

Studio dell'evoluzione clonale in pazienti di Mieloma Multiplo analizzati in fase di esordio e ricaduta di malattia, trattati in prima linea con una combinazione terapeutica di immunomodulatore e desametasone (RD).

BACKGROUND

Il Mieloma Multiplo (MM) è una patologia caratterizzata da un elevato livello di eterogeneità genomica, rilevabile sia a livello citogenetico che molecolare e rappresentata da alterazioni numeriche e strutturali e da mutazioni puntiformi, coinvolgenti tutti i cromosomi. Le alterazioni possono essere clonali o – più frequentemente – sub-clonali e la “dimensione” del clone portatore di particolari alterazioni può cambiare nel tempo attraverso dinamiche descritte dalla teoria dell'evoluzione clonale.

Questa teoria suggerisce che la frequenza relativa dei sub-cloni di MM (architettura clonale) può variare nel corso dello sviluppo della malattia a causa dell'azione di una pluralità di “pressioni selettive” che, in una chiave di lettura tipicamente “darwiniana”, selezionano i cloni più adatti alla sopravvivenza (a *fitness* maggiore) nell'ecosistema tumorale. Le suddette pressioni selettive possono essere dovute alle interazioni che i cloni tumorali stabiliscono con il sistema immunitario o il microambiente midollare, ma anche all'azione citotossica dovuta ai regimi terapeutici e/o specifici farmaci chemioterapici, potenzialmente in grado di modificare drasticamente la composizione dell'architettura clonale. L'azione combinata delle pressioni selettive elencate può provocare l'acquisizione di caratteristiche di resistenza e aggressività ai cloni di MM, determinando in ultima analisi la ricaduta dei pazienti di MM e la progressione verso stadi più avanzati di malattia.

Al fine di identificare associazioni significative con le traiettorie evolutive seguite dai pazienti di MM studiati e definire nuovi *marker* prognostici evolutivi, in base ai quali stratificare in modo efficace le coorti di pazienti analizzati, si rendono necessari studi capaci di identificare e descrivere con precisione le caratteristiche e l'intensità delle specifiche pressioni selettive, dovute all'azione dei diversi farmaci e alle caratteristiche *baseline* dei pazienti.

Una volta individuate le traiettorie evolutive associate ai regimi terapeutici, diventa possibile valutare l'effetto della pressione selettiva specificamente esercitata da questi, ed eventualmente confrontare le dinamiche evolutive provocate da diversi regimi terapeutici.

Uno dei regimi terapeutici più utilizzati in pazienti anziani con MM prevede l'impiego della combinazione di un immunomodulatore con il desametasone (Revlimid-Desametasone, RD) come terapia di induzione e consolidamento in prima linea. Non è noto ad oggi il ruolo di questa combinazione terapeutica nel modificare le traiettorie evolutive dei cloni di mieloma in corso di trattamento.

SCOPO DEL PROGETTO

Il progetto proposto si inserisce nel contesto dello studio “*Impact of different treatment strategies on clonal evolution in Multiple Myeloma*” (RF-2016-02362532) e ha come obiettivo lo studio dell'evoluzione dell'eterogeneità genomica – in termini di cambiamento del profilo di *copy number alterations* (CNA) - in pazienti analizzati in due fasi del loro decorso clinico (esordio e ricaduta). Il progetto si pone come obiettivo la descrizione delle dinamiche di cambiamento dell'architettura clonale nelle due fasi di malattia e la correlazione tra i

cambiamenti indotti nel profilo genomico e la pressione selettiva esercitata dalle diverse combinazioni di farmaci o dalle specifiche caratteristiche cliniche dei pazienti.

Per lo svolgimento del progetto verranno utilizzate prevalentemente metodiche bioinformatiche e statistiche. In particolare, sarà sviluppata una *pipeline* bioinformatica per la caratterizzazione dell'evoluzione dei profili di copy number ottenuti tramite l'impiego della metodica ULP-WGS. Tale *pipeline* permetterà l'identificazione di sub-cloni (anche molto piccoli) nella popolazione tumorale, attraverso la definizione dei limiti di rilevazione delle alterazioni numeriche.

PIANO SPERIMENTALE

Nello studio sarà inclusa una coorte di 100 pazienti di nuova diagnosi, trattati con RD, per i quali è stato raccolto un campione all'entrata dello studio e, in almeno 20 casi, anche in fase di ricaduta.

L'analisi dei dati sarà eseguita con l'utilizzo di script bioinformatici personalizzati e pacchetti dedicati, sviluppati attraverso il linguaggio di programmazione "R" e "Bash".

In dettaglio, il piano sperimentale prevedrà le seguenti fasi:

1. Raccolta e conservazione del materiale biologico: sangue midollare, sangue periferico e saliva (una sola volta durante il decorso di malattia), raccolte in due fasi successive della malattia.
2. Produzione dei dati e sviluppo pipeline di analisi da applicare ai campioni raccolti e sequenziati con ULP-WGS.
3. Ottimizzazione dei profili di CNA ottenuti mediante la correzione di eventuali bias di analisi e l'applicazione di tools specifici per l'identificazione accurata di eventi subclonali.
4. Analisi del background genomico dei campioni di nuova diagnosi, ed eventualmente delle ricadute raccolte con la pipeline ideata.

RISULTATI ATTESI

1-3 mesi: Biobanking dei campioni, creazione ed ottimizzazione di una pipeline di analisi per esperimenti ULP Whole Genome Sequencing

4-12 mesi: Analisi del background genomico di tutti i campioni collezionati, esordio e ricaduta.

PROSPETTIVE FUTURE

Si prevede di collezionare una quantità significativa di dati provenienti dalla profilazione genomica dei pazienti trattati con RD, sia nella fase di esordio di malattia che all'eventuale ricaduta: lo studio potrebbe continuare con l'identificazione di specifiche "traiettorie evoluzionistiche" dei cloni tumorali, legate all'*outcome* clinico dei pazienti, con la creazione di modelli bioinformatici, a partire da script sviluppati internamente in grado di estrapolare efficacemente e armonizzare i dati ottenuti da esperimenti diversi.

BIBLIOGRAFIA

- Pawlyn, C., Morgan, G. Evolutionary biology of high-risk multiple myeloma. *Nat Rev Cancer* **17**, 543–556 (2017). <https://doi-org.ezproxy.unibo.it/10.1038/nrc.2017.63>
- Morgan, G., Walker, B. & Davies, F. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer* **12**, 335–348 (2012). <https://doi-org.ezproxy.unibo.it/10.1038/nrc3257>
- Chau, M., Wang, H., Lai, Y., Zhang, Y., Xu, F., Tang, Y., Wang, Y., Chen, Z., Leung, T. Y., Chung, J., Kwok, Y. K., Chong, S. C., Choy, K. W., Zhu, Y., Xiong, L., Wei, W., & Dong, Z. (2020). Low-pass genome sequencing: a validated method in clinical cytogenetics. *Human genetics*, *139*(11), 1403–1415. <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02185-9>
- RF-2016-02362532 “*Impact of treatment strategies on clonal evolution on multiple myeloma*”