire il ruolo presunto di MSI2 nel metabolismo energetico e nella plasticità metabolica della cellula leucemica tramite studi di metabolomica.
- MSI2 ha un ruolo nel metabolismo bioenergetico della cellula leucemica. L'ablazione del gene MSI2 impatta in modo significativo l'attività mitocondriale. Le cellule MSI2 KO hanno un'attività mitocondriale aumentata già a livello basale (in condizioni di omeostasi). In seguito al trattamento con Desametasone, mentre il mitocondrio delle cellule in cui MSI2 è espresso si iperattiva (per compensare l'inibizione della glicolisi indotta dai glucocorticoidi), nei cloni MSI2 KO l'attività mitocondriale e di conseguenza la capacità di produrre ATP viene completamente abbattuta, ragione per cui le cellule non sopravvivono.
- Bersagliare la respirazione mitocondriale abbatte la resistenza ai glucocorticoidi *in vitro* e *in vivo*. Il metabolismo mitocondriale è direttamente coinvolto nella resistenza ai farmaci della cellula leucemica. Il trattamento con gli inibitori della fosforilazione ossidativa (Oxphos) si è dimostrato altamente efficace in combinazione coi glucocorticoidi, sia *in vitro* che *in vivo*.
- L'inibitore di MSI2 Ro 08-2750 ha un effetto sinergico in combinazione con l'inibitore di Bcl2 Venetoclax. Abbiamo infatti osservato che la combinazione con Ro 08-2750 + Venetoclax ha affetto sinergico, e la tripla combinazione con Ro 08-2750 + Venetoclax + Desametasone riduce drasticamente la vitalità sia nelle linee cellulari *in vitro* che in campioni PDX *ex vivo*. Ulteriori studi pre-clinici *in vivo* su campioni di blasti primari saranno necessari per avvalorare questo dato e gettare le basi per una futura applicazione clinica di tale strategia terapeutica.

Bibliografia

1. Lightfoot, T., Smith, A. & Roman, E. Leukemia. *International Encyclopedia of Public Health* 410–418 (2017) doi:10.1016/B978-0-12-803678-5.00253-8.
2. Kato, M. *Pediatric acute lymphoblastic leukemia. Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia* (Springer Singapore, 2019). doi:10.1007/978-981-15-0548-5.
3. Brown, P. Treatment of infant leukemias: challenge and promise. *Hematology/ the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program* vol. 2013 Preprint at <https://doi.org/10.1182/asheducation-2013.1.596> (2013).
4. Ibrahimova, A., Pommert, L. & Breese, E. H. Acute Leukemia in Infants. *Curr Oncol Rep* **23**, 27 (2021).
5. Rice, S. & Roy, A. MLL-rearranged infant leukaemia: A ‘thorn in the side’ of a remarkable success story. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* vol. 1863 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2020.194564> (2020).
6. Greaves, M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer* **18**, 471–484 (2018).
7. Andersson, A. K. *et al.* The landscape of somatic mutations in infant MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemias. *Nat Genet* **47**, (2015).
8. Bardini, M. *et al.* DNA copy-number abnormalities do not occur in infant ALL with t(4;11)/MLL-AF4. *Leukemia* **24**, (2010).
9. Dobbins, S. E. *et al.* The silent mutational landscape of infant MLL-AF4 pro-B acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* **52**, (2013).
10. Krivtsov, A. v. & Armstrong, S. A. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nature Reviews Cancer* vol. 7 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrc2253> (2007).
11. Eguchi, M., Eguchi-Ishimae, M. & Greaves, M. The Role of the MLL Gene in Infant Leukemia. *Int J Hematol* **78**, 390–401 (2003).
12. Marschalek, R. MLL Leukemia and Future Treatment Strategies. *Arch Pharm (Weinheim)* **348**, 221–228 (2015).
13. Bernt, K. M. *et al.* MLL-Rearranged Leukemia Is Dependent on Aberrant H3K79 Methylation by DOT1L. *Cancer Cell* **20**, 66–78 (2011).
14. Brown, P., Pieters, R. & Biondi, A. How I treat infant leukemia. *Blood* **133**, 205–214 (2019).
15. Kotecha, R. S. Updates in infant acute lymphoblastic leukemia and the potential for targeted therapy. *Hematology* **2022**, 611–617 (2022).
16. van der Sluis, I. M. *et al.* A Phase 2 Study to Test the Feasibility, Safety and Efficacy of the Addition of Blinatumomab to the Interfant06 Backbone in Infants with Newly Diagnosed *KMT2A* -Rearranged Acute Lymphoblastic Leukemia. a Collaborative Study of the Interfant Network. *Blood* **138**, 361–361 (2021).
17. el Chaer, F., Keng, M. & Ballen, K. K. MLL-Rearranged Acute Lymphoblastic Leukemia. *Current Hematologic Malignancy Reports* vol. 15 83–89 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s11899-020-00582-5> (2020).

18. Benito, J. M. *et al.* MLL-Rearranged Acute Lymphoblastic Leukemias Activate BCL-2 through H3K79 Methylation and Are Sensitive to the BCL-2-Specific Antagonist ABT-199. *Cell Rep* **13**, 2715–2727 (2015).
19. Ramakers-van Woerden, N. I. *et al.* In vitro drug-resistance profile in infant acute lymphoblastic leukemia in relation to age, MLL rearrangements and immunophenotype. *Leukemia* **18**, (2004).
20. Scheijen, B. Molecular mechanisms contributing to glucocorticoid resistance in lymphoid malignancies. *Cancer Drug Resistance* (2019) doi:10.20517/cdr.2019.29.
21. Olivás-Aguirre, M., Torres-López, L., Pottosin, I. & Dobrovinskaya, O. Overcoming Glucocorticoid Resistance in Acute Lymphoblastic Leukemia: Repurposed Drugs Can Improve the Protocol. *Front Oncol* **11**, (2021).
22. Schlossmacher, G., Stevens, A. & White, A. Glucocorticoid receptor-mediated apoptosis: mechanisms of resistance in cancer cells. *Journal of Endocrinology* **211**, 17–25 (2011).
23. Gruver-Yates, A. & Cidlowski, J. Tissue-Specific Actions of Glucocorticoids on Apoptosis: A Double-Edged Sword. *Cells* **2**, 202–223 (2013).
24. Stam, R. W. *et al.* Association of high-level MCL-1 expression with in vitro and in vivo prednisone resistance in MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **115**, 1018–1025 (2010).
25. Buentke, E. *et al.* Glucocorticoid-induced cell death is mediated through reduced glucose metabolism in lymphoid leukemia cells. *Blood Cancer J* **1**, e31–e31 (2011).
26. Candelli, T. *et al.* Identification and characterization of relapse-initiating cells in MLL-rearranged infant ALL by single-cell transcriptomics. *Leukemia* **36**, (2022).
27. Kudinov, A. E., Karanicolas, J., Golemis, E. A. & Bumber, Y. Musashi RNA-binding proteins as cancer drivers and novel therapeutic targets. *Clinical Cancer Research* vol. 23 Preprint at <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2728> (2017).
28. Fox, R. G., Park, F. D., Koechlein, C. S., Kritzik, M. & Reya, T. Musashi Signaling in Stem Cells and Cancer. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* vol. 31 Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100814-125446> (2015).
29. Kudinov, A. E., Karanicolas, J., Golemis, E. A. & Bumber, Y. Musashi RNA-binding proteins as cancer drivers and novel therapeutic targets. *Clinical Cancer Research* vol. 23 Preprint at <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2728> (2017).
30. Sun, J., Sheng, W., Ma, Y. & Dong, M. Potential role of musashi-2 rna-binding protein in cancer emt. *OncoTargets and Therapy* vol. 14 Preprint at <https://doi.org/10.2147/OTT.S298438> (2021).
31. Guo, Q. Q. *et al.* RNA-Binding Protein MSI2 Binds to miR-301a-3p and Facilitates Its Distribution in Mitochondria of Endothelial Cells. *Front Mol Biosci* **7**, (2021).
32. de Andrés-Aguayo, L., Varas, F. & Graf, T. Musashi 2 in hematopoiesis. *Curr Opin Hematol* **19**, 268–272 (2012).
33. Li, M. *et al.* RNA-binding protein MSI2 isoforms expression and regulation in progression of triple-negative breast cancer. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* **39**, (2020).
34. MacNicol, M. C. *et al.* Evasion of regulatory phosphorylation by an alternatively spliced isoform of Musashi2. *Sci Rep* **7**, (2017).
35. Kang, D., Lee, Y. & Lee, J.-S. RNA-Binding Proteins in Cancer: Functional and Therapeutic Perspectives. *Cancers (Basel)* **12**, 2699 (2020).

36. Ito, T. *et al.* Regulation of myeloid leukaemia by the cell-fate determinant Musashi. *Nature* **466**, (2010).
37. Kharas, M. G. *et al.* Musashi-2 regulates normal hematopoiesis and promotes aggressive myeloid leukemia. *Nat Med* **16**, (2010).
38. Schuschel, K. *et al.* RNA-binding proteins in acute leukemias. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 21 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms21103409> (2020).
39. Hattori, A. *et al.* Cancer progression by reprogrammed BCAA metabolism in myeloid leukaemia. *Nature* **545**, 500–504 (2017).
40. Park, S. M. *et al.* Musashi2 sustains the mixed-lineage leukemia-driven stem cell regulatory program. *Journal of Clinical Investigation* **125**, (2015).
41. Palacios, F. *et al.* Musashi 2 influences chronic lymphocytic leukemia cell survival and growth making it a potential therapeutic target. *Leukemia* **35**, 1037–1052 (2021).
42. Erazo, T. *et al.* TP53 mutations and RNA-binding protein MUSASHI-2 drive resistance to PRMT5-targeted therapy in B-cell lymphoma. *Nat Commun* **13**, 5676 (2022).
43. Mu, Q. *et al.* High expression of Musashi-2 indicates poor prognosis in adult B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* **37**, (2013).
44. Aly, R. M. & Ghazy, H. F. Prognostic significance of MSI2 predicts unfavorable outcome in adult B-acute lymphoblastic leukemia. *Int J Lab Hematol* **37**, (2015).
45. Zhao, H. Z. *et al.* Prognostic significance of the Musashi-2 (MSI2) gene in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Neoplasma* **63**, (2016).
46. Han, Y. *et al.* Musashi-2 Silencing Exerts Potent Activity against Acute Myeloid Leukemia and Enhances Chemosensitivity to Daunorubicin. *PLoS One* **10**, e0136484 (2015).
47. Minuesa, G. *et al.* Small-molecule targeting of MUSASHI RNA-binding activity in acute myeloid leukemia. *Nat Commun* **10**, 2691 (2019).
48. de Beauchamp, L., Himonas, E. & Helgason, G. V. Mitochondrial metabolism as a potential therapeutic target in myeloid leukaemia. *Leukemia* vol. 36 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41375-021-01416-w> (2022).
49. Samuels, A. L., Heng, J. Y., Beesley, A. H. & Kees, U. R. Bioenergetic modulation overcomes glucocorticoid resistance in T-lineage acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* **165**, (2014).
50. Niedermayer, A. *et al.* Venetoclax Resistance in B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia Is Characterized By Increased Mitochondrial Metabolism and Can be Overcome By Co-Targeting Oxidative Phosphorylation. *Blood* **140**, 6358–6359 (2022).