

BORSISTA: Martina Lia

Periodo di borsa di studio: 1/11/ 2014 – 31/10/ 2015 (sponsor Fondazione BCC Pordenonese)

“Progetto di ricerca traslazionale malattie rare: linfomi di Hodgkin dell’età pediatrica e poliposi familiare del colon”

Presso la S.O.S. di Radioterapia Pediatrica, in collaborazione con la Gastroenterologia e la Core Facility di Bio-Proteomica, è in corso un progetto di ricerca scientifica dal titolo “*Progetto di ricerca traslazionale malattie rare: linfomi di Hodgkin dell’età pediatrica e poliposi familiare del colon*” afferente il settore di ricerca traslazionale e riguardante in particolare tumori rari in età pediatrica e dell’adolescente, quale il linfoma di Hodgkin (LH) e la poliposi adenomatosa familiare del colon (FAP) che bene si prestano alla implementazione di studi traslazionali sui tumori rari.

In dettaglio, tale programma oltre ai classici obiettivi terapeutici ha la finalità scientifica, attraverso una collaborazione con altri centri italiani, di avviare degli studi che permettano di caratterizzare biologicamente il linfoma di Hodgkin pediatrico al fine di individuare fattori prognostici di risposta al trattamento e di monitorare l’insorgenza precoce di tumori gastrointestinali in famiglie con predisposizione genetica.

Queste patologie rare dell’età pediatrica sono candidati elettivi per una ricerca traslazionale che può favorire una migliore comprensione dei meccanismi patogenetici alla base della malattia, e nel contempo, può essere di aiuto per un miglior inquadramento clinico della malattia e conseguente approccio terapeutico.

La dr.ssa Lia Martina ha iniziato questo percorso occupandosi del linfoma di Hodgkin (LH). Il linfoma di Hodgkin è un tumore relativamente raro, caratterizzato da particolari cellule multinucleate chiamate cellule di Reed-Sternberg (RS). E’ un tumore inusuale in cui le cellule RS costituiscono solo una piccola porzione della massa tumorale, di conseguenza i sottotipi istologici di LH sono assegnati in base alla natura dell’infiltrato cellulare presente.

Da numerosi studi epidemiologici è possibile correlare il LH con il virus di Epstein-Barr e in luce di un possibile ruolo infettivo del virus nella neoplasia associato ad altri fattori immunologici e genetici, si ritiene che un ruolo preponderante nel processo patologico sia determinato da molecole HLA (*Human leukocyte antigen*), chiamate anche antigeni di istocompatibilità deputate alla presentazione di antigeni.

Numerosi studi hanno confermato una associazione tra il LH e alcuni sottotipi di HLA, nello specifico HLA –A e DR. In questo lavoro si è voluto verificare l’eventuale associazione fra HL e varianti del gene HLA-G in risposta alla risposta clinica del paziente.

HLA-G è una molecola HLA di classe I non classica, la cui espressione basale è generalmente limitata a tessuti fetali, tessuto midollare del timo adulto, cornea, isole pancreatiche ed ai precursori delle cellule endoteliali ed è noto che la sua espressione aumenta in una serie di condizioni infiammatorie.

Il gene dell’HLA-G mostra un limitato polimorfismo, le relative proteine sono fisiologicamente espresse sui citotrofoblasti e nel timo, ma sono state rilevate anche in situazioni patologiche. Infatti l’espressione dell’HLA-G è stata adottata come meccanismo per evadere la risposta citotossica delle cellule CTL (linfociti T citotossici) e NK (cellule Natural Killer).

Considerando la natura dell’LH e apprezzando il ruolo della molecola HLA-G nella trasformazione neoplastica, risulta di estrema importanza determinare la frequenza delle varianti polimorfiche per determinarne una possibile associazione.

A questo scopo, abbiamo studiato se i singoli polimorfismi nella regione 3’UTR dell’HLA-G (14-bp INDEL/+3003C-T/+3010C-G/+3027A-C/+3035C-T/+3142C-G/+3187A-G/+3196C-G), da soli o in combinazione tra loro siano associati con il sesso, l’età, l’istologia, lo stadio, la presenza dei sintomi, le ricadute e la sopravvivenza del paziente.

104 giovani pazienti con LH (63 maschi, 41 femmine; dai 3 ai 26 anni, età media 14 anni) sono stati reclutati per lo studio nell’ambito della casistica AIEOP (Associazione Italiana di Emato-Oncologia Pediatrica). I campioni di sangue di questi pazienti provengono da diversi centri italiani coinvolti nel progetto. In particolare hanno collaborato i seguenti centri: Istituto di Ricerca Pediatrica-Fondazione Città della Speranza, Padova, Clinica di Oncoematologia Pediatrica, Azienda Ospedaliera-Università di Padova, Unità di Oncoematologia Pediatrica, Dipartimento Pediatrico della Fondazione MBBM, Ospedale S.Gerardo,

Monza, Unita' di Oncoematologia Pediatrica, Ospedale Regina Margherita, Torino, Unita' di Oncoematologia Pediatrica, Policlinico San Matteo, Pavia, Unita' di Oncoematologia Pediatrica, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma, Parma, Unita' di Oncoematologia Pediatrica, Policlinico – Vittorio Emanuele, Catania, Dipartimento di Oncologia Pediatrica, Ospedale Santobono-Pausillipon, Napoli, Unita' di Oncoematologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ferrara S.Anna, Ferrara.

L'intera regione 3'UTR è stata amplificata mediante PCR con primers locus specifici ed i singoli prodotti di amplificazione direttamente sequenziati.

Sono state analizzate le singole varianti del HLA-G in associazione con i parametri clinici sopra elencati.

In particolare, dai diversi centri ho ricevuto il DNA già estratto mentre dei campioni provenienti dal CRO di Aviano il DNA è stato estratto da sangue periferico mediante il kit EZ1 DNA Blood e BioRobot EZ1 Workstation (QUIAGEN). In alcuni casi non essendo disponibile il sangue periferico il DNA è stato estratto da linfociti mediante il kit DNeasy Blood and Tissue (QUIAGEN).

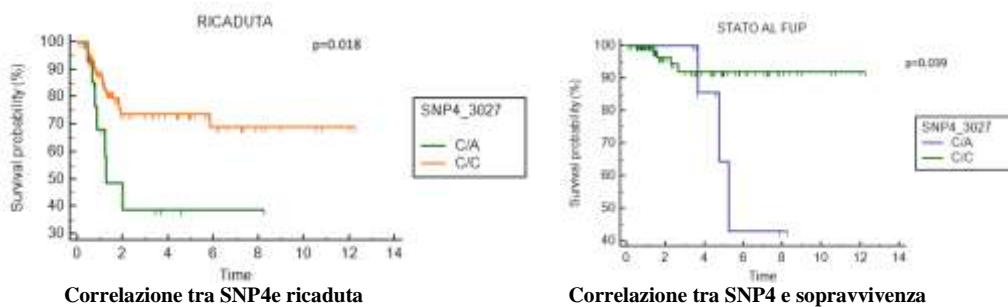
Tutte le tipizzazioni del DNA sono state effettuate in un unico centro (CRO Aviano).

Tutti i pazienti sono stati tipizzati per la presenza dell'esone 8 dell' HLA-G usando la reazione a catena della polimerasi (PCR) con primers locus specifici.

I prodotti della PCR sono stati sequenziati mediante elettroforesi capillare con strumento ABI PRISM 3100.

Le sequenze ottenute sono state analizzate con i software Chromas Lite e Codon-Code Aligner.

I risultati dell'analisi come illustrato nella susseguente figura sono statisticamente significativi per un'associazione fra lo SNP+3027 A-C e una più precoce ricaduta della malattia ed una minor sopravvivenza.



Ulteriori studi, su casistiche più ampie e il continuo follow-up dei pazienti esaminati, sono necessari per confermare questi risultati.

Dai dati preliminari ottenuti con una casistica iniziale di 48 pazienti è stato scritto un abstract intitolato "Analisi dei polimorfismi dell'HLA-G in pazienti pediatrici ed adolescenti con linfoma di Hodgkin" presentato come poster al convegno AIEOP di Lecce dal 23-26 Maggio 2015.

L'analisi sta continuando con la collaborazione dell'università di Padova per studiare l'espressione nei tessuti dell'HLA-G e mediante lo studio di miRNA che potrebbero avere come target alcune regioni dell'HLA-G e intervenire nell'espressione di questi geni.

Allo scopo di continuare lo studio sia in genetica che in proteomica, nel corso dell'anno sono stati processati diversi campioni di sangue e siero da pazienti provenienti dall'Area Giovani del CRO, in particolare sangue intero, plasma, siero, cellule vitali e granulociti. I campioni sono stati conservati a -80°C fino al momento dell'analisi.

Gli studi genetici hanno prodotto innumerevoli informazioni in merito a molte patologie. Tuttavia molto resta ancora da chiarire circa le vie attraverso cui un gene, o un insieme di geni, determinano l'insorgenza di una patologia. Uno studio di tipo proteomico può complementare le informazioni ricavate da una analisi genetica, superando i limiti di altri approcci e fornendo informazioni circa interazioni, funzioni e fluttuazioni di un corredo proteico, elementi che hanno un ruolo cruciale nel sistema cellulare.

Nel caso particolare del LH in età pediatrica vi è un forte interesse nella comprensione delle basi molecolari associate alla risposta favorevole o sfavorevole al trattamento della malattia.

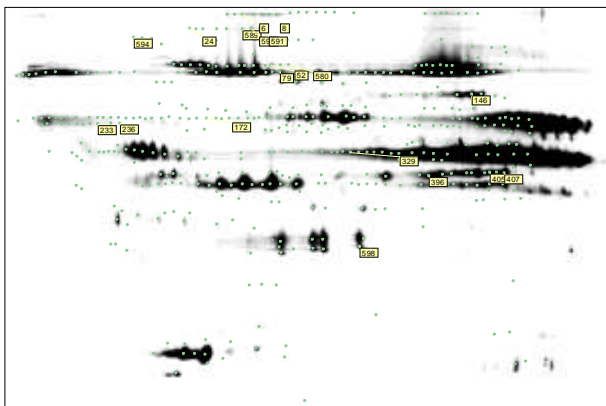
Quindi un'altra parte del lavoro presso la Core Facility di Bio-proteomica è stata quella di confrontare i profili di espressione proteica ottenuti da plasmi di soggetti affetti da LH alla ricerca di potenziali marcatori prognostici.

Tramite un approccio proteomico di tipo comparativo sono stati confrontati i plasmi, raccolti al momento della diagnosi, di 14 pazienti affetti da LH di età compresa tra 10 e 18 anni, selezionati per la presenza (n=8; R) o assenza (n=6; NR) di una recidiva nell'arco di tempo medio di 3 anni dalla diagnosi. I profili proteici dei gruppi 'recidivati, R' versus 'non-recidivati, NR' sono stati confrontati. In particolare, gli estratti proteici sono stati marcati e separati tramite 'two dimensional difference gel electrophoresis, 2D DIGE' e le immagini dei gel ottenuti sono stati analizzate tramite il software Decyder.

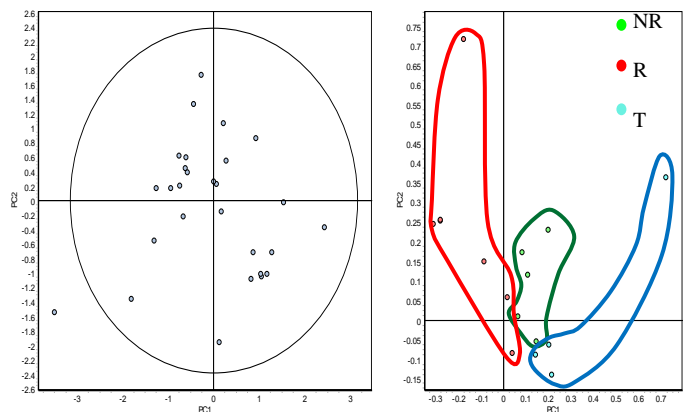
Nel dettaglio, le proteine sono state estratte dal plasma mediante il kit Proteominer, che consente di poter analizzare anche le proteine meno abbondanti nel plasma e 2D-Clean up kit che prepara i campioni eliminando le sostanze interferenti.

Le proteine estratte sono quantificate con il metodo Bio-Rad Bradford e l'assorbanza letta a 260 nm.

19 spots sono risultati differenzialmente espressi tra 'recidivati, R' versus 'non-recidivati, NR'. La loro identificazione tramite prelievo da gel micropreparativi, digestione ed analisi in spettrometria di massa e' in corso. Le proteine identificate saranno quindi valutate nel loro insieme per l'individuazione di ipotetiche vie metaboliche correlabili con le caratteristiche cliniche dei pazienti ed, in particolare, con la loro probabilità di ricaduta entro i primi 3 anni di follow-up.



Gel 2-D rappresentativo del plasma di pazienti affetti da LH espresse



"Principal component analysis" delle proteine differenzialmente

Nei prossimi mesi mediante Spot Picker le proteine d'interesse verranno eluite dalle mappe proteomiche per essere così analizzate mediante spettrometria di massa per la loro identificazione.

Questo studio proteomico ha prodotto un abstract intitolato "Analisi comparativa di proteine plasmatiche associate alla ricaduta in soggetti pediatrici affetti da linfoma di Hodgkin" e un poster portato al Congresso Aieop in Lab 2015 svoltosi a Napoli il 14-15 settembre 2015. Produrre questi dati è stato un traguardo importante visti i numerosi problemi tecnici riscontrati in corso d'opera e alle limitazioni dovute alla rottura di strumentazioni in laboratorio e tempi d'attesa lunghi per la riparazione di questi.

Nei prossimi mesi oltre che proseguire con le analisi sopra descritte, inizierà ad occuparsi dello studio della FAP, Poliposi Adenomatosa Familiare del Colon, patologia comune negli adulti ma estremamente rara nei bambini e negli adolescenti. Negli adulti sono di solito presenti fattori di rischio legati allo stile di vita come fumo, cattiva alimentazione, calo dell'efficienza della risposta immunologica, che non hanno generalmente un ruolo nei bambini, si deduce quindi che la predisposizione genetica gioca in questa fascia d'età un ruolo preponderante nella patogenesi del tumore.

La FAP è una malattia rara ed ereditaria a trasmissione autosomica dominante causata da una alterazione genica a carico del gene APC localizzato sul cromosoma 5. La malattia è caratterizzata dallo sviluppo di migliaia di polipi adenomatosi al colon retto fin dalla pubertà ed il rischio di sviluppare nel corso della vita, un cancro colon-rettale è del 100%.

La sede della mutazione nel gene APC determina variabilità fenotipica della malattia con una diversa numerosità ed aggressività dei polipi e lo sviluppo di manifestazioni extracoliche. Alla variabilità fenotipiche

determinata dalla sede della mutazione nel gene APC si associa un diverso comportamento clinico della malattia nei membri della stessa famiglia che condividono il medesimo difetto genetico.

Inoltre questa malattia presenta una grande variabilità clinica, ma in alcune famiglie tale variabilità è stata tale che ha richiesto un diverso approccio o una terapia in età più giovanile. Si è visto che queste famiglie interessate presentano una mutazione troncante rispettivamente ai codoni 645, 1495, 1862, 3081.

In questi mesi sono stati raccolti alcuni campioni biologici da 7 pazienti e loro familiari affetti da FAP e selezionati dopo *genetic counseling* in gastroenterologia per lo studio proteomico e genetico di questa patologia, in particolare sono state conservate per le successive analisi biopsie, sangue intero, plasma, e cellule mononucleate del periferico.

Verrà condotto un confronto proteomico utilizzando il tessuto biopsico congelato, in particolare si analizzerà la parte affetta dalla patologia versus la parte apparentemente sana, mediante analisi 2D-DIGE ed identificazione delle proteine di interesse. A questo confronto seguirà un confronto fra tessuti di soggetti appartenenti alla stessa famiglia con la medesima mutazione.

Ipotizzando una stretta interazione fra la risposta immunologica dell'ospite e lo sviluppo di neoplasie, lo studio comparativo mediante l'analisi 2D-DIGE in proteomica dovrebbe darci la possibilità di avere un quadro più preciso dei segnali e delle proteine coinvolte nelle forme più aggressive della patologia con la possibilità di intervenire in maniera più mirata.

Per arricchire la formazione e crescita in questo Istituto, ha partecipato alla giornata dei giovani ricercatori tenutasi il 25 e 26 maggio 2015 presso la sala convegni del CRO di Aviano, competizione scientifica a premi organizzata dal gruppo YRCA (Young Researchers CRO Aviano) con una presentazione sulla genetica nei tumori.