

S.S. Oncologia Traslazionale Pediatrica

Ruolo del gene Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) nel neuroblastoma e targeting di alk mediante inibitori tirosino chinasi

Linea di ricerca: 1 - Prevenzione e Cancerogenesi

Programma: c - Basi genetiche e molecolari della trasformazione neoplastica

Responsabile scientifico: Gian Paolo Tonini

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: neuroblastoma; ALK; tirosin-chinasi; inibitori; predisposizione genetica

Altre strutture IST partecipanti: S.S. Animal Facility (M. Cilli)

Altri Enti coinvolti: Fondazione Italiana per la Lotta al Neuroblastoma, Genova (L. Longo, M. De Mariano); Fondazione IRCCS, Istituto Nazionale Tumori, Milano (L. Passoni, R. Luksch)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: prevenzione primaria/secondaria

Soggetti cofinanziatori: Fondazione Italiana per la Lotta al Neuroblastoma

Background

Il neuroblastoma (NB) è un tumore pediatrico neuroblastico che origina dalle cellule della cresta neurale destinate nel processo di differenziamento fisiologico al surrene ed al sistema nervoso simpatico. I casi di NB rappresentano il 7-10% dei tumori dell'infanzia e la prevalenza è 1 caso ogni 7000 nascite. Questa incidenza è pressoché uniforme nel mondo, per lo meno nei paesi industrializzati. La maggior parte dei casi di NB è sporadica e si manifesta sia nella forma della malattia localizzata con prognosi favorevole che in quella di malattia disseminata che, al contrario, ha una prognosi peggiore e contribuisce pesantemente alla mortalità correlata ai tumori pediatrici. D'altra parte, la regressione spontanea della malattia si osserva nel 70% dei pazienti diagnosticati con stadio 4S. Sono state descritte anche rare forme di NB familiare, che rappresentano circa l'1% di tutti i casi diagnosticati. Il NB è anche osservabile in pazienti affetti da altre forme di disordine della cresta neurale o da patologie maligne come la malattia di Hirschsprung e la neurofibromatosi di tipo 1 (NF1). Questa variabilità nelle manifestazioni cliniche riflette la considerevole eterogeneità biologica del tumore. Inoltre, studi molecolari hanno identificato numerose alterazioni somatiche, tra cui l'amplificazione del proto-oncogene *MYCN*, la delezione del cromosoma 1p e il gain del cromosoma 17q, che sono associate a prognosi sfavorevole.

Il gene Anaplastic Lymphoma Kinase (*ALK*) codifica per un recettore transmembrana tirosin-chinasi di 200-220 kDa. Fisiologicamente, l'espressione di *ALK* è limitata al sistema nervoso in sviluppo e si ritiene sia coinvolto nella regolazione della differenziazione neuronale. Il dominio catalitico di questa proteina è stato originariamente identificato nella traslocazione cromosomica t(2;5)(p23;q25), che si verifica nella maggior parte dei linfomi anaplastici a grandi cellule (ALCLs). Questo riarrangiamento produce la fusione oncogenica della parte ammino-terminale della nucleofosmina (NPM) al dominio catalitico intracellulare di *ALK*. Recentemente, in una collaborazione con un gruppo di ricerca americano, abbiamo identificato *ALK* come il primo gene predisponente al neuroblastoma sia sporadico che familiare. Le mutazioni di *ALK*, che coinvolgono il dominio tirosin-chinasi della proteina, sono state indicate come meccanismo guida dell'attivazione del gene, mediante fosforilazione delle tirosine del dominio catalitico del recettore. Le mutazioni di *ALK* sono state prima identificate nelle famiglie affette da NB ed in seguito trovate anche in circa l'8-10% dei tumori sporadici. Sono già stati effettuati esperimenti preliminari di soppressione dell'espressione di *ALK* con tecniche di interference RNA, che hanno determinato inibizione della crescita cellulare in linee cellulari di NB sia con *ALK* mutato che amplificato. Inoltre, su alcune linee di NB sono stati testati 2 inibitori (es.: PF-2341066 e NVP-TAE684) ed i risultati mostrano che questi inibitori potrebbero essere efficaci nelle linee cellulari di NB con *ALK* mutato. Infine, abbiamo osservato un'efficacia degli inibitori CEP14083/2 e CEP14513/2 sia in linee di NB con *ALK* mutato che in linee che sovraesprimono il recettore wild type.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Per superare gli attuali limiti terapeutici, si propone il recettore tirosin-chinasi *ALK* quale oncogene bersaglio per possibili terapie future del neuroblastoma.

L'obiettivo finale del presente progetto è verificare come l'espressione e l'attivazione di *ALK* possano avere un impatto clinico sia dal punto di vista prognostico, sia come bersaglio per lo sviluppo di terapie molecolari mirate.

Impatto assistenziale certo o potenziale

Il presente progetto potrà avere benefici per il trattamento dei pazienti affetti da neuroblastoma.

Risultati e prodotti 2009

Nel 2009 sono stati sequenziati 114 casi di neuroblastoma (NB) sporadico al fine di individuare mutazioni nel dominio tirosin chinasi del gene *ALK*. Sei casi hanno evidenziato mutazioni di *ALK*, una delle quali non era ancora stata descritta, la 3509T>G (I1170S), identificata in un caso di NB stadio 3U. La ricerca di mutazioni a carico del dominio

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

tirosin-chinasico di ALK è stata estesa anche agli individui affetti di 6 famiglie con NB ricorrente (4 di queste famiglie sono state reclutate in questo ultimo anno), e qualora fosse il caso ai parenti non affetti di tali individui. In una di queste famiglie è stata individuata la mutazione 3575G>C (R1192P) già individuata in altre 2 famiglie americane e in una famiglia francese. Questo tipo di mutazione risulta essere peculiare dei casi familiari e non è stata osservata nei casi sporadici. Abbiamo, inoltre, caratterizzato 28 linee di NB per le mutazioni a carico degli esoni da 20-28 che codificano per il dominio tirosin-chinasico di ALK. Al fine di verificare se l'espressione di ALK nei tumori potesse dipendere da mutazioni del promotore abbiamo sequenziato 2564 bp a monte del codone di inizio della trascrizione di ALK in 29 pazienti con diversa immunoreattività per ALK e in 8 linee cellulari di NB. I risultati di tale screening non hanno mostrato alcuna mutazione nel promotore di ALK.

L'analisi immunoistochimica di 34 NB localizzati ha evidenziato alti livelli di espressione di ALK in pazienti che hanno avuto una progressione di malattia. Ad oggi sono stati analizzati un totale di 72 pazienti. I risultati ottenuti indicano che 7 su 14 pazienti caratterizzati da un'alta espressione di ALK sono andati incontro a recidiva suggerendo che l'elevata espressione di ALK alla diagnosi in pazienti con NB localizzato indicherebbe un rischio di recidiva pari al 50%.

L'uso in vitro di inibitori di ALK ha rivelato che le molecole CEP-14083 e CEP-14513 (Cephalon) sono in grado di indurre inibizione della proliferazione e morte cellulare. Poiché le caratteristiche fisico-chimiche di tali molecole precludono il loro utilizzo in vivo, è necessario lo screening di nuovi inibitori da utilizzare nella sperimentazione in vivo in modelli murini. Si è quindi testata l'attività dell'inibitore CEP-26939 (Cephalon) sia in vitro su 10 linee cellulari di NB (IMR-32, NB-INT1, SK-N-BE2C, NB8, NB5, NB1, SK-N-SH, SH-SY5Y, LAN-5, SMS-KCNR) che in vivo in 2 linee cellulari (IMR-32, UKF-NB3). L'inibitore CEP-26939 non ha dimostrato alcuna efficacia in vitro ed in vivo. Fanno eccezione le linee cellulari LAN-5 e NB1 che sono risultate sensibili con una IC50 di 125 nM.

Pubblicazioni

Passoni L.-Longo L.-Collini P.-Coluccia A.M.-Bozzi F.-Podda M.-Gregorio A.-Gambini C.-Garaventa A.-Pistoia V.-Del Grosso F.-Tonini G.P.-Cheng M.-Gambacorti-Passerini C.-Anichini A.-Fossati-Bellani F.-Di Nicola M.-Luksch R. Mutation-independent anaplastic lymphoma kinase overexpression in poor prognosis neuroblastoma patients. *Cancer Res.* 69(18):7338-7346, 2009

Attività previste e risultati attesi nel 2010

Il numero di pazienti con NB localizzato finora analizzati per l'espressione di ALK (72) non consente di trarre conclusioni statisticamente significative e definitive. Scopo finale è quello di analizzare un numero totale di pazienti pari a circa 150-200 tra cui almeno 30 pazienti recidivati. Dato l'elevato numero di pazienti, oltre ai nuovi casi della casistica italiana si prevede l'attivazione di collaborazioni internazionali per ottenere un numero congruo di pazienti.

Si prevede, inoltre, di utilizzare nuovi inibitori del dominio chinasi di ALK. Tali inibitori hanno dimostrato efficacia in vivo in modelli di Linfoma Anaplastico ALK-dipendenti. Sono in corso esperimenti atti a determinare l'effetto di tali inibitori sulla proliferazione e sopravvivenza cellulare in vitro nelle linee di NB descritte sopra. In base ai risultati ottenuti dalla sperimentazione in vitro, si valuterà la possibilità di estendere lo screening in vivo in modelli murini.

Per superare gli attuali limiti terapeutici, si propone il recettore tirosin-chinasico ALK quale oncogene associato al NB e bersaglio di possibili nuove terapie molecolari mirate. Al fine di poter sviluppare terapie alternative basate sull'inibizione di ALK e/o dei suoi 'pathway' molecolari associati si prevede quanto segue: a) studio dei meccanismi di regolazione dell'espressione ed attivazione di ALK mediante identificazione di uno o più microRNA coinvolti nella regolazione del livello di espressione di ALK; b) studio della metilazione del promotore; c) studio dei possibili sinergismi tra inibitori specifici di ALK ed altre molecole, come ad esempio inibitori della N-glicosilazione. Poiché la glicosilazione è una modificazione post-traduzionale che si è dimostrata essenziale per la piena maturazione e la funzionalità di altri recettori tirosin-chinasici, come EGFR, Erb2, Erb3 e IGF-IR, intendiamo evidenziare se le cellule di NB possano avere un'aumentata suscettibilità agli inibitori di ALK quando sottoposte a trattamenti che interferiscono con la glicosilazione della proteina. Questo punto chiarirà se la glicosilazione di ALK possa essere un nuovo target potenziale per la terapia, suffragando l'ipotesi di utilizzo di inibitori non tossici della N-glicosilazione in associazione con inibitori specifici di ALK.

Studio del cross-talk chemochine e recettori delle chemochine nel microambiente tumorale del neuroblastoma

Linea di ricerca: 2 - Interazioni Tumore-Ospite

Programma: a - Ruolo del microambiente tumorale nella progressione neoplastica

Responsabile scientifico: Gian Paolo Tonini

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Federica Del Grosso, Paola Scaruffi, Simona Coco, Sara Stigliani

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: chemochine; tumori solidi; neuroblastoma; microarray; microambiente tumorale

Altre strutture IST partecipanti: S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica (M. Truini); S.C. Terapia Immunologica (S. Ferrini)

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

Altri Enti coinvolti: D.O.Bi.G., Università degli Studi di Genova (F. Valdora)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: diagnostica

Soggetti cofinanziatori: Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro; Regione Liguria; Fondazione Italiana per la Lotta al Neuroblastoma

Background

La maggior parte dei tumori solidi sono composti da cellule maligne e cellule stromali. Le cellule stromali giocano un ruolo fondamentale nella crescita e diffusione delle cellule maligne. In alcuni tumori, l'origine delle cellule stromali è ambigua ed è difficile assegnare le cellule stromali alla componente maligna o normale. I Tumori Neuroblastici (TN) sono tumori pediatrici che mostrano una notevole eterogeneità clinica, biologica e tissutale (Maris et al., 2007). Essi sono composti principalmente da due popolazioni cellulari: le cellule neuroblastiche maligne e le cellule stromali Schwanniche, presenti in diverse proporzioni. Nel neuroblastoma a stroma povero, la componente neuroblastica maligna è prevalente mentre nel ganglioneuroblastoma intermixed stroma ricco, la componente delle cellule stromali supera il 50% della massa (Shimada et al., 1999). Il neuroblastoma stroma povero è un tumore estremamente aggressivo nei pazienti sopra l'anno di età e si presenta con metastasi diffuse mentre il ganglioneuroblastoma stroma ricco si presenta come tumore localizzato meno aggressivo.

Gli studi eseguiti sulle componenti cellulari dei NT sono ancora esigui e discordanti poiché alcuni indicano che sia le cellule neuroblastiche sia le cellule stromali di Schwann sono di origine maligna mentre altri dimostrano che le cellule stromali sono cellule normali e solo i neuroblasti sono di origine maligna (Maris et al, 2001; Ambros et al, 1996). I nostri studi sostengono questa seconda ipotesi dimostrando per mezzo di analisi del genoma con microarray che le cellule stromali hanno poche alterazioni cromosomiche di tipo numerico mentre i neuroblasti maligni hanno diverse alterazioni cromosomiche strutturali (Coco et al, 2005; Scaruffi et al, 2007; Albino et al, 2008). Gli studi condotti sui profili di espressione genica con microarray (i dati dei profili di espressione sono disponibili su <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/index.cgi> Accession Number: GSE7529) hanno, inoltre, evidenziato una differente espressione delle chemochine 13 e 14 tra le cellule di Schwann e i neuroblasti suggerendoci di approfondire lo studio del microambiente tumorale e della chemiotassi tra cellule stromali e neuroblasti maligni.

Le chemochine sono coinvolte in diverse funzioni quali: l'invasione e la mobilità cellulare, la sopravvivenza cellulare, ecc. La chemochina CXCL13 lega il suo recettore CXCR5 mentre il recettore della CXCL14 non è stato ancora individuato. Le chemochine sono espresse in diversi tipi cellulari e possono agire come stimoli autocrini ed aumentare il potenziale metastatico del tumore. Il recettore CXCR5 è espresso dalle cellule di neuroblastoma e sembra avere un ruolo importante per la metastatizzazione dei neuroblasti nel midollo osseo. Noi abbiamo analizzato gli RNA messaggeri di 28 TN e 14 linee cellulari di neuroblastoma per mezzo di RT-PCR quantitativa e abbiamo trovato una variabile espressione di CXCL13, CXCR5 e CXCL14. Abbiamo quindi focalizzato la nostra attenzione sull'espressione di CXCL13 e CXCR5 nei neuroblasti e nelle cellule stromali di Schwann separandole dal tumore per mezzo di microdissezione laser e abbiamo trovato che i neuroblasti esprimono prevalentemente CXCR5 mentre le cellule stromali CXCL13. Abbiamo ipotizzato, quindi, un cross-talk tra cellule stromali di Schwann e neuroblasti maligni.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

L'obiettivo dello studio è dimostrare l'esistenza di un cross-talk tra cellule stromali di Schwann e neuroblasti maligni mediato da una o più chemochine e comprendere il ruolo delle chemochine nella metastatizzazione del tumore.

Impatto assistenziale certo o potenziale

L'impatto assistenziale è potenziale ma molto elevato. La terapia del neuroblastoma negli ultimi 20 anni ha fatto modesti passi avanti, le forme metastatiche aggressive che si presentano nel bambino sopra l'anno di età risultano fatali in oltre il 70% dei casi con un follow up di 5 anni. Almeno il 40% dei casi diventa resistente all'induzione della terapia. L'introduzione del trapianto allogenico e del trattamento con acido retinoico dopo il trapianto ha incrementato la sopravvivenza in modo non significativo. In anni più recenti è quindi incrementato lo studio di antagonisti diretti contro recettori delle cellule neuroblastiche maligne.

In questo ambito pensiamo che la caratterizzazione delle chemochine nel neuroblastoma e un dettagliato studio del loro ruolo nella crescita e metastatizzazione del tumore possano essere utili per identificare e quindi modulare con antagonisti alcuni recettori delle chemochine e controllare il comportamento delle cellule tumorali.

Risultati e prodotti 2009

Durante il 2009, sono state svolte le attività sottoelencate con i risultati sperimentali descritti:

- i livelli di espressione degli mRNA di CXCR5 e CXCL13 sono stati definiti in 11 linee cellulari di neuroblastoma con caratteristiche fenotipiche differenti (N-, I- e S-type) mediante real-time RT-PCR, confermando nel modello in vitro la capacità delle cellule neuroblastiche di esprimere a vari livelli il recettore CXCR5 e dimostrando nel neuroblastoma la presenza dell' isoforma b ma non di quella a. La co-espressione di CXCL13 (seppur a livelli molto bassi) e di CXCR5 è stata osservata in 5 linee su 11 analizzate. La contemporanea espressione di CXCR5 e CXCL13 suggerisce un loop autocrino-paracrino dell'attività biologica della chemochina CXCL13;

- l'espressione del recettore CXCR5 è stata dimostrata in 10/11 linee cellulari mediante analisi in immunofluorescenza su vetrino, per mezzo di FACS ed immunocitochimica. L'espressione di CXCL13, esclusivamente a livello citoplasmatico e a bassissimi livelli, è stata osservata in 2 linee cellulari mediante immunofluorescenza su vetrino. La chemochina secreta nei surnatanti di colture cellulari è invece risultata rilevabile, mediante ELISA, esclusivamente in seguito a induzione di differenziamento della linea S-type LA1-5S verso un fenotipo "schwannico", per mezzo di trattamento con BUdR. Tale esperimento ha confermato in vitro l'ipotesi di un cross-talk tra cellule neuroblastiche, che esprimono CXCR5, e cellule stromali schwanniche, che esprimono CXCL13;

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

- l'analisi in Real-Time RT-PCR dell'espressione di CXCR5 e CXCL13 mRNA in cellule stromali di Schwann e in neuroblasti, isolati da tumori neuroblastici mediante microdissezione, ha evidenziato l'espressione di CXCL13 mRNA solo nelle cellule stromali e quella di CXCR5b, e non CXCR5a, esclusivamente nelle cellule neuroblastiche;
- l'analisi in immunohistochimica di ganglioneuroblastomi stroma-rich ha evidenziato l'espressione della chemochina CXCL13 da parte delle cellule stromali schwanniche, individuate mediante colorazione con anticorpo anti-GFAP
- la capacità dei neuroblasti, che esprimono il recettore CXCR5, di migrare se sottoposti allo stimolo della chemochina CXCL13 umana ricombinante è stata dimostrata mediante test di chemiotassi utilizzando diverse linee cellulari di neuroblastoma CXCR5-positive.

I risultati ottenuti confermano l'ipotesi dell'esistenza di un cross-talk tra cellule stromali schwanniche e neuroblasti maligni mediato dall'asse CXCL13-CXCR5, e contribuiscono a chiarire il ruolo dello stroma cellulare nei tumori neuroblastici e a comprendere il ruolo delle chemochine nella metastatizzazione del tumore.

Pubblicazioni

Del Grosso F.-Coco S.-Scaruffi P.-Stigliani S.-Valdora F.-Benelli R.-Salvi S.-Boccardo S.-Truini M.-Croce M.-Ferrini S.-De Ambrosio A.-Tonini G.P.

Identification of chemokine CXCR5-CXCL13 cross-talk between malignant neuroblastoma cells and Schwannian stromal cells suggests a role in the inhibition of metastatic dissemination.

Int. J. Cancer, submitted

Attività previste e risultati attesi nel 2010

Durante l'anno 2010, l'attività sperimentale riferita a questa linea di ricerca prevede le trasfezioni con vettori di espressione di CXCR5 o CXCL13, di linee cellulari di neuroblastoma allo scopo di chiarire univocamente il loro ruolo nell'interazione neuroblasti-cellule stromali. La realizzazione di test funzionali, di morte cellulare, chemiotassi, proliferazione utilizzando le linee trasfettate contribuirà a chiarire in vitro il ruolo del cross-talk mediato da questa chemochina nei meccanismi di proliferazione e disseminazione dei diversi tumori neuroblastici. Si procederà poi all'allestimento di esperimenti in vivo utilizzando cellule di neuroblastoma e/o cellule di neuroblastoma stabilmente trasfettate con CXCR5 o CXCL13, in un modello di xenotrapianto sottocutaneo o orto topico di topo.

Il progetto prevede, inoltre, l'approfondimento dello studio dell'espressione genica e proteica della chemochina CXCL14, anch'essa, insieme a CXCL13, candidata a svolgere un ruolo nel cross-talk tra cellule stromali schwanniche, dove è presente, e neuroblasti, nei quali l'espressione non è stata rilevata e che potrebbero invece esprimere il rispettivo recettore, ad oggi non noto. La sperimentazione su CXCL14 verrà condotta sia nei campioni di tumore che nelle linee cellulari di neuroblastoma allo scopo di identificare il contributo di questo fattore solubile nella crescita e nella disseminazione dei tumori neuroblastici.

Costruzione di prototipi di nanopore array per la definizione di espressione genica su scale temporali del millisecondo per singolo poro

Linea di ricerca: 3 - Ottimizzazione e personalizzazione delle strategie terapeutiche

Programma: : a - Definizione del profilo di rischio individuale in pazienti con neoplasia in fase iniziale o avanzata

Responsabile scientifico: Gian Paolo Tonini

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Paola Scaruffi, Sara Stigliani, Simona Coco

Anno di inizio: 2009

Durata: 24 mesi

Parole chiave: tumori solidi; microarray; marcatori molecolari prognostici; arrayCGH; espressione genica; nanopore-array

Altre strutture IST partecipanti: S. C. Trasferimento Tecnologico e coordinamento core facilities (T. Ruzzon, E. Vitiello)

Altri Enti coinvolti: Dipartimento di Fisica, Università di Genova e Laboratorio Nanomed, Centro Biotecnologie Avanzate, Genova (U. Valbusa, V. Mussi)

Tipologia progetto: tecnologie abilitanti

Area di interesse: diagnostica

Soggetti cofinanziatori: MIUR

Background

Il progetto Genoma Umano ha permesso di identificare nuovi geni e sequenze EST (Expressed Sequence Tag) che, una volta caratterizzate, completeranno la decodificazione del genoma umano (<http://www.ornl.gov/hgmis/>). Nuove tecnologie sono state sviluppate per l'analisi del genoma, in grado di analizzare decine di migliaia di geni in un singolo esperimento come per esempio quella dei microarray, basata sul principio secondo cui filamenti di DNA a singola catena ancorati a supporti rigidi si possono ibridare con DNA complementare. I microarray sono impiegati per caratterizzare i profili di espressione genica, per rilevare polimorfismi o mutazioni, per identificare SNPs (Single

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

Nucleotide Polymorphisms), per individuare perdite o guadagni di materiale genetico o un cambiamento nel numero di copie di un gene.

Recentemente è stata proposta la tecnologia dei nano-pori per l'analisi del genoma (Howorka S. et al. *Biotechnol.* 19:636-639, 2001; Vercoutere W. et al. *Nat. Biotechnol.* 19:248-252, 2001; Wang H. and Branton D., *Nature* 19:622-623, 2001). Un nanoporo proteico di alfa-emolisina è alloggiato in un doppio strato lipidico, immerso in una fase liquida in presenza di un campo elettrico. Nel nano-poro si sistema una sequenza oligonucleotidica (probe). Se nella fase liquida si trova la molecola ad essa complementare (target), si forma un duplex di probe-target che altera la conduttività del sistema, determinando una variazione di corrente. Sono stati creati sistemi per sequenziare frammenti di DNA ed identificare mutazioni puntiformi ed è potenzialmente possibile applicare tale tecnologia anche all'analisi di espressione genica e di SNPs di cellule umane normali e neoplastiche. Il metodo è estremamente semplice, elegante e di facile impiego e soprattutto consente la caratterizzazione degli acidi nucleici con una scala temporale del millisecondo. Si può prevedere che lo sviluppo di un sistema di nano-pori in fase solida e non in membrane biologiche, possa avere una vasta applicazione nella diagnostica delle neoplasie e delle altre patologie genetiche. Un recente lavoro (Li J. et al., *Nature* 412:166-169, 2001) dimostra che fasci ionici ad energie di qualche KeV consentono la realizzazione di membrane di SiO₂ o di Si₃N₄ con pori di dimensioni di pochi nanometri, aprendo la strada alla costruzione di membrane solide costituite da array di nanopori.

Negli anni 2006-2008 è stato messo a punto un protocollo di funzionalizzazione chimica su nitrato di silicio (i dettagli tecnici sono contenuti nella richiesta di deposito di brevetto congiunto IST/Università degli Studi di Genova). Dopo la deposizione di oligonucleotidi ammino-modificati (probe), i risultati sono stati valutati mediante microscopia a forza atomica (AFM) e microscopia in fluorescenza (con oligonucleotide marcati con fluoroforo). Abbiamo dimostrato la possibilità di legare covalentemente i probe dopo la funzionalizzazione chimica del nitrato di silicio nanoforato mediante l'utilizzo del FIB, garantendo una buona specificità di legame.

Su chip funzionalizzati con probe fluorescenti (FITC) sono state eseguite prove di ibridazione statica con target fluorescente (cy3), che hanno dimostrato un legame specifico tra molecola probe legata al substrato e molecola target, perciò i chip nanoforati e funzionalizzati sono in grado di funzionare come biosensori.

Sono state effettuate misure di corrente su singolo nanoporo alloggiando la membrana in un prototipo di cella di misura. I chip precedentemente nanoforati vengono funzionalizzati e poi trasferiti in cella di misura realizzata in polimero (PDMS), costituita da due serbatoi contenenti una soluzione ionica (tipicamente KCl 1 M), comunicanti solo attraverso il nanoporo, e due elettrodi (fili di argento clorurato Ag/AgCl) per l'applicazione di una tensione e la rilevazione della corrente. Vengono applicate delle rampe di tensione e registrate delle rampe di corrente in modo da ricostruire le curve tensione-corrente. Da queste ultime, con un fit lineare è possibile ricavare una stima della resistenza R del nanoporo; dalla resistenza R del nanoporo si può ricavare una stima del suo diametro efficace.

La funzionalizzazione determina un restringimento delle dimensioni del nanoforo, ossia una riduzione del diametro efficace misurabile attraverso le misure di corrente in cella, cioè un aumento della resistenza elettrica. Dunque la funzionalizzazione con molecole probe si ottiene una riduzione di diametro del nanoporo.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Costruzione di un prototipo di nanopore-array per la rapida identificazione di trascritti genici e SNP da RNA o DNA estratto da campioni biologici (sangue, saliva, tessuti biotici).

Il prototipo potrà essere utilizzato anche per la ricerca di per applicazioni in campo zootecnico e zooprofilattico, ad esempio per l'identificazione di OGM in alimenti o in coltivazione, o per la ricerca di DNA virale o batterico.

Impatto assistenziale certo o potenziale

Il presente progetto consentirà la produzione di un dispositivo da utilizzarsi per la valutazione di marcatori molecolari con significato prognostico e/o consentire un migliore inquadramento del paziente nelle categorie di rischio e la conseguente personalizzazione della terapia. Inoltre, l'identificazione di SNP associati alla suscettibilità ad alcune malattie o alla diversa risposta alla terapia farmacologica consentirà di effettuare un fingerprinting genetico dei pazienti, al fine di valutare la predisposizione a patologie e la risposta ai farmaci.

Risultati e prodotti 2009

Sono state effettuate misure elettriche sul nanoporo prima e dopo la funzionalizzazione, a diverse concentrazioni di KCl e in diverse condizioni di pH, per valutare le modificazioni delle caratteristiche fisiche del nanoporo indotte dalla presenza del DNA, con particolare attenzione alla schermatura introdotta dalle cariche negative dello scheletro delle molecole sonde.

Per ottenere una riduzione del rumore delle misure ed aumentare, quindi, la sensibilità del sistema di lettura, siamo passati dall'utilizzo di membrane di nitrato di silicio dello spessore di 100 nm, all'uso di membrane di spessore di 20 nm. Queste membrane vengono nanoforate al FIB e funzionalizzate chimicamente secondo il protocollo standard messo a punto in precedenza durante lo svolgimento del progetto.

Le misure di corrente in cella elettrochimica sono condotte con KCl 1M e a concentrazioni scalari più basse per ottenere la curva di rettificazione che consente la caratterizzazione fisica del nanoporo oggetto delle misure stesse.

Inoltre parallelamente vengono condotte misure di corrente in buffer di ibridazione classici a diversi potenziali di corrente applicata. Il passaggio a buffer di ibridazione è indispensabile per l'utilizzo del nanoporo funzionalizzato chimicamente con sonde di oligonucleotidi per il riconoscimento specifico di molecole di DNA che saranno iniettate nella cella di misura, e, quindi, per utilizzare il nanoporo funzionalizzato come biosensore. Il controllo accurato delle condizioni sperimentali è necessario per procedere a misure di ibridazione dinamiche in cella con target non marcati.

Al fine di valutare la funzionalità del nanoporo come biosensore di proteine, il nanoporo è stato funzionalizzato con sonde di DNA a doppio filamento (dsDNA) costituite dalla sequenza riconosciuta dal fattore trascrizionale NF-κB ed in cella è stato iniettato un mix proteico contenente la proteina NF-κB. Le misure di corrente hanno mostrato sia picchi in aumento, che decrementi della corrente. Le analisi sono tuttora in corso per poter interpretare i dati di corrente come passaggio attraverso il nanoporo delle proteine e/o interazione tra NF-κB e sequenza di DNA specifica e, quindi, blocco della corrente misurata in cella.

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

Pubblicazioni

Mussi V.-Fanzio P.-Repetto L.-Firpo G.-Valbusa U.-Scaruffi P.-Stigliani S.-Tonini G.P.
Solid state nanopores for gene expression profiling.
Superlattices and Microstructures 46:59/63, 2009

Mussi V.-Fanzio P.-Repetto L.-Firpo G.-Scaruffi P.-Stigliani S.-Tonini G.P.-Valbusa U.
DNA-functionalized solid state nanopores for biosensing.
Nanotechnology, submitted

Brevetti

Richiesta di brevetto numero No. RM2009A000450 del 4 settembre 2009 dal titolo: "Chip nanoforato di nitruro di silicio per l'analisi di profili di espressione genica e relativi biosensori". Inventori V. Mussi, P. Fanzio, L. Repetto, G. Firpo, U. Valbusa, P. Scaruffi, S. Stigliani, G.P. Tonini. Titolarietà congiunta: Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro (50%), Università degli Studi di Genova (50%).

Attività previste e risultati attesi nel 2010

Si effettueranno dei test di validazione su campioni biologici (linee cellulari di neuroblastoma umano e campioni bioptici)

In parallelo verranno eseguite:

- 1) Misure utilizzando il nanoporo funzionalizzato come biosensore di molecole di DNA non marcato. Il DNA sarà rilevato mediante modificazioni della corrente misurata in cella al passaggio delle molecole target nel nanoporo e conseguente interazione con le sonde complementari legate all'imboccatura del nanoporo
- 2) Metodiche classiche di biologia molecolare, con lo stesso target marcato in fluorescenza e ibridizzato su supporto su cui sono presenti le stesse sonde marcate con un fluoroforo diverso.

Si passerà dall'analisi a singolo nanoporo all'array di nanopori diversamente funzionalizzati (con sonde per molti target). Tale passaggio prevede un notevole avanzamento tecnologico:

- 1) Produzione al FIB di array di nanopori opportunamente distanziati
- 2) Funzionalizzazione di ogni nanoporo con una sonda diversa mediante l'utilizzo di spottatore piezoelettrico
- 3) Produzione di una cella di misura in grado di contattare i diversi nanopori separatamente
- 4) Sviluppo di un software di analisi in grado di gestire contemporaneamente i dati prodotti dai singoli nanopori.

Diagnostica avanzata dei tumori solidi pediatrici

Linea di ricerca: 3 – Ottimizzazione e personalizzazione delle strategie terapeutiche

Programma: a - Definizione del profilo di rischio individuale in pazienti con neoplasia in fase iniziale o avanzata

Responsabile scientifico: Gian Paolo Tonini

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Paola Scaruffi

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: neuroblastoma; FISH, Multiplex Ligation Probe dependent Amplification (MLPA); arrayCGH; marcatori molecolari prognostici; gene expression

Altri Enti coinvolti: Fondazione Italiana per la Lotta al Neuroblastoma, Genova (K. Mazzocco, R. Defferrari, S. De Luca); Divisione di Ematologia/Oncologia Pediatrica, Istituto G. Gaslini, Genova (A. Garaventa, B. De Bernardi); Divisione di Anatomia Patologica, Istituto G. Gaslini, Genova (C. Gambini); IRCCS Istituto Tumori Giovanni Paolo II, Bari (A. Paradiso)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: diagnostica

Soggetti cofinanziatori: MIUR; Regione Liguria; Fondazione Italiana per la Lotta al Neuroblastoma

Background

L'identificazione delle alterazioni genetiche dei tumori riveste un ruolo importante sia per conoscere la biologia della cellula neoplastica sia per sviluppare nuovi mezzi diagnostici e terapeutici. E' dimostrato, infatti, che in diversi tipi di tumori, quali ad esempio, tumore della mammella, linfoma, tumori neuroblastici, alterazioni genetiche non casuali siano significativamente associate all'aggressività del tumore.

L'inquadramento diagnostico dei tumori neuroblastici periferici riveste fondamentale importanza per le decisioni terapeutiche. I tumori neuroblastici, che includono neuroblastoma (NB), ganglioneuroblastoma (GNB) e ganglioneuroma (GN), presentano caratteristiche eterogenee da un punto di vista istopatologico e genetico. Negli

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

ultimi anni sono state introdotte nuove tecniche di citogenetica molecolare per meglio definire le caratteristiche genetiche di tali tumori in modo da poterli classificare in base alle alterazioni comuni. Nel NB sono state identificate alcune mutazioni genetiche non casuali, quali l'amplificazione dell'oncogene MYCN e la delezione del cromosoma 1p36, associate all'aggressività e alla progressione tumorale. Attualmente tali anomalie vengono analizzate per inquadrare i pazienti nei differenti protocolli terapeutici e per valutare il rischio di recidiva tumorale. I protocolli terapeutici attualmente vigenti sono: Infant ad interim, LNESG2 (Localised NB European Study Group 2), High Risk e Unresectable ad interim. Presso la nostra struttura, riconosciuta come Centro Nazionale di Riferimento per la biologia molecolare del neuroblastoma, vengono eseguite, secondo le linee guida dei protocolli europei (Ambros IM et al. J Clin Oncol. 2003 Jun 1;21(11):2077-84), le valutazioni dell'amplificazione di MYCN e della delezione del cromosoma 1p36 nei tumori di tutti i pazienti italiani affetti da questa patologia. Tale valutazione si svolge secondo le seguenti fasi:

- a) arrivo e conservazione dei campioni tumorali presso la Struttura IST e il Laboratorio della Fondazione Neuroblastoma
- b) valutazione morfologica e preparazione dei campioni per le analisi citogenetiche e molecolari
- c) analisi di FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) con sonde per la regione sub-telomeric del cromosoma 1p36 e dell'oncogene MYCN
- d) analisi molecolare della perdita di eterozigosi per i loci D1S76 e D1S80 per mezzo di PCR
- e) produzione di un referto elettronico con i risultati delle analisi
- f) invio dei risultati ai centri pediatrici richiedenti e all'Ufficio Neuroblastoma presso l'Istituto G. Gaslini di Genova.

Nel corso dell'ultimo biennio abbiamo messo a punto la tecnica di analisi pan genomica Multiplex Ligation Probe dependent Amplification (MLPA), che permette l'analisi contemporanea di 120 regioni cromosomiche, utilizzata con lo scopo di evidenziare un pattern genetico volto alla stratificazione dei pazienti in base alle caratteristiche genetiche del tumore. Nell'ambito dei differenti protocolli, in particolar modo nell' LNESG2 e in quello LINES (Low and Intermediate NB European Study) che entrerà in vigore entro la fine di quest'anno, la valutazione di altre alterazioni cromosomiche, oltre allo stato del gene MYCN, ha assunto una notevole importanza prognostica. In accordo con le più recenti linee guida l'analisi pan genomica verrà eseguita su tutti i campioni di tumore dei pazienti arruolati nei protocolli sopracitati mediante la metodica MLPA, evidenziando aberrazioni cromosomiche quali alterazioni numeriche, parziali gain e loss e traslocazioni sbilanciate. Tale analisi ha una valenza diagnostica molecolare importante poiché fornisce al paziente la migliore qualità per la caratterizzazione genomica del tumore e la valutazione della sua aggressività.

Nell'ambito della nostra Struttura applichiamo inoltre la tecnologia dei microarray sia per studi di espressione genica e di microRNA, sia per eseguire la array-Comparative Genomic Hybridization (array-CGH), una tecnologia innovativa per l'analisi genetica, che permette di identificare con un unico esperimento regioni di perdita o amplificazione genica in tutto il genoma.

Nell'anno 2008 sono state eseguite analisi su campioni di tessuto congelato, paraffinato e su strisci di midollo osseo tramite di FISH a doppio colore su nuclei interfascici, 127 analisi di MYCN e 105 analisi per la ricerca della delezione di 1p36.

Abbiamo utilizzato la tecnica MLPA per lo studio retrospettivo di pazienti arruolati nei protocolli terapeutici attualmente chiusi. Abbiamo analizzato il DNA di 76 pazienti arruolati nel protocollo terapeutico "Infant", 25 nel protocollo "Unresectable" e 32 nel protocollo LNESG1. I dati relativi a questi casi sono stati confrontati con quelli ottenuti con la metodologia dell'a-CGH con BAC, che consta in un'analisi pan genomica di ciascun tumore, effettuata nel Dipartimento di Oncologia Pediatrica dell'Istituto Curie di Parigi.

Sono stati inoltre studiati con questo approccio n. 40 DNA di neuroblastomi che presentano MYCN gain, n. 20 pazienti appartenenti al gruppo dei Neuroblastomi Adolescenti (circa il 3% di tutti i NB, comprendente i pazienti con età alla diagnosi tra 10 e 18 anni) e n. 40 pazienti arruolati in protocolli attualmente in corso.

L'alterazione definita "MYCN gain" è caratterizzata da un numero di copie dell'oncogene MYCN, variabile da 1 a 4 volte rispetto al numero dei cromosomi 2. La percentuale di MYCN gain descritta in letteratura e presente nella nostra casistica rappresenta circa l'8-10% della popolazione totale di neuroblastomi. Ad oggi abbiamo raccolto n. 64 casi italiani con tale alterazione distribuiti nei vari stadi di malattia. Da un punto di vista genetico si è osservato che in quasi la totalità dei casi analizzati, sia mediante FISH che MLPA, il gain è a carico non solo del gene MYCN ma anche dei geni adiacenti quali ALK, NAG e DDX1. Si può parlare così di gain della regione cromosomica 2p23→25. Abbiamo proposto a livello del gruppo ENQUA uno studio cooperativo per capire il ruolo prognostico di tale alterazione e la sua frequenza nei diversi stadi di malattia. E' in corso la determinazione del profilo genetico di questa popolazione di neuroblastomi tramite approcci pan genomici, quali MLPA e/o aCGH per delineare i gruppi di rischio.

Uno studio condotto a livello internazionale, ha permesso di analizzare il profilo di espressione genica di 579 NB distribuiti nei vari stadi di malattia e di identificare una signature di 59 geni che è risultata un predittore di prognosi indipendente da parametri clinici, quali stadio di malattia ed età del paziente alla diagnosi, e da caratteristiche del tumore (amplificazione dell'oncogene MYCN, ploidia, istologia, indice mitotico di carioressi).

Negli ultimi anni è stato descritto in letteratura un metodo di diagnostica non invasiva utilizzando il sangue periferico di pazienti. Il plasma dei pazienti neoplastici contiene acidi nucleici liberi rilasciati direttamente in circolo dalle cellule tumorali. Le alterazioni a carico del DNA circolante in pazienti affetti da tumore sono tumore specifiche, cioè il DNA presente nel plasma degli individui affetti da tumore proviene dal tumore stesso, e presenta alcune caratteristiche tipiche del DNA tumorale. Presso la struttura è stata messa a punto l'identificazione dell'amplificazione di MYCN utilizzando il DNA circolante dei pazienti: sono stati raccolti n. 50 campioni di plasma di pazienti all'esordio di malattia e n. 60 campioni di plasma di bambini sani come controllo; di tali casi è stato estratto il DNA utilizzando un kit specifico per l'estrazione di DNA da siero/plasma (ditta Dia-chem s.r.l.). Le prime analisi sono state eseguite utilizzando, come controllo, il DNA di due campioni di linee cellulari di neuroblastoma, una amplificata e l'altra non amplificata. Sono state scelte le sequenze complete dei primer dei geni per MYCN e per IL1beta (quest'ultimo come gene di riferimento localizzato sul cromosoma 2q) e i probe per testare la fattibilità di una multiplex PCR in Real Time PCR. E' stato utilizzato un metodo di quantificazione assoluta con l'uso di curve standard per MYCN e IL1beta.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari
Il progetto si propone di:

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

- determinare la correlazione tra pattern di aberrazioni cromosomiche, profili di espressione genica e outcome del paziente, al fine di migliorare i criteri per la classificazione del rischio del paziente nei seguenti protocolli europei: LNESG2, Infant ad interim, Unresectable ad interim, LINES.
- eseguire dello studio dello stato dell'oncogene MYCN e della delezione del cromosoma 1p per tutti i pazienti italiani centralizzati all'Istituto G. Gaslini di Genova.
- valutare l'utilizzo di alcuni marcatori molecolari quali fattori prognostici di malattia per il neuroblastoma.
- definire percorsi idonei per il trasferimento delle informazioni sperimentali alla clinica e alla progettazione di approcci terapeutici modulati in base al profilo di alterazioni cromosomiche proprio del tumore.
- valutare nella popolazione di neuroblastomi italiani la performance della signature di espressione di 59 geni quale predittore di prognosi.
- ottimizzare le metodiche di diagnostica non invasiva.

Impatto assistenziale certo o potenziale

I risultati di questo studio permetteranno una dettagliata caratterizzazione molecolare del neuroblastoma e il riconoscimento delle varianti più aggressive di questo tumore. I geni che verranno identificati come geni associati al neuroblastoma permetteranno la definizione di categorie di pazienti a differente rischio di progressione di malattia e lo sviluppo di strategie terapeutiche modulate sulla base delle caratteristiche genetiche del tumore. Il presente progetto avrà, quindi, dei benefici diretti per i piccoli pazienti affetti da neuroblastoma, in quanto la modulazione delle terapie potrà permettere di riservare gli approcci terapeutici più aggressivi solo ai pazienti che ricadranno nelle classi con rischio maggiore di progressione e recidiva della malattia; in questo modo si eviterà la somministrazione di terapie ad alte dosi quando questo non si riveli necessario, se non altamente dannoso, per gli esiti che tale chemioterapia può avere sui pazienti.

Risultati e prodotti 2009

Nell'anno 2009 sono state eseguite 130 analisi di MYCN e 108 analisi per la ricerca della delezione di 1p36 su campioni di tessuto congelato, paraffinato e su strisci di midollo osseo per mezzo di FISH a doppio colore su nuclei interfascici. Sono state valutate le alterazioni del DNA per mezzo della tecnica MLPA in tumori di pazienti adolescenti (33 casi) e di pazienti arruolati nel protocollo LNESG2 (50 casi). E' proseguita, a livello europeo, la raccolta dei dati biologici relativi ai pazienti con tumore che presentava MYCN gain, allo scopo di interpretarne il significato. E' stata quasi completata la raccolta dei dati biologici dei tumori di pazienti arruolati nel protocollo Unresectable.

Presso la struttura è già stata messa a punto l'identificazione dell'amplificazione di MYCN utilizzando il DNA circolante su campioni di plasma di pazienti all'esordio di malattia e su campioni di plasma di bambini sani come controllo.

Durante l'anno 2009 sono stati analizzati n. 40 campioni di plasma di bambini affetti da neuroblastoma, 20 con amplificazione di MYCN e 20 senza tale alterazione. E' stato estratto il DNA e i risultati hanno dimostrato come sia fondamentale l'accuratezza della fase pre-analitica del campione. A tale proposito sono state scritte delle Linee Guida che sono state inviate ad alcuni centri pediatrici al fine di eseguire l'analisi di nuovi campioni di plasma in condizioni standard.

Pubblicazioni

Paradiso A.-Mangia A.-Orlando C.-Verderio P.-Belfiglio M.-Marchetti A.-Bertario L.-Chiappetta G.-Gion M.-Tonini G.P.-Podo F.-Vocaturio A.-Silvestrini R.-Romani M.-Belloni E.-Cavallo D.-Ulivi P.-Tommasi S.-Steffan A.-Russo A.-Alessio M.-Calistri D.-Zancan M.-Parrela P.-Broggini M.-Giuseppe A.-Buttitta F.-Finocchiaro G.-Mazzocco K.-Veronesi G.-Landuzzi L.-Benevolo M.-Mariani L.-De Marco F.-Venuti A.-Giannelli G.-Quaranta M.-Trojano V.

The Integrated Oncology Program of the Italian Ministry of Health. Analytical and clinical validation of new biomarkers for early diagnosis: network, resources, methodology, quality control, and data analysis.

Int. J. Biol. Markers 24(3):119-129, 2009

Perfumo C.-Parodi S.-Mazzocco K.-Defferrari R.-Inga A.-Scarrà G.B.-Ghiorzo P.-Haupt R.-Tonini G.P.-Fronza G.

MDM2 SNP309 genotype influences survival of metastatic but not of localized neuroblastoma.

Pediatr Blood Cancer 53(4):576-583, 2009

Attività previste e risultati attesi nel 2010

Nell'anno 2010 ci proponiamo di:

- Eseguire lo studio, tramite FISH, dello stato dell'oncogene MYCN e della delezione del cromosoma 1p per i pazienti italiani centralizzati presso l'Istituto G. Gaslini di Genova.

- Analizzare, per mezzo di MLPA, tutti i tumori dei pazienti arruolati nel protocollo LINES del quale è previsto l'inizio a metà del 2010; per un gruppo di pazienti all'interno di questo protocollo la presenza di anomalie strutturali sarà dirimente per la scelta del trattamento del paziente.

- Continuare ad analizzare, tramite MLPA, i tumori dei pazienti arruolati nel protocollo LNESG2.

- Raccogliere e processare secondo le nuove "linee guida per la raccolta del plasma" il plasma dei pazienti affetti da neuroblastoma, allo scopo di evidenziare, in primo luogo, l'eventuale amplificazione di MYCN e successivamente utilizzare il DNA estratto dal plasma per analisi di altre alterazioni del DNA per mezzo di analisi pangenomica quali MLPA o arrayCGH.

- Analizzare i dati biologici di tutti i pazienti europei arruolati nel protocollo Unresectable.

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

Genomica dei tumori pediatrici

Linea di ricerca: 3 - Ottimizzazione e personalizzazione delle strategie terapeutiche

Programma: a - Definizione del profilo di rischio individuale in pazienti con neoplasia in fase iniziale o avanzata

Responsabile scientifico: Gian Paolo Tonini

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Paola Scaruffi, Simona Coco, Sara Stigliani

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: neuroblastoma; medulloblastoma; array-CGH; espressione genica; miRNA; T-UCR

Altre strutture IST partecipanti S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica (M. Truini); S.C. Genetica dei Tumori (M. Romani, B. Banelli)

Altri Enti coinvolti: D.O.Bi.G., Università degli Studi di Genova (F. Valdora); Fondazione Italiana per la Lotta al Neuroblastoma (S. De Luca); LAMSADE - CNRS, Université Paris Dauphine, Paris, France (S. Moretti); Epidemiologia Clinica e Molecolare, IRCCS San Raffaele Pisana, Roma (S. Bonassi); Università Federico II e CEINGE, Napoli (A. Iolascon); Policlinico Umberto I, Roma (F. Giangaspero); Università degli Studi di Padova (G. Basso); Fondazione Bruno Kessler, Trento (C. Furlanello); Children' Hospital, University of Koln, Germania (F. Berthold); University Hospital Heidelberg, Germania (S. Pfister); Istituto G. Gaslini, Genova (A. Garaventa, R. Haupt); Department of Molecular Pathology, Gustave Roussy Institute, Villejuif, France (B. Jean); Centre Léon Bérard, Laboratory of Translational Research, Lyon, France (V. Combaret); Center for Medical Genetics Ghent, CMGG, Ghent University Hospital, Ghent, Belgium (J. Vermeulen)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: diagnostica

Soggetti cofinanziatori: Fondazione Italiana per la Lotta al Neuroblastoma; Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro; MIUR; Ministero della Salute

Background

L'identificazione delle alterazioni genetiche dei tumori riveste un ruolo importante sia per conoscere la biologia della cellula neoplastica sia per sviluppare nuovi presidi diagnostici e nuove terapie. Presso la nostra Struttura, sono in corso programmi di studio focalizzati sui tumori pediatrici neuroblastici e cerebrali (medulloblastoma).

Tumori neuroblastici (TN)

I TN sono tumori che coinvolgono la componente simpatica del sistema nervoso autonomo e comprendono: Neuroblastoma (NB), Ganglioneuroblastoma Schwannian stroma-rich (GNBn-SR), Ganglioneuroblastoma nodulari (GNBn-SR), Ganglioneuroma (GN). I TN sono composti di cellule neuroblastiche (Nb) con quantità variabili di cellule Schwanniche stromali (SS). L'istologia tumorale è predittiva dell'outcome dei pazienti e i pazienti con GNB o GN hanno una prognosi migliore rispetto a quelli con neuroblastoma. Il NB è la più frequente neoplasia diagnosticata in età prescolare, con circa 110 nuovi casi/anno in Italia. Il NB mostra una notevole eterogeneità clinica, variando da malattia aggressiva (NB ad alto rischio, HR-NB), a una malattia che può regredire spontaneamente o a seguito di trattamento terapeutico (stadio 4S). I pazienti affetti da HR-NB costituiscono circa la metà dei casi di NB e hanno una prognosi infausta, nonostante l'uso di protocolli con chemioterapici a dosi elevate. La sopravvivenza libera da eventi a 5 anni dalla diagnosi non supera il 30% ed è stato dimostrato che la risposta alla terapia costituisce uno dei maggiori fattori di rischio per il paziente. Le caratteristiche biologiche del tumore, quali l'amplificazione di MYCN ed il contenuto nucleare di DNA, e i parametri sierici (LDH, ferritina e NSE), prognosticamente importanti nella malattia localizzata, risultano meno significativi nei pazienti con HR-NB.

Grazie alla rapida evoluzione della tecnologia dei DNA microarray, sono stati recentemente identificati pattern di aberrazioni cromosomiche (principalmente a carico dei cromosomi 1, 2, 3, 7, 11 e 17) e profili di espressione genica, sulla base dei quali sono stati proposti nuovi criteri di classificazione del NB. In particolare, sono state identificate due classi genetiche di HR-NB. Una, caratterizzata da anomalie cromosomiche di tipo numerico, è associata a una prognosi favorevole per il paziente. L'altra presenta aberrazioni segmentali con o senza amplificazione dell'oncogene MYCN, occasionalmente in associazione a guadagno o perdita di interi cromosomi, ed è associata ad un incremento del rischio di ricaduta di malattia. Studi di espressione genica hanno permesso di identificare una signature di 59 geni che è risultata un accurato predittore di prognosi indipendente da parametri clinici e da caratteristiche del tumore. L'impatto di tale signature nella predizione della risposta alla terapia è però non noto.

Studi preliminari suggeriscono che fattori oncogeni nel NB possano essere costituiti anche da RNA non codificanti, quali microRNA e Transcribed-Ultra Conserved Regions (T-UCRs). È noto che i microRNA sono regolatori dell'espressione genica e che specifici pattern di espressione di microRNA sono associati a progressione, prognosi e farmacoresistenza in vari tumori. Ad oggi sono presenti solo due lavori pubblicati (Chen Y, 2007; Sculte JH, 2008) che riportano una espressione differenziale di microRNA su casistiche limitate di neuroblastomi, non raggiungendo, quindi, la potenza statistica necessaria per valutare il valore predittivo di prognosi di tali profili di espressione. Recentemente, sono state individuate 481 UCR, sequenze altamente conservate tra regioni ortologhe di uomo, ratto e topo e localizzate sia in regioni intra- che inter-geniche. Il profilo di espressione dei T-UCR è stato studiato in leucemie e carcinomi colonrettali

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

ed epatocellulari dell'adulto, dimostrando l'esistenza di pattern di espressione associati alla progressione di tali neoplasie.

Allo scopo di migliorare la sopravvivenza dei pazienti, sono necessarie strategie innovative di trattamento in grado di bersagliare i pathway biologici responsabili del fenotipo HR-NB. In tale ambito, si prospetta l'urgenza di un'analisi integrata per determinare la performance prognostica di signature basate su aberrazioni del genoma, espressione genica e RNA non codificanti, da affiancare agli attuali parametri clinico-biologici di stratificazione dei pazienti in classi di rischio di progressione e ricaduta.

Medulloblastoma

Il medulloblastoma (MB) è un tumore maligno embrionale del sistema nervoso centrale che origina dal neuroectoderma e si sviluppa nel cervelletto. Rappresenta circa il 20-30% dei tumori pediatrici con un picco di incidenza nei bambini con età compresa tra i 5-10 anni. Dal punto di vista istologico il MB può essere distinto in due principali gruppi: tumori non desmoplastici che rappresentano circa l'85% dei casi e MB desmoplastici. I non desmoplastici, il cui istotipo più frequente è quello classico, sono caratterizzati da cellule densamente stipate con nuclei tondi circondati da scarso citoplasma. Il MB desmoplastico è caratterizzato dalla presenza di noduli privi di stroma, definiti "isole pallide", immersi in fibre reticolari (aree desmoplastiche). Sulla base di alcuni fattori clinici, quali età alla diagnosi (inferiore o maggiore 3 anni), presenza di metastasi e resezione chirurgica completa o incompleta, i pazienti sono distinti in due gruppi di rischio: pazienti a rischio standard e ad alto rischio. Il trattamento del MB è complesso e multidisciplinare e prevede l'impiego combinato ed integrato e della chirurgia, della chemioterapia e della radioterapia. La chemioterapia viene utilizzata sia come "standard" (cisplatino ed etoposide) nelle forme a basso rischio, che in programmi di cura intensificata con chemioterapia ad alte dosi sequenziali anche se la sua efficacia è variabile in funzione dell'istologia e alla resistenza intrinseca del tumore. Nonostante questo complesso approccio terapeutico la sopravvivenza dei pazienti a 5 anni dalla diagnosi si aggira intorno al 60-70%. Occorre, inoltre, sottolineare che nel bambino, rispetto all'adulto, vi sono fattori quali il maggiore rischio di sequele neurocognitive, uditive, vascolari a lungo termine dovute a danni da radioterapia che limitano l'impiego di tali terapie rendendo ancora più complesse le scelte terapeutiche. Lo sviluppo di moderne strategie di citogenetica quali l'array-CGH e spectral karyotype hanno permesso di meglio caratterizzare il genoma di MB identificando le più ricorrenti alterazioni cromosomali. La delezione del 17p è la più frequente aberrazione strutturale, riscontrata in circa 30-50% dei pazienti, spesso associata con la formazione dell'isocromosoma 17q. Altre alterazioni cromosomali sono la delezione del cromosoma 6, 8p, 10q e il gain del 7. Amplificazione degli oncogeni MYC e MYCN, presente nel circa 5-15%, è stata trovata associata alla variante istologia large cell e a una prognosi sfavorevole. Altri fattori biologici, la cui presenza avrebbe un ruolo prognostico sfavorevole nel MB sono un'aumentata espressione di ERBB2 mentre al contrario l'espressione di TRKC e l'accumulo nel nucleo della β -catenina sono associati a una miglior prognosi. Recentemente, è stato pubblicato un lavoro (Pfister S., 2009) in cui si propone una predizione dell'andamento clinico dei pazienti basandosi sulla presenza del gain del 6q, 17q, e l'amplificazione di MYC e MYCN. Mutazione a carico dei geni PTCH1 e SUFU coinvolti nella pathway Sonic Hedgehog (SHH) sono stati trovati nel circa il 25% dei casi, mentre geni β -catenina, APC, AXIN della pathway di WNT sono stati trovati approssimativamente nel 15%. Studi di espressione genica, hanno permesso di identificare signature specifiche associate alla malattia metastatica, alla variante istologia e alla sopravvivenza. In un recente lavoro pubblicato nel 2008 gli autori (Kool M., 2008), applicando un approccio di integrazione genoma-trascrittoma, hanno identificato cinque differenti sottotipi di MB ognuno con caratteristiche attivazioni di pathway e/o signature e associate a specifici difetti genetici.

Oggi più che mai è necessario implementare le conoscenze sui tumori pediatrici del Sistema Nervoso Centrale e periferico con studi biomolecolari che permettano di caratterizzare le alterazioni genetiche specifiche del tumore, identificare nuovi fattori prognostici molecolari, definire nuovi gruppi di rischio e stratificare in maniera più mirata i percorsi terapeutici.

Grazie allo sviluppo di nuove tecnologie quali i microarray è possibile analizzare decine di migliaia di geni in un singolo esperimento ottenendo una visione globale dell'attività dei geni del campione in esame. L'implementazione di software specifici permette, inoltre, di caratterizzare in modo integrato i profili di espressione genica e le aberrazioni cromosomiche. Un ulteriore avanzamento nello studio dei tumori solidi, volto al superamento dell'eterogeneità tissutale, consiste nell'applicazione della microdissezione tissutale, una tecnologia ad alta precisione che con l'ausilio di un raggio laser consente di raccogliere separatamente sottopopolazioni cellulari morfologicamente identiche.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Il progetto si propone una caratterizzazione molecolare dei Tumori neuroblastici e Medulloblastoma, al fine di:

- Identificare nuovi fattori prognostici molecolari,
- Determinare le correlazioni tra pattern di aberrazioni cromosomiche, profili di espressione genica e di RNA non codificanti e outcome del paziente, al fine di identificare nuovi fattori prognostici di malattia e migliorare i criteri per la classificazione di pazienti ad alto rischio di ricaduta;
- Identificare target molecolari di approcci terapeutici innovativi modulati in base al profilo di alterazioni genomiche e trascrittomiche proprie del tumore.

Impatto assistenziale certo o potenziale

I risultati di questi studi permetteranno di ottenere una dettagliata caratterizzazione del genoma e del trascrittoma dei tumori neuroblastici e del medulloblastoma. I marcatori molecolari che saranno associati alle varianti più aggressive dei tumori saranno utilizzati per meglio definire categorie di pazienti a rischio di progressione di malattia, per identificare possibili bersagli molecolari per lo sviluppo di terapie innovative modulate sulla base delle caratteristiche genetiche del tumore. Il presente progetto avrà, quindi, dei benefici diretti per i pazienti poiché si auspica che in un breve futuro gli approcci terapeutici ad alte dosi potranno essere riservati ai pazienti che ricadranno nelle classi con rischio di progressione elevato, evitando la somministrazione di chemioterapia ad alte dosi quando non necessaria. Verranno così ridotti i decessi per tossicità e saranno evitate alcune delle sequele a lungo termine che si manifestano nei bambini curati con terapia farmacologica ad alte dosi. La modulazione dei percorsi terapeutici in base alle caratteristiche molecolari del tumore consentirà, inoltre, un contenimento delle spese a carico del SSN.

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

Risultati e prodotti 2009

Nel corso del 2009 nel nostro laboratorio abbiamo studiato le aberrazioni cromosomiche (mediante array-CGH) e la gene expression in 158 tumori neuroblastici di pazienti con malattia metastatica, di cui i) 43 deceduti per malattia, ii) 66 lungo-sopravvissuti liberi da malattia (follow-up 5 anni), iii) 49 in stadio 4S. I risultati conseguiti hanno permesso di identificare distinte signature molecolari:

- I neuroblastomi dei pazienti con comportamento clinico più aggressivo mostrano un pattern di aberrazioni cromosomiche caratterizzato da anomalie strutturali sbilanciate, associato alla up-regolazione a livello trascrizionale di geni coinvolti nell'induzione della proliferazione cellulare.

- I neuroblastomi dei pazienti a prognosi favorevole sono caratterizzati da aberrazioni cromosomiche sia strutturali che numeriche ed elevati livelli di espressione di geni associati al pathway dell'apoptosi e del differenziamento cellulare.

- I neuroblastomi in stadio 4S sono caratterizzati quasi esclusivamente da aberrazioni numeriche e mostrano un'aumentata attivazione di geni coinvolti nel differenziamento cellulare.

Uno studio cooperativo condotto a livello internazionale, ha permesso di analizzare il profilo di espressione genica di 579 neuroblastomi distribuiti nei vari stadi di malattia e di identificare una signature di 59 geni che è risultata un predittore di prognosi indipendente da parametri clinici, quali stadio di malattia ed età del paziente alla diagnosi, e da caratteristiche del tumore (amplificazione di dell'oncogene MYCN, ploidia, istologia, indice mitotico di carioressi).

Recentemente, è stata identificata una nuova classe di RNA non codificanti ("Transcribed Ultra Conserved Region", TUCR), sequenze altamente conservate tra regioni ortologhe di uomo, ratto e topo e localizzate sia in regioni intra- che inter-geniche. Nella nostra Struttura abbiamo analizzato i profili di espressione di 723 microRNA e di 481 TUCR in 34 tumori di pazienti con neuroblastoma ad alto rischio (HR-NB). Mediante un approccio high-throughput con microarray e PCR quantitativa abbiamo identificato 28 TUCR e 13 microRNA in grado di definire una signature di espressione significativamente associata alla prognosi del paziente. Questi dati suggeriscono un possibile ruolo del network mRNA/RNA non codificanti nella patogenesi del neuroblastoma.

Nel corso dell'ultimo anno, la nostra unità, inoltre, si è occupata di studiare il genoma e il trascrittoma di casi di medulloblastoma a istologia classica, prelevati da pazienti appartenenti al gruppo Standard Risk. L'array-CGH è stata eseguita su 32 casi, inoltre per incrementare il potere statistico dello studio, abbiamo utilizzato un approccio di meta-analisi integrando 18 casi di array-CGH disponibili in PubMed. Le più frequenti alterazioni identificate sono: gain del 17q (33%), 1q (25%), del 7q (22%), e loss di 8p22.2-pter (20%), 17p (18%), 16q (17%), 10q (15%). I risultati dimostrano una significativa correlazione tra delezione del cromosoma 16q e la sopravvivenza dei pazienti. In 19 casi, inoltre, è stato studiato il profilo di espressione genica. L'analisi dei dati ha selezionato 1752 geni differenzialmente espressi rispetto a un pool di 10 cervelletti sani, utilizzato come campione di riferimento. Tra i geni trovati marcatamente downregolati, sono stati osservati 4 geni (DKK3, SFRP1, SFRP2, MSX2) regolatori del pathway di Wnt, che è noto essere coinvolto nella sviluppo del medulloblastoma. L'analisi è stata eseguita inizialmente sul gene DKK3 ed è stato ipotizzato che la sua down-regolazione sia associata a un meccanismo epigenetico di silenziamento. L'analisi quantitativa di metilazione del DNA, tramite la tecnica di Pyrosequencing, ha mostrato un'ipermetilazione nelle regioni dei due promotori di DKK3 in una bassa percentuale di cellule (12-14%), suggerendo che il silenziamento epigenetico non è il principale meccanismo coinvolto.

Pubblicazioni

Banelli B.-Bonassi S.-Casciano I.-Mazzocco K.-Di Vinci A.-Scaruffi P.-Brigati C.-Alemanni G.-Borzì L.-Tonini G.P.-Romani M.

Outcome prediction and risk assessment by quantitative pyrosequencing methylation of the 14.3.3s gene in advanced stage, high-risk, neuroblastic tumor patients.

Int. J. Cancer. Epub Jul 22, 2009

Coco S.-Tonini G.P.-Stigliani S.-Scaruffi P.

Genome and transcriptome analysis of neuroblastoma advanced diagnosis from innovative therapies.

Curr. Pharm. Des. 15: 448/455, 2009

Gemignani F.-Neri M.-Bottari F.-Barale R.-Canessa P.A.-Canzian F.-Ceppi M.-Spitaleri I.-Cipollini M.-Ivaldi G.P.-Mencoboni M.-Scaruffi P.-Tonini G.P.-Ugolini D.-Mutti L.-Bonassi S.-Landi S.

Risk of malignant pleural mesothelioma and polymorphisms in genes involved in the genome stability and xenobiotics metabolism.

Mutat Res. Fund. Mol. M. 671(1-2):76/83, 2009

Lerosey I.-Delattre O.-Schleiermacher G.-Michon J.-Combaret V.-Fischer M.-Oberthuer A.-Ambros P.F.-Beiske K.-Bénard J.-Marques B.-Rubie H.-Kohler J.-Pötschger U.-Ladenstein R.-Hogarty M.D.-McGrady P.-London W.B.-Laureys G.-Speleman F.-Vandesompele J.

Predicting outcomes for children with neuroblastoma using a multigene-expression signature: a retrospective SIOPEN/COG/GPOH study.

Lancet Oncol. 10(7):663/71, 2009

Lipska B.S.-Drozynska E.-Scaruffi P.-Tonini G.P.-Izycka-Swieszewska E.-Zietkiewicz S.-Balcerska A.-Perek D.-Chybicka A.-Biernat W.-Limon J.

c.1810C>T polymorphism of NTRK1 gene is associated with reduced survival in neuroblastoma patients.

BMC Cancer. 9:436;1/436;9, 2009

Scaruffi P.-Stigliani S.-Moretti S.-Coco S.-De Vecchi C.-Valdora F.-Garaventa A.-Bonassi S.-Tonini G.P.

Transcribed-Ultra Conserved Region expression is associated with outcome in high-risk neuroblastoma.

BMC Cancer. 9:441;1/441;9, 2009

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

Tonini G.P.

Treatment of neuroblastoma: from cellular to molecular therapy.

Curr. Pharm. Des. 15:422/423, 2009

Vermeulen J.-De Preter K.-Naranjo A.-Vercruyssen L.-Van Roy N.-Hellemans J.-Swerts K.-Bravo S.-Scaruffi P.-Tonini G.P.-De Bernardi B.-Noguera R.-Piqueras M.-Cañete A.-Castel V.-Janoueix-Perfumo C.-Parodi S.-Mazzocco K.-Defferrari R.-Inga A.-Scarrà G.B.-Ghiorzo P.-Haupt R.-Tonini G.P.-Fronza G.

MDM2 SNP309 genotype influences survival of metastatic but not of localized neuroblastoma.

Pediatr Blood Cancer. 53(4):576/583, 2009

Corrias M.V.-Pistorio A.-Cangemi G.-Tripodi G.-Carlini B.-Scaruffi P.-Fardin P.-Garaventa A.-Pistoia V.-Haupt R.

Detection of cell-free RNA in children with neuroblastoma and comparison with that of whole blood cell RNA.

Pediatr Blood Cancer, in press

Attività previste e risultati attesi nel 2010

Ci proponiamo di:

- Analizzare le variazioni di espressione genica e i profili di RNA non codificanti (es. microRNA, TUCR, ecc) in tumori di pazienti con HR-NB che i) hanno risposto alla terapia adiuvante, ii) che sono risultati resistenti, mediante la tecnologia dei microarray e della PCR quantitativa. In tal modo si definiranno i pathway genetici associati al fenomeno della farmacoresistenza. Tali risultati verranno poi validati in vitro e in vivo su modello murino.

- Analizzare le alterazioni cromosomiche, i profili di espressione genica e degli RNA non codificanti delle differenti componenti cellulari ("isole pallide" e aree desmoplastiche nei MB desmoplastici), utilizzando la laser capture microdissection. Si potranno così identificare le correlazioni genotipo-fenotipo e definire la loro origine mono/poligonale

- Studiare il genoma e il trascrittoma di MB ad istologia classica, utilizzando un approccio di meta-analisi e di integrazione array-CGH - gene expression, al fine di identificare marcatori prognostici per meglio arruolare i pazienti in categorie di rischio di progressione di malattia. La meta-analisi sarà eseguita utilizzando 50 casi che verranno condivisi dal gruppo di gruppo tedesco di Heidelberg.

- Studiare il pathway di WNT, in particolare focalizzandoci sullo studio di una classe di geni antagonisti, quali DKK3, SFRP1, SFRP2 trovati down-regolati nella nostra casistica. Lo studio ci permetterà di meglio definire il ruolo di questa classe di geni regolatori di WNT e di chiarire il loro ruolo nel pathway proliferativo delle cellule di medulloblastoma.

- Definire il ruolo dei microRNA come regolatori dell'espressione genica, in studi in vitro trattando cellule di MB con cisplatino, un farmaco comunemente utilizzato nei protocolli terapeutici, e valutando le variazioni di espressione genica mediante microarray. Si potrà così caratterizzare il meccanismo di azione del cisplatino ed individuare biomarcatori associati alla risposta al trattamento chemioterapico nel MB.

- Al fine di studiare i microRNA e i geni attivati dal cisplatino, un chemioterapico utilizzato nei protocolli terapeutici per il medulloblastoma, è in corso uno studio in vitro su linee cellulari di medulloblastoma umano.