

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

Programmazione 2009-2011

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, Sciutto, 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 è 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.

Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi

Le nostre attività dei prossimi 3 anni, si propongono di contribuire alla identificazione della complessa base molecolare e funzionale di CIN utilizzando modelli umani di precancerogenesi e linee ingegnerizzate come già dettagliato. Innanzi tutto, ci poniamo il problema di testare i metodi sperimentali e i procedimenti volti a raccogliere campioni rappresentativi delle lesioni e della mucosa tessuto-specifica e individuo-specifica "cl clinicamente sana".

Tra i moderni metodi ci avvarremo, in particolare, di FCM ad alta risoluzione, FCM-Sorting, FISH, oligoarray-CGH che possono permettere la misura qualitativa e quantitativa di aberrazioni al DNA, ai cromosomi e ai nuclei fornendo nuovi Biomarcatori potenzialmente utili per la Diagnosi Precoce ovvero nuovi criteri quantitativi di predizione di rischio di cancro o di recidiva per questi pazienti. Questi nuovi Biomarcatori, prima che gli end-points clinici siano disponibili dal follow-up dei pazienti, saranno trattati come end-points-surrrogato e investigati per le loro potenziali associazioni con i classici parametri istopatologici e clinici, inclusi alcuni fattori eziologici come il fumo di sigaretta. Questi sono i primi risultati attesi entro la fine del 2009.

Una importante novità, già avviata nel 2009, è stata la formazione di un gruppo interdisciplinare (anche, in parte, con l'individuazione di personale a contratto da dedicare al progetto) sullo studio (progetto OPL) della instabilità cromosomica nel modello delle lesioni orali preneoplastiche nell'uomo (in particolare, leucoplachie ed eritroplasie). Lo studio è multicentrico grazie all'attivazione di un protocollo di collaborazione con la Specialità di Otorinolaringoiatria dell'Azienda Ospedaliera S. Martino di Genova (A. Santelli), con le unità di precancerosi orale dell'IST (P. Mereu, M. Scala) e con il

Programmazione 2009-2011

Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, Medicina Orale e Oncologia Orale dell'Università di Torino (M. Pentenero, S. Gandolfo). Gli obiettivi preliminari della collaborazione sono stati e saranno relativi ai protocolli di campionamento e ai protocolli istopatologici, in collaborazione con le diverse patologie, ai protocolli clinici, alle misure di citometria a flusso con l'uso del CyFlow ML, al Sorting-FCM (con l'acquisizione di un nuovo strumento), alla ottimizzazione dell'isolamento di DNA genomico da campioni tissutali di scarsa quantità da OPLs e da adenomi coloretali per procedere alle misure di array-CGH con 2 distinti gruppi, la S.S. Oncologia Traslazionale Pediatrica con P. Scaruffi e G.P. Tonini e il gruppo straniero di G. Meijer, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands. Riteniamo, data l'importanza e la notevole quantità di informazioni fornita con i metodi descritti su modelli particolarmente interessanti, che anche dati preliminari in un piccolo numero di casi possano essere oggetto di pubblicazione.

Track record

Calistri D.-Rengucci C.-Seymour I.-Leonardi E.-Truini M.-Malacarne D.-Castagnola P.-Giaretti W.
KRAS, p53 and BRAF gene mutations and aneuploidy in sporadic colorectal cancer progression.
Cell. Oncol. 28:161/166, 2006

Derks S.-Postma C.-Moerkerk PTM.-van den Bosch SM.-Carvalho B.-Hermsen MAJA.-Giaretti W.-Herman JG.-
Weijenberg MP.-de Bruïne AP.-Meijer GA.-van Engeland M.
Promoter methylation precedes genetic alterations and chromosomal instability in colorectal cancer development.
Cell. Oncol. 28:247/257, 2006

Giaretti W.
Vanishing conflicts on cancer theories.
Cell. Oncol. 28:1/2, 2006

Iacopetta B.-Russo A.-Bazan V.-Dardanoni G.-Gebbia N.-Soussi T.-Kerr D.-Elsaleh H.-Soong R.- Kandioler D.-Janschek E.-Kappel S.-Lung M.-Leung CS.-Ko JM.-Yuen S.-Ho J.-Leung SY.-Crapez E.-Duffour J.-Ychou M.-Leahy DT.-
O'Donoghue DP.-Agnese V.-Cascio S.-Di Fede G.- Chieco-Bianchi L.-Bertorelle R.-Belluco C.-Giaretti W.-Castagnola P.-
Ricevuto E.-Ficorella C.- Bosari S.-Arizzi CD.-Miyaki M.-Onda M.-Kampman E.- Diergaard B.-Royds J.-Lothe RA.-Diep CB.-Meling GI.-Ostrowski J.-Trzeciak L.-Guzinska-Ustymowicz K.-Zalewski B.-Capella GM.- Moreno V,-Peinado MA.-
Lonnroth C.-Lundholm K.-Sun XF.-Jansson A.-Bouzourene H.-Hsieh LL.-Tang R.-Smith DR.-Allen-Mersh TG.-Khan ZA.-
Shorthouse AJ.-Silverman ML.-Kato S.- Ishioka C.
TP53-CRC Collaborative Group. Functional categories of TP53 mutation in colorectal cancer: results of an International Collaborative Study.
Ann. Oncol. 17(5):842/847, 2006

Maffei M.-Monticone M.-Verardo.-S. Giaretti W.-Castagnola P.
A new in vitro model to understand the KRAS role in the CRC progression.
Cell. Oncol. 30:263/264, 2008

Giaretti W.
Chromosomal instability and progression in colorectal cancer.
Cytometry, part B Clin. Cytometry 74B(1):54/55, 2008

Monticone M.-Biollo E.-Maffei M.-Donadini A.-Romeo F.-Storlazzi CT.-Giaretti W.-Castagnola P. Gene expression deregulation by KRAS G12D and G12V in a BRAF V600E context.
Mol. Cancer 7:92 , 2008

Terpstra L.-Castagnola P.-Donadini A.-Carvalho B.-Giaretti W.-Meijer GA.
Chromosomal instability and DNA aneuploidy in colorectal cancer.
Cell Oncol. 30, Abstract ISCO Congress, Amsterdam, March 5-8, 2008

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. Epub May 18, 2009