

S.C. Genetica dei Tumori

Analisi delle alterazioni genetiche ed epigenetiche nelle neoplasie cerebrali e loro significato prognostico

Linea di ricerca: 1 – Prevenzione e Cancerogenesi

Programma: c - Basi genetiche e molecolari della trasformazione neoplastica

Responsabile scientifico: Angela Di Vinci

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Claudio Brigati, Ida Casciano, Massimo Romani, Giorgio Allemanni, Alessandra Forlani

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: gliomi; metilazione; epigenetica

Altre strutture IST partecipanti: S.C. Oncologia Medica A (G. Gardin); S.S. Radioterapia Infantile e Tecniche Speciali (S. Barra)

Altri Enti coinvolti: Anatomia Patologica, A.O.U. San Martino, Genova (G.L. Ravetti); Neurochirurgia, A.O.U. San Martino, Genova (G.L. Zona); Ospedale S. Orsola, Bologna (W. Mantovani)

Tipologia progetto: clinico-epidemiologica sperimentale

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Soggetti cofinanziatori: Ministero della Salute; Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro

Background

La metilazione aberrante delle isole CpG nella regione promotrice dei geni costituisce un importante evento epigenetico nella genesi e sviluppo di diversi tipi di cancro. Sono già disponibili conoscenze sullo stato di metilazione delle neoplasie cerebrali che influenzano il decorso e la risposta alla terapia alchilante, ma non è stato ancora pubblicato alcuno studio sulla possibile suddivisione in sottogruppi prognostici, sulla base di alterazioni multiple, riferiti a casistica uniforme per caratteri clinici, chirurgici, istologici, di terapia radiante e chemioterapia.

Nei glioblastomi è stato dimostrato che l'ipermetilazione d'isole CpG del gene del riparo MGMT è un utile predittore di risposta agli agenti alchilanti. La frequente resistenza a tale terapia è comunque un fenomeno complesso, attribuibile ad una varietà di fattori, tra cui la natura della cellula gliale staminale. In particolare, l'alterata espressione dei geni HOX (specie del cluster A) contribuirebbe a mantenere quella capacità di rinnovamento cellulare necessaria per resistere ai tradizionali farmaci alchilanti in uso nel glioblastoma, come TMZ.

In analogia con quanto osservato in *Drosophila*, si ritiene oggi che i geni HOX agiscano al centro di una catena regolatoria che, almeno in cellule emopoietiche, coinvolge a monte i geni ALL-1 e a valle i geni DLX.

Nel progetto, ci limiteremo essenzialmente allo studio dei geni HOX e DLX, già descritti come attori importanti nello sviluppo gliale e neuronale

Il nostro gruppo ha recentemente dimostrato che il silenziamento dei geni DLX correla con l'insensibilità a farmaci pro-apoptotici in linee tumorali di diversa derivazione tissutale. Inoltre, in pazienti leucemici, questo silenziamento avviene con modalità epigenetiche e conferisce prognosi negativa, dovuta a maggiore "staminalità" cellulare.

L'individuazione d'alterazioni epigenetiche nella catena regolativa MLL-1/HOX/DLX sarebbe quindi indice di alta staminalità, scarsa risposta alla terapia e costituirebbe un fattore prognostico negativo in gliomi. Ciò sarebbe un dato nuovo e significativo, importante per una corretta stratificazione dei pazienti, in modo da riservare il trattamento con alchilanti soltanto ai gruppi in grado di rispondere prontamente alla terapia.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

L'obiettivo principale è il miglioramento della predittività di progressione e risposta alla terapia rispetto agli attuali parametri prognostici. Ciò verrà ottenuto mediante la realizzazione di un profilo di metilazione dei geni HOXA/DLX3,4,7 per ogni paziente.

Obiettivi secondari sono:

- 1) la migliore caratterizzazione molecolare della staminalità in cellule gliali attraverso lo studio della struttura della cromatina e dell'espressione di geni HOX/DLX
- 2) l'identificazione di nuovi siti CpG specifici nei geni bersaglio il cui stato di metilazione sia in grado di modulare la trascrizione

Impatto assistenziale certo o potenziale

La terapia farmacologica del glioma con alchilanti risente della incompleta conoscenza delle componenti molecolari che caratterizzano la cosiddetta "cellula staminale tumorale" progenitrice di questi tipi di tumori. I farmaci correnti e la stessa radioterapia hanno presumibilmente una influenza sulla massa tumorale, ma sono inefficaci contro cellule ad alta staminalità. Una completa caratterizzazione dettagliata di tale cellula è quindi importante per lo sviluppo di terapie adeguate.

Programmazione 2009-2001

I parametri isto-patologici attualmente utilizzati non sempre sono in grado di predire esattamente l'andamento clinico e il rischio di recidiva (specialmente nei meningiomi). La possibilità di definire sottogruppi molecolari, potrà aumentare il livello di potenzialità prognostica.

Sulla base dei dati ottenuti verrà elaborato uno standard ottimale di inquadramento per i soggetti affetti da neoplasia del SNC la cui rilevanza sarà di importanza primaria nell'ambito del SSN.

Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi

Lo studio della metilazione dei geni HOXA verrà effettuato su aree descritte (www.sequenom.com/epibrowser) sia utilizzando un apparato MassArray in collaborazione con l'Ospedale S. Orsola di Bologna, sia mediante Pirosequenziamento, come descritto (www.biotage.com). La macchina è disponibile in Istituto e viene da noi correntemente utilizzata.

Il criterio di scelta di DLX3,4,7 poggia sui nostri dati pubblicati e sulla presenza di questi tre geni sullo stesso cromosoma 17, ciò che li rende suscettibili a co-regolazione epigenetica. L'analisi dello stato di metilazione di DLX3,4,7 verrà effettuata su isole CpG descritte mediante pirosequenziamento.

Sono già stati condotti esperimenti preliminari in vitro secondo tecniche standard su linee di glioblastoma U87-MG, allo scopo di ottenere cloni resistenti a dosi massicce di TMZ (100 µM). Espressione quantitativa di HOXA-DLX3,4,7 rispetto alle cellule parentali trattate per breve tempo (12 ore) con TMZ verrà effettuata mediante real-time RT-PCR.

La raccolta dei campioni freschi è iniziata nel 2006 ed abbiamo pertanto a disposizione una banca di DNA, proveniente da tessuto congelato, costituita da circa 100 casi e un piccolo archivio di RNA di circa 20 casi. Abbiamo inoltre un archivio di DNA proveniente da tessuto paraffinato di circa 40 casi di glioblastomi di pazienti trattati con TMZ e radioterapia.

I casi vengono campionati opportunamente affinché possano essere studiati istologicamente con approfondimento immunohistochimico e molecolare. I casi saranno inseriti ab initio in un database che si arricchirà di tutti i dati sensibili clinici, neuroradiologici (anche con spettrometria) chirurgici, istologici, immunohistologici, genetici con analisi FISH e molecolari, radioterapeutici, chemioterapeutici e di follow up, tramite un data manager unico centrale.

Esperimenti preliminari da noi già condotti mediante MassArray su un numero limitato di gliomi a stadi diversi ha dimostrato che gli HOXA 3, 5, 7, 9 e 10 presentano livelli di metilazione paziente-specifici, fornendo pertanto le premesse alla valutazione di un ruolo dell'alterazione epigenetica di questi geni nella patogenesi e nella risposta alla terapia.

Dall'analisi della casistica completa e dallo studio dei cloni resistenti a TMZ i seguenti risultati sono attesi:

- evidenziazione di specifiche alterazioni epigenetiche nei nostri geni bersaglio nell'ambito di gruppi istologici omogenei, correlati a diverso andamento clinico e differente risposta terapeutica.
- modulazione del livello di espressione dei geni HOXA e DLX mediato dal livello di metilazione del promotore
- identificazione di nuovi siti CpG rispetto a quelli descritti in letteratura il cui stato di metilazione sia in grado di modulare la trascrizione di HOX/DLX, per meglio caratterizzare la cellula staminale tumorale.

Track record

Campo Dell'Orto M.-Banelli B.-Giarin E.-Accordi B.-Trentin L.-Romani M.-Te Kronnie G.-Basso G.
Down regulation of DLX3 expression in MLL-AF4 childhood lymphoblastic leukemia is mediated by promoter region methylation
Oncol. Rep. 18:417/423, 2007

De Lerma Barbaro A.-De Ambrosia A.-Banelli B.-Li Pira G.-Aresu O.-Romani M.-Ferrini S.-Accolla RS.
Methylation of CIITA promoter IV causes loss of HLA-II inducibility by IFN γ in promyelocytic cells.
Int. Immunol. 11:1457/1466, 2008

Attivazione epigenetica del promotore interno di DeltaNp73 come biomarcatore prognostico in linfomi

Linea di ricerca: 1 - Prevenzione e Cancerogenesi

Programma: c - Basi genetiche e molecolari della trasformazione neoplastica

Responsabile scientifico: Claudio Brigati

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Ida Casciano, Angela Di Vinci, Massimo Romani, Giorgio Allemanni, Alessandra Forlani

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: oncogeni; apoptosi; p73; linfomi

Altre strutture IST partecipanti: S.S. Malattie Linfoproliferative (S. Zupo)

Altri Enti coinvolti: Clinica Medica 1, Università di Roma 1 (V. Burgio)

Programmazione 2009-2001

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Soggetti cofinanziatori: Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro

Background

DeltaNp73 è una forma troncata della proteina p73 che risulta dall'uso alternativo di due promotori, uno posto al 5' dell'unità di trascrizione (promoter 1) e un secondo posto nel terzo introne (promoter 2). Le forme troncate di p73 non sono transattivanti e si ritiene agiscano come fattori dominanti-negativi sulla forma proapoptotica di p73. In questo senso deltaNp73 è definito un potenziale oncogene, e, infatti, varianti deltaN sono iperesprese in parecchi tumori. Inoltre la de-metilazione del promoter 2 è stata descritta come marcatore prognostico negativo indipendente nel neuroblastoma e altri tumori solidi.

In tessuti normali, come atteso, l'espressione di deltaNp73 è bassa o assente. In linfociti, p73 è necessario per l'apoptosi indotta da antigeni in T cellule. Di converso, la sopravvivenza di cellule T dopo incontro con antigeni richiede l'inibizione di p73, come potrebbe risultare dall'iperattivazione delle sue forme tronche, ad azione dominante negativa. In linea con queste premesse, noi abbiamo indagato l'espressione di deltaNp73 in B cellule di tonsilla umana.

Mediante cell sorting e separazione su gradiente, abbiamo osservato che sottopopolazioni di cellule B di tonsilla situate prevalentemente nei centri germinativi e aventi caratteristiche immunofenotipiche e fisiche proprie di cellule attivate possono esprimere la proteina deltaNp73. Il legame tra attivazione cellulare ed espressione di deltaNp73 è stato poi ricapitolato in vitro mediante stimolazione con TPA. Cellule B normali, sia resting che attivate, si sono rivelate sensibili al forbolo e hanno mostrato una parziale demetilazione del promotore 2 (normalmente altamente mutilato in entrambe le popolazioni) con presenza di modificazioni istoniche indicative di cromatina attiva; a questo faceva seguito una trascrizione promotore 2-specifica. L'importanza di meccanismi epigenetici e la struttura della cromatina nell'attivazione del promotore 2 è stata ulteriormente confermata mediante trattamento con l'inibitore della deacetilasi TSA che ne ha rapidamente aumentato l'attività. Inoltre, abbiamo indagato in ulteriore dettaglio i meccanismi molecolari che potrebbero costituire i mediatori chiave di questa conformazione cromatinica e abbiamo osservato che un sito AP-1, normale bersaglio di Jun e Fos, posto sul promotore 2, è legato in vitro da fattori nucleari solo in cellule B attivate.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Obiettivi generali:

- trasferire i risultati ottenuti su tonsilla normale in campo clinico diagnostico, analizzando materiale biologico di pazienti affetti da linfomi. A questo scopo si prepareranno popolazioni linfocitarie B di linfoma purificate da frammenti biotici freschi di pazienti affetti da linfoma di vario istotipo (linfoma mantellare, centrollicolare, marginale).
- valutare, in linea con i dati ottenuti mediante il tumor promoter TPA, il grado d'attivazione funzionale (trascrizionale) e strutturale (metilazione) del promoter 2 in linfomi
- determinare se il grado di metilazione del promotore 2 sia correlabile con dati clinici, come osservato in altri tumori, al fine di usare il test di metilazione come biomarcatore di prognosi e suscettibilità alla terapia in pazienti affetti da linfoma.

Si confronteranno i risultati ottenuti su ciascun tipo di linfoma con quelli ottenuti nella corrispondente controparte linfocitaria B normale. In primo luogo, questo confronto potrebbe portare informazioni sui meccanismi epigenetici coinvolti nella linfomagenesi e in secondo luogo potrebbe risultare utile in campo diagnostico-prognostico.

Obiettivi secondari:

- Porre le basi per un uso degli inibitori delle deacetilasi in prospettiva terapeutica nel linfoma.

Impatto assistenziale certo o potenziale

Impatto potenziale per la possibilità di migliore definizione di criteri prognostici basati sul grado di metilazione del promotore 2, in analogia con quanto riportato per altri tumori. Inoltre la migliore conoscenza degli effetti degli inibitori delle deacetilasi e inibitori della proteina chinasi C su questo oncogene ne qualifica il possibile studio in prospettiva terapeutica.

Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi

Durante il primo anno verrà effettuato il reperimento, la selezione e l'analisi del materiale biologico idoneo. Saranno studiati almeno 30 casi (in collaborazione con Simona Zupo, S.S. Malattie Linfoproliferative, IST) derivati da pazienti affetti da linfomi centrocitici a grandi cellule, mantellari e marginali; inoltre sarà reperito materiale di controllo costituito da linfonodi normali reattivi, disponibili in Istituto presso la SS Malattie Linfoproliferative. In collaborazione con Vito Burgio (Università di Roma 1) su tutti i casi verrà effettuata un'analisi immunoistochimica per deltaNp73 usando l'anticorpo specifico IMG-313 (Imgenex). Inoltre, si effettuerà l'analisi di metilazione del promotore 2 con pyrosequencing, e, laddove possibile, la real-time RT-PCR per i trascritti deltaN ad origine dai promotori 1 e 2. Parallelamente si esplorerà l'effetto della TSA su caratteristiche fenotipiche e di crescita in opportune linee cellulari di linfoma.

I risultati attesi saranno:

- iperespressione proteica deltaNp73 nelle sezioni di linfomi rispetto al controllo
- ipometilazione del promotore 2, specie nei linfomi centrocitici, rispetto al controllo
- iperespressione di trascritti per deltaNp73, originati in parte anche dal promotore 2, rispetto al controllo
- variazione (presumibilmente un decremento) del tasso di proliferazione con espressione di molecole apoptotiche in linee di linfoma dopo trattamento con TSA.

Programmazione 2009-2001

Durante il secondo anno le attività svolte saranno le seguenti:

- valutazione se il legame sul sito AP-1 del promotore 2 osservato in vitro sia attivo anche in vivo mediante CHIP con anticorpi anti c-Jun e Fos (i naturali ligandi di AP-1, mediatori centrali dell'attività di TPA).
- valutazione della funzionalità di questo legame in esperimenti di transfezione transiente usando sistemi reporter disponibili in laboratorio. In particolare, l'attività del reporter verrà dosata in linee di linfoma trattate o meno con siRNA anti c-Jun e Fos.

Nel terzo anno di attività si analizzerà il ruolo del sito AP-1 (e quindi di Jun e Fos) nella funzione complessiva del promotore 2 mediante mutagenesi sito-specifica del costruito reporter. Parallelamente, sempre in sistemi reporter, si indagherà la rilevanza dell'attivazione della proteina chinasi C (la via seguita da Jun e Fos) mediante l'uso di specifici inibitori dell'enzima.

Track record

De Lerma Barbaro A, De Ambrosia A, Banelli B, Li Pira G, Aresu O, Romani M, Ferrini S.-Accolla R.S.
Methylation of CIITA promoter IV causes loss of HLA-II inducibility by IFN γ in promyelocytic cells.
Int. Immunol. 11:1457/1466, 2008

Banelli B, Bonassi S, Casciano I, Mazzocco K, Di Vinci A, Scaruffi P, Brigati C, Allemanni G, Borzi L, Tonini G.P.-Romani M.
Outcome prediction and risk assessment by quantitative pyrosequencing methylation analysis of the SFN gene in advanced stage, high-risk neuroblastic tumor patients.
Int. J. Cancer 2009, in press

Di Vinci A, Sessa F, Casciano I, Banelli B, Franzi F, Brigati C, Allemanni G, Russo P, Dominioni L.-Romani M.
Different intracellular compartmentalization of TA and Δ Np73 in non-small cell lung cancer.
Int. J. Oncol. 34:449/456, 2009

Alterazioni epigenetiche nel neuroblastoma: ricerca di fattore prognostici e individuazione di meccanismi molecolari di malattia

Linea di ricerca: 2 - Interazioni Tumore-Ospite

Programma: c - Studi preclinici per lo sviluppo di test diagnostici e terapie biologiche antitumorali

Responsabile scientifico: Massimo Romani

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Claudio Brigati, Angela Di Vinci, Ida Casciano, Giorgio Allemanni, Alessandra Forlani

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: neuroblastoma; epigenetica; fattori prognostici

Altre strutture IST partecipanti: S.S. Oncologia Traslazionale Pediatrica (G.P. Tonini); S.C. Terapia Immunologica (S. Ferrini)

Altri Enti coinvolti: Laboratorio di Oncologia, Istituto G. Gaslini, Genova (M. Ponzoni); Università di Catania (M. Purrello)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: diagnostica

Soggetti cofinanziatori: Fondazione Italiana per la Lotta al Neuroblastoma

Background

I tumori neuroblastici (NT) sono la seconda neoplasia pediatrica ed includono due istotipi maligni (il neuroblastoma, NB e il ganglioneuroblastoma, GNB) e un istotipo benigno: il ganglioneuroma (GN).

Negli ultimi anni sono stati identificati diversi criteri basati sulle evidenze cliniche e biologiche che vengono utilizzati per suddividere i pazienti in quattro classi di rischio (alta, intermedia, bassa e molto bassa) e questa stratificazione, assieme alla stadiazione secondo il sistema INSS, ha un impatto diretto sulla scelta del protocollo ottimale di trattamento.

I pazienti a rischio intermedio o basso e molto basso reagiscono bene alla terapia e la loro aspettativa di vita può essere superiore al 70-90% a 5 anni a seconda dello stadio. Al contrario, i pazienti ad alto rischio in stadio 4 (che rappresentano il 50% di tutti i casi di tumore neuroblastico), presentano una rapida progressione e solo il 20-30% dei pazienti sopravvive più di 5 anni.

Programmazione 2009-2001

L'eterogeneità clinica dei tumori neuroblastici si accompagna alla eterogeneità biologica. Gli studi di genomica e di genomica funzionale hanno infatti rivelato la presenza di molteplici alterazioni associate alle caratteristiche cliniche di questo tumore.

Il neuroblastoma è stato uno dei primi tumori in cui le caratteristiche biologiche sono entrate a far parte dell'albero decisionale clinico e recentemente l'analisi epigenetica ha dimostrato le sue potenzialità nella definizione di classi di rischio in questo tumore e nella individuazione di nuovi bersagli terapeutici.

L'analisi delle alterazioni epigenetiche nel neuroblastoma è passata da una prima fase in cui è stato valutato qualitativamente lo stato di metilazione di geni candidati selezionati sulla base del loro coinvolgimento in diverse neoplasie, ad una fase diretta a determinare profili di metilazione anche attraverso l'analisi quantitativa. Questi ultimi studi hanno portato alla definizione di un particolare fenotipo, denominato "metilatore", associato alla riduzione dell'intervallo libero da malattia. Più recentemente sono state definite delle soglie di metilazione in grado di discriminare pazienti ad alto rischio con outcome favorevole da quelli con malattia rapidamente progressiva. Una delle prospettive più interessanti dell'analisi epigenetica è la individuazione di nuovi bersagli molecolari aggredibili da terapie che interferiscono direttamente o indirettamente con la metilazione del DNA.

Il nostro gruppo si occupa da anni della biologia e della epigenetica del neuroblastoma e ha contribuito al riconoscimento del fenotipo metilatore anche grazie alla identificazione di livelli soglia di metilazione clinicamente rilevanti in geni potenzialmente coinvolti nella patogenesi del neuroblastoma. In tale ottica il presente progetto in cui l'analisi epigenetica quantitativa sarà combinata con l'analisi mediante microarray di metilazione, rappresenta la logica evoluzione di una attività consolidata.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

L'obiettivo del progetto è quello di comprendere il ruolo della metilazione nella biologia e nella clinica dei tumori neuroblastici attraverso la definizione di profili di metilazione predittivi dell'outcome dei pazienti. La nostra attività sarà focalizzata sui pazienti ad alto rischio, una classe eterogenea in cui l'identificazione di nuovi e più precisi parametri prognostici può portare alla migliore definizione della classe di rischio e, in ultima analisi, allo sviluppo di terapie personalizzate.

Alla luce di recenti osservazioni che conferiscono ai Micro RNA un importante ruolo nello sviluppo di molti tumori, inclusi quelli neuroblastici, sarà studiato anche il ruolo della metilazione nel controllo di un subset di Micro RNA

Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi

Il progetto sarà suddiviso in quattro sottoprogetti:

- Analisi di metilazione mediante microarray
- Validazione del valore prognostico di marker epigenetici
- Analisi di Micro RNA
- Saggi funzionali con agenti demetilanti

Nel primo anno di attività si procederà alla validazione di marker epigenetici già identificati nel corso della nostra attività pregressa e alla messa a punto dell'analisi su microarray.

- Analisi di metilazione mediante microarray

L'aspetto cruciale di questa metodologia è la preparazione della sonda che viene effettuata immunoprecipitando corti frammenti di DNA con un anticorpo diretto contro le citosine metilate. La messa a punto del saggio consisterà nella valutazione dell'arricchimento di un set di sequenze il cui livello di metilazione è stato preventivamente misurato con sistemi di analisi quantitativa e nella determinazione di profili "pilota" su linee cellulari con caratteristiche differenti (MYCN amplificate e MYCN singola copia).

Nel secondo anno di attività la metodologia sarà applicata ai pazienti selezionati secondo una strategia di "class discrimination". In particolare saranno paragonati i profili di metilazione in pazienti ad alto rischio che presentano malattia in rapida progressione con pazienti ad alto rischio ma liberi da malattia da almeno 5 anni e con pazienti a basso rischio per individuare caratteristiche epigenetiche comuni e distinte utilizzabili come marcatori prognostici e per individuare nuovi potenziali bersagli terapeutici.

- Validazione del valore prognostico di marker epigenetici

Nel corso del biennio 2007-2008 abbiamo individuato diversi marcatori epigenetici di potenziale rilevanza clinica e uno di questi (il gene SFN) è stato validato in pazienti ad alto rischio. Nel corso del primo anno di attività completeremo la validazione degli altri marcatori e paragoneremo il loro valore prognostico con quello del "fenotipo metilatore" per determinare se questi due gruppi di geni che presentano metilazione aberrante nel neuroblastoma e che sono stati selezionati con strategie differenti, sono sovrapponibili o se individuano classi diverse di pazienti.

- Analisi di Micro RNA

Sarà valutato l'effetto diretto e quello indiretto della metilazione sulla espressione di Micro RNA e dei corrispondenti geni target in linee cellulari e in pazienti

- Saggi funzionali con agenti demetilanti

Sarà valutato l'effetto demetilante della Genisteina e dell'Epigallocatechina 3-gallato. L'azione di questi composti sulla metilazione sarà studiata anche in relazione alle alterazioni funzionali delle cellule di neuroblastoma.

Track record

Di Vinci A.-Gelvi I.-Banelli B.-Casciano I.-Allemanni G.-Romani M.

Meth-DOP-PCR: an assay for the methylation profiling of trace-amounts of DNA extracted from bodily fluids
Lab. Invest. 86:297/303, 2006

Programmazione 2009-2001

De Ambrosis A.-Casciano I.-Croce M.-Pagnan M.-Radic L.-Banelli B.-Di Vinci A.-Allemanni G.-Tonini G.P.-Punzoni M.-Romani M.-Ferrini S.

An interferon-sensitive response element is involved in constitutive caspase-8 gene expression in neuroblastoma cells
Int. J. Cancer 120:39/47, 2007

Di Pietro C.-Ragusa M.-Barbagallo D.-Duro LR.-Guglielmino MR.-Majorana A.-Giunta V.-Rapisarda A.-Tricarichi E.-Miceli M.-Grillo A.-Banelli B.-Defferari I.-Forte S.-Laganà A.-Bosco C.-Giugno R.-Pulvirenti A.-Ferro S.-Grzeschik KH.-Di Cataldo A.-Tonini GP.-Romani M.-Purrello M.

Involvement of GTA protein NC2B in Neuroblastoma pathogenesis suggests that it physiologically participates in the regulation of cell proliferation
Mol. Cancer 7:52, 2008

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

Outcome prediction and risk assessment by quantitative pyrosequencing methylation analysis of the SFN gene in advanced stage, high-risk neuroblastic tumor patients.
Int. J. Cancer, in press

Marcatori genetici ed epigenetici nei tumori dell'adulto: sviluppo di nuove applicazioni diagnostiche e prognostiche

Linea di ricerca: 2 - Interazioni Tumore-Ospite

Programma: c - Studi preclinici per lo sviluppo di test diagnostici e terapie biologiche antitumorali

Responsabile scientifico: Ida Casciano

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Claudio Brigati, Angela Di Vinci, Massimo Romani, Giorgio Allemanni, Alessandra Forlani

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: epigenetica; diagnostica molecolare; tumore mammario; tumore polmonare

Altre strutture IST partecipanti: S.C. Oncologia Medica A (L. Del Mastro, F. Grossi); S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica (M. Truini); S.C. Chirurgia Toracica (G.B. Ratto)

Tipologia progetto: clinico-epidemiologica osservazionale

Area di interesse: diagnostica

Soggetti cofinanziatori: Ministero della Salute; Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro

Background

La diagnosi di patologie neoplastiche, il loro inquadramento clinico, la formulazione di ipotesi prognostiche e l'arruolamento di pazienti in protocolli clinici consolidati o sperimentali si basa sulla integrazione di procedure di imaging e di diagnostica istopatologica e di laboratorio.

In questi ultimi anni è stato sviluppato il concetto di "ottimizzazione" e "personalizzazione" delle terapie nell'ottica di incrementarne l'efficacia e diminuirne gli effetti avversi. L'individuazione di criteri che permetteranno l'utilizzazione di terapie mirate richiederà l'utilizzazione di metodologie di indagine direttamente derivate dal laboratorio di ricerca sperimentale, che dovranno essere validate ad adattate alla utilizzazione in clinica.

In questo contesto, gli approcci basati sulla genomica e la proteomica appaiono come i più promettenti anche se la loro applicazione in campo clinico non ha ancora dato i risultati ipotizzati e sperati.

I limiti di queste tecnologie, oltre al costo elevato della strumentazione di base, sono la mancanza di standard di riferimento e, anche per motivi commerciali, la presenza di diverse piattaforme "hardware" e software con caratteristiche difficilmente sovrapponibili che hanno portato alla produzione di una grande quantità di dati di notevole interesse biologico ma di modesta rilevanza clinica.

In attesa che, nel medio termine, si arrivi ad individuare un "linguaggio comune" e degli standard condivisi nel campo della genomica e della proteomica, diviene sempre più attuale la necessità di utilizzare tecnologie consolidate, ma d'avanguardia, per fornire strumenti utilizzabili per individuare i percorsi terapeutici ottimali, per rispondere a precise domande del paziente sul suo stato di malattia, per migliorare le procedure diagnostiche e per individuare fattori predittivi di risposta o di tossicità alla terapia.

Il nostro gruppo si occupa da diversi anni di alterazioni genetiche ed epigenetiche in tumori e il presente progetto di ricerca è diretto al trasferimento in clinica di tecnologie e know how sviluppati per applicazioni precliniche.

Programmazione 2009-2001

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

L'obiettivo del progetto è quello di fornire uno strumento operativo attraverso il quale precise problematiche cliniche possano essere affrontate mediante tecnologie che siano d'avanguardia ma, allo stesso tempo, riproducibili ed affidabili.

Le tematiche generali sulle quali sarà focalizzata l'attività sono:

- Identificazione, validazione e trasferimento di nuovi fattori prognostici nel carcinoma polmonare e in quello mammario
- Identificazione di predittori e indicatori di risposta alla terapia

Un aspetto innovativo del progetto sarà l'utilizzazione del siero come sorgente surrogata di DNA tumorale sul quale effettuare le analisi molecolari

Obiettivi Specifici

Alcuni degli iniziali obiettivi specifici del progetto saranno:

Carcinoma Mammario:

- determinazione dello stato di amplificazione di HER2 sul DNA circolante
- determinare la clonalità tumorale in caso di neoplasia bilaterale sincrona o metacrona

Carcinoma Polmonare:

- individuare marcatori epigenetici in pazienti in stadio 1a e 1b predittivi di recidiva tumorale dopo resezione chirurgica

Impatto assistenziale certo o potenziale

Questo progetto presenta evidenti potenzialità assistenziali a breve o medio termine. In particolare la determinazione dello stato di amplificazione di HER2 dal DNA circolante permetterà di avviare alla terapia con Trastuzumab le pazienti recidivanti il cui tumore originario non era amplificato ma che presentano copie multiple di HER2 alla ripresa di malattia.

Analogamente, la determinazione della clonalità del Ca mammario bilaterale e l'individuazione di marcatori predittivi di ricaduta in tumori polmonari permetterà di selezionare o di sviluppare i protocolli terapeutici ottimali.

Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi

A) Carcinoma Mammario

- Amplificazione di HER2. L'efficacia dei vari trattamenti anti-tumorali disponibili nel carcinoma mammario varia in funzione sia delle caratteristiche biologiche del tumore sia delle caratteristiche dell'ospite. In questo progetto ci proponiamo di individuare sia fattori biologici del tumore sia fattori correlati all'ospite in grado di predire la risposta a trattamenti con farmaci biologici o con agenti ormonali.

La presenza di DNA tumorale circolante è un fattore prognostico in varie neoplasie ed apre prospettive interessanti sia per valutazione della risposta alla terapia sia per la scelta del tipo di terapia. Questo progetto ha l'obiettivo di sviluppare nuove metodiche per identificare alterazioni molecolari nel DNA circolante di pazienti con carcinoma mammario metastatico che possano predire la risposta ad inibitori dell'HER2/NEU. In particolare verrà valutata l'amplificazione di HER2/NEU nel DNA circolante con l'obiettivo di identificare i casi che, negativi per l'amplificazione sul tumore primitivo, possano aver acquisito tale alterazione nella fase metastatica e giovare del trattamento con inibitori di HER2. Inoltre, poiché il prodotto del gene EGFR è il target di vari farmaci biologici, verrà effettuata valutazione di mutazioni e dello stato di fosforilazione di EGFR che possano essere predittivi di sensibilità/resistenza agli inibitori di tiroxina kinasi. Verrà condotto inoltre uno studio pilota volto a valutare il profilo di metilazione di una serie di geni che presentano alterazioni della metilazione nel ca mammario per determinare se la persistenza e/o la ricomparsa di DNA metilato è un indicatore di malattia residua o di ripresa di malattia.

- Clonalità nel carcinoma mammario bilaterale. In una percentuale compresa tra lo 0.3 e il 12% di casi, il carcinoma mammario si presenta come neoplasia bilaterale, sincrona o metacrona. La bilateralità del tumore può essere causata dalla metastatizzazione controlaterale o dalla insorgenza di un secondo tumore primario.

La precisa distinzione tra recidiva e secondo tumore è un problema di notevole rilevanza clinica per la corretta stadiazione della paziente, per la sua valutazione prognostica e per la scelta del protocollo terapeutico più adeguato.

Non esistono criteri standard per distinguere i secondi tumori primari dalle recidive anche se alcuni criteri clinici e morfologici quali l'istotipo differente, la presenza di carcinoma in situ, o il grading differente possono fornire utili informazioni sulla origine comune o differente delle due neoplasie.

Nel corso degli anni sono state utilizzate diverse tecnologie per poter facilitare la discriminazione tra recidiva e secondo tumore primario, tuttavia i risultati ottenuti non hanno mostrato un reale vantaggio rispetto alla analisi clinico morfologica.

Nell'ottica di sviluppare un saggio molecolare che possa fornire un valido supporto ai classici parametri clinico-morfologici, utilizzeremo la combinazione tra l'analisi delle metilazione e di un polimorfismo genetico del gene HUMARA (recettore per gli ormoni androgeni) per stabilire la clonalità di neoplasie mammarie bilaterali.

Il razionale dello studio si basa sulla casualità della inattivazione del cromosoma X in donne 46, XX. Dato che un tumore può essere considerato come una espansione clonale, l'inattivazione di distinti cromosomi X in una neoplasia bilaterale può essere considerata come una evidenza a supporto della origine differente dei tumori.

Il cromosoma X attivo e quello inattivo possono essere riconosciuti sulla base della differente metilazione (attivo: non metilato; inattivo: metilato) a livello di un polimorfismo genetico altamente informativo. Tra i vari marcatori disponibili è stato selezionato il gene HUMARA che presenta un polimorfismo di lunghezza con un "Polymorphism Information Content" (PIC) = 0.9 (il 90 % delle donne sono eterozigoti per questo marcatore e quindi informative).

Programmazione 2009-2001

B) Carcinoma Polmonare

La resezione chirurgica completa con adeguato margine di tessuto sano rappresenta al momento l'elemento fondamentale per ottenere la guarigione definitiva delle neoplasie polmonari di stadio I. Tuttavia, nonostante la chirurgia apparentemente radicale, il 30-40% dei pazienti in stadio IA o IB presenta ricadute e rapida progressione.

Dato che molte di queste ricadute sono sistemiche si suppone che i pazienti che andranno incontro a recidiva sono portatori di micrometastasi esterne ai limiti della resezione chirurgica.

Il trattamento adiuvante dei pazienti in stadio I è un argomento controverso. Se per lo stadio IA si ritiene che il trattamento adiuvante non offra sostanziali benefici al paziente, per lo stadio IB sono stati proposti diversi regimi chemioterapici ma la loro efficacia non è stata chiaramente dimostrata.

La metilazione del DNA è una modificazione epigenetica che contribuisce alla inattivazione della funzionalità genica, è un evento precoce della trasformazione cellulare ed è coinvolta nella progressione tumorale. Un recente studio condotto su un gruppo di 116 pazienti in stadio IA e IB trattati chirurgicamente tra il 1986 e il 2002 ha dimostrato che la metilazione di 4 geni (RASSF1A, APC, p16 e CDH13) nel tumore e/o nei linfonodi regionali e mediastinici è associata con la recidiva entro 40 mesi dalla resezione del tumore.

La presenza di sequenze metilate nei linfonodi è stata considerata come indicativa della presenza di micrometastasi, non evidenziabili all'analisi istopatologica, responsabili per la rapida recidiva tumorale.

Nel presente progetto ci proponiamo di:

- verificare su una casistica più ampia e più omogenea, per mezzo di sistemi di analisi qualitativa, l'associazione tra presenza di metilazione nel set di geni sopraindicato e ricaduta precoce e determinare se queste alterazioni possono essere riscontrate nel DNA tumorale circolante.
- determinare se l'analisi quantitativa di metilazione permette di individuare livelli soglia di metilazione che siano in grado di identificare con precisione maggiore dell'analisi qualitativa i pazienti suscettibili a recidiva incrementando quindi la predittività dei marcatori.
- identificare nuovi marcatori epigenetici clinicamente rilevanti mediante analisi di metilazione su microarray in cui saranno confrontati i profili di metilazione di tumori polmonari con diverse caratteristiche cliniche

Track record

Di Vinci A.-Gelvi I.-Banelli B.-Casciano I.-Allemanni G.-Romani M.

Meth-DOP-PCR: an assay for the methylation profiling of trace-amounts of DNA extracted from bodily fluids.
Lab. Invest. 86:297/303, 2006

Di Vinci A.-Sessa F.-Casciano I.-Banelli B.-Franzi F.-Brigati C.-Allemanni G.-Russo P.-Dominioni L.-Romani M.

Different intracellular compartmentalization of TA and $\Delta Np73$ in non-small cell lung cancer.
Int. J. Oncol. 34:449/456, 2009

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

Outcome prediction and risk assessment by quantitative pyrosequencing methylation analysis of the SFN gene in advanced stage, high-risk neuroblastic tumor patients.
Int. J. Cancer, in press

Ruolo e applicabilità terapeutica di CTLA-4 come regolatore della proliferazione cellulare e citochine in cellule tumorali e della risposta immune

Linea di ricerca: 2 - Interazioni Tumore-Ospite

Programma: c - Studi preclinici per lo sviluppo di test diagnostici e terapie biologiche antitumorali

Responsabile scientifico: Maria Pia Pistillo

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Anna Morabito, Stefania Laurent

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: CTLA-4; trasduzione del segnale; citochine pro-angiogeniche; immunoterapia

Altre strutture IST partecipanti: S.C. Immunologia (M.C. Mingari); S.C. Oncologia Medica A (P. Queirolo, L. Del Mastro); S.C. Oncologia Medica C (P. Piccioli); S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica (S. Salvi); S.S. Genomica Funzionale (U. Pfeffer); S.C. Epidemiologia Clinica (B. Dozin)

Altri Enti coinvolti: Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università di Genova (D. Saverino); Clinica Ematologica, DIMI, Genova (M. Gobbi); Dipartimento di Patologia Umana, Università di Messina (G. Ferlazzo); Dipartimento di Istologia, Embriologia e Biologia Applicata, Università di Bologna (F. Alviano)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Programmazione 2009-2001

Soggetti cofinanziatori: MIUR; A.O.U. San Martino, Genova; Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro

Background

CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4) è uno dei recettori inibitori più largamente studiati nel contesto della risposta immunitaria T-mediata. La sua espressione, inizialmente ristretta ai linfociti T attivati e cellule T regolatorie, è stata recentemente evidenziata in una varietà di cellule non-T, sia normali che neoplastiche, suggerendo che CTLA-4 abbia un ruolo molto più ampio di quanto finora ritenuto. CTLA-4 è una glicoproteina omodimerica di membrana la cui funzione inibitoria si esplica principalmente dopo interazione con i ligandi CD80/CD86, espressi sulle cellule presentanti l'antigene, e porta a inibizione di proliferazione cellulare, progressione del ciclo cellulare e produzione di citochine. I meccanismi molecolari sottostanti la funzione inibitoria di CTLA-4 sono molteplici e complessi ma per la maggior parte riconducibili al legame della sua coda citoplasmatica a molecole di "signaling" intracellulari (PI3K, SHP2, PP2A), all'inibizione di ciclina D3 e di chinasi ciclino-dipendenti (cdk4/cdk6), nonché di fattori di trascrizione nucleari (NF- κ B, NF-AT, AP-1). L'espressione di un CTLA-4 funzionale è stata da noi evidenziata anche in linee cellulari derivate sia da tumori solidi di vario istotipo (carcinoma mammario, ovarico e melanoma) (Contardi E. et al. Int J Cancer 2005) che da neoplasie ematologiche (LAM, LLC) (Laurent S. et al. Br J Hematol 2007). In tali cellule CTLA-4 si è dimostrato capace di inibire la proliferazione cellulare e la produzione di citochine pro-infiammatorie e pro-angiogeniche dopo interazione con i ligandi suggerendone quindi un ruolo funzionale nella biologia dei tumori e la possibilità di sfruttarlo per un possibile "targeting" terapeutico.

Nel contempo abbiamo fornito la prima evidenza di espressione e funzione del CTLA-4 anche in cellule dendritiche (DC) derivate in vitro da monociti umani attivati con vari stimoli. Le DC giocano un ruolo centrale nell'iniziazione e controllo dell'immunità cellulare T-mediata. Di conseguenza l'upregolazione di CTLA-4 sulle DC mature potrebbe rappresentare un meccanismo di regolazione a "feedback" negativo per prevenire l'eccessiva attivazione delle cellule T e preservare l'omeostasi immunologica.

Lo studio del CTLA-4 nei tumori potrebbe chiarire se tale recettore esercita in queste cellule lo stesso ruolo immunosoppressorio che gli è stato attribuito quando è espresso sui linfociti T. In tal caso potrebbe costituire un meccanismo di "escape" aggiuntivo a quello della downregolazione delle molecole HLA di classe I che caratterizza la maggior parte dei tumori solidi. A tale riguardo il Laboratorio Tumori Mammari ha concluso uno studio retrospettivo che ha analizzato la downregolazione delle molecole HLA di classe I e delle subunità, catena pesante e leggera, in tessuti tumorali da pazienti con carcinoma mammario in follow-up presso la S.C. Oncologia Medica A (Protocollo ID 10156) (Morabito A. et al. Hum. Immunol. 2009).

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Rimane ancora molto da apprendere sulle molteplici funzioni del recettore CTLA-4 nell'ambito della biologia dei tumori e della regolazione della risposta immune. Pertanto, il programma di ricerca si propone come obiettivo generale quello di studiare le funzioni fisiologiche di CTLA-4 in modelli cellulari tumorali ed immunologici e di valutare la possibilità applicativa di un "targeting" terapeutico basato sul CTLA-4 e/o sulla via di trasduzione del segnale CTLA-4-dipendente. Obiettivo secondario è contribuire ad una migliore comprensione del meccanismo d'azione degli anticorpi umanizzati che bloccano il CTLA-4 (Ipilimumab, Tremelimumab) e vengono impiegati in studi clinici di fase II/III nel melanoma cutaneo metastatico anche nel nostro Istituto.

Impatto assistenziale certo o potenziale

I risultati di questa ricerca, sulla base delle nuove conoscenze acquisite sulle funzioni fisiologiche di CTLA-4 nei tumori e nelle cellule della risposta immune, potrebbero portare allo sviluppo di nuovi approcci terapeutici per il trattamento di tumori solidi ed ematologici. Infatti, l'osservazione che le cellule tumorali, sia di melanoma, carcinoma mammario ed ovarico che di alcune leucemie acute e croniche, possono rispondere al trattamento in vitro con i ligandi di CTLA-4 andando in apoptosi può aprire nuove strade per un approccio terapeutico con reagenti agonisti di CTLA-4. Ugualmente, l'osservazione che le cellule dendritiche siano regolate negativamente dal "signaling" trasdotto da CTLA-4, se confermata, come indicato da dati preliminari, può suggerire nuove terapie fondate sulla possibilità di interferire selettivamente con tale "signaling" in modelli di immunoterapia dei tumori basati sulle DC.

Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi

Le attività del triennio 2009-2011 saranno rivolte allo studio della funzione regolatoria del recettore CTLA-4 determinata dalla sua capacità di trasdurre segnali inibitori della sopravvivenza/proliferazione in cellule tumorali e della risposta immune. Di conseguenza verrà valutata la possibile applicabilità terapeutica della via di trasduzione del segnale CTLA-4-mediato in modelli sperimentali in vitro e in vivo. Verrà inoltre valutato il profilo di espressione genica nelle linee cellulari tumorali (melanoma cutaneo ed uveale) utilizzando la tecnica del microarray su piattaforma Affimetrix al fine di studiare i geni e i "pathways" espressi in modo differenziale prima e dopo trattamento delle linee con gli anticorpi agonisti/antagonisti di CTLA-4.

Altre attività saranno indirizzate alla migliore comprensione del meccanismo d'azione e dell'attività antitumorale degli anticorpi bloccanti CTLA-4 (Ipilimumab), impiegati nell'immunoterapia del melanoma cutaneo metastatico anche in Istituto.

Nel primo anno di attività verranno analizzati gli effetti funzionali indotti dal trattamento in vitro con anticorpi agonisti/antagonisti di CTLA-4, su linee cellulari e colture primarie derivate da alcuni tumori solidi (melanoma cutaneo ed uveale, carcinoma ovarico e mammario), su cellule leucemiche e cellule dendritiche mature derivate da monociti stimolati. Verranno quindi analizzati parametri morfologici e funzionali relativi a proliferazione, ciclo cellulare, apoptosi e produzione di citochine pro-infiammatorie e pro-angiogeniche.

Nel primo anno ci si aspetta di conseguire i seguenti risultati:

- identificazione del ruolo della via di trasduzione del segnale CTLA-4-mediato nei tumori e in cellule della risposta immune innata;
- possibilità di interferire con i meccanismi di sopravvivenza/proliferazione cellulare attraverso l'attivazione della via di trasduzione del segnale CTLA-4-mediato, indotta da reagenti agonisti di CTLA-4;
- valutazione degli effetti funzionali indotti dagli anticorpi anti-CTLA-4 terapeutici direttamente sulle cellule tumorali anziché sui linfociti T.

Programmazione 2009-2001

Track record

Laurent S.-Palmisano G.L.-Martelli A.M.-Kato T.-Tazzari P.L.-Pierri I.-Clavio M.-Balbi G.-Megna M.-Morabito A.-Lamparelli T.-Bacigalupo A.-Gobbi M.-Pistillo M.P.

CTLA-4 expressed by chemoresistant, as well as untreated, myeloid leukemia cells can be targeted with ligands to induce apoptosis.

Br. J. Hematol. 136:597/608, 2007

Pasquinelli G.-Pistillo M.P.-Ricci F.-Buzzi M.-Tazzari P.L.-Foroni L.-Manferdini C.- Ceccarelli C.-Stella A.-Conte R.

The "in situ" expression of human leukocyte antigen Class I antigens is not altered by cryopreservation in human arterial allografts.

Cell Tissue Bank. 8:195/203, 2007

Chew S. F.-Kanaan C.-Tait B.D.-Six participating laboratories-Pistillo M.P.

HLA expression and cancer – 14th IHIWS immunohistochemistry quality control exercise exchange results.

Tissue Antigens 69 s1:248/251, 2007

Morabito A.-Dozin B.-Salvi S.-Pasciucco G.-Balbi G.-Laurent S.-Pastorino S.-Carli F- Truini M.-Bruzzi P.-Del Mastro L.-Pistillo M.P.

Analysis and clinical relevance of human leukocyte antigen class I, heavy chain, and beta2-microglobulin downregulation in breast cancer.

Hum. Immunol. 70:492/495, 2009

Relazioni a congressi internazionali

Queirolo P.-Laurent S.-Boitano M.-Carrega P.-Saverino D.-Camoriano M.-Caielli A.-Alviano F.-Ferlazzo G.-Pistillo M.P.

Targeting CTLA-4 directly on melanoma cells: a possible novel perspective in the immunotherapy of cutaneous melanoma. 2009 ASCO Annual Meeting.

J. Clin. Oncol. 27:(suppl; abstr e22138), 2009

Nuovi marcatori molecolari a scopo di diagnosi, prognosi, predittività e/o monitoraggio della risposta alle terapie del melanoma e del carcinoma mammario

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

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

Responsabile scientifico: Maria Pia Pistillo

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Anna Morabito, Stefania Laurent

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: polimorfismi genici; immunoterapia; micrometastasi

Altre strutture IST partecipanti: S.C. Oncologia Medica A (P. Queirolo, L. Del Mastro); S.S. Oncologia Molecolare e Angiogenesi (A. Poggi); S.C. Epidemiologia Clinica (B. Dozin); S.C. Oncologia Medica C (P. Piccioli); S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica (S. Salvi)

Altri Enti coinvolti: Clinica Ematologica, DIMI, Università di Genova (M.Gobbi); Ospedale Sant'Andrea, La Spezia (S. Roncella); Istituto Toscano Tumori, ITT, Firenze (R. Notaro)

Tipologia progetto: clinico epidemiologica sperimentale

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Soggetti cofinanziatori: MIUR; A.O.U. San Martino, Genova; Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro

Background

La ricerca sarà focalizzata su due aspetti principali riassunti nei punti A e B.

A) Polimorfismi genici. E' noto che lo sviluppo di un tumore è un processo di trasformazione a tappe multiple dipendenti sia dalle caratteristiche intrinseche del tumore che dalla costituzione genetica dell'ospite. Di conseguenza la risposta clinica individuale ai trattamenti terapeutici antitumorali rimane spesso eterogenea sia in termini di efficacia che di tossicità. Tra i motivi di questa eterogeneità, rivestono particolare importanza le variazioni genetiche non solo delle molecole coinvolte nel metabolismo e nell'azione dei farmaci stessi, ma anche quelle di geni regolatori della risposta immune.

Programmazione 2009-2001

Nel campo dei farmaci comunemente usati in oncologia vari studi hanno identificato possibili correlazioni tra il risultato del trattamento e i polimorfismi genici, ovvero variazioni nella sequenza del DNA che sono presenti almeno nell'1% della popolazione. Tali variazioni genetiche riguardano più spesso un singolo nucleotide (polimorfismi a singolo nucleotide, SNP) e possono essere responsabili dell'alterata funzionalità di recettori cellulari (bersagli farmacologici diretti o indiretti), modificando la risposta farmacologica di un individuo. In particolare, alcuni polimorfismi genici dei recettori CTLA-4 e FcγRII/III (FcγRII/III), geni connessi con la regolazione della risposta immune mediata rispettivamente dai linfociti T e dalle cellule Natural Killer (NK), giocano un ruolo importante nel melanoma cutaneo metastatico e nel carcinoma mammario. Infatti, i polimorfismi di CTLA-4 possono influenzare l'efficacia della risposta all'immunoterapia del melanoma metastatico con l'anticorpo anti-CTLA-4 Ipilimumab (Sanderson K. et al. J. Clin. Oncol. 2005), mentre quelli dell'FcγRII/III la risposta all'immunoterapia del carcinoma mammario con l'anticorpo anti-HER-2 Trastuzumab (Musolino A. et al. J. Clin. Oncol. 2008). Ciò è dovuto al fatto che i polimorfismi genici influenzano nel primo caso l'espressione e l'attività inibitoria di CTLA-4 sui linfociti T modulando quindi l'efficacia dell'Ipilimumab, e nel secondo caso l'affinità di legame dell'FcγRII/III espresso dalle NK per il frammento cristallizzabile (Fc) dell'anticorpo Trastuzumab che ha come risultato l'uccisione delle cellule tumorali mediante citotossicità anticorpo-mediata (ADCC).

I polimorfismi di CTLA-4 sono stati anche associati alla suscettibilità e progressione del carcinoma mammario (Erfani N. et al. Cancer Genet. Cytogenet. 2006; Ghaderi A. et al. Breast Cancer Res. Treat. 2004) e di altri tumori solidi. Il nostro gruppo ne ha recentemente studiato la rilevanza clinica nell'esito del trapianto di cellule staminali tra fratelli HLA-identici (Piccioli P. et al. Ann. Hematol. 2009, in revision).

B) Determinazione di micrometastasi. La determinazione di micrometastasi in vari distretti dell'organismo (sangue periferico, midollo osseo, linfonodi, versamenti pleurici, liquor, etc) è fondamentale per il follow-up, per la prognosi e per valutare l'efficacia della terapia. Le tecniche solitamente utilizzate per la determinazione di micrometastasi (citologia, immunoistochimica, comparative genomic hybridization) mostrano scarsa sensibilità. Viceversa, alta sensibilità si può ottenere mediante le tecniche di biologia molecolare (PCR, Real time-PCR). Nel caso del tumore mammario un gene molto utilizzato è la mammoglobina umana (hMAM) (Watson M.A. et al. Cancer Res. 1996, Zehentner B.K. et al. Clin. Biochem. 2004, Roncella S. et al. Diagn. Mol. Pathol. 2008). L'applicazione clinica delle informazioni fornite dall'analisi quantitativa dell'hMAM richiede ulteriori approfondimenti.

Un aspetto peculiare delle micrometastasi è quello delle cellule neoplastiche circolanti (CTC) nel sangue periferico. E' noto che il tumore mammario può rilasciare CTC nel sangue periferico e in altri liquidi biologici o tessuti, che sono potenzialmente capaci di dare origine a metastasi (Cristofanilli M. et al. N. Eng. J. Med. 2004). Nonostante i numerosi studi sull'argomento, i risultati sull'utilità clinica delle CTC sono al momento contrastanti soprattutto a causa della varietà di metodologie impiegate per la loro determinazione. Di conseguenza, la messa a punto di metodologie standardizzate per la ricerca delle CTC rappresenta un requisito indispensabile per una corretta valutazione sia della biologia funzionale di tali cellule che della loro utilità come marcatore per la diagnosi, la prognosi ed il monitoraggio della risposta alle terapie del carcinoma mammario. L'hMAM, benché richieda ulteriori conferme, appare allo scopo un gene molto promettente.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Il programma di ricerca si propone come obiettivo generale quello di identificare nuovi marcatori molecolari di rilevanza clinica nel melanoma e nel carcinoma mammario. In particolare si propone: a) di caratterizzare le varianti polimorfiche di alcuni geni connessi con la regolazione della risposta immune (CTLA-4, FcγRII e RIII) e di valutarne il possibile ruolo di indicatori di prognosi e di risposta all'immunoterapia del melanoma e del carcinoma mammario; b) di mettere a punto, in collaborazione con l'Ospedale Sant'Andrea di La Spezia (Dr. Roncella S.), metodologie molecolari per la determinazione di micrometastasi in vari distretti dell'organismo in pazienti con carcinoma mammario. Verrà focalizzata l'attenzione sulla determinazione quantitativa dei livelli trascrizionali del gene mammoglobina (hMAM), una glicoproteina epiteliale mammaria, proposta come marcatore per la ricerca delle CTC nel sangue periferico, linfonodi, midollo osseo di pazienti con carcinoma mammario.

Impatto assistenziale certo o potenziale

I risultati di questa ricerca, sulla base delle conoscenze acquisite attraverso la caratterizzazione molecolare e funzionale dei marcatori CTLA-4, FcγRII, FcγRIII ed hMAM potrebbero portare allo sviluppo di nuovi indicatori di diagnosi, prognosi, predittività di risposta e di efficacia terapeutica per il melanoma e il carcinoma mammario. In particolare, potrebbero aiutare a stabilire quali siano i pazienti che possano beneficiare al meglio di una terapia biologica con anticorpi anti-CTLA4 (Ipilimumab) nel melanoma o anti-HER-2 (Trastuzumab) nel carcinoma mammario metastatico.

La ricerca potrà inoltre contribuire ad approfondire le conoscenze sull'utilizzo di hMAM come marcatore molecolare per determinare prognosi, micrometastasi, recidive e risposta alle terapie del carcinoma mammario.

Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi

Le attività del triennio 2009-2011 saranno rivolte alla caratterizzazione di nuovi marcatori con possibile significato di diagnosi, prognosi, predittività e/o monitoraggio della risposta all'immunoterapia del melanoma e del carcinoma mammario.

In particolare, la ricerca si propone di: i) caratterizzare alcuni polimorfismi genici di CTLA-4 e correlarli con le caratteristiche cliniche, istopatologiche, di follow up e di risposta al trattamento con l'anticorpo Ipilimumab o ad altre terapie immunologiche nel melanoma cutaneo metastatico; ii) caratterizzare i polimorfismi genici e l'attività funzionale di FcγRII, FcγRIII e correlarli con la risposta al trattamento con Trastuzumab in pazienti con carcinoma mammario iperesprimente HER-2. Altre attività saranno indirizzate alla comprensione della rilevanza clinica della determinazione delle CTC nei fluidi biologici e/o tessuti attraverso la messa a punto di metodologie molecolari per la determinazione di hMAM e altri marcatori.

Nel primo anno di attività verranno caratterizzate, mediante Multiplex Tetra-Primer ARMS PCR, le varianti polimorfiche di 3 SNP del gene CTLA-4 (-318C>T, +49A>G, CT60 G>A) in pazienti con melanoma cutaneo metastatico arruolati in studi clinici di fase II/III in Istituto (Protocollo ID 10233) e in pazienti con carcinoma mammario. Verrà messa a punto la metodologia per la determinazione delle varianti polimorfiche di un SNP per FcγRIIIa (158 A/V) e uno per

Programmazione 2009-2001

FcgammaRIIa (131 A/H) mediante amplificazione per PCR del DNA genomico estratto da leucociti del sangue periferico con primers specifici in condizioni di PCR standardizzate seguite da sequenziamento diretto dei prodotti di PCR. Tale metodologia verrà successivamente applicata per genotipizzare pazienti con tumore mammario iperesprimente HER2+ eleggibili per trattamento con Trastuzumab.

Verranno inoltre analizzate, in collaborazione con l'Ospedale Sant'Andrea di La Spezia (Dr. Roncella S.), metodologie molecolari per la determinazione di micrometastasi nei fluidi biologici di pazienti con carcinoma mammario focalizzando l'attenzione sulla determinazione quantitativa dei livelli trascrizionali del gene mammoglobina (hMAM).

Nell'ambito delle attività inerenti la Banca di linee cellulari ECBR, nel corso del triennio 2009-2011, si procederà alla riorganizzazione del materiale biologico che entrerà a far parte del Centro di Risorse Biologiche (CRB) dell'IST in accordo con le direttive del CRB.

Track record

Balbi G.-Ferrera F.-Rizzi M.-Piccioli P.-Morabito A.-Cardamone L.-Ghio M.-Palmisano G.L.-Carrara P.-Pedemonte S.-Sessarego M.-De Angioletti M.-Notaro R.-Indiveri F.-Pistillo M.P.

Association of -318 C/T and +49 A/G CTLA-4 gene polymorphisms with a clinical subset of Italian patients with systemic sclerosis.

Clin. Exp. Immunol. 149:40/47, 2007

Piccioli P.-Serra M.-Pedemonte S.-Balbi G.-Loiacono F.-Lastraioli S.-Gargiulo L.-Morabito A.-Zuccaro D.-Del Mastro L.-Pistillo M.P.-Venturini M.-De Angioletti M.-Notaro R.

Hexaprimer amplification refractory mutation system PCR for simultaneous single-tube genotyping of 2 close polymorphisms.

Clin. Chem. 54:227/229, 2008

Roncella S.-Ferro P.-Bacigalupo B.-Dessanti P.-Pronzato P.-Franceschini M.C.-Pratticò L.-Carletti A.M.-Canessa P.A.-Fontana V.-Fais F.-Pistillo M.P.-Fedeli F.

Assessment of RT-PCR detection of human mammaglobin for the diagnosis of breast cancer derived pleural effusions.

Diagn. Mol. Pathol. 17:28/33, 2008

Mangerini R.-Lanino E.-Terranova P.-Faraci M.-Pistillo M.P.-Gaetani G.F.-Ferraris A.M.

Telomere length of donors influences granulocyte recovery in children after hematopoietic stem cell transplantation.

Ann. Hematol. Epub Feb 20, 2009

Piccioli P.-Balbi G.-Serra M.-Morabito A.-Lamparelli T.-Gobbi M.-Laurent S.-Dozin B.-Bruzzi P.-Ferraris A.M.-Bacigalupo A.-Notaro R.-Pistillo M.P.

CTLA-4 +49 A>G polymorphism of recipients of HLA-matched sibling allogeneic stem cell transplantation is associated with survival and relapse incidence.

Ann. Hematol., in revision

Roncella S.-Ferro P.-Franceschini M.C.-Bacigalupo B.-Dessanti P.-Sivori M.-Carletti A.M.-Fontana V.-Canessa P.A.-Pistillo M.P.-Fedeli F.

Diagnosis and origin determination of malignant pleural effusions through the use of the breast cancer marker Human mammaglobin.

Diagn. Mol. Pathol., in revision

Relazioni a congressi

Roncella S.-Ferro P.-Bacigalupo B.-Pronzato P.-Franceschini M.-Pratticò L.-Carletti A.-Vanessa P.-Fontana V.-Pistillo M.P.-Fedeli F.

Assessment of RT-PCR detection of human mammaglobin for the diagnosis of breast cancer derived pleural effusions.

ASCO Annual Meeting-J. Clin. Oncol. 26:(20 suppl; abstr 1112), 2008

Fedeli F.-Ferro P.-Bacigalupo B.-Franceschini M.C.-Carletti A.M.-Canessa P.A.-Fontana V.-Pistillo M.P.-Roncella S.

Evaluation of RT-PCR for Human Mammaglobin mRNA in assisting the diagnosis of breast cancer pleural effusion.

98th Annual Meeting USCAP, Boston, 7-13 Marzo 2009-Mod. Pathos. Suppl. 1:22, 2009

Valutazione dei livelli di letrozolo e di estrone solfato in pazienti in post-menopausa affette da carcinoma mammario estrogeno positivo: correlazione con i polimorfismi del gene CYP19

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

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

Responsabile scientifico: Maria Ornella Vannozzi

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Gianluigi Lunardi

Anno di inizio: 2009

Programmazione 2009-2001

Durata: 36 mesi

Parole chiave: letrozolo; estrone solfato; polimorfismi; carcinoma mammario

Altre strutture IST partecipanti: S.C. Oncologia Medica A (L. Del Mastro, C. Bighin); S.C. Oncologia Medica C (P. Piccioli, M. Serra); S.C. Patologia Clinica (P. Marroni)

Tipologia progetto: clinico-epidemiologia sperimentale

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Background

Nelle donne in stato postmenopausale gli estrogeni sono sintetizzati nei tessuti periferici. L'ultimo passaggio della sintesi di estrogeni è la conversione degli androgeni androstenedione e testosterone rispettivamente negli estrogeni estrone ed estradiolo. Questa reazione di trasformazione è catalizzata dall'enzima aromatasi (codificato dal gene CYP19). Il letrozolo è un farmaco attivo oralmente in grado di legarsi all'aromatasi ed agire come potente inibitore dell'enzima. Dal punto di vista farmacocinetico il letrozolo ha una biodisponibilità del 99.9%, ed una lunga emivita (2 giorni nei volontari sani). In studi clinici il raggiungimento dello stato-stazionario della concentrazione plasmatica è stata osservata tra le 2 e le 6 settimane di trattamento. Il farmaco viene metabolizzato a livello epatico dagli isoenzimi del citocromo P450 3A4 e 2D6 nel suo maggior metabolita, il CGP44645 privo di attività farmacologica. L'affinità per l'enzima CYP3A4 sembra essere bassa ed ai livelli fisiologici del farmaco non si raggiunge saturazione dello stesso. Al contrario, l'affinità per l'enzima CYP2D6 è alta e la farmacocinetica del letrozolo potrebbe essere influenzata da fenomeni di auto-inibizione/saturazione così come da differenze soggettive in questa via metabolica o dall'interazione con altri farmaci.

La farmacodinamica degli inibitori dell'aromatasi è spesso valutata per mezzo del dosaggio ormonale degli estrogeni. Tuttavia l'utilizzo dei livelli circolanti di estrogeni (estrone e estradiolo) per la valutazione dell'efficacia della inibizione dell'aromatasi è un metodo abbastanza grossolano a causa delle notevoli difficoltà tecniche nel misurare livelli estremamente bassi di estrogeni in donne in stato postmenopausale. Il problema è minore per l'estrone solfato che è prodotto tramite solfatazione dell'estrone, i cui livelli sono in equilibrio con quelli dell'estrone e dell'estradiolo e che è circolante in quantità sufficiente da essere più facilmente valutabile grazie anche allo sviluppo di una metodica di dosaggio RIA altamente sensibile. E' stato dimostrato che il trattamento con inibitori dell'aromatasi causa una caduta simile delle concentrazioni di tutti e tre gli estrogeni.

La soppressione estrogenica mediata dal letrozolo viene influenzata dai polimorfismi del gene CYP19 che codifica l'attività dell'enzima aromatasi e di conseguenza tali variazioni genetiche potrebbero influenzare la risposta clinica alla terapia

Dati preliminari ottenuti da un nostro studio hanno dimostrato che:

- su un gruppo di 129 pazienti si è riscontrata una correlazione tra i livelli basali di estrone solfato e 4 polimorfismi del gene CYP19 (rs10046, rs4646, rs749292 e rs 727479)
- sulle stesse pazienti l'inibizione dei livelli di estrone solfato (mediana 82 %) riscontrata dopo 6 mesi di terapia con letrozolo sembrerebbe annullare tali differenze genetiche
- su un gruppo di 52 pazienti dopo 6 settimane di trattamento con letrozolo, 26 pazienti non avevano ottenuto una inibizione della produzione di estrogeni superiore al 50% mentre per le altre 26 l'inibizione riscontrata era superiore al 75%, in assenza di differenze statisticamente significative dei livelli plasmatici di letrozolo.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

- Monitorare le concentrazioni plasmatiche di letrozolo ed estrone solfato nel tempo e valutare la correlazione tra la farmacocinetica del letrozolo e l'inibizione dell'aromatasi calcolata tramite il decremento percentuale delle concentrazioni di estrone solfato in un trattamento di lungo periodo (5 anni)
- Stabilire il ruolo dei polimorfismi correlati con la biosintesi e il catabolismo degli estrogeni e i livelli plasmatici di estrone solfato monitorati su un lungo periodo
- Correlare, i dati ottenuti dall'analisi dei polimorfismi genetici del gene CYP19 (Oncologia Medica C - Dott.ssa P. Piccioli) ed i dati dei livelli di estrone solfato valutati sulle stesse pazienti, al follow-up clinico (Oncologia Medica A - Dott.ssa L. Del Mastro).

Impatto assistenziale certo o potenziale

L'efficacia della terapia con letrozolo dipende dalla capacità di soppressione estrogenica operata dall'inibitore dell'aromatasi e dalla possibilità di raggiungere livelli plasmatici di farmaco compatibili con l'effetto farmacologico. Il monitoraggio dei livelli estrogenici in corso di terapia e l'analisi farmacocinetica possono risultare perciò estremamente utili per la comprensione dell'effetto del trattamento

Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi

- Arruolamento presso la struttura di Oncologia Medica A di 300 pazienti partecipanti allo studio GIM-5 (Letrozole adjuvant therapy after Tamoxifen. Study of gene CYP19 correlation with letrozole efficacy in postmenopausal early breast cancer patients) e prosecuzione del monitoraggio di circa 150 pazienti già in corso di valutazione
- Determinazione delle concentrazioni plasmatiche di letrozolo e di estrone solfato:
 - a) il monitoraggio terapeutico del letrozolo sarà eseguito valutando le concentrazioni minime del farmaco dopo 6 settimane dall'inizio del trattamento (valutazione delle concentrazioni allo stato stazionario) e successivamente ogni 6 mesi per 5 anni (per valutare le concentrazioni durante un trattamento di lungo termine). Il letrozolo sarà misurato con cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC)
 - b) le concentrazioni plasmatiche di estrone solfato saranno misurate in campioni raccolti prima dell'inizio del trattamento con letrozolo e durante il trattamento con il farmaco (dopo 6 settimane e quindi ogni 6 mesi per 5 anni). L'estrone solfato sarà misurato tramite metodica RIA (Radio immuno assay).

Programmazione 2009-2001

- Analisi sulle stesse pazienti dei polimorfismi genetici del gene CYP19

I dati saranno caratterizzati tramite statistica descrittiva e analizzati statisticamente con test parametrici e non parametrici.

Attività del primo anno:

Arruolamento di circa 100 pazienti; raccolta e conservazione dei campioni plasmatici; esecuzione delle analisi quantitative di letrozolo ed estrone solfato; analisi statistica dei dati e valutazione delle correlazione con i polimorfismi genetici e la risposta terapeutica.

Track record

Coates AS.-Keshaviah A.-Thürlimann B.-Mouridsen H.-Mauriac L.-Forbes JF.-Paridaens R.-Castiglione-Gertsch M.-Gelber RD.-Colleoni M.-Láng I.-Del Mastro L.-Smith I.-Chirgwin J.-Nogaret JM.-Pienkowski T.-Wardley A.-Jakobsen EH.-Price KN.-Goldhirsch A.

Five years of letrozole compared with tamoxifen as initial adjuvant therapy for postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer: update of study BIG 1-98.

J. Clin. Oncol. 25(5):486/492, 2007

Del Mastro L.-Claravezza M.-Venturini M.

Reducing the risk of distant metastases in breast cancer patients: role of aromatase inhibitors. Cancer Treat. Rev.

33(8):681/687, 2007

Crivellari D.-Sun Z.-Coates AS.-Price KN.-Thürlimann B.-Mouridsen H.-Mauriac L.-Forbes JF.-Paridaens RJ.-Castiglione-Gertsch M.-Gelber RD.-Colleoni M.-Láng I.-Del Mastro L.-Gladieff L.-Rabaglio M.-Smith IE.-Chirgwin JH.-Goldhirsch A.

Letrozole compared with tamoxifen for elderly patients with endocrine-responsive early breast cancer: the BIG 1-98 trial.

J. Clin. Oncol. 26(12):1972/1979, 2008

Piccioli P.-Serra M.-Pedemonte S.-Balbi G.-Loiacono F.-Lastraioli S.-Gargiulo L.-Morabito A.-Zuccaro D.-Del Mastro L.-Pistillo MP.-Venturini M.-De Angioletti M.-Notaro R.

Hexaprimer amplification refractory mutation system PCR for simultaneous single-tube genotyping of 2 close polymorphisms.

Clin. Chem. 54(1):227/229, 2008

Venturini M.-Serra M.-Piccioli P.-Levaggi A.-Boni L.-Vannozzi M.-Aitini E.-Boni C.-Bottini A.-Cianciulli A.-Cognetti F.-DePlacido S.-DiBlasio B.-Driol P.-Fava S.-Merlano MC.-Ponzzone R.-Porpiglia M.-Sconamiglio G.-Del Mastro L.-Notaro R.-Lunardi G.

Single nucleotide polymorphisms (SNPS) of CYP19A1 are associated with plasma levels of estrone sulfate (ES) in postmenopausal women with breast cancer (BC).

Ann. Oncol. 19: Suppl 9 M10, 2008

Giobbie Hurder A.-Price K.N.-Gelber R.D.-Del Mastro L.-International Breast Cancer Study Group; BIG 1-98 Collaborative Group

Design, conduct, and analyses of Breast International Group (BIG) 1-98: a randomized, double-blind, phase-III study comparing letrozole and tamoxifen as adjuvant endocrine therapy for postmenopausal women with receptor-positive, early breast cancer.

Clin. Trials 6(3):272/287, 2009