

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.C. Oncologia Radioterapica (S. Barra); S.C. Epidemiologia, Biostatistica e Clinical Trials (D.F. Merlo)

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: Regione Liguria

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.

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

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.

Risultati e prodotti 2009

E' stata completata l'analisi di metilazione sui geni HOXA-3, -7, -9 e -10 su un subset di 32 gliomi in stadio WHO 1-4. I pazienti sono stati divisi in tre gruppi:

1: WHO 1-2

2: WHO 3

3: WHO 4

L'analisi quantitativa di metilazione è stata condotta mediante Pyrosequencing e per ogni gene sono state valutate 9-11 doppiette CG.

Il valore medio di metilazione di ogni promotore è stato messo in relazione sia con le caratteristiche cliniche del paziente che con il livello di espressione del gene. L'analisi statistica dei risultati ha dimostrato che il livello di metilazione dei geni HOXA-3, -9 e -10 è significativamente più elevato nei gliomi WHO 3 e 4 rispetto a quelli in stadio 1 e 2.

E' stato definito il ruolo funzionale della metilazione sulla espressione dei geni HOXA-3, -7, -9 e -10.

La stessa analisi è stata condotta su una casistica di 42 meningiomi suddivisi in due gruppi: WHO-1 (meningiomi tipici) e WHO-2 (atipici ad alto rischio di recidiva), come tessuto di controllo abbiamo utilizzato 7 campioni di tessuto durale.

Sono state osservate differenze altamente significative nel livello di metilazione in tutti e 4 i geni HOXA esaminati tra i meningiomi WHO-1 e -2. Non sono state osservate differenze tra tessuto durale normale e meningiomi WHO-1.

I nostri risultati suggeriscono che i geni HOXA siano coinvolti in tumori cerebrali e che alti livelli di metilazione/inattivazione dei geni siano correlati con le forme più aggressive di gliomi e meningiomi. L'ipermetilazione dei geni HOXA nei meningiomi atipici e recidivanti è il primo marcatore molecolare noto potenzialmente predittivo di progressione ed invasività.

Nel campo della ricerca di base abbiamo generato cloni di linee di glioblastoma resistenti ad altissime dosi di Temozolomide, il farmaco di scelta nella chemioterapia delle neoplasie gliali di alto grado.

Attività previste e risultati attesi nel 2010

Nel corso del 2010 il progetto si focalizzerà sulla componente "di base" ed in particolare sullo studio della catena regolativa MLL-1/HOX/DLX e al suo eventuale ruolo nel mantenimento della staminalità delle cellule gliali e alla resistenza alla Temozolomide.

I dati ottenuti in vitro saranno poi validati sulla casistica di tumori già a disposizione. In particolare si cercherà di correlare eventuali alterazioni della catena MLL-1/HOX/DLX con la risposta clinica alla terapia.

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)

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

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

senso deltaNp73 è definito un potenziale oncogene, e, infatti, varianti deltaN sono iperesprese in parecchi tumori. Inoltre la de-metilazione del promotore 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 metilato 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, centrofollicolare, marginale).
- valutare, in linea con i dati ottenuti mediante il tumor promoter TPA, il grado d'attivazione funzionale (trascrizionale) e strutturale (metilazione) del promotore 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.

Risultati e prodotti 2009

Nell'ambito della tematica generale del progetto è stata completata una attività non prevista nella programmazione 2009 che ha portato a dimostrare come le cellule del sistema immunitario siano un target degli inibitori dell'angiogenesi mediato da IL 12 (lavoro pubblicato su J. Transl. Med.).

E' stato completato lo studio sul ruolo di deltaN-p73 (variante di p73 con funzioni oncogeniche ed antiapoptotiche) nei linfociti B ed è stata dimostrata l'attivazione della variante in un subset di cellule che sulla base della presenza di marcatori immunofenotipici viene definita come "attivata". La regolazione della espressione della variante deltaN dipende, almeno in parte, da fattori epigenetici come dimostrato dalla analisi della metilazione del promotore specifico della variante e da esperimenti di immunoprecipitazione della cromatina con anticorpi diretti contro le forme K4 (attivatoria) e K27 (inibitoria) dell'istone H3 metilato.

E' stato poi dimostrato il ruolo del complesso AP1 nella attivazione del promotore mediante gel shift e immunoprecipitazione della cromatina con un anticorpo anti-JUN ed infine è stato dimostrato l'effetto di farmaci in grado di modulare la conformazione epigenetica della cromatina sulla espressione del gene (i risultati sono stati presentati in un articolo inviato a BMC Cancer).

Pubblicazioni

Albini A.-Brigati C.-Ventura A.-Lorusso G.-Pinter M.-Morini M.- Mancino A.-Sica A.-Noonan D.
Angiostatin anti angiogenesis requires IL/12: the innate immune system as a key target.
J. Transl. Med. 7:5;1/5;8, 2009

Brigati C.-Banelli B.-Matis S.-Cutrona G.-Casciano I.-Di Vinci A.-Allemanni G.-Forlani A.-Romani M.
Epigenetic mechanisms regulate deltaNP73 promoter function in human tonsil B cells
BMC Cancer, submitted

Attività previste e risultati attesi nel 2010

Nel corso del 2010 continueremo lo studio dei meccanismi che controllano il funzionamento del promotore che governa l'espressione di deltaNp73. In particolare si studierà il legame del complesso AP1 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.

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

Nel secondo anno progettuale si cercherà anche di stabilire il ruolo della deltaNp73 in leucemie e linfomi B. In collaborazione con la S.S. Malattie Linfoproliferative dell'IST si studieranno casi derivati da pazienti affetti da linfomi centrocitici a grandi cellule, mantellari e marginali; inoltre sarà reperito materiale di controllo costituito da linfonodi normali reattivi.

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); S.C. Epidemiologia, Biostatistica e Clinical Trials (D.F. Merlo)

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.

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

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

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

Risultati e prodotti 2009

Abbiamo condotto uno studio retrospettivo su una coorte composta da 50 pazienti in stadio 4 ad alto rischio e 16 pazienti in stadio 4 a rischio intermedio e i risultati sono stati validati su una coorte indipendente di 72 pazienti in stadio 4, tutti ad alto rischio. Gli end-point dello studio sono stati la sopravvivenza e l'intervallo libero da malattia a 60 mesi. Il parametro valutato è stato il livello di metilazione dei geni RASSF1A, SFN (14.3.3sigma), CY26C1 e DCR2; questi geni sono dei comuni target di ipermetilazione in svariati tipi di tumore. L'analisi di metilazione è stata condotta con la metodologia quantitativa del Pyrosequencing e quella di espressione mediante Real-Time PCR.

I dati sono stati analizzati con il modello di Cox.

Abbiamo individuato soglie di metilazione predittive dell'outcome a 60 mesi mediante analisi delle curve ROC e dimostrato mediante analisi multivariata che la metilazione oltre il livello soglia dell'85% del gene SFN è in grado di distinguere i pazienti con un outcome favorevole da quelli con malattia rapidamente progressiva. Abbiamo inoltre dimostrato che il livello di metilazione del gene SFN nei pazienti ad alto rischio che sopravvivono oltre 60 mesi è paragonabile a quello dei pazienti a rischio intermedio o basso.

A livello funzionale abbiamo dimostrato che il livello di espressione di SFN nei pazienti con metilazione superiore all'85% è minore di quella riscontrata in pazienti con metilazione inferiore alla soglia discriminante.

L'analisi quantitativa della metilazione del gene SFN permette di definire in maniera molto precisa i pazienti in una specifica classe di rischio e, potenzialmente, potrebbe contribuire ad adottare le scelte terapeutiche maggiormente efficaci e con minore tossicità (pubblicato nel 2009 su Int. J. Cancer).

Un altro studio ultimato riguarda il controllo della espressione dei MiRNA 152, 200B e 338 e dei loro geni downstream. I MiRNA sono stati selezionati mediante data mining in banche dati di espressione di neuroblastoma. I risultati ottenuti hanno dimostrato il controllo epigenetico di due di questi MiRNA e la deregolazione delle vie metaboliche in cui sono coinvolti.

I risultati ottenuti sono stati descritti in un manoscritto attualmente al vaglio dei revisori (Ragusa et al, J. Mol. Med, submitted).

Pubblicazioni

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 126: 656/668, 2009

Ragusa M.-Majorana A.-Banelli B.-Barbagallo D.-Statelo L.-Casciano I.-Guglielmino M.R.-Duro L.R.-Scalia R.-Magro G.-Di Pietro C.-Romani M.-Purrello M

MIR152, MIR200B, MIR338, human positional and functional Neuroblastoma candidates, are involved in neuroblast differentiation and apoptosis.

J. Mol. Med., submitted

Attività previste e risultati attesi nel 2010

Il proseguimento delle attività sul neuroblastoma dipenderà dalla continuazione del supporto da parte della Fondazione Italiana Neuroblastoma che, per il 2010, a causa della generale crisi economica che ha visto ridurre sostanzialmente le donazioni, ha interrotto i finanziamenti a tutti i gruppi precedentemente finanziati. Saranno comunque terminati due studi in cui la maggior parte dei dati è già stata raccolta e che necessitano solo del completamento di piccole parti sperimentali e della analisi dei dati. Nel primo sarà valutato in maniera quantitativa lo stato di metilazione del cluster genico della Protocaderina B (PCDHB) che determina il "Fenotipo Metilatore" del neuroblastoma e si studierà la relazione tra metilazione di PCDHB e di SFN. Nel secondo studio si estenderà l'analisi di metilazione di SFN a pazienti in altri gruppi di rischio e stadio per valutare la generalità delle nostre osservazioni.

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

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

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

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.

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.

Risultati e prodotti 2009

È stato completato lo studio sulla clonalità nel carcinoma mammario bilaterale utilizzando come marcatore un polimorfismo genetico del gene HUMARA (Human Androgen Receptor). I nostri risultati hanno dimostrato che questa analisi molecolare è in grado di affiancare e migliorare i classici parametri istologici nel distinguere tra neoplasia metastatica controlaterale e secondo tumore primitivo (studio pubblicato su Ann. Oncol.).

È stata completata la messa a punto della metodica di qPCR per la valutazione del numero di copie di HER2. L'analisi di una casistica di 40 pazienti ha dimostrato la concordanza del 90% tra IHC, FISH e qPCR.

Per quanto riguarda gli studi sul DNA circolante nel Ca Mammario al fine di determinare lo stato di amplificazione di HER 2 nelle pazienti recidivanti, lo studio ha ricevuto l'approvazione del comitato etico ed è iniziata la raccolta dei campioni. Le analisi preliminari hanno dimostrato la concordanza tra amplificazione del tumore e nel DNA circolante.

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

E' stata attivata la parte del progetto dedicata alla ricerca di target metilati nei linfonodi di pazienti con Ca polmonare in stadio IA e IB come predittore di ricaduta. Sono stati messi a punto i saggi per i geni maggiormente informativi (CDH13, p16 e APC) e sono stati analizzati i primi 30 campioni (DNA tumorale e linfonodi) della casistica selezionata (320 pazienti).

Pubblicazioni

Banelli B.-Casciano I.-Di Vinci A.-Gatteschi B.-Levaggi A.-Carli F.-Bighin C.-Salvi S.-Allemanni G.-Ghiorzo P.-Pronzato P.- Venturini M.-Romani M.-Del Mastro L.

Pathological and molecular characteristics distinguishing contralateral metastatic from new primary breast cancer. Ann. Oncol. Epub Oct 29, 2009

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 DeltaNp73 in non small cell lung cancer. Int. J. Oncol. 34:449/456, 2009

Attività previste e risultati attesi nel 2010

Nel 2010 prevediamo di completare lo studio sulla determinazione della amplificazione di HER2 nel DNA circolante di pazienti con Ca mammario.

Nell'ottica di individuare nuovi marcatori molecolari predittivi di outcome e/o di risposta alla terapia inizieremo studi di genome-wide screening per sequenze metilate su una casistica campione di neoplasie mammarie. Lo studio sarà condotto utilizzando il set di microarray "Promoter 2" della Agilent che copre circa 17.000 promotori di geni.

Nell'ambito del Ca polmonare si procederà con la raccolta e l'analisi dei campioni selezionati da tre centri: IST, Ospedale di Pietra Ligure e Ospedale di Alessandria.

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); S.S. Sviluppo di Terapie Innovative (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

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-kB, 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

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

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.

Risultati e prodotti 2009

Nell'ambito delle attività inerenti lo studio delle funzioni immunoregulatorie del recettore CTLA-4 in cellule tumorali e della risposta immune, nel 2009, sono stati analizzati gli effetti funzionali indotti dal trattamento in vitro con anticorpi monoclonali (mAbs) agonisti di CTLA-4 in: i) colture primarie e linee cellulari derivate da tumori solidi (melanoma cutaneo e carcinoma ovarico); ii) cellule dendritiche derivate da monociti umani.

In particolare, sono stati analizzati, mediante citofluorimetria, alcuni parametri funzionali relativi a proliferazione, ciclo cellulare, apoptosi e, mediante saggi Elisa, la produzione di citochine pro-infiammatorie e pro-angiogeniche.

Per quanto riguarda le cellule tumorali, i risultati hanno dimostrato che il trattamento di 7 colture primarie, derivate da biopsie di pazienti di melanoma dell'IST, e di 2 linee di carcinoma ovarico con mAbs anti-CTLA-4 agonisti (cloni 3D5 e 2H8 forniti da A. Lanzavecchia, Institute for Research in Biomedicine, Bellinzona, CH) induce inibizione della proliferazione cellulare dovuta al blocco precoce del ciclo nelle fasi G0-G1, seguito da apoptosi tardiva. Il trattamento inibisce anche la secrezione di citochine pro-infiammatorie (IL-6, TNF-alpha) e pro-angiogeniche (IL-8, VEGF).

E' stato inoltre osservato, in un modello di angiogenesi in vitro, che i sopranatanti delle colture di melanoma trattate con 3D5/2H8 perdono la capacità di indurre differenziazione endoteliale di cellule mesenchimali stromali a causa del ridotto contenuto in citochine pro-angiogeniche.

Per quanto riguarda le cellule dendritiche (DC), è stato evidenziato il profilo di espressione di CTLA-4 nel corso della loro differenziazione a partire da monociti appena isolati dal sangue periferico (espressione elevata), sulle DC immature (espressione downmodulata o assente) e sulle DC maturate con vari stimoli (LPS, PolyI:C, citochine) (espressione upregolata). L'espressione è stata confermata al livello citoplasmatico e trascrizionale per le varie isoforme di CTLA-4. Analisi funzionali preliminari dimostrano che anche sulle DC il trattamento con i mAbs anti-CTLA-4 agonisti ha effetti modulatori della secrezione di citochine pro-infiammatorie (IL-8, IL-12).

Nel corso del 2009 si è anche concluso lo studio inerente la rilevanza clinica della downregolazione delle molecole HLA di classe I (subunità pesante e leggera) nel carcinoma mammario. L'analisi (Protocollo ID 10156), condotta su 67 pazienti trattate in IST, ha rivelato una associazione statisticamente significativa tra la downregolazione della subunità leggera (B2-m) ed una miglior sopravvivenza globale e libera da eventi nelle pazienti con coinvolgimento linfonodale.

Pubblicazioni

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

Attività previste e risultati attesi nel 2010

Nel corso del 2010 si prevede di continuare a studiare gli effetti funzionali indotti dal trattamento con i mAbs anti-CTLA-4 agonisti, sia nelle cellule di melanoma cutaneo e di carcinoma ovarico che in quelle dendritiche. Tali effetti verranno confrontati con quelli indotti dal trattamento con i mAbs umanizzati antagonisti, o bloccanti il CTLA-4,

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

(Ipilimumab, Tremelimumab) attualmente impiegati in IST per l'immunoterapia del melanoma cutaneo metastatico e in fase di sperimentazione nella terapia del carcinoma ovarico.

Poiché l'espressione e il ruolo fisiologico di CTLA-4 nel melanoma uveale non sono stati ancora indagati, ci proponiamo di estendere lo studio a questa patologia utilizzando come modello alcune linee cellulari umane, fornite dalla Dott.ssa M. J. Jager (Leiden, The Netherlands) rappresentative dei vari stadi di progressione della malattia.

Nell'ambito dello studio sul carcinoma ovarico si intende estendere l'analisi di espressione di CTLA-4 a cellule mononucleate derivate da liquidi ascitici, mediante citofluorimetria con doppie marcature per CTLA-4 e marcatori di carcinoma ovarico.

Nel 2010 ci si aspetta di conseguire i seguenti risultati:

- valutazione degli effetti funzionali indotti da mAbs anti-CTLA-4, sia agonisti che antagonisti terapeutici, su cellule tumorali (melanoma cutaneo ed uveale, carcinoma ovarico);
- valutazione degli effetti indotti da mAbs anti-CTLA-4 agonisti sulla secrezione di citochine da parte di DC mature e sulla capacità di stimolare la proliferazione di linfociti T autologhi da parte di DC pulsate con antigeni di richiamo;
- approfondimento delle conoscenze sul meccanismo d'azione e sull'attività antitumorale degli anticorpi anti-CTLA-4 impiegati, anche in IST, nell'immunoterapia del melanoma cutaneo metastatico.

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); S.S. Sviluppo di Terapie Innovative (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.

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'FcγRIII 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).

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

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, immunocitochimica, 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 mammaglobina 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. È 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, FcγR2 e R3) 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 mammaglobina (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, FcγR2, FcγR3 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.

Risultati e prodotti 2009

Nell'ambito del programma di ricerca sui polimorfismi genici, nel 2009 sono state 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 12 pazienti con melanoma cutaneo metastatico e 180 pazienti con carcinoma mammario, arruolati presso l'Oncologia Medica A dell'IST. Sono stati raccolti i dati inerenti le caratteristiche cliniche, istopatologiche e di follow up dei pazienti, con particolare riferimento alla risposta agli anticorpi Ipilimumab e Tremelimumab dei pazienti affetti da melanoma. In entrambi gli studi è stato quindi creato un database per la correlazione statistica delle frequenze genotipiche ed alleliche con i dati clinici e l'analisi è stata condotta anche in 180 donatori sani, confrontabili per età e sesso.

Nel contempo si è concluso lo studio sulla rilevanza clinica dei polimorfismi di CTLA-4 nell'esito del trapianto di cellule staminali tra fratelli HLA-identici evidenziando un'associazione statisticamente significativa tra la presenza dell'allele G del polimorfismo +49A>G nei riceventi il trapianto e un aumento della sopravvivenza globale, di quella libera da malattia e una riduzione della frequenza di ricadute.

In collaborazione con la Dott.ssa P. Piccioli (Oncologia Medica C IST), è stata messa a punto una metodologia di Multiplex Tetra-Primer ARMS-PCR per la determinazione delle varianti polimorfiche degli SNP per FcγR3a (158 A/V) e FcγR2a (131 A/H) che verrà applicata per genotipizzare pazienti con tumore mammario iperesprimente HER2 eleggibili per trattamento con Trastuzumab.

Nell'ambito dello studio sulla determinazione di micrometastasi, in collaborazione con l'Ospedale Sant'Andrea di La Spezia (Dott. S. Roncella), è stata messa a punto una metodologia di RT-PCR per la determinazione dei livelli trascrizionali del gene mammaglobina (hMAM) nei fluidi biologici tra cui i versamenti pleurici (VP). Il trascritto di hMAM è stato evidenziato nel 45% (104/228) dei VP maligni e nel 5% (10/185) di quelli benigni dimostrando l'utilità di hMAM come marcatore per la determinazione indiretta delle cellule tumorali nei VP. Poiché l'RT-PCR ha evidenziato il trascritto di hMAM anche nel 32% (34/106) dei VP citologicamente negativi, emerge l'utilità dell'RT-PCR per hMAM come marcatore da affiancare alla citologia per differenziare VP benigni da quelli neoplastici e fornire indicazioni per effettuare la toracosopia.

Nell'ambito delle attività inerenti la Banca ECBR, si è proceduto ad eseguire controlli di qualità (vitalità, ricerca di micoplasma e tipizzazione HLA genomica) su di un set di linee B linfoblastoidi.

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

Pubblicazioni

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. 88:1029/1031, 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. Epub Dec 18, 2009

Linee cellulari distribuite

Nel 2009 la Banca di linee cellulari ECBR ha distribuito 2 linee B linfoblastoidi di cui 1 alla Fondation Jean Dausset-CEPH (Dott. H. Cann) per l'inclusione nell'HGDP-CEPH Human Genome Diversity Cell Line Panel e l'altra alla S.C. Immunologia-IST (Dott.ssa D. Pende) per studi sull'alloreattività NK nei trapianti di cellule staminali emopoietiche.

Attività previste e risultati attesi nel 2010

Per quanto riguarda l'aspetto dei polimorfismi genici, si prevede di estendere l'analisi degli SNP di CTLA-4 (-318C>T, +49A>G, CT60 G>A) ad un numero maggiore di pazienti, sia di melanoma cutaneo metastatico che di carcinoma mammario, e di effettuare l'analisi statistica di correlazione con i dati clinico-patologici relativi a ciascun paziente. Si prevede inoltre di confrontare le frequenze genotipiche ed alleliche con quelle di controlli sani.

Per la determinazione dei polimorfismi SNP di FcgammaRIIIa (158 A/V) e FcgammaRIIa (131 A/H), si prevede la messa a punto di altre metodologie di PCR basate sull'amplificazione del DNA genomico seguita da sequenziamento diretto dei prodotti di PCR in entrambe le direzioni al fine di validare i genotipi assegnati con la Multiplex Tetra-Primer ARMS-PCR e valutare la concordanza tra i metodi.

Per quanto riguarda l'aspetto delle micrometastasi si prevede l'implementazione della metodologia per la determinazione quantitativa del trascritto del gene hMAM al fine di aumentarne la sensibilità e consentirne l'applicabilità anche in contesti routinari. Tale metodologia verrà impiegata per indagare la presenza di cellule tumorali non solo nei VP ma anche nel sangue periferico di pazienti con tumore mammario ed altre neoplasie.

Nel 2010 ci si aspetta di conseguire i seguenti risultati:

- a) identificazione dei polimorfismi genici di CTLA-4 eventualmente coinvolti nella risposta individuale al trattamento con gli anticorpi anti-CTLA-4, Ipilimumab e Tremelimumab, in pazienti con melanoma metastatico;
- b) definizione della correlazione tra polimorfismi genici di CTLA-4 e parametri clinico-patologici in pazienti con carcinoma mammario;
- c) messa a punto di una metodologia di genotipizzazione per SNP di FcgammaRIIIa (158 A/V) e FcgammaRIIa (131 A/H), in pazienti con carcinoma mammario HER2+ in trattamento con Trastuzumab;
- d) messa a punto di una metodologia molecolare per la ricerca di cellule tumorali circolanti nel sangue periferico di pazienti con carcinoma mammario.

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

Durata: 36 mesi

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

Altre strutture IST partecipanti: S.C. Oncologia Medica A (C. Bighin); S.S. Sviluppo di Terapie Innovative (L. Del Mastro); 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

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

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

Risultati e prodotti 2009

E' stata valutata la soppressione dei livelli plasmatici di estrone solfato (ES) durante un lungo periodo (sino a 12 mesi) di trattamento con Letrozolo (L) (25mg/d). Tale soppressione è stata correlata sia con i polimorfismi (SNPs) del gene CYP19A1 sia con i livelli di ES prima del trattamento con L (livelli basali).

Sono stati determinati mediante metodica RIA i livelli di estrone solfato (ES): prima dell'inizio della terapia con L (204 pazienti) e dopo 6 settimane (180 pazienti), 6 mesi (152 pazienti) e 12 mesi (136 pazienti) di terapia. Sulle stesse pazienti sono stati identificati i polimorfismi (SNPs) del gene CYP19A1 mediante Hexaprimer Amplification Refractory Mutation System PCR (H-ARMS-PCR). I dati delle concentrazioni di ES sono stati trasformati in log per ottenere una distribuzione gaussiana della popolazione.

Non è stata osservata alcuna associazione ($p > 0.15$) tra i genotipi del gene CYP19 e i logaritmi delle concentrazioni di ES sia a livello basale sia dopo 6 settimane, 6 mesi e 12 mesi di terapia con L. Durante il trattamento con L, si è osservato una riduzione delle concentrazioni di ES esponenzialmente correlata ai livelli basali di ES. Inoltre durante il trattamento con L i livelli di ES circolanti hanno un andamento decrescente col protrarsi della terapia. Infatti su 107 pazienti su cui sono stati eseguiti tutti i prelievi nei tempi prestabiliti, la mediana delle concentrazioni di ES risulta: 52 pg/mL dopo 6 settimane, 44 pg/mL dopo 6 mesi e 36 pg/mL dopo 12 mesi.

Da questi dati si evince quindi che l'inibizione dell'enzima aromatasi, calcolata tramite il decremento percentuale della concentrazione di ES, sembra aumentare con il protrarsi della terapia con L.

Il monitoraggio dei livelli plasmatici di L, effettuato sulle stesse pazienti mediante cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC), indica che non si hanno differenze significative tra percentuale di inibizione di produzione di ES e i livelli riscontrati di L (risultati presentati all'ASCO Meeting 2009, abs 555 - J Clin Oncol 27:15s, 2009).

Le competenze nel campo della farmacocinetica e nella farmacodinamica sono state applicate ad altri aspetti e protocolli della terapia antitumorale ed in questa ottica è stata studiata la cinetica del temsirolimus e del suo metabolita attivo sirolimus (un farmaco innovativo utilizzato nel trattamento del carcinoma renale) in pazienti dializzati

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

e non dializzati ed è stato dimostrato che l'emodialisi non influenza la concentrazione ematica della molecola e del suo metabolita attivo.

Pubblicazioni

Lunardi G.-Armirotti A.-Nicodemo M.-Cavallini L.-Damonte G.- Vannozi M.O.-Venturini M.
Comparison of temsirolimus pharmacokinetics in patients with renal cell carcinoma not receiving dialysis and those receiving hemodialysis: a case series.
Clin. Ther. 31:1812/1819, 2009

Attività previste e risultati attesi nel 2010

Arruolamento presso la struttura di Oncologia Medica A di circa 100 pazienti partecipanti allo studio GIM-5 (Letrozole adjuvant therapy after Tamoxifen. Study of gene CYP19 correlation with letrozole efficacy in post menopausal early breast cancer patients) e prosecuzione del monitoraggio delle 204 pazienti già in corso di studio.

Nel corso del prossimo anno si avranno a disposizione i dati relativi ai livelli plasmatici di ES e L dopo 2 anni di terapia per le pazienti già arruolate, dai quali ci aspettiamo di:

- evidenziare e confermare l'andamento crescente di inibizione degli estrogeni circolanti con il proseguire della durata del trattamento
- stabilire il ruolo dei polimorfismi correlati con la biosintesi e il catabolismo degli estrogeni e i livelli plasmatici di ES monitorati su un lungo periodo
- valutare le correlazioni tra polimorfismi genetici , inibizione dei livelli di estrogeni e i dati clinici relativi alla risposta terapeutica e/o eventuale tossicità che si potrebbe osservare in seguito a trattamento prolungato con farmaci inibitori dell'enzima aromatasi come il L.