

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

s.s. Oncopatologia Traslazionale

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

Linea di ricerca: 1 - Prevenzione e Cancerogenesi

Programma: c - Basi genetiche e molecolari della trasformazione neoplastica

Responsabile scientifico: Gian Paolo Tonini

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Federica Del Grosso

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

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

Altre strutture IST partecipanti: s.s. Animal facility (M. Cilli)

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

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: prevenzione primaria/secondaria

Soggetti cofinanziatori: Fondazione Italiana per la Lotta al Neuroblastoma, Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro

Background

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

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

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

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

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

Impatto assistenziale certo o potenziale

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

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

Risultati e prodotti 2010

Al fine di individuare mutazioni nel dominio tirosin-chinasico del gene ALK, in aggiunta ai casi di neuroblastoma (NB) sporadico e familiare precedentemente studiati, abbiamo analizzato 32 pazienti appartenenti alla casistica AYA (Adolescenti e Giovani Adulti) che rappresentano circa il 3% dei pazienti con NB. Dei 32 casi 7 non sono risultati valutabili. Da tale screening è emersa una percentuale maggiore di mutazioni a carico del dominio tirosin-chinasico di ALK rispetto a quella trovata normalmente nella popolazione di neuroblastoma pediatrico. Infatti, 4 casi su 25 valutabili (16%) hanno evidenziato mutazioni del dominio chinasico di ALK, mentre la percentuale individuata nei NB sporadici italiani è circa il 6%. Lo screening di mutazioni di ALK è stato esteso anche a 55 casi di medulloblastoma. In questa casistica è stata individuata una delezione puntiforme somatica (3605delG), presente anche a livello costituzionale.

Poiché la N-glicosilazione è una modificazione post-traduzionale che si è dimostrata essenziale per la piena maturazione e la funzionalità di recettori tirosin-chinasici, come EGFR, ErbB2, ErbB3 e IGF-IR, abbiamo indagato gli effetti della tunicamicina, un antibiotico che blocca la N-glicosilazione delle proteine (tra cui ALK), su linee cellulari con diverse alterazioni di ALK tra cui le linee di NB: SH-SY5Y (mutazione di ALK F1174L), LAN-5 (mutazione di ALK F1174L), UKF-NB3 (mutazione di ALK R1275Q), NB1 (amplificazione genomica di ALK), LA1-5S e NB5 (ALK non espresso) e la linea cellulare di linfoma anaplastico a grandi cellule SU-DHL1 (traslocazione NPM-ALK). I trattamenti con tunicamicina effettuati su cellule di NB esprimenti ALK (sia mutato che over-espresso) hanno evidenziato l'accumulo di una banda deglicosilata. Il risultato interessante osservato in seguito a tale trattamento è stato il deciso decremento della fosforilazione di ALK nelle linee di NB la cui oncogenicità è determinata da alterazioni di ALK. Inoltre, nelle stesse linee cellulari abbiamo osservato una defosforilazione delle proteine effettrici attivate da ALK (AKT, STAT3, ERK1/2). Contrariamente, il trattamento con tunicamicina non ha determinato effetti né su NPM-ALK né sulla fosforilazione delle proteine effettrici nelle linee di controllo. L'inibizione della N-glicosilazione ha inoltre ridotto la vitalità cellulare delle linee con ALK mutato o amplificato ma non nelle linee usate come controllo. Sono stati inoltre studiati inibitori "small molecule" da poter utilizzare nella sperimentazione in vivo in modelli murini. Si è quindi testata l'attività e l'efficacia in vitro degli inibitori NMS-E 422 e NMS-E 580 su 10 linee cellulari di NB positive per l'espressione di ALK (ALK nativo: IMR-32, IMR-5, HTLA, SK-N-BE2, SK-N-BE2c, GILIN; ALK mutato: UKF-NB3, KELLY, SK-N-SH, KCNR) e in 3 linee cellulari esprimenti bassi livelli di ALK e/o negative (NB-INT1, NB5, SK-N-AS). Gli inibitori testati in vitro non hanno dimostrato elevata specificità ed efficacia a dosi inferiori di 50 nM. Pertanto non si è proceduto alla sperimentazione in vivo in modelli murini.

Pubblicazioni

Devoto M.-Specchia C.-Laudenslager M.-Longo L.-Hakonarson H.-Maris J.-Mossé J.
Genome-wide linkage analysis to identify genetic modifiers of ALK mutation penetrance in familial neuroblastoma.
Hum. Hered., in press

Del Grosso F.-De Mariano M.-Passoni L.-Luksch R.-Tonini G.P.-Longo L.
N-glycosylation of ALK as a potential target for disruption of prosurvival signaling pathways in neuroblastoma cell lines.
PloSOne, submitted

Presentazioni a congressi

Del Grosso F.-De Mariano M.-Passoni L.-Paleari L.-Tonini G.P.-Longo L.
N-glycosylation of ALK as a potential target for disruption of prosurvival signaling pathways in neuroblastoma cell lines.
Advances in Neuroblastoma Research, Stockholm, Sweden, 21-24 June 2010

Longo L.-De Mariano M.-Del Grosso F.-Passoni L.-Defferrari R.-Mazzocco K.-Castellano A.-Luksch R.-Garaventa A.-Tonini G.P.
Screening of ALK mutations and abnormalities in neuroblastoma cell lines and Italian neuroblastoma cases.
Advances in Neuroblastoma Research, Stockholm, Sweden, 21-24 June 2010

Attività previste e risultati attesi nel 2011

Attualmente sono in corso le seguenti attività di ricerca:

- 1) Screening di "small molecule inhibitors" specifici per il dominio chinasico di ALK - Sono in corso esperimenti atti a determinare l'effetto di inibitori sulla proliferazione e sopravvivenza cellulare in vitro nelle linee di NB descritte sopra. In base ai risultati ottenuti dalla sperimentazione in vitro, si valuterà la possibilità di estendere lo screening in vivo in modelli murini.
- 2) Trasfezione di linee cellulari di NB con un vettore esprimente luciferasi - Le linee di NB saranno trasfettate in modo stabile con il vettore di espressione pLXIN2 che codifica per la luciferasi di lucciola e avente resistenza alla neomicina sotto promotore CMV e gentilmente fornito dal dott. A. Daga (s.c. Trasferimento Genico, IST, Genova). L'attività luciferasica dei trasfettanti stabili verrà confermata mediante Ivis Xenogen, disponibile presso l'Animal Facility dell'IST
- 3) Test in vivo: valutazione in vivo dell'effetto terapeutico di "small molecule inhibitors" specifici per il dominio chinasico di ALK in modelli murini sperimentali di neuroblastoma (pseudo-metastatico ed ortotopico).
- 4) Studio del ruolo della glicosilazione di ALK nell'attivazione del recettore - Indagare se le cellule di NB possano evidenziare un'aumentata suscettibilità agli inibitori specifici di ALK qualora siano sottoposte a un trattamento che interferisce con la glicosilazione della proteina.
- 5) Studio della regolazione dell'espressione di ALK nel NB - Identificazione di uno o più microRNA coinvolti nella regolazione del livello di espressione di ALK mediante piattaforma Agilent.
- 6) Identificazione di nuovi geni coinvolti nella predisposizione al NB o di geni modificatori mediante Next Generation Sequencing e mediante analisi di linkage nelle famiglie con NB ricorrente.

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

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

Linea di ricerca: 2 – Interazioni Tumore-Ospite

Programma: a - Ruolo del microambiente tumorale nella progressione neoplastica

Responsabile scientifico: Gian Paolo Tonini

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

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

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

Altre strutture IST partecipanti: s.c. Anatomia e citoistologia patologica (M. Truini), s.c. Terapia immunologia, (S. Ferrini), s.c. Immunologia (M.C. Mingari)

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

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: diagnostica

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

Background

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

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

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

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

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

Impatto assistenziale certo o potenziale

L'impatto assistenziale è potenziale ma molto elevato. La terapia del neuroblastoma negli ultimi 20 anni ha fatto modesti passi avanti, le forme metastatiche aggressive che si presentano nel bambino sopra l'anno di età risultano fatali in oltre il 70% dei casi con un follow up di 5 anni. Almeno il 40% dei casi diventa resistente all'induzione della terapia. L'introduzione del trapianto allogenico e del trattamento con acido retinoico dopo il trapianto ha incrementato

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

la sopravvivenza in modo non significativo. In anni più recenti è quindi incrementato lo studio di antagonisti diretti contro recettori delle cellule neuroblastiche maligne.

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

Risultati e prodotti 2010

Durante l'anno 2010, il programma di ricerca inerente il progetto è proseguito perseguendo i seguenti obiettivi sperimentali:

- Realizzazione di una linea cellulare di neuroblastoma in grado di esprimere stabilmente il recettore CXCR5 nella sua isoforma b (CXCR5b). Al tal fine è stato progettato e utilizzato il vettore plasmidico pIRES1neo-NM_032966 contenente la sequenza codificante per la variante b del recettore CXCR5. Le linee cellulari di neuroblastoma ACN (CXCR5b negative) e SHSY-5Y (debolmente positive) sono state trasfettate per mezzo di lipofectamina, stabilizzate mediante selezione con G418 e saggiate mediante FACS. Mentre le cellule ACN hanno evidenziato l'espressione della proteina esclusivamente nella regione citoplasmatica, presumibilmente non funzionale, le cellule SHSY-5Y hanno mostrato un incremento dell'espressione di CXCR5b localizzata in membrana. Il bulk risultato positivo è stato clonato e i cloni selezionati, ulteriormente positivi in membrana per CXCR5b, sono stati sub-clonati, per ottenere un trasfettante stabile efficientemente in grado di esprimere il recettore funzionante e in quantità sufficiente da poter essere utilizzato in un modello animale.

- Produzione di un "modello" di cellula stromale schwannica del neuroblastoma in grado di mimare le caratteristiche fenotipiche e il ruolo funzionale dello stroma tumorale. Poiché non è disponibile né commercialmente né in laboratori di ricerca una linea di cellule stromali schwanniche di neuroblastoma e avendo verificato l'incapacità delle linee cellulari di neuroblastoma di esprimere e secernere nell'ambiente extracellulare la chemochina CXCL13, è stata sfruttata la potenzialità di alcune linee di neuroblastoma (SK-N-BE(2)c e LA1-5S) di differenziare, se sottoposte a trattamento con BrdU, fino ad assumere un fenotipo simile a quello delle cellule stromali schwanniche. Inducendo le linee di NB a differenziare con BrdU, oltre a osservare i previsti cambiamenti morfologici, associati all'espressione de novo del marker di differenziamento in senso gliale S100A6, è stato possibile rilevare la presenza della chemochina CXCL13 nel mezzo condizionato di tali cellule differenziate, confermando la capacità di questo tipo cellulare di secernere la molecola coinvolta nel cross-talk CXCL13-CXCR5b.

- Approfondimento delle indagini sul ruolo funzionale della chemochina CXCL13 nel mediare l'attività di chemotassi e proliferazione delle cellule neuroblastiche che esprimono il recettore CXCR5b. La capacità delle cellule di neuroblastoma di migrare se sottoposte specificamente allo stimolo della chemochina CXCL13 ricombinante è stata verificata effettuando esperimenti di chemotassi nei quali la significativa migrazione attraverso un filtro ottenuta utilizzando la chemochina ricombinante da sola è stata neutralizzata sia pretrattando le cellule con un anticorpo anti-CXCR5 sia aggiungendo al chemoattrattante un anticorpo anti-CXCL13. La capacità delle cellule stromali schwanniche del neuroblastoma di influenzare il comportamento dei neuroblasti CXCR5b+ grazie alla secrezione nel microambiente tumorale della chemochina CXCL13 è stata dimostrata verificando, in esperimenti di chemotassi, la significativa migrazione determinata utilizzando come chemoattrattante il terreno condizionato di cellule differenziate con BrdU, contenente CXCL13. Il controllo realizzato neutralizzando la chemochina con l'aggiunta dell'anticorpo anti-CXCL13, ha mostrato che l'attività di CXCL13 è specifica. Esperimenti preliminari di proliferazione cellulare di linee di neuroblastoma esprimenti CXCR5b in seguito a trattamento con CXCL13 ricombinante hanno dato risultati variabili, manifestando un effetto inibitorio della crescita cellulare a bassissime concentrazioni di chemochine e un effetto promuovente la proliferazione cellulare solo ad alte concentrazioni. Tali risultati verranno approfonditi nel successivo anno di sperimentazioni.

Pubblicazioni

Del Grosso F.-Coco S.-Scaruffi P.-Stigliani S.-Valdora F.-Benelli R.-Salvi S.-Boccardo S.-Truini M.-Croce M.-Ferrini S.-Tonini G.P.
Role of CXCL13-CXCR5 crosstalk between malignant neuroblastoma cells and Schwannian stromal cells in neuroblastic tumors.
Mol. Cancer Res., submitted.

Presentazioni a congressi

Del Grosso F.-Coco S.-Scaruffi P.-Stigliani S.-Valdora F.-Benelli R.-Salvi S.-Boccardo S.-Truini M.-Croce M.-Ferrini S.-Tonini G.P.
Il cross-talk tra la chemochina CXCL13 e il suo recettore CXCR5 regola il rapporto tra neuroblasti maligni e cellule stromali suggerendo un ruolo nell'inibizione della disseminazione del neuroblastoma.
Poster. XXXVI Congresso Nazionale AIEOP, Pisa, 6-8 Giugno 2010

Del Grosso F.-Coco S.-Scaruffi P.-Stigliani S.-Valdora F.-Benelli R.-Salvi S.-Boccardo S.-Truini M.-Croce M.-Ferrini S.-Tonini G.P.
Chemokines CXCR5-CXCL13 cross-talk between malignant neuroblastoma cells and Schwannian stromal cells suggests a role in the inhibition of metastatic dissemination.
Poster. Advanced Neuroblastoma Research Meeting, Stockholm, 22-25 June 2010

Del Grosso F.-Coco S.-Scaruffi P.-Stigliani S.-Valdora F.-Benelli R.-Salvi S.-Boccardo S.-Truini M.-Croce M.-Ferrini S.-Tonini G.P.
Identification of chemokine CXCR5-CXCL13 cross-talk between malignant neuroblastoma cells and Schwannian stromal cells suggests a role in the inhibition of metastatic dissemination.
Poster. EACR21 21th Meeting of the European Association for Cancer Research, Oslo, 26-29 June 2010

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

Attività previste e risultati attesi nel 2011

Durante l'anno 2011, si procederà alla selezione del clone trasfettante in grado di esporre in membrana con maggiore efficienza il recettore CXCR5b e alla realizzazione di una linea cellulare stabilmente ed efficientemente trasfettata con vettore di espressione per la chemochina CXCL13. Le linee trasfettanti verranno testate in esperimenti di chemotassi, co-coltura, proliferazione cellulare in seguito a trattamento con chemochina ricombinante o con terreno condizionato di cellule trasfettanti CXCL13+, e test di apoptosi, per verificare in un modello cellulare in vitro l'effettivo ruolo funzionale del cross-talk suggerito dai dati sperimentali fin qui raccolti. L'obiettivo successivo dello studio consisterà nell'allestimento di esperimenti in vivo utilizzando cellule di neuroblastoma e/o cellule di neuroblastoma stabilmente trasfettate con le chemochine sia nel modello ortotopico che in quello singenico e transgenico. Il progetto prevede, inoltre, l'approfondimento dello studio dell'espressione genica e proteica della chemochina CXCL14, anch'essa, insieme a CXCL13, candidata a svolgere un ruolo nel cross-talk tra cellule stromali schwanniche, dove è presente, e neuroblasti, nei quali l'espressione non è stata rilevata e che potrebbero invece esprimere il rispettivo recettore, ad oggi non noto. La sperimentazione su CXCL14 sarà condotta sia nei campioni di tumore sia nelle linee cellulari di neuroblastoma allo scopo di identificare il contributo di questo fattore solubile alla crescita e alla disseminazione dei tumori neuroblastici.

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

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

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

Responsabile scientifico: Gian Paolo Tonini

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

Anno di inizio: 2009

Durata: 24 mesi

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

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

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

Tipologia progetto: tecnologie abilitanti

Area di interesse: diagnostica

Soggetti cofinanziatori: MIUR

Background

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

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

Negli anni 2006-2008 è stato messo a punto un protocollo di funzionalizzazione chimica su nitrato di silicio (i dettagli tecnici sono contenuti nella richiesta di deposito di brevetto congiunto IST/Università degli Studi di Genova). Dopo la

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

deposizione di oligonucleotidi ammino-modificati (probe), i risultati sono stati valutati mediante microscopia a forza atomica (AFM) e microscopia in fluorescenza (con oligonucleotide marcati con fluoroforo). Abbiamo dimostrato la possibilità di legare covalentemente i probe dopo la funzionalizzazione chimica del nitrato di silicio nanoforato mediante l'utilizzo del FIB, garantendo una buona specificità di legame.

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

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

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

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

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

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

Impatto assistenziale certo o potenziale

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

Risultati e prodotti 2010

Sui prototipi di nanopori funzionalizzati chimicamente e con sonde a DNA sono stati condotti esperimenti di traslocazione di DNA: la traslocazione di molecole di λ DNA (48 kbp circa) attraverso un foro funzionalizzato con molecole ssDNA (probe 45mer, per il gene GAPDH). Applicando una differenza di potenziale di 120 mV tra i serbatoi, le molecole target vengono spinte attraverso il canale, e ciascun evento di passaggio viene rilevato come una riduzione transitoria di corrente la cui durata è funzione della lunghezza delle molecole target, della loro conformazione durante il passaggio e della tensione applicata.

Abbiamo eseguito esperimenti di ibridazione su nanopori funzionalizzati con molecole ssDNA (probe 45mer, per il gene GAPDH): come molecole target sono stati utilizzati due oligonucleotidi: uno con la stessa sequenza usata per la funzionalizzazione (non complementare) 5' - GCC AAA AGG GTC ATC ATC TCT GCC CCC TCT GCT GAT GCC CCC ATG - 3' NC, ed uno perfettamente complementare : 5' - CAT GGG GGC ATC AGC AGA GGG GGC AGA GAT GAT GAC CCT TTT GGC - 3'. E' stato possibile dimostrare che le curve di corrente registrate in presenza di target NC (non complementare) o PC (perfettamente complementare) nella cella di misura contenente buffer di ibridazione, differiscono in modo significativo; pertanto l'analisi della corrente registrata consente di discriminare tra i due tipi di target dimostrando la possibilità di utilizzare il nanoporo funzionalizzato con ssDNA come biosensore per complementarità per molecole di DNA.

In collaborazione con le altre unità del progetto NanoMed abbiamo condotto degli esperimenti utilizzando un array di nanopori funzionalizzati in modo da generare una "rete di molecole probe" (RMP) per identificare l'interazione tra molecole probe adese ai fori e molecole target disperse in soluzione sfruttando processi di collisione indotti dall'applicazione di campi elettrici. L'identificazione di tali eventi è legata all'analisi delle variazioni di corrente ionica attraverso il setto poroso, ma lo studio dei processi collisionali piuttosto che quelli di traslocazione elettroforetica consente di realizzare dispositivi per l'analisi di singola molecola indipendenti dalle dimensioni delle molecole in gioco. La dimensione dei fori dell'array, la conformazione e la dimensione delle molecole in studio (cui è legato il tempo medio di traslocazione in un device standard basato su nanopori) diventano quindi parametri meno critici. In particolare:

- 1) l'analisi dei processi collisionali si può effettuare su molecole di qualsiasi dimensione
- 2) la dimensione dei fori dell'array da realizzare tramite processi litografici standard o attraverso fasci ionici è indipendente dall'interazione tra biomolecole in studio
- 3) l'analisi dei processi collisionali non necessita di procedimenti per rallentare le molecole in studio non essendo legata alla rilevazione di fenomeni di traslocazione
- 4) i processi collisionali hanno una frequenza maggiore di quelli di traslocazione
- 5) l'utilizzo di un array di nanopori consente di avere un rapporto segnale/rumore migliore
- 6) l'utilizzo di un array di nanopori riduce gli effetti negativi legati all'eventuale occlusione, momentanea o permanente, dei singoli fori componenti.

Pubblicazioni

Mussi V.-Fanzio P.-Repetto L.-Firpo G.-Scaruffi P.-Stigliani S.- Tonini G.P.-Valbusa U.
DNA functionalized solid state nanopore for biosensing.
Nanotechnology 21:145102;1/145102;5, 2010

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

Mussi V.-Fanzio P.-Repetto L.-Firpo G.-Scaruffi P.-Stigliani S.- Menotta M.- Magnani M .-Tonini G.P.- Valbusa U.
Electrical characterization of DNA-functionalized solid state nanopores for bio-sensing
J. Phys. Condens. Matter 22(45):454104, 2010

Mussi V.-Fanzio P.-Repetto L.-Firpo G.-Scaruffi P.-Stigliani S.-Tonini G.P -Valbusa U.
DNA nanopore for complementary sequence detection.
Nature Nanotechnology, submitted

Brevetti

Richiesta brevetto nazionale dal titolo "Analisi di singola molecola mediante processi collisionali con array di nanopori funzionalizzati".

Inventori V. Mussi, P. Fanzio, L. Repetto, G. Firpo, C. Manneschi, U. Valbusa, P. Scaruffi, S. Stigliani, G.P. Tonini, M. Menotta, M Magnani.

Titolarità congiunta: Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro (30%), Università degli Studi di Genova (50%), Università degli Studi di Urbino (20%)

Attività previste e risultati attesi nel 2011

Saranno condotti esperimenti di ibridazione con miscele di NC e PC in diverse proporzioni per valutare la sensibilità della differenza nella misura di corrente in cella. Inoltre saranno condotti esperimenti con campioni biologici complessi, anche con DNA di lunghezza maggiore simulando le condizioni di un microarray commerciale.

In collaborazione con la s.c. Trasferimento tecnologico IST, saranno condotte le trattative con le aziende interessate allo sfruttamento del primo brevetto nazionale esteso con PCT, frutto di questo progetto. Appena ottenuto anche il secondo brevetto valuteremo la sua possibile estensione e la sua possibile valorizzazione.

Sempre in collaborazione con la s.c. Nanobiotecnologie IST sarà valutato un protocollo di funzionalizzazione chimica per consentire di attaccare sonde oligonucleotidiche ad un prototipo di dispositivo con nanopori su supporto polimerico. Questo tipo di prototipi polimerici avrebbero il vantaggio dell'abbattimento dei costi, rispetto al nitruro di silicio, in vista di una possibile produzione su scala del prototipo e successiva commercializzazione. Sul dispositivo a nanoporo polimerico saranno condotti esperimenti di misura della corrente elettrica in cella prima e dopo la funzionalizzazione, di traslocazione e di ibridazione con target a ssDNA e dsDNA.

Diagnostica avanzata dei tumori solidi pediatrici

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

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

Responsabile scientifico: Gian Paolo Tonini

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

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

Altri Enti coinvolti: Fondazione Italiana per la Lotta al Neuroblastoma (K. Mazzocco, R. Defferrari)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: diagnostica

Soggetti cofinanziatori: Fondazione Italiana per la Lotta al Neuroblastoma

Background

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

L'inquadramento diagnostico dei tumori neuroblastici riveste fondamentale importanza per le decisioni terapeutiche. I tumori neuroblastici, che includono neuroblastoma (NB), ganglioneuroblastoma (GNB) e ganglioneuroma (GN), presentano caratteristiche eterogenee da un punto di vista istopatologico e genetico. Negli ultimi anni sono state introdotte nuove tecniche di citogenetica molecolare per meglio definire le caratteristiche genetiche di tali tumori in modo da poterli classificare in base alle alterazioni comuni. Nel NB sono state identificate alcune mutazioni genetiche non casuali, quali l'amplificazione dell'oncogene MYCN e la delezione del cromosoma 1p36, associate all'aggressività e alla progressione tumorale. Attualmente tali anomalie vengono analizzate per inquadrare i pazienti nei differenti protocolli terapeutici e per valutare il rischio di recidiva tumorale. I protocolli terapeutici attualmente vigenti sono: Infant ad interim, LNESG2 (Localised NB European Study Group 2), High Risk e Unresectable ad interim. Presso la nostra struttura, riconosciuta come Centro Nazionale di Riferimento per la biologia molecolare del neuroblastoma, vengono eseguite, secondo le linee guida dei protocolli europei (Ambros IM et al. J Clin

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

Oncol. 2003 Jun 1;21(11):2077-84), le valutazioni dell'amplificazione di MYCN e della delezione del cromosoma 1p36 nei tumori di tutti i pazienti italiani affetti da questa patologia. Tale valutazione si svolge secondo le seguenti fasi:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Il progetto si propone di:

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

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

- valutare nella popolazione di neuroblastomi italiani la performance della signature di espressione di 59 geni quale predittore di prognosi.
- ottimizzare le metodiche di diagnostica non invasiva.

Impatto assistenziale certo o potenziale

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

Risultati e prodotti 2010

Nell'anno 2010 sono state eseguite 137 analisi di MYCN e 93 analisi per la ricerca della delezione di 1p36 su campioni di tessuto congelato, paraffinato e su strisci di midollo osseo per mezzo di FISH a doppio colore su nuclei interfascici. Sono state valutate le alterazioni cromosomiche del DNA (definite SCA: alterazioni cromosomiche strutturali e NCA: alterazioni numeriche) per mezzo della tecnica MLPA in tumori di 40 pazienti per un totale di 130 analisi.

E' stata conclusa, a livello europeo, la raccolta dei dati biologici relativi ai pazienti con tumore che presentava MYCN gain, allo scopo di interpretarne il significato.

E' stata completata la raccolta dei dati biologici dei tumori di pazienti arruolati nel protocollo Unresectable.

Abbiamo terminato la valutazione delle analisi genetiche relativa alla popolazione AYA Neuroblastoma (adolescent and young adults) che comprende 34 casi già analizzati con MLPA, di cui 25 analizzati anche per le mutazioni di ALK. E' stata trovata una percentuale doppia di incidenza di mutazioni di ALK nella popolazione AYA rispetto a quella descritta in letteratura nei bambini (16% vs 8%).

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, 2010

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

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

Pediatr. Blood Cancer 54:897/903, 2010

Oberthuer A.-Hero B.-Berthold F.-Juraeva D.-Faldum A.-Kahlert Y.- Asgharzadeh S.-Seeger R.-Scaruffi P.-Tonini G.P.-Janoueix Lerosey I.-Delattre O.-Schleiermacher G.-Vandesompele J.-Vermeulen J.- Speleman F.-Noguera R.-Piqueras M.-Benard J.-Valent A.-Avigad S.- Yaniv I.-Weber A.-Christiansen H.-Grundy R.-Schardt K.-Schwab M.- Eils R.-Warnat P.-Kaderali L.-Simon T.-Decarolis B.-Theissen J.- Westermann F.-Brors B.-Fischer M.

Prognostic impact of gene expression based classification for neuroblastoma.

J. Clin. Oncol. 28(21):3506/3515, 2010

Parodi St.-Perfumo C.-Garaventa A.-Inga A.-Mazzocco K.-Defferrari R.-Tonini G.P.-Fronza G.-Haupt R.

MDM2 SNP309 genotype is associated with ferritin and LDH serum levels in children with stage 4 neuroblastoma.

Pediatr. Blood Cancer 55:267/272, 2010

Tonini G.P.

Topotecan and etoposide combination to test neuroblastoma in pediatric preclinical testing program. Letter

Pediatr. Blood Cancer. 2010 Aug;55(2):393.

Verderio P.-Mangia A.-Orlando C.-Belfiglio M.-Marchetti A.- Bertario L.-Chiappetta G.-Gion M.-Tonini G.P.-Podo F.-Vocaturio A.- Silvestrini R.-Lombardo C.-Paradiso A.

Research trends for early cancer biomarker detection in Italy: an Integrated Program in Oncology (PIO) survey.

Tumori 96:721/725, 2010

Corrias M.V.-Haupt R.-Carlini B.-Cappelli E.-Giardino S.-Tripodi G.-Tonini G.P. Garaventa A.-Pistoia V.-Pistorio A.

Multiple target molecular monitoring of bone marrow and peripheral blood samples from patients with localized neuroblastoma and healthy donors.

Pediatr. Blood Cancer, in press

Di Cataldo A.-Mazzocco K.-Magro G.-Mirabile E.-Lo Nigro L.-Defferrari R.-Tonini G.P.

Simultaneous tumors: acute myeloid leukemia infiltrating mediastinal ganglioneuroblastoma.

Pediatr. Blood Cancer, in press

Attività previste e risultati attesi nel 2011

Il presente progetto non avrà più attività per l'anno 2011 e si considera concluso.

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

Genomica dei tumori pediatrici

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

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

Responsabile scientifico: Gian Paolo Tonini

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

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

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

Altre strutture IST partecipanti: s.c. Anatomia e citoistologia patologica (E. Margallo); s.c. Genetica ed epigenetica dei tumori (M. Romani, B. Banelli)

Altri Enti coinvolti: D.O.Bi.G., Università degli Studi di Genova (F. Valdora); Fondazione Italiana per la Lotta al Neuroblastoma (R. Gallesio S. De Luca); LAMSADE - CNRS, Université Paris Dauphine, Paris, France (S. Moretti); Epidemiologia Clinica e Molecolare, IRCCS San Raffaele Pisana, Roma (S. Bonassi); Università Federico II e CEINGE, Napoli (A. Iolascon); Policlinico Umberto I, Roma (F. Giangaspero); Università degli Studi di Padova (G. Basso); Fondazione Bruno Kessler, Trento (C. Furlanello); Children' Hospital, University of Koln, Germania (F. Berthold); University Hospital Heidelberg, Germania (S. Pfister)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: diagnostica

Soggetti cofinanziatori: Fondazione Italiana per la Lotta al Neuroblastoma

Background

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

Tumori neuroblastici (TN)

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

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

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

Allo scopo di migliorare la sopravvivenza dei pazienti, sono necessarie strategie innovative di trattamento in grado di bersagliare i pathway biologici responsabili del fenotipo HR-NB. In tale ambito, si prospetta l'urgenza di un'analisi

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

integrata per determinare la performance prognostica di signature basate su aberrazioni del genoma, espressione genica e RNA non codificanti, da affiancare agli attuali parametri clinico-biologici di stratificazione dei pazienti in classi di rischio di progressione e ricaduta.

Medulloblastoma

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

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

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

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

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

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

Impatto assistenziale certo o potenziale

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

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

Risultati e prodotti 2010

Nel corso dell'ultimo anno nel nostro laboratorio abbiamo studiato le aberrazioni cromosomiche mediante a-CGH e la gene expression in neuroblastomi (NB) di pazienti con malattia metastatica, suddivisi in corto-sopravvissuti (deceduti per malattia nei primi 5 anni dalla diagnosi) e lungo- sopravvissuti (pazienti vivi dopo almeno 5 anni).

I risultati conseguiti hanno permesso di identificare distinte signature molecolari: 1) NB dei pazienti corto-sopravvissuti mostrano un pattern di aberrazioni cromosomiche caratterizzato da anomalie strutturali sbilanciate, associato alla up-regolazione a livello trascrizionale di geni coinvolti nell'induzione della proliferazione cellulare; 2) al contrario i NB dei pazienti lungo- sopravvissuti sono caratterizzati da aberrazioni cromosomiche sia strutturali che numeriche ed elevati livelli di espressione di geni associati al pathway dell'apoptosi e del differenziamento cellulare.

La nostra unit , si   occupata, inoltre, di studiare il genoma e il trascrittoma su un campione omogeneo di casi di medulloblastoma (MB) a istologia classica, ottenuti da pazienti trattati con protocolli che prevedevano una combinazione di chemio-radioterapia. L'analisi del genoma   stata eseguita mediante a-CGH su 32 casi, inoltre per incrementare il potere statistico dello studio, abbiamo utilizzato un approccio di "pooled analysis" integrando 55 casi di dati a-CGH disponibili in PubMed. L'analisi statistica ha evidenziato una significativa associazione tra la delezione del cromosoma 9q e 16q e una minore sopravvivenza ($p < 0,05$); al contrario la monosomia del cromosoma 6 correlava con una miglior prognosi dei pazienti.

In 19 casi, inoltre,   stato studiato il profilo di espressione genica. L'analisi dei dati ha permesso di selezionare 1752 geni (517 up- 1235 down-regolati) differenzialmente espressi, rispetto ad un pool di 10 cervelletti sani, utilizzato come campione di riferimento. Tra i geni trovati significativamente downregolati, sono stati osservati 4 geni (DKK3, SFRP1, SFRP2, MSX2) che regolano la pathway di Wnt, nota per essere coinvolta nella sviluppo del MB. L'espressione genica dei 4 geni   stata validata mediante PCR quantitativa su una casistica indipendente di MB, confermando la downregolazione per DKK3, SFRP1 e MSX2. Non individuando nessuna correlazione tra la delezione dei loci, dove mappano i geni, e il corrispondente basso livello di espressione, abbiamo ipotizzato che la down-regolazione di questi geni fosse associata ad un fenomeno epigenetico di silenziamento. L'analisi dello stato di metilazione dei tre geni, mediante la tecnica MSP (Methylation Specific PCR) ha mostrato un'alta percentuale di metilazione per SFRP1 e MSX2, ma non per DKK3, escludendo tale meccanismo come responsabile della sua downregolazione. In conclusione il nostro studio ha mostrato che la downregolazione di DKK3, SFRP1 e MSX2 potrebbe essere implicata nello sviluppo dei MB. I nostri dati, inoltre, dimostrano che il silenziamento epigenetico potrebbe essere uno dei principali meccanismi di regolazione dell'espressione di SFRP1 e MSX2, mentre per DKK3 possono esistere altri sistemi di regolazione.

Parallelamente ci siamo occupati di caratterizzare il meccanismo d'azione del cisplatino un farmaco comunemente utilizzato nei protocolli terapeutici di trattamento chemioterapico nel MB, in relazione alla espressione genica e dei miRNA. Abbiamo valutato l'effetto del cisplatino su 6 linee di MB: le linee D458 e D425 hanno evidenziato una percentuale maggiore di cellule in apoptosi, valutate mediante marcatura con Annexina-FITC/Ioduro di Propidio e successiva analisi al citofluorimetro. Al fine di selezionare solo le cellule in apoptosi a seguito del trattamento con cisplatino, abbiamo utilizzato il FACS sorting. L'analisi dell'espressione genica e dei miRNA mediante microarray ha evidenziato 204 geni e 33 miRNA differenzialmente espressi, tra le cellule trattate e quelle di controllo. L'analisi di gene ontology ha dimostrato che tra i geni overespressi il 12% erano associati all'apoptosi confermando l'effetto proapoptotico del cisplatino. L'analisi integrata di profili di espressione genica e miRNA utilizzando "TargetScan" ha permesso di predire che 19 geni trovati overespressi sarebbero regolati da 13 miRNA; al contrario 2 tra i geni downregolati sarebbero il bersaglio di 2 miRNA.

Pubblicazioni

Scaruffi P.-Stigliani S.-Coco S.-Valdora F.-De Vecchi C.-Bonassi St.-Tonini G.P.
Transcribed ultra conserved region expression profiling from low input total RNA.
BMC Genomics 11:149;1/149;7, 2010

Parodi St.-Perfumo C.-Garaventa A.-Inga A.-Mazzocco K.-Defferrari R.-Tonini G.P.-Fronza G.-Haupt R.
MDM2 SNP309 genotype is associated with ferritin and LDH serum levels in children with stage 4 neuroblastoma.
Pediatr. Blood Cancer 55:267/272, 2010

Potenza N.-Papa U.-Scaruffi P.-Mosca N.-Tonini G.P.-Russo A.
A novel splice variant of the human dicer gene is expressed in neuroblastoma cells.
FEBS Lett. 584:3452/3457, 2010

Coco S.-Valdora F.-Bonassi S.-Scaruffi P.-Stigliani S.-Oberthuer A.-Berthold F.-Andolfo I.-Servidei T.-Riccardi R.-Basso E.-Iolascon A.-Tonini G.P.
Chromosome 9q and 16q loss identified by genome-wide pooled-analysis are associated with tumor aggressiveness in patients with classic medulloblastoma.
OMICS, in press

Presentazioni a congressi

Coco S.-Theissen J.-Scaruffi P.-Stigliani S.-Moretti S.-Oberthuer A.-Hero B.-Fischer M.-Bonassi S.-Gallo F.-DeVecchi C.-Berthold F.-Tonini G-P.
Genome/transcriptome analysis of metastatic neuroblastoma, reveals an increase of structural aberrations and deregulation of Rho/Ras and telomerase pathways associated with poor patients outcome.
Advanced Neuroblastoma Research 2010, Stockholm, Sweden, June 21-24-2010

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

Scaruffi P.-Coco S.-Valdora F.-Stigliani S.-Zhang Y.-Chen P.-Smutko J.-Tonini G.P.
Novel Whole Genome Amplification Approach Is Useful To Perform aCGH In Microdissected Schwannian Stromal and Neuroblastic Components of Ganglioneuroblastomas.
Advanced Neuroblastoma Research 2010, Stockholm, Sweden, June 21-24-2010

Stigliani S.-Coco S.-Moretti S.-Oberthuer A.-Theissen J.-Fischer M.-Valdora F.-Gallo F.-De Vecchi C.-Garaventa A.-Berthold F.-Bonassi S.-Tonini G.P.-Scaruffi P.
Deregulation of Rho/Ras and Neuronal Differentiation Pathways is Associated With Fatal Outcome In High-Risk Disseminated Neuroblastoma.
Advanced Neuroblastoma Research 2010, Stockholm, Sweden, June 21-24-2010

Stigliani S.-Coco S.-Valdora F.-Scaruffi P.-Morretti S.-Cesari G.-Pietra G.-Mingari M.C.-Basso G.-Iolascon A.-Tonini G.P.
Gene and miRNA expression profiling induced by cisplatin on MB cells
71° Congresso Nazionale SIC Rome Cavalieri, Roma, 11 -13 dicembre 2010
Valdora F.-Scaruffi P.-Banelli B.-Stigliani S.-Moretti S.-Bonassi S.-Adolfo I.-Zollo M.-Oberthuer M.-Theissen J.-Romani M.-Cinalli G.-Iolascon A.-Tonini G.P.-Coco S.
WNT antagonist genes are down-regulated in Medulloblastoma.
71° Congresso Nazionale SIC Rome Cavalieri, Roma, 11 -13 dicembre 2010

Valdora F.-Scaruffi P.-Banelli B.-Moretti S.-Bonassi S.-Adolfo I.-Zollo M.-Oberthuer A.-Theissen J.-Romani M.-Cinalli G.-Iolascon A.-Tonini G. P.-Coco S.
Down-regolazione dei geni antagonisti della pathway di WNT nel Medulloblastoma
XXXVI Congresso Nazionale AIEOP, Pisa, 6-8 giugno 2010

Attività previste e risultati attesi nel 2011

Nel 2011 la nostra unità si propone di:

- caratterizzare in dettaglio le alterazioni strutturali trovate significativamente alterate tra i pazienti con NB metastatico suddivisi in corto- e lungo- sopravvissuti. Recentemente sono state sviluppate una serie di tecnologie avanzate che fanno parte della "NEXT GENERATION SEQUENCING" che consentono, tramite approcci diversi, di sequenziare l'intero genoma o specifiche regioni selezionate del DNA con grande precisione e in tempi brevi. Avendo identificato, per mezzo di a-CGH, aberrazioni strutturali differenti in NB metastatici corto e lungo sopravvissuti, quello che ci proponiamo è di approfondire la conoscenza di tali regioni utilizzando il "DNA target sequencing". Per questo scopo utilizzeremo la piattaforma del nostro Istituto, la GS junior Titanium della Roche che sfrutta il meccanismo del pirosequenziamento. Il fine è quello di identificare possibili mutazioni sui geni presenti in tali regioni che potrebbero essere responsabili della diversa progressione della patologia. I geni candidati definiti con uno score di probabilità di associazione con l'andamento della malattia, saranno studiati per la loro funzionalità in modelli in vitro e in vivo
- studiare in dettaglio la delezione 16q e 9q, individuati come marcatori prognostici nel MB a istologia classica. In particolare ci occuperemo di studiare in dettaglio le minime regioni delete mediante la tecnologia del sequenziamento 'target-enrichment' che ci permetterà di sequenziare regioni di interesse selettivamente catturate e di individuare eventuali mutazioni, delezioni, inversioni che coinvolgono sia le regioni codificanti che non, implicate nella maggiore aggressività del MB
- studiare il meccanismo di down-regolazione di DKK3 e investigare il suo potenziale effetto tumorigenico nel MB. L'attività di ricerca sarà così articolata: Studio del meccanismo di down-regolazione di DKK3, studiando il ruolo dei miRNA che lo regolano. Una volta individuati i miRNA candidati e responsabili della bassa espressione di DKK3, si svilupperà un modello in vitro valutando la regolazione di miRNA con antagomir e valutando l'espressione di DKK3 e il suo corrispettivo effetto su un potenziale blocco della proliferazione cellulare, differenziamento cellulare o morte cellulare
- caratterizzare il meccanismo d'azione del cisplatino ed individuare geni e miRNA associati alla risposta al trattamento chemioterapico nel MB. Validazione dell'espressione dei miRNA e dei geni trovati deregolati a seguito del trattamento con il cisplatino su linee cellulari trattate con il farmaco. Verranno selezionati quei miRNA che influenzano i geni coinvolti nell'apoptosi. I miRNA candidati saranno quindi valutati funzionalmente in modelli in vitro tramite la overespressione mediante miRNA mimic o la downregolazione mediante antagomir al fine di valutare il loro effetto apoptico sulle linee cellulari
- identificare una signature associata alle cellule tumorali staminali rispetto a cellule tumorali di MB, al fine di investigare potenziali pathway deregolate in questa classe di cellule. Lo studio sarà eseguito su 3 linee primarie e 4 linee cellulari di MB, che saranno fatte crescere in condizioni di ipossia ($O_2 < 5\%$) e con mezzi di coltura specifici, al fine di stimolare la proliferazione della componente staminale che sarà quindi sortata sfruttando specifici marcatori (CD133++;CD15++). I profili di espressione saranno studiati mediante i microarray, selezionando quei geni differenzialmente espressi rispetto alle stesse linee primarie e stabilizzate cresciute in condizioni normossiche (controllo negativo).