

## S.S. Genomica Funzionale

**Analisi dei profili di espressione per la classificazione molecolare dei tumori, la predizione della risposta al trattamento e l'identificazione dei meccanismi molecolari della chemioprevenzione**

*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:* Ulrich Pfeffer

*Altro personale della struttura partecipante al progetto:* Giovanna Angelini

*Anno di inizio:* 2009

*Durata:* 36 mesi

*Parole chiave:* microarray; expression profiling; single nucleotide polymorphism; chemio prevenzione; carcinoma mammario; carcinoma uroteliale; melanoma uveale

*Altre strutture IST partecipanti:* S.C. Oncologia Medica A (P. Pronzato, L. Del Mastro, P. Queirolo); S.C. Oncologia Medica B (F. Boccardo); S.C. Oncologia Medica C (M. Ferrarini, P. Piccoli); S.S. Senologia Chirurgica Avanzata (G. Canavese); S.C. Oncologia Urologica (P. Puppo); S.C. Chirurgia Toracica (C. Mosci); S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica (M. Truini, F. Carli, S. Salvi, P. Romano); S.C. Terapia Immunologica (S. Ferrini); S.C. Genetica dei Tumori (M.P. Pistillo)

*Altri Enti coinvolti:* Centro Biotecnologie Avanzate, Genova (A. De Flora); DOBIG, Università di Genova (M.P. Sormani); Istituto G. Gaslini, Genova (L. Varesio, M. Ponzoni); CILEA, Milano (L. Milanesi); ILET Sezione di Genova, CNR (M. Muselli), IRCCS Multimedica Milano (A. Albini); Ludwig Maximilian Universität Monaco, Germania (B. Bachmeier); Zentrum für Molekularbiologie der Universität Heidelberg, Germania (T. Efferth); University of Liverpool, UK (S. Coupland)

*Tipologia progetto:* clinico-epidemiologica osservazionale

*Area di interesse:* prevenzione primaria/secondaria

*Soggetti cofinanziatori:* MIUR

### *Background*

L'applicazione delle tecnologie della genomica all'oncologia ha portato all'approvazione di due "signatures" di espressione genica per la prognosi del carcinoma mammario che lasciano tuttavia ampio margine di miglioramento in particolare attraverso al re-introduzione di informazione funzionale nella fase di sviluppo di tali classificatori. Allo stesso tempo l'attenzione della clinica si sposta sulla predizione della risposta al trattamento per garantire ad ogni paziente il trattamento con la più alta probabilità di efficacia.

I classificatori di seconda generazione si baseranno sulla genomica integrata che prende in considerazione oltre all'espressione dei geni codificanti anche quelli non codificanti ed in particolare i miRNA nonché le alterazioni strutturali del genoma che vengono analizzate mediante ibridazione genomica comparativa su microarray contenenti sonde specifiche per i siti polimorfici del genoma umano.

La genomica integrata può inoltre dare informazioni circa i meccanismi d'azione di farmaci attraverso l'analisi del profilo di espressione di mRNA e miRNA generato in modelli cellulari ed animali, potenzialità che sfrutteremo per la continuazione dei nostri studi sulla chemoprevenzione.

La natura delle analisi genomiche determina la necessità dello sviluppo di mezzi bio-informatici ad hoc, generati per la risoluzione di problemi specifici.

### *Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari*

Obiettivo generale: Identificare classificatori molecolari per l'individualizzazione della terapia

Obiettivi secondari:

- Generazione di "signatures" prognostiche basate sui geni sperimentalmente identificati come coinvolti nei processi biologici che portano alla metastatizzazione.
- Generazione di un classificatore prognostico per il melanoma uveale.
- Identificazione di bersagli per terapie biologiche esistenti nel melanoma uveale.
- Validazione di un classificatore multi genico per il carcinoma uroteliale.

### *Impatto assistenziale certo o potenziale*

- Le "signatures" prognostiche verranno spinte al loro limite teorico di accuratezza prognostica e potranno essere integrate nella procedura di decisione terapeutica dopo appropriata validazione ed approvazione.
- Il classificatore prognostico per il melanoma uveale potrà essere integrato nell'algoritmo prognostico esistente ([www.ocularmelanoma.org](http://www.ocularmelanoma.org)).
- Sulla base del profilo di espressione sarà possibile individuare casi di melanoma uveale potenzialmente responsivi a terapie innovative; quest'informazione potrà portare alla formulazione di trials clinici.
- Il classificatore per il carcinoma uroteliale potrà guidare il tipo di intervento chirurgico.

# Programmazione 2009-2001

## *Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi*

Nel triennio intendiamo sviluppare l'approccio di genomica integrata tramite la messa a punto dell'integrazione di dati provenienti da analisi di espressione di mRNA (Affymetrix) e miRNA (Exiqon) e delle alterazioni genomiche su SNP-arrays (Affymetrix). Questo approccio verrà applicato alle varie patologie di interesse dell'Istituto.

La definizione di "signatures" funzionalmente definite procede attraverso l'isolamento di sottopopolazioni di linee cellulari selezionate per la loro capacità di eseguire passaggi cruciali della metastatizzazione come l'invasione, la resistenza all'anoikis, l'adesione al endotelio del tessuto bersaglio, l'extravasazione. Verrà analizzato il profilo di espressione delle sottopopolazioni in paragone alla popolazione di partenza e i geni identificati verranno usati per sviluppare classificatori prognostici sulla base di dati microarray di ampie casistiche di carcinomi mammari applicando statistiche classiche e innovative.

Il limite intrinseco del potere prognostico dei classificatori basati sull'espressione genica verrà analizzato mediante la generazione automatizzata di "signatures" basate sull'informazione funzionale della GeneOntology. L'applicazione di decine di signatures diverse permetterà l'individuazione di casi consistentemente misclassificati ossia "non classificabili".

Per quanto riguarda il melanoma uveale è prevista la generazione di profili di espressione di mRNA e miRNA di circa 30 casi nel primo anno per una prima validazione del classificatore prognostico proposto dal gruppo di W. Harbour.

La validazione della signature recentemente da noi sviluppata per la prognosi del carcinoma uroteliale superficiale prevede l'analisi di circa 25 nuovi casi mediante real-time PCR dei 42 geni che compongono il classificatore. Dopo l'analisi sarà possibile valutare la potenzialità del classificatore per eventualmente proporre un'ulteriore validazione multicentrica.

## *Track record*

Bachmeier B.-Nerlich AG.-Iancu CM.-Cilli M.-Schleicher E.-Vene R.-Dell'Eva R.-Jochum M.-Albini A.-Pfeffer U.  
The chemopreventive polyphenol Curcumin prevents hematogenous breast cancer metastases in immunodeficient mice.

Cell. Physiol. Biochem. 19:137/152, 2007

Indraccolo S.-Pfeffer U.-Minuzzo S.-Esposito G.-Roni V.-Mandrizzato S.-Ferrari N.-Anfosso L.-Dell'Eva R.-Noonan DM.-Chieco-Bianchi L.-Albini A.-Amadori A.

Identification of genes selectively regulated by IFNs in endothelial cells.

J. Immunol. 178:1122/1135, 2007

Larghero P, Vene R, Minghelli S, Travaini G, Morini M, Ferrari N, Pfeffer U, Noonan DM, Albini A, Benelli R.

Biological assays and genomic analysis reveal lipoic acid modulation of endothelial cell behavior and gene expression.

Carcinogenesis 28:1008/1020, 2007

Pedemonte N.-Caci E.-Sondo E.-Caputo A.-Rhoden K.-Pfeffer U.-Di Candia M.-Bandettini R,Ravazzolo R.-Zegarra-Moran O.-Galiotta L.J.

Thiocyanate Transport in Resting and IL-4-Stimulated Human Bronchial Epithelial Cells: Role of Pendrin and Anion Channels.

J. Immunol. 178:5144/5153, 2007

Albini A.-Mirisola V.- Pfeffer U.

Metastasis signatures: genes regulating tumor-microenvironment interactions predict metastatic behavior.

Cancer Metastasis Rev. 27:75/83, 2008

Bachmeier BE.-Nerlich AG.-Mirisola V.-Jochum M.-Pfeffer U.

Lineage infidelity and expression of melanocytic markers in human breast cancer.

Int. J. Oncol. 33:1011/1015, 2008

Bachmeier BE.-Mohrenz IV.-Mirisola V.-Schleicher E.-Romeo F.-Hohneke C.-Jochum M.-Nerlich AG.-Pfeffer U.

Curcumin downregulates the inflammatory cytokines CXCL1 and -2 in breast cancer cells via NFkappaB.

Carcinogenesis 29:779/789, 2008

Caputo A.-Caci E.-Ferrera L.-Pedemonte N.-Barsanti C.-Sondo E.-Pfeffer U.-Ravazzolo R.-Zegarra-Moran O.-Galiotta L.J.

TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity.

Science 322:590/594, 2008

Gennari A.-Sormani M.P.-Pronzato P.-Puntoni M.-Colozza M.-Pfeffer U.-Bruzzi P.

HER2 status and efficacy of adjuvant anthracyclines in early breast cancer: a pooled analysis of randomized trials.

J. Natl. Cancer Inst. 100:14/20, 2008

Vannini N.-Pfeffer U.-Lorusso G.-Noonan DM.-Albini A.

Endothelial cell aging and apoptosis in prevention and disease: E-selectin expression and modulation as a model.

Curr. Pharm. Des. 14:221/225, 2008

Cavarra E.-Fardin P.-Fineschi S.-Ricciardi A.-De Cunto G.-Sallustio F.-Zorzetto M.-Luisetti M.-

Pfeffer U.-Lungarella G.-Varesio L.

Early response of gene clusters is associated with mouse lung resistance or sensitivity to cigarette smoke.

Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 296:418/429, 2009

# Programmazione 2009-2001

Persano L.-Moserle L.-Esposito G.-Bronte V.-Barbieri V.-Iafrate M.-Gardiman MP.-Larghero P.-Pfeffer U.-Naschberger E.-Sturzl M.-Indraccolo S. et al  
Interferon-alpha counteracts the angiogenic switch and reduces tumor cell proliferation in a spontaneous model of prostatic cancer.  
Carcinogenesis 30:851/860, 2009

Mazibrada J.-Andrea MD.-Ritta M.-Borgogna C.-Dell'eva R.-Pfeffer U.-Chiusa L.-Gariglio M.-Landolfo S.  
In vivo growth inhibition of head and neck squamous cell carcinoma by the Interferon-inducible gene IFI16.  
Cancer Lett., in press

Pfeffer U.-Romeo F.-Noonan DM.-Albini A.  
Prediction of breast cancer metastasis by genomic profiling: where do we stand?  
Clin. Exp. Metastasis, in press

## **Citogenetica (arrayCGH) ed analisi di polimorfismi per la classificazione molecolare e la predizione della risposta ai trattamenti terapeutici Dati di progetto**

*Linea di ricerca:* 3 – Ottimizzazione e personalizzazioni delle strategie terapeutiche

*Programma:* b - Predizione della risposta ai trattamenti, inclusa la possibilità di valutare precocemente la risposta definitiva

*Responsabile scientifico:* Giovanna Angelini

*Altro personale della struttura partecipante al progetto:* Ulrich Pfeffer

*Anno di inizio:* 2009

*Durata:* 36 mesi

*Parole chiave:* SNP (single nucleotide polymorphism); CNV (copy number variation); LOH (loss of heterozygosity); carcinoma mammario; melanoma uveale; microcitoma polmonare

*Altre strutture IST partecipanti:* S.C. Oncologia Medica A (L. Del Mastro); S.C. Oncologia Medica C (P. Piccioli); S.S. Senologia Chirurgica Avanzata (G. Canavese); S.C. Chirurgia Toracica (C. Mosci); S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica (M. Truini, F. Carli, P. Romano); S.C. Terapia Immunologica (S. Ferrini); S.C. Genetica dei Tumori (M.P. Pistillo)

*Altri Enti coinvolti:* Centro Biotecnologie Avanzate, Genova (A. De Flora); DOBIG, Università di Genova (M.P. Sormani); Istituto G. Gaslini, Genova (V. Capra); CRBA, Bologna (V. Mantovani); University of Liverpool, UK (S. Coupland)

*Tipologia progetto:* clinico-epidemiologica osservazionale

*Area di interesse:* prevenzione primaria/secondaria

*Soggetti cofinanziatori:* MIUR

### *Background*

Il nostro gruppo ha messo a punto l'analisi dei polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) avvalendosi della tecnologia innovativa dei DNA microarrays, utilizzando la piattaforma Affymetrix. Questo approccio permette di ridurre la complessità del genoma consentendo una genotipizzazione rapida ed efficiente. L'analisi delle varianti alleliche degli SNP, uniformemente distribuiti su tutto il genoma, su chip ad alta densità, permette infatti di effettuare simultaneamente in un'unica analisi la genotipizzazione, l'analisi della perdita di eterozigosi (LOH), l'identificazione delle disomie uniparentali (UPD) e l'analisi delle variazioni di copy number su tutti i cromosomi.

### *Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari*

Obiettivo generale: Individuare alterazioni cromosomiche coinvolte nei processi di tumorigenesi invasione e metastatizzazione.

Obiettivi secondari:

- Identificare polimorfismi che possano indirizzare la terapia del carcinoma mammario.
- Per il melanoma uveale, confermare i dati riportati in letteratura relativi allo stretto rapporto evidenziato tra le alterazioni cromosomiche ed il processo di metastatizzazione ed identificare i geni sui cromosomi 3 e 8 che determinano il maggiore rischio di recidiva osservato.
- Produrre un classificatore molecolare per il microcitoma polmonare.
- Identificare l'interazione tra geni anche appartenenti a pathways distinti.

### *Impatto assistenziale certo o potenziale*

- Il classificatore prognostico per il melanoma uveale potrà essere integrato nell'algoritmo prognostico esistente ([www.ocularmelanoma.org](http://www.ocularmelanoma.org)). Quando i dati di aCGH potranno essere ottenuti anche dalle poche cellule presenti nell'agoaspirato sarà possibile utilizzare tale metodica per fornire un giudizio prognostico ed un indirizzo terapeutico.

## Programmazione 2009-2001

- Il classificatore molecolare del microcitoma polmonare potrà essere utilizzato per la decisione terapeutica dopo correlazione delle classi molecolari con la risposta alla terapia.

### *Descrizione delle attività 2009-2011, con dettaglio delle attività e dei risultati attesi nel primo anno*

Per quanto concerne il carcinoma mammario, abbiamo iniziato in collaborazione con Lucia Del Mastro e Patrizia Piccioli (S.C. Oncologia Medica A e C) uno studio su donne in post-menopausa radicalmente operate per tumore infiltrante della mammella, in assenza di recidive locali e/o a distanza, in trattamento con Tamoxifen per 5 anni ed arruolate in uno studio prospettico multicentrico per ricevere ulteriori 5 anni di terapia ormonale con letrozolo. Abbiamo suddiviso le pazienti in gruppi differenti a seconda dei livelli di risposta alla terapia ed effettuato l'analisi degli SNP su tutto il genoma. I nostri risultati preliminari indicano che esistono differenze significative nel genoma delle pazienti che rispondono alla terapia con letrozolo rispetto a quelle che non rispondono. In particolare sono state identificate delle regioni amplificate sui cromosomi 9 e 19 che saranno oggetto di uno studio più approfondito. Intendiamo completare ed estendere l'analisi per tutte le pazienti seguendone il follow up nel tempo. Mediante l'analisi della regressione logistica multipla e di metodiche statistiche di nuova generazione come la Multi-Dimensionality Reduction, ci proponiamo inoltre di identificare le interazioni tra i geni di maggior interesse.

Per il microcitoma polmonare, intendiamo collezionare ed analizzare nei tre anni del progetto, circa 100 campioni di tumore. I dati ottenuti mediante SNP arrays saranno correlati con i dati di espressione genica, per individuare eventuali delezioni, amplificazioni o LOH significativi per l'espressione genica. L'insieme dei dati verrà utilizzato per sviluppare una classificazione molecolare del microcitoma polmonare con la finalità di individuare sottoclassi che potranno successivamente essere correlate con il comportamento clinico del tumore e la risposta al trattamento.

Per lo studio sul melanoma uveale, utilizzeremo l'analisi di array CGH ad elevatissima risoluzione per individuare perdite o aumenti del contenuto di DNA delle cellule tumorali. Se eseguita in un numero consistente di tumori renderà possibile individuare regioni cromosomiche ristrette delete od amplificate che possano contenere geni causalmente coinvolti nella tumorigenesi. Per il melanoma uveale sono già stati identificate, mediante FISH, alterazioni cromosomiche e sappiamo che i cromosomi 3, 6 e 8 sono coinvolti nella tumorigenesi. Applicando la tecnica della aCGH sarà possibile individuare le regioni specifiche di tali cromosomi che portano geni oncosoppressori (chr. 3) od oncogeni (chr. 6 e 8). Inoltre sarà possibile raffinare e consolidare il potere prognostico delle alterazioni cromosomiche.

Nel triennio intendiamo infine sviluppare l'approccio di genomica integrata tramite la messa a punto dell'integrazione di dati provenienti da analisi di espressione di mRNA (Affymetrix) e miRNA (Exiqon) e delle alterazioni genomiche su SNP-arrays (Affymetrix). Questo approccio verrà applicato alle varie patologie di interesse dell'Istituto.

### *Track record*

Bachmeier B.-Nerlich AG.-Iancu CM.-Cilli M.-Schleicher E.-Vené R.-Dell'Eva R.-Jochum M.-Albini A.-Pfeffer U.  
The chemopreventive polyphenol Curcumin prevents hematogenous breast cancer metastases in immunodeficient mice.  
Cell Physiol. Biochem. 19:137/152, 2007

Albini A.-Mirisola V.-Pfeffer U.  
Metastasis signatures: genes regulating tumor-microenvironment interactions predict metastatic behavior.  
Cancer Metastasis Rev. 27:75, 2008

Bachmeier BE.-Mohrenz IV.-Mirisola V.-Schleicher E.-Romeo F.-Höhneke C.-Jochum M.-Nerlich AG.-Pfeffer U.  
Curcumin downregulates the inflammatory cytokines CXCL1 and -2 in breast cancer cells via NFkappaB.  
Carcinogenesis 29:779/789, 2008

Bachmeier BE.-Nerlich AG.-Mirisola V.-Jochum M.-Pfeffer U.  
Lineage infidelity and expression of melanocytic markers in human breast cancer.  
Int. J. Oncol. 33:1011/1015, 2008

Gennari A.-Sormani MP.-Pronzato P.-Puntoni M.-Colozza M.-Pfeffer U.-Bruzzi P.  
HER2 status and efficacy of adjuvant anthracyclines in early breast cancer: a pooled analysis of randomized trials.  
J. Natl. Cancer Inst. 100:14/20, 2008

Pfeffer U.-Romeo F.-Noonan D.M.-Albini A.  
Prediction of breast cancer metastasis by genomic profiling: where do we stand?  
Clin. Exp. Metastasis Epub Jun 22, 2009

Mazibrada J.-Andrea MD.-Ritta M.-Borgogna C.-Dell'eva R.-Pfeffer U.-Chiusa L.-Gariglio M.-Landolfo S.  
In vivo growth inhibition of head and neck squamous cell carcinoma by the Interferon-inducible gene IFI16.  
Cancer Lett., in press