

S.S. Citometria

Instabilità cromosomica (CIN) nella genesi e progressione tumorale orale e dell'apparato digerente: ruolo di geni del ciclo cellulare e dell'apparato mitotico

Linea di ricerca: 1 - Prevenzione e Cancerogenesi

Programma: c - Basi genetiche e molecolari della trasformazione neoplastica

Responsabile scientifico: Walter Giaretti

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Davide Malacarne, Antonio Cavallero, Mirna Figliomeni, Emanuela Di Nallo, Alessandra Donadini, Massimo Maffei

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: lesioni potenzialmente maligne del cavo orale; lesioni predisponenti e preneoplastiche dell'apparato digerente; fumo di tabacco di sigaretta; instabilità cromosomica; geni del ciclo cellulare; geni dell'apparato mitotico

Altre strutture IST partecipanti: S.S. Oncologia Traslazionale Pediatrica (P. Scaruffi, G.P. Tonini); S.C. Trasferimento Genico (P. Castagnola); S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica (M. Truini); S.C. Endoscopia Interdisciplinare (F. Munizzi); S.C. Oncologia Chirurgica, (F. Cafiero, P. Mereu, M. Scala); S.S. Day Surgery (L. Moresco)

Altri Enti coinvolti: Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, Medicina Orale e Oncologia Orale, Università di Torino (S. Gandolfo); Dipartimento di Scienze Biomediche e Oncologia Umana, Sezione di Patologia, Università di Torino (R. Navone); A.O.U. San Martino, Genova (A. Santelli); Anatomia Patologica, IRCC Candiolo, Torino (M. Risio); Lab. Oncologia Sperimentale e Clinica, Istituto Oncologico, Bari (A. Paradiso); Dip. Oncologia, Azienda Universitaria Policlinico, Palermo (A. Russo); Istituto Oncologico Romagnolo, IOR (D. Calistri, D. Amadori); Fondazione G. Pascale, Napoli (A. Budillon); Genetica e Microbiologia, Università di Bari (C.T. Storlazzi); Department of Pathology, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands (G. Meijer)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: prevenzione primaria/secondaria

Soggetti cofinanziatori: Compagnia di San Paolo; Philip Morris International

Background

Negli ultimi anni, l'evidenza sperimentale di un ruolo dell'instabilità cromosomica (CIN) nella genesi e progressione dei tumori solidi si è molto rafforzata (Kops et al. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nature Rev. Cancer* 2005; 5:773-785; Holland AJ and Cleveland DW. Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nature Rev/Mol Cell Biol* 2009; 10(7):478-487) aprendo la via o confermando nuovi biomarcatori di rischio di cancro per le lesioni preneoplastiche di molti tipi di tumori solidi (Torres-Rendon A, Stewart R, Craig GT, Wells M, Speight PM. DNA ploidy analysis by image cytometry helps to identify oral epithelial dysplasias with a high risk of malignant progression. *Oral Oncol* 2008; 45(6):468-473; Reid BJ, Levine DS, Longton G, Blount PL, Rabinovitch PS. Predictors of progression to cancer in Barrett's esophagus: baseline histology and flow cytometry identify low- and high-risk patient subsets. *Am J Gastroenterol* 2000; 95(7):1669-1676; Rabinovitch PS, Dziadon S, Brentnall TA, Emond MJ, Crispin DA, Haggitt RC et al. Pancolonic chromosomal instability precedes dysplasia and cancer in ulcerative colitis. *Cancer Res* 1999; 59(20):5148-5153; Risques RA, Lai LA, Brentnall TA, Li L, Feng Z, Gallaher J et al. Ulcerative colitis is a disease of accelerated colon aging: evidence from telomere attrition and DNA damage. *Gastroenterology* 2008; 135(2):410-418.).

Anche i meccanismi molecolari alla base di CIN sono stati molto più studiati anche se solo parzialmente compresi (Fujiwara et al. Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature* 2005; 437:1043-1047; Barber TD, McManus K, Yuen KWY, Reis M, Parmigiani G, Shen D et al. Chromatid cohesion defects may underlie chromosome instability in human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(9):3443-3448.). E' anche emerso con notevole forza che le cause di CIN non sono solo più da ricercarsi nei geni specifici dell'apparato mitotico o dei cinetocori ma anche nei geni del ciclo cellulare che sono stati finora piuttosto trascurati. Un nostro lavoro di review (Castagnola P and Giaretti W. *BBA Rev. Cancer* 1756:115/125, 2005) riporta i dati sperimentali della letteratura, inclusi i nostri, che sono a supporto dell'ipotesi di un ruolo di RAS su CIN. Tra i nostri diversi papers pubblicati sull'argomento ne segnaliamo uno, in particolare, ottenuto con metodi di "metaphase-comparative genomic hybridization" in collaborazione con il gruppo di Gerrit Meijer (University of Amsterdam) sulla transizione adenoma-carcinoma coloretale (Hermesen M et al. Colorectal adenoma to carcinoma progression follows multiple pathways of chromosomal instability. *Gastroenterology* 2002; 123:1109-1119). Oltre a continuare ad investigare il modello coloretale e dell'apparato digerente, intendiamo dare una particolare priorità allo studio della genesi e progressione tumorale del cavo orale. Questo modello, caratterizzato da lesioni orali potenzialmente maligne (OPLs), per la maggior parte leucoplachie, è uno dei modelli attualmente più potenzialmente informativi e per cui la prevenzione è fondamentale in quanto il fattore eziologico più importante è il fumo di sigaretta (Napier SS, Speight PM. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. *J. Oral Pathol Med* 2008, 37(1):1-10). Recentemente, abbiamo attivato uno studio multicentrico che ha permesso di investigare, per ora in un numero relativamente piccolo di pazienti con OPLs, le relazioni intercorrenti tra le caratteristiche del paziente, inclusi i

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

fattori di rischio, e della lesione (Pentenero M, Giaretti W, Navone R, Demurtas A, Rostan I, Bertolusso G et al. DNA aneuploidy and dysplasia in oral potentially malignant disorders: Association with cigarette smoking and site. *Oral Oncol* 2009 May 18. [Epub ahead of print]). Oltre alla valutazione della DNA aneuploidia con tecniche di citometria a flusso (FCM) ad alta risoluzione, come già in passato (Giaretti W. Ploidy and proliferation evaluated by flow cytometry. An overview of techniques and impact in oncology. *Tumori* 1991; 77(5):403-419. Review), intendiamo avvalerci, in particolare, della tecnica "oligo-array-comparative genomic hybridization, oaCGH". La FCM ad alta risoluzione può dimostrarsi particolarmente utile per fornire biomarcatori di predizione di rischio di genesi e progressione in un setting clinico di routine. Inoltre, la proprietà di "sorting" della FCM sarà utilizzata per affrontare il problema della eterogeneità tumorale separando le subpopolazioni (singole e multiple) DNA aneuploidi e permettere analisi oa-CGH di maggiore qualità e specificità. Oa-CGH, se confrontata con i metodi di citogenetica convenzionali, permette una risoluzione e una precisa localizzazione di regioni cromosomiche delete e amplificate che possano implicare come conseguenza variazioni in CIN e in caratteristiche proliferative e apoptotiche e facilitare la ricerca di nuovi geni associati al cancro (Grade M et al. Aneuploidy-dependent massive deregulation of the cellular transcriptosome and apparent divergence of the Wnt/beta-catenin signaling pathway in human rectal carcinomas. *Cancer Res.* 2006; 66:267-282; Giaretti W, Venesio T, Prevosto C, Lombardo F, Ceccarelli J, Molinu S, Risio M. Chromosomal instability and APC gene mutations in human sporadic colorectal adenomas. *J Pathol* 2004, 204:193-199; Giaretti W, Rapallo A, Geido E, Scitutto, Merlo F, Risio M, Rossini FP. Specific K-ras2 mutations in human sporadic colorectal adenomas are associated with DNA near-diploid aneuploidy and inhibition of proliferation. *Am J Pathol* 1998, 153:1201-1209; Giaretti W. A model of DNA aneuploidization and evolution in colorectal cancer. *Lab Invest* 1994, 71(6):904-910; Giaretti W. Vanishing conflicts on cancer theories. *Cell Oncol* 2006, 28(1-2):1-2). Il progetto intende attivare sia studi pilota di tipo sperimentale (basati sulle tecniche oa-CGH, FCM, FISH, RT-PCR) che di tipo traslazionale-clinico, grazie alla collaborazione di clinici e patologi operanti in istituzioni di particolare eccellenza, per investigare la possibilità di validare biomarcatori di rischio di cancro per le lesioni predisponenti e preneoplastiche dei tumori orali, coloretali e dell'apparato digerente.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Obiettivo generale del progetto è l'identificazione della base molecolare e funzionale di CIN mediante lo studio delle lesioni preneoplastiche orali (OPLs; in maggioranza, leucoplachie ed eritroplasie) e dei carcinomi orali (SCCs); degli adenomi e adenocarcinomi coloretali sporadici; delle lesioni preneoplastiche e carcinomi gastrici; utilizzando un set dinamico di linee cellulari primarie e commerciali derivandone varianti ingegnerizzate per trasfezione di geni target. Saranno investigati nuovi geni associati ai risultati ottenuti dalle analisi oa-CGH ed alcuni geni noti associati al ciclo cellulare (tra cui KRAS2, APC e TP53) e all'apparato mitotico (tra cui Mad, Bub, Aurora, ed APC). Tra gli obiettivi secondari vogliamo testare l'ipotesi che il danno genomico causato dall'abuso di tabacco e alcohol in OPLs possa essere specifico e individuabile tra i possibili danni valutati con le tecniche coniugate di FCM e oa-CGH e che tali aberrazioni possano essere mediate dalla specificità dei vari tipi di tessuto del cavo orale (lingua, pavimento della bocca, guancia, gengiva, etc.). Un importante obiettivo, infine, destinato a diventare primario nei tempi medio-lunghi (almeno 3-6 anni) è il data management clinico (end points clinici) durante il follow-up dei pazienti.

Impatto assistenziale certo o potenziale

I destinatari dei risultati del progetto sono potenzialmente tutti i pazienti con accertata presenza di lesioni potenzialmente maligne del cavo orale (leucoplachie ed eritroplasie), preneoplasie coloretali e dell'apparato digerente (adenomi o polipi, esofago di Barrett), destinati ad essere seguiti in follow-up periodicamente nel tempo e sorvegliati per l'eventuale comparsa di un carcinoma. Per ora i criteri per seguire questi pazienti sono quasi unicamente di tipo clinico e istologico (l'osservazione visiva del clinico e la diagnosi del patologo). Questi criteri, oltre che essere particolarmente costosi se applicati per tutti i pazienti, non sono considerati da soli sufficienti per prevedere il rischio di recidive e di progressione in cancro in questi modelli ed è di notevole importanza definire e validare dei biomarcatori di rischio di tipo sperimentale che rispecchino i meccanismi di genesi e progressione tumorale. Alcuni biomarcatori, come ad esempio la DNA aneuploidia mediante metodi di routine di citometria a flusso, hanno già dimostrato un importante impatto nel prevedere rischio di cancro per diverse lesioni preneoplastiche come l'esofago di Barrett e la rettocolite ulcerosa. In pratica, anche se vanno promossi ulteriori studi di validazione, l'impatto assistenziale di questi studi almeno nel breve intervallo di tempo e pressoché certo. Nel caso delle OPLs, a cui noi intendiamo dedicarci in modo prioritario, l'impatto assistenziale è per ora solo potenziale. In linea con le finalità del nostro Ente e con chiari effetti socioeconomici sul territorio, questi nuovi Biomarcatori, integrati con i classici parametri istopatologici e clinici, dovrebbero contribuire ad un più razionale management clinico. Essi, pertanto, dovrebbero portare ad una riduzione dei costi della Sanità Pubblica permettendo di operare una selezione di sottopopolazioni di pazienti a più basso e a più alto rischio di tumore con costi di follow-up differenziati.

Risultati e prodotti 2009

Le attività 2009 sono state relative ai protocolli di campionamento, di istopatologia, di clinica e alle misure di FCM, MLPA e array-CGH. Biomarcatori associati possono contribuire a predire la transizione preneoplasia-neoplasia. Per un primo gruppo di 60 lesioni orali potenzialmente maligne (OPMLs), 6/42 hanno mostrato sublinee aneuploidi in assenza di displasia mentre 8/18 erano aneuploidi con displasia. La displasia era significativamente legata alla aneuploidia ($p = 0.03$) nei fumatori. In un secondo gruppo di 124 pazienti con documentazione di sesso, età, abitudine al tabacco e istologia, le lesioni displastiche della mucosa buccale erano 20 volte più probabili nei fumatori rispetto ai non fumatori ($p = 0.01$). In un terzo studio e per una popolazione diversa di pazienti, ODFs (mucosa orale non displastica sita in campi distanti da OPMLs e che appare clinicamente normale) e OPMLs senza displasia erano DNA aneuploidi rispettivamente in 7/82 (8.5%) e 25/109 (23%) casi. OPMLs displastiche e OSCCs (cancro) erano DNA aneuploidi in 12/26 (46%) e 12/13 (92%) casi. I valori di DNA Index aneuploidi ($DI \neq 1$) in ODFs e OPMLs displastiche e non displastiche erano near-diploid ($DI < 1.4$) rispettivamente in tutti, in 2/3 e 1/3 dei casi. OSCCs, invece, erano caratterizzati prevalentemente da sublinee aneuploidi multiple (67%) e comunemente (57%) alto-aneuploidi ($DI \geq 1.4$). Questi dati indicano che FCM ad alta risoluzione permette la separazione di step precoci e progressivi della carcinogenesi orale che sono in accordo con il concetto di effetto di campo. Profili a-CGH sono stati ottenuti da DNA estratto da sublinee DI specifiche usando microarrays (105K oligonucleotides; Tecnologie Agilent). Cambiamenti nel numero di copie di DNA sono stati rilevati nell'88% (15/17) delle sublinee aneuploidi, nel 54% (13/24) diploidi e nel

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

61% (8/13) in ODFs diploidi. I guadagni in 8q e 20q erano presenti ad alta frequenza nelle sublinee diploidi delle ODFs e nelle OPMLs non displastiche. I risultati attuali suggeriscono che i guadagni 8q e 20q sono eventi precoci della carcinogenesi orale. L'amplificazione del cromosoma 20q è stata anche riportata nel cancro coloretale (CRC) suggerendo che ivi siano localizzati oncogeni putativi che contribuiscono all'instabilità cromosomica (CIN) ed alla progressione tumorale. Il sorting FCM di nuclei ottenuti da CRCs ha permesso analisi DI specifiche mediante MLPA utilizzando un mix di sonde che si legavano ai bracci dei cromosomi 8p, 8q, 13q e 20q. L'aberrazione rilevata con maggiore frequenza è stata il guadagno del 20q tra le sublinee DNA aneuploidi (14/16, 87.5%) verso 4/16 (25%) per le corrispondenti componenti DNA diploidi. Biomarcatori quantitativi FCM, aCGH e MLPA possono fornire utili applicazioni cliniche per predire la transizione preneoplasia-neoplasia (lavoro in corso).

Pubblicazioni

Monticone M.-Biollo E.-Fabiano A.-Fabbi M.-Daga A.-Romeo F.-Maffei M.-Melotti A.-Giaretti W.-Corte G.-Castagnola P. z-Leucinyl-leucinyl-norleucinal induces apoptosis of human glioblastoma tumor-initiating cells by proteasome inhibition and mitotic arrest response. Mol. Cancer Res. 7:1822/1834, 2009

Pentenero M.-Giaretti W.-Navone R.-Demurtas A.-Rostan I.-Bertolusso G.-Broccoletti R.-Arduino PG.-Malacarne D.-Gandolfo S. DNA aneuploidy and dysplasia in oral potentially malignant disorders: association with cigarette smoking and site. Oral. Oncol. 45:887/890, 2009

Attività previste e risultati attesi nel 2010

I risultati ottenuti nel 2009 (oltre a quelli pubblicati, altri 2 manoscritti sono stati sottomessi) hanno indicato che le tecniche di FCM per analisi e sorting combinate con aCGH e MLPA hanno una notevole potenza analitica. Tra i risultati più interessanti, è stato suggerito preliminarmente che l'amplificazione del 20q è da considerarsi un evento molto precoce della cancerogenesi orale, già presente nelle lesioni orali non displastiche e addirittura nella mucosa orale apparentemente normale (ODFs). Al contrario, dati di MLPA hanno suggerito, in modo ancora preliminare, che l'amplificazione del 20q è da considerarsi un evento relativamente tardivo nella cancerogenesi coloretale. Nei carcinomi coloretali (CRCs) analizzati nella serie attuale, mentre la componente aneuploide FCM-sortata indica un'alta frequenza di amplificazione 20q, nelle corrispondenti componenti diploidi tale frequenza è bassa. Dunque, l'ipotesi che l'amplificazione del 20q nei CRCs indichi la presenza di molteplici oncogeni putativi che contribuirebbero all'instabilità cromosomica CIN e alla transizione diploide-aneuploide (Carvalho B et al. Gut 58:79-89, 2009; De Angelis P et al. Int. J. Cancer 120:2734-2738, 2007) non è rafforzata dai nostri dati attuali.

Nel corso del 2010, in attesa dei primi end-points clinici ipotizzabili solo successivamente, ci proponiamo di utilizzare più sonde sul braccio del cromosoma 20q per studiare in dettaglio con tecniche MLPA il coinvolgimento di questa regione cromosomica nella transizione diploide-aneuploide sia nella cancerogenesi coloretale che in quella orale. Gli stessi subcloni saranno anche studiati con analisi aCGH ad alta risoluzione. Inoltre, intendiamo portare avanti lo studio avviato nel 2009 sulle lesioni orali (ODFs, OPMLs e OSCCs) con i metodi messi a punto di DNA FCM ad alta risoluzione (il valore minimo ad ora è stato un aumento di DNA rispetto al diploide del 2.4%). Infine, intendiamo analizzare, anche con l'utilizzo di linee cellulari ingegnerizzate in vitro, quali meccanismi possano generare CIN e sublinee aneuploidi nella mucosa orale non displastica che appare clinicamente normale e nelle lesioni OPMLs non displastiche.