

**Università degli Studi del Piemonte Orientale
“Amedeo Avogadro”**



**Dottorato di Ricerca
in
Medicina Molecolare
*XXV Ciclo***

Relazione 1° anno

**ANALISI MOLECOLARE DEI CROMOSOMI
1p E 19q
NEI GLIOMI MEDIANTE
Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
(MLPA)**

Candidato: Angela Piazzi

Tutor: Prof. Davide Schiffer
Prof.ssa Mara Giordano

SEZIONE 1

RISULTATI SCIENTIFICI

INTRODUZIONE

I gliomi sono i più comuni tumori primari del sistema nervoso centrale con un'incidenza annua di 5-6 nuovi casi ogni 100000 persone. Attualmente, la classificazione e il *grading* dei diversi tipi di glioma è principalmente basata sulle caratteristiche morfologiche ed istologiche secondo la classificazione dei tumori del sistema nervoso centrale stabilita dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO). Nella diagnosi di tumore gliale solo pochi parametri molecolari hanno guadagnato un'importanza clinica tale da essere considerati *markers* prognostici o predittivi [1].

Nel glioblastoma multiforme (GBM), l'ipermetilazione del promotore del gene O⁶-metilguanina-DNA-metiltransferasi (*MGMT*) è un marcatore molecolare predittivo di risposta alla chemioterapia con agenti alchilanti, quali il temozolomide (TMZ), e di una maggiore sopravvivenza [2]. Nei tumori oligodendrogliali invece, la perdita di eterozigosi (LOH) delle regioni cromosomiche 1p e 19q, rilevata nell'80% circa degli oligodendrogliomi e in circa il 50% degli oligoastrocitomi, è associata ad una migliore aspettativa di vita nonché ad una risposta favorevole del tumore alla radio e alla chemioterapia sia con PCV (procarbazine, CCNU, vincristina) sia con agenti meno tossici quali il TMZ [3].

Dal punto di vista biologico, la perdita combinata di 1p e 19q è mediata da una traslocazione sbilanciata tra i due cromosomi. I punti di rottura, all'interno di questa traslocazione, rimangono ancora sconosciuti. Il cromosoma 19 possiede un'alta densità di ripetizioni *Alu*, note per la loro associazione con i riarrangiamenti cromosomici, e per l'alta prevalenza di strutture duplicative quali famiglie di *clusters* genici ripetute *in tandem* e duplicazioni di grossi segmenti intercromosomici. È possibile che queste caratteristiche possano predisporre il cromosoma 19 ad essere soggetto a riarrangiamenti risultando in diversi *patterns* di delezione [4]. Molto verosimilmente, la traslocazione centromerica o pericentromerica, coinvolta nella perdita di 1p e 19q, porta alla formazione di due cromosomi derivati. Successivamente, viene perso quello formato dal braccio corto del cromosoma 1 e dal braccio lungo del cromosoma 19 [5].

Relativamente al cromosoma 1, è stato dimostrato che la perdita di eterozigosi può avere un'estensione variabile lungo il cromosoma. Sono state infatti descritte sia delezioni che interessano tutto il braccio corto (più frequenti) sia, occasionalmente, delezioni parziali interstiziali. È stato dimostrato che la perdita più comune si verifica a livello della banda 1p36 [6]. L'estensione della regione cromosomica deleta in 1p sembra essere positivamente correlata al grado di risposta alla chemioterapia. Al contrario, delezioni interstiziali hanno un significato prognostico negativo e non si associano alla perdita del 19q. Relativamente al cromosoma 19, diversi studi sulle perdite alleliche hanno evidenziato che la regione corrispondente alla banda 19q13 risulta essere quella più frequentemente deleta [7].

SCOPO DEL LAVORO

L'evidenza che i gliomi recanti un determinato tipo di alterazione genetica, come la perdita di 1p/19q e la metilazione del promotore del gene *MGMT*, possiedono caratteristiche differenti da

quelli che ne sono privi, ha sottolineato l'importanza dello studio delle caratteristiche molecolari di queste neoplasie.

Lo scopo di questo lavoro è consistito nella validazione su 34 casi di glioma di una nuova metodica di analisi delle regioni cromosomiche 1p e 19q, la *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA), mediante il confronto con una delle tecniche più largamente utilizzate per questo tipo d'indagine quale l'impiego di marcatori microsatellitari. Successivamente è stata effettuata l'analisi di tali regioni cromosomiche attraverso la nuova metodica su una casistica mista di 180 gliomi.

Infine, si è proceduto a confermare la presenza di delezioni a carico del cromosoma Y che erano state osservate in 7 casi analizzati in MLPA.

MATERIALI E METODI

CASISTICA

In questo studio retrospettivo è stata analizzata una casistica di 180 gliomi comprendenti 19 astrocitomi, 29 oligodendrogliomi e 132 GBM. La diagnosi di glioma è stata effettuata su sezioni di tessuto cerebrale fissato in formalina tamponata (4%) ed incluso in paraffina (FFPE) secondo le linee guida WHO.

Per ogni campione, l'analisi genetica è stata eseguita su DNA genomico estratto da tessuto tumorale FFPE o congelato e, in 34 casi, anche da sangue venoso periferico in anticoagulante (EDTA). È stato inoltre utilizzato il DNA genomico estratto da 6 linee cellulari stabilizzate di GBM derivate da colture primarie di 16 prelievi operatori (inclusi nei 132 GBM analizzati).

SELEZIONE DEI MICROSATELLITI

La rilevazione della perdita di eterozigosi mediante l'utilizzo di marcatori polimorfici, quali i microsatelliti, necessita di una comparazione del genotipo tumorale del paziente con quello del suo DNA costitutivo. Quest'ultimo viene ricavato dal DNA linfocitario estratto da un prelievo ematico periferico. In genere, più che la perdita completa di uno degli alleli, è rilevabile una variazione del loro rapporto rispetto al DNA costitutivo. Questa variazione, definita "sbilanciamento allelico", è dovuta al fatto che il prelievo di campione tumorale non è costituito solo da cellule tumorali ma contiene, in percentuale variabile, anche una contaminazione di cellule normali.

Per la valutazione della perdita di eterozigosi nelle regioni cromosomiche 1p e 19q sono stati utilizzati complessivamente 6 microsatelliti (Tab. 1).

I microsatelliti sono stati selezionati dalla letteratura e dalle principali banche dati disponibili in Internet (<http://www.genome.ucsc.edu>, <http://www.cephb.fr/en/cephdb/browser.php>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/guide/human>), tenendo conto della posizione del marcatore sul cromosoma ed dell'informatività genetica.

	STR	LOCUS	UNITA' RIPETUTA	ETEROZIGOSITA'	PESO MOLECOLARE	BIBLIOGRAFIA
1p	D1S508	1p36.23	(AC) _n	0,812	68-85	Barbashina et al. 2005 [6]; Gil-Salù et al. 2007 [8]; Hashimoto et al. 2003 [9]; Gresner et al. 2007 [10];
	D1S1612*	1p36.23	(GGAA) _n	0,929	94-130	-
	D1S496	1p36.1-p34.3	(AC) _n	0,815	213-287	Barbashina et al. 2005 [6]; Dong et al. 2004 [11];
	D1S2724	1p33	(AC) _n	0,821	267-287	Dong et al. 2004 [11];
	D1S1631*	1p23.3	(ATA) _n	0,893	129-156	-
	D1S457	1p13.3	(AC) _n	0,742	199-214	Kelly et al. 2010 [12];
	D1S534*	1p13.2	(GATA) _n	0,893	196-212	-
	D1S2696*	1p11.1	(AC) _n	0,889	159-185	Bouley et al. 2007 [13];
19q	D19S908*	19q13.3	(AC) _n	0,714	200-232	-
	D19S219	19q13.32	(AC) _n	0,77	160-190	Barbashina et al. 2005 [6]; Batchelor et al. 2004 [14]; Dong et al. 2004 [11]; Ueki et al. 2002 [15]; Gil-Salù et al. 2007 [8]; Eoli et al. 2006 [16]; Hashimoto et al. 2003 [9]; Fathi et al. 2007 [17]; Gresner et al. 2007 [10]; Ramirez et al. 2010 [18];
	D19S412	19q13.33	(AC) _n	0,812	189-201	Barbashina et al. 2005 [6]; Batchelor et al. 2004 [14]; Dong et al. 2004 [11]; Ueki et al. 2002 [15]; Gil-Salù et al. 2007 [8]; Eoli et al. 2006 [16]; Hashimoto et al. 2003 [9]; Ishii et al., 2007 [17]; Smith et al., 1999 [18]; Fathi et al. 2007 [19]; Ramirez et al. 2010 [20];
	D19S902*	19q13.34	(AC) _n	0,893	199-217	-

Tabella 1 Pannello completo dei microsatelliti utilizzati in questo studio. I microsatelliti indicati con * sono stati utilizzati solo in caso di mancata informatività degli altri marcatori.

ANALISI DELLA LOH CON MICROSATELLITI

I marcatori microsatellitari sono stati separati mediante elettroforesi capillare su sequenziatore automatico ABI PRISM 3130 *Genetic Analyser* (Applied Biosystems, Foster City,

CA, USA). Gli elettroferogrammi risultanti sono stati successivamente analizzati con il programma *Gene Mapper ID*® versione 4.0.

CALCOLO DELLA PERDITA DI ETEROZIGOSI

Il calcolo della perdita di eterozigosi è stato eseguito misurando, per ogni marcatore, la differenza del rapporto allelico tra il campione di DNA linfocitario e il DNA tumorale. In primo luogo è stato calcolato il rapporto tra le altezze dei due picchi (corrispondenti alle intensità di fluorescenza) in ciascuno dei due campioni, linfocitario e tumorale.

$$\text{RAPPORTO ALLELICO} = \frac{\text{Altezza Picco 1° Allele}}{\text{Altezza Picco 2° Allele}}$$

Successivamente, lo sbilanciamento allelico è stato misurato dal confronto tra i due rapporti.

$$\text{SBILANCIAMENTO ALLELICO} = \frac{\text{Rapporto Allelico Linfocitario}}{\text{Rapporto Allelico Tumorale}}$$

La perdita del *locus* per ogni microsatellite è stata assegnata per valori inferiori a 0.5 o maggiori di 1.5, in accordo con le linee guida suggerite in letteratura e dall'*Applied Biosystems*. Relativamente ad ogni regione cromosomica, la LOH del cromosoma viene assegnata quando almeno 1 microsatellite su 2 marcatori o 2 microsatelliti su 4 marcatori risultano essere deleti. La determinazione della perdita di eterozigosi è stata eseguita in doppio, su ogni campione per tutti i marcatori, nello stesso esperimento di amplificazione.

MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA)

L'MLPA è una tecnica di PCR *multiplex* in cui fino ad un massimo di 45 specifiche sequenze vengono simultaneamente amplificate in modo quantitativo in una singola reazione. Dal momento che viene utilizzata una singola coppia di *primers*, i frammenti vengono tra loro distinti per la lunghezza che varia dalle 130 alle 490 bp [21].

Questa tecnica prevede l'utilizzo di due diversi tipi di sonde, il primo composto da una sequenza complementare al *primer forward* e da un oligonucleotide complementare ad una parte della sequenza d'interesse; il secondo costituito da un altro oligonucleotide complementare all'altra parte di sequenza *target*, da un frammento *stuffer* necessario per la discriminazione dei frammenti in base alle paia di basi e da una sequenza complementare al *primer reverse*. Le sonde vanno ad ibridarsi con il DNA genomico denaturato e solo quelle appaiate correttamente sono in grado di legarsi in un unico frammento mediante una reazione ligasica. La quantità di prodotto di ligazione dipende dalla quantità di sequenza bersaglio presente nel campione. I frammenti prodotti dall'unione delle sonde, e non il DNA genomico, vengono quindi amplificati in una reazione di PCR mediante un'unica coppia di *primers* fluorescenti [22].

Per l'analisi delle delezioni a carico delle regioni cromosomiche 1p e 19q è stato utilizzato il *kit* SALSA MLPA P088-B1 (*MRC-Holland*, Amsterdam, The Netherlands). Questo *kit* contiene, oltre ai 7 frammenti per il controllo di qualità, 18 sonde per il cromosoma 1, 10 sonde per il

cromosoma 19, 14 sonde di controllo collocate su cromosomi diversi e 2 frammenti specifici per la determinazione del sesso, rispettivamente di 100 bp per il cromosoma X e di 105 bp per Y (Tab. 2; Tab. 3). La reazione è stata eseguita, al fine di testarne la riproducibilità in doppio per ogni campione, su concentrazioni di DNA variabili da 100 ng a 500 ng, a seconda della qualità del materiale di partenza, secondo il protocollo fornito dal *kit*. Successivamente i prodotti della reazione di MLPA sono stati analizzati per migrazione elettroforetica capillare su sequenziatore automatico ABI PRISM 3130 *Genetic Analyser* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Gli elettroferogrammi risultanti sono stati analizzati, per una preliminare valutazione dei risultati e dei controlli di qualità, mediante il programma *Gene Mapper ID*® versione 4.0.

CROMOSOMA 1

TAGLIA (bp)	GENE	POSIZIONE SUL CROMOSOMA	LOCALIZZAZIONE SONDA
391	TNFRSF4	1p36.33	Ex 5
178	GNB1	1p36.33	Ex 3
346	TNFRSF14	1p36.32	Ex 8
328	TP73	1p36.32	5' UTR
454	PARK7	1p36.23	Ex 7 – 3' UTR
400	MFFN2	1p36.22	Ex 10
320	PTAFR	1p35.3	Ex 2
283	FAF1	1p33	Ex 4
160	PPAP2B	1p32.2	5' UTR
337	CYP2J2	1p32.1	Ex 2
274	LPHN2	1p31.1	Ex 20
256	GTF2B	1p22.2	Ex 2
373	DPYD	1p21.3	Ex 1
472	NRAS	1p13.2	Ex 5
130	NOTCH2	1p11.2	Ex 5
CENTROMERO			
310	LMNA	1q21.2	Ex 3
427	CRB1	1q31.3	Ex 5
190	TNNT2	1q32.1	Ex 2

Tabella 2 Peso molecolare e posizione delle sonde per il cromosoma 1.

CROMOSOMA 19

TAGLIA (bp)	GENE	POSIZIONE SUL CROMOSOMA	LOCALIZZAZIONE SONDA
142	SMARCA4	19p13.2	Ex 33
211	LDLR	19p13.2	Ex 4
CENTROMERO			
166	CCNE1	19q12	Ex 11
184	PDCD5	19q13.12	Ex 1
238	UPK1A	19q13.13	Ex 2
364	TGFB1	19q13.2	Ex 3
409	ZNF342	19q13.32	Ex 2
220	PPP1R15A	19q13.33	Ex 2
301	BAX	19q13.33	Ex 4
266	CHMP2A	19q13.43	Ex 3

Tabella 3 Peso molecolare e posizione delle sonde sul cromosoma 19.

MLPA: NORMALIZZAZIONE DEI DATI E ANALISI MEDIANTE *COFFALYSER*

La normalizzazione dei dati ottenuti mediante l'analisi al sequenziatore dell'MLPA prevede, in primo luogo, il calcolo del rapporto, per ogni sonda, tra il valore di ogni picco (altezza) e il valore combinato delle sonde di controllo all'interno dello stesso campione (*Probe Fraction*), al fine di compensare l'efficienza della reazione di PCR (normalizzazione intra-corsa). Il *Probe Fraction* di ogni campione viene quindi diviso per il valore medio dei *Probe Fractions* di 4 campioni di riferimento utilizzati come controlli, generando così il valore normalizzato o *Probe Ratio*.

La normalizzazione dei dati ottenuti mediante MLPA è stata effettuata con l'ausilio del software *MRC-Coffalyser* versione 9.4 (*MRC-Holland*, <http://old.mlpa.com/coffalyser>). Il risultato dell'elaborazione dei dati ottenuti dal *Coffalyser* fornisce per ogni valore di *Probe Ratio*, corrispondente ad una determinata sonda, la deviazione *standard* ed una predizione.

La normalizzazione interna dei campioni è stata effettuata sulle sonde di controllo e ogni singolo campione è stato successivamente normalizzato con i dati ottenuti da quattro campioni di controllo. I valori di normalità sono stati stabiliti tra 0.75 e 1.5. Il criterio di assegnazione della perdita, o del *gain*, prevede la presenza di almeno due sonde consecutive, per ogni cromosoma, con LOH o *gain* [23; 24].

ANALISI DELL'AMELOGENINA

L'amelogenina è una proteina coinvolta nello sviluppo dello smalto dentario appartenente alla famiglia delle proteina della matrice extra-cellulare. Il gene codificante per questa proteina è presente sul cromosoma Xp22.1-22.3 e Yp11.2.

Il gene dell'amelogenina è utilizzato per la determinazione del sesso in campioni di origine umana mediante l'impiego di *primers* specifici per l'introne 1. L'amplicone di *AMLX*, presente sul cromosoma X, risulta essere di 106 bp mentre l'amplicone di *AMLY*, presente sul cromosoma Y, risulta essere di 112 bp. Le due copie *AMLX* e *AMLY* differiscono infatti per una delezione di 6bp nell'introne 1 presente solo sul cromosoma X.

Per la reazione di PCR è stata utilizzata una coppia di *primers* marcata al 5' del *primer forward* con un fluorocromo. I frammenti sono stati successivamente separati per migrazione elettroforetica capillare su sequenziatore automatico ABI PRISM 3130 *Genetic Analyser* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA). Gli elettroferogrammi risultanti sono stati analizzati con il programma *Gene Mapper ID*® versione 4.0.

RISULTATI

VALIDAZIONE DELLA *MULTIPLEX LIGATION DEPENDENT-PROBE AMPLIFICATION* MEDIANTE MARCATORI MICROSATELLITARI

L'analisi della perdita di eterozigosi per le regioni cromosomiche 1p e 19q è stata eseguita, con l'impiego di marcatori microsatellitari, su una casistica di 34 gliomi di cui era disponibile sia il DNA estratto dal tumore che il DNA costitutivo (linfocitario) del paziente. La casistica era così suddivisa: 23 glioblastomi multiformi, 8 oligodendrogliomi e 3 astrocitomi.

Questi 34 gliomi sono stati parallelamente analizzati mediante MLPA al fine di valutare la concordanza dei risultati tra le due tecniche. Sono stati evidenziati 3 casi discordanti per la perdita

di 1p e 7 casi discordanti per la perdita di 19q. La concordanza dei risultati è stata rispettivamente del 91,2% e del 79,4%. Tuttavia, l'analisi basata sull'impiego dei microsatelliti è in grado di rilevare gli sbilanciamenti allelici ma non di stabilire se questi derivino da delezioni o da guadagni di funzione a carico delle regioni cromosomiche [25]. I 3 campioni discordanti per la regione cromosomica 1p non risultavano deleti all'analisi in MLPA bensì presentavano dei *gains* a carico delle regioni in cui mappavano i microsatelliti portando la concordanza tra le due metodiche al 100%. Analogamente, dei 7 casi discordanti per 19q, 5 sono risultati avere dei *gains* a carico della regione d'interesse trasformando la concordanza al 94,1%.

ANALISI DELLE DELEZIONI DI 1p E 19q MEDIANTE MLPA

In generale, l'analisi delle regioni cromosomiche 1p e 19q è stata eseguita su una casistica di 180 gliomi comprendenti 29 oligodendrogliomi, 19 astrocitomi e 132 GBM. La delezione è stata assegnata con la presenza di almeno due sonde consecutive con valore inferiore a 0.75. Le frequenze delle perdite a carico dei singoli cromosomi e della codelezione sono riportati in Tab. 4.

CASI	LOH 1p	LOH 19q	LOH 1p/19q
Oligodendrogliomi (II, III)	75.9% (22/29)	62.1% (18/29)	58.6% (17/29)
Astrocitomi (I, II, III)	42.1% (8/19)	21.1% (4/19)	15.8% (3/19)
GBM	14.4% (19/132)	6.8% (9/132)	4.6% (6/132)

Tabella 4 Frequenze delle delezioni a carico dei cromosomi 1p e 19q e della perdita combinata per i gliomi analizzati.

ANALISI DEI *GAINS* A CARICO DI 1p E 19q MEDIANTE MLPA

Nei gliomi di derivazione astrocitaria, dal I al IV grado di malignità, l'analisi ha evidenziato delle regioni soggette a guadagno di funzione, considerando il criterio di assegnazione delle due sonde consecutive con valore maggiore di 1,5. Le frequenze di tali guadagni per la casistica analizzata sono riportati in Tab. 5.

CASI	GUADAGNO DI FUNZIONE 1p	GUADAGNO DI FUNZIONE 19q
Oligodendrogliomi (II, III)	- (0/29)	3.5% (1/29)
Astrocitomi (I, II, III)	10.5% (2/19)	15.8% (3/19)
GBM	18.2% (24/132)	25.8% (34/132)

Tabella 5 Frequenze dei guadagni di funzione rilevate a carico dei cromosomi 1p e 19q per i gliomi analizzati.

DETERMINAZIONE DELLA REGIONE DI DELEZIONE MINIMA

Analizzando le singole frequenze di delezione delle regioni cromosomiche analizzate in MLPA e considerando che è stata assegnata la delezione con la presenza minima di due sonde consecutive con valore inferiore o uguale a 0.75, si può definire un intervallo di delezione minima. Relativamente ai 29 tumori di derivazione oligodendrogliale, osservando i *loci* in cui è stata riscontrata una perdita in almeno il 50% dei casi, si può definire una regione di delezione minima per il cromosoma 1p estesa dall'1p36.32 (*TNFRSF14*) fino all'1p33 (*FAF1*). Negli astrocitomi (19 casi) è possibile definire una regione minima di delezione solo se si considera una frequenza di delezione pari al 26%. Questa si estende esclusivamente a due *loci* consecutivi corrispondenti all'1p36.32 (*TNFRSF14*) e all'1p36.3 (*TP73*) (Fig. 1). La regione cromosomica 1p36 è soggetta ad alterazioni genetiche non solo nei gliomi ma anche in altre neoplasie quali, ad esempio, i carcinomi della cervice a cellule squamose, i carcinomi epatocellulari e i tumori del polmone [26; 27; 28].

Per quanto riguarda il cromosoma 19q, la regione compresa tra il 19q13.13 (*UPK1A*) e il 19q13.2 (*PPP1R15A*) risulta essere la regione minima deleta, con la perdita riscontrata almeno nel 50% dei casi di oligodendroglioma (Fig. 2).

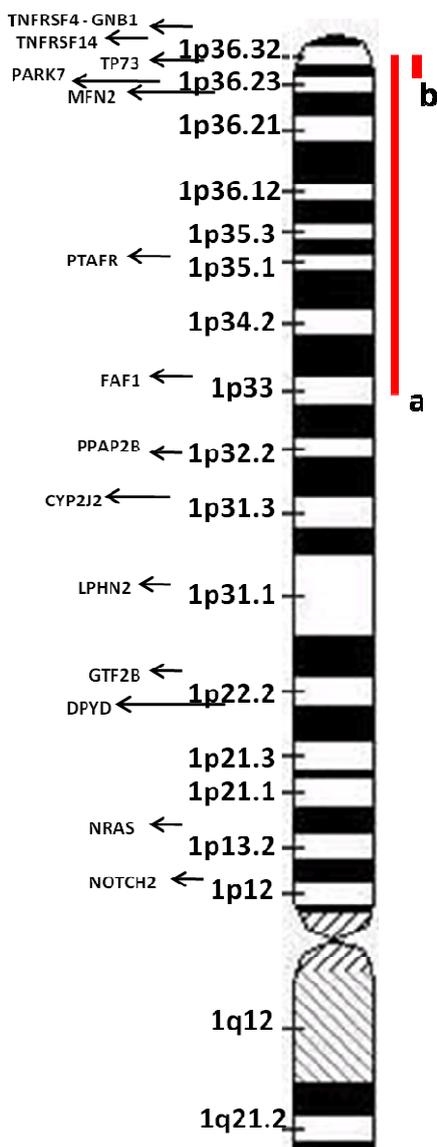


Figura 1. Cromosoma 1p. La linea rossa "a" indica l'estensione della regione di delezione minima negli oligodendrogliomi (1p36.32 *TNFRSF14*-1p33 *FAF1*). La linea rossa "b" indica l'estensione della regione minima di delezione negli astrocitomi di basso grado (1p36.32 *TNFRSF14*-1p36.3 *TP73*).

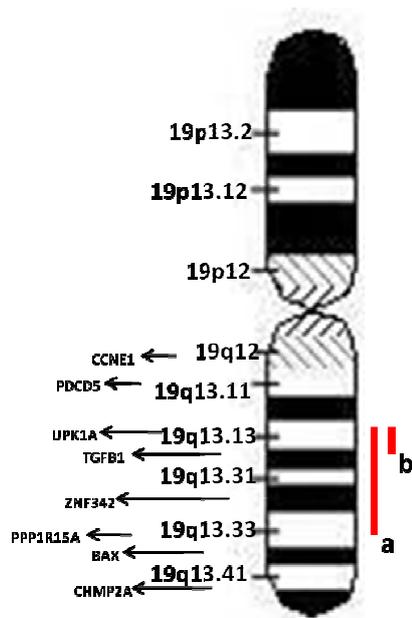


Figura 2. Cromosoma 19. La linea rossa "a" indica l'estensione della regione di delezione minima negli oligodendrogliomi (19q13.13 *UPK1A*-19q13.33 *PPP1R15A*). La linea rossa "b" indica l'estensione della regione minima di delezione negli astrocitomi di basso grado (19q13.13 *UPK1A*-19q13.2 *PPP1R15A*).

ANALISI DELL'AMELOGENINA

Il kit utilizzato per l'analisi in MLPA contiene due sonde rispettivamente per la rilevazione dei cromosomi X e Y. In 7 dei 180 gliomi analizzati, è stata osservata una discordanza tra il sesso determinato mediante l'analisi del *Coffalyser* e il dato clinico del paziente. L'analisi degli elettroferogrammi ha evidenziato, nei 7 casi tutti con diagnosi di GBM, o l'assenza completa del picco corrispondente alla sonda per il cromosoma Y o una sua riduzione.

Queste osservazioni sono state confermate su tutti i 7 casi dall'analisi dell'amelogenina. Al fine di confermare ulteriormente tale risultato è stata effettuata la determinazione del sesso anche sulle linee cellulari stabilizzate ottenute da GBM già analizzati in MLPA. In particolare, una di queste linee è stata derivata da uno dei campioni in cui era stata osservata la perdita parziale del cromosoma Y; anche la linea è risultata essere completamente deleta per il cromosoma Y. Le altre linee cellulari derivate da campioni in cui non era stata osservata un'alterazione a carico del cromosoma Y hanno evidenziato perdite a carico di questo cromosoma in 5 casi su 6.

DISCUSSIONE

Le alterazioni genetiche che caratterizzano i gliomi sono state largamente oggetto di studio negli ultimi anni. La perdita di eterozigosi di 1p e 19q è la più frequente alterazione molecolare rilevata negli oligodendrogliomi, in particolare riscontrata in circa il 70-80% dei tumori di II grado e nel 50% di quelli di III grado. La codelezione a carico di queste due regioni cromosomiche è stata osservata, sebbene con minor frequenza, anche nelle neoplasie di derivazione astrocitaria. Tuttavia il suo significato in questo gruppo di tumori rimane ancora sconosciuto, mentre delezioni a carico di singoli *loci* sul cromosoma 1 e 19 possiedono un significato prognostico negativo [7].

La metodica MLPA si è dimostrata essere una tecnica molto promettente per la diagnostica grazie alla sua capacità di rilevare variazioni nel numero di copie di DNA analizzando fino a 45 *loci* per campione in un unico esperimento basato su una PCR semi-quantitativa. In particolare, l'applicazione dell'MLPA per l'analisi delle delezioni di 1p e 19q è risultata, dopo la validazione,

riproducibile, affidabile e ad elevata processività. Tale metodica risulta particolarmente utile per la determinazione delle delezioni cromosomiche nei gliomi in caso di casistiche d'archivio di cui è disponibile il solo DNA tumorale, a differenza dell'analisi dell'LOH con i microsatelliti in cui è richiesto anche il DNA costitutivo.

La presenza di una traslocazione centromerica o pericentromerica che porta alla perdita di 1p e 19q ha suggerito l'ipotesi dell'esistenza di uno o più geni oncosoppressori sul cromosoma 1p o 19q coinvolti nello sviluppo dei tumori oligodendrogliali. La definizione di una regione di delezione minima su entrambi i cromosomi è volta anche all'identificazione di geni candidati a questo ruolo.

Le frequenze della codelezione 1p/19q riscontrate nella casistica di 180 gliomi (58.6% degli oligodendrogliomi, 15.8% degli astrocitomi, 4.6% dei GBM) sono concordi con quanto è stato precedentemente descritto in letteratura. In particolare, negli oligodendrogliomi la codelezione è stata riscontrata nel 71.4% dei tumori di II grado e nel 46.7% dei tumori di III grado.

All'interno della regione di delezione minima del cromosoma 1p (6 sonde consecutive), il *locus* più frequentemente deletato è stata riscontrato a livello della banda 1p35-p34.3, in particolare all'interno dell'esone 2 del gene codificante il recettore per il fattore di attivazione piastrinica (*PTARF*) [29].

A differenza degli oligodendrogliomi in cui generalmente sono riscontrabili delezioni estese a tutto l'1p, negli astrocitomi, oltre a questa regione minima, l'analisi al *Coffalyser* rivela la presenza di delezioni interstiziali (a carico di singoli *loci*) localizzate in particolare nelle regioni 1p36 (*TNFRSF4*, 21,1%), 1p35-p34.3 (*PTARF*, 68,4%), 1p32.2 (*PPAP2B*, 31,6%) e 1p31.1 (*LPHN2*, 52,6%). In realtà, senza un'analisi mutazionale più specifica, è impossibile stabilire se queste alterazioni corrispondano a delle vere e proprie delezioni piuttosto che a mutazioni di altro genere, anche attivanti, in grado d'impedire l'ibridazione della sonda con il DNA bersaglio. La sonda localizzata nell'esone 5 del gene *TNFRSF4* va ad ibridarsi con una sequenza bersaglio contenente un SNP validato in letteratura. È possibile che il 21,1% dei casi, identificati come *spot* di delezione, siano dovuti alla presenza di un determinato allele piuttosto che ad una reale perdita a carico di questo gene.

La delezione minima evidenziata sul cromosoma 19q nei casi di oligodendroglioma è compresa tra il gene *UPK1A* (19q13.13) e il gene *PPP1R15A* (19q13.2) (4 sonde consecutive) sebbene le delezioni interessino molto più frequentemente l'intero braccio lungo del cromosoma 19. All'interno di questa regione non è identificabile un *locus* preferenziale di perdita in quanto le frequenze riscontrate sono equivalenti tra di loro. Il confronto delle regioni di delezione minima identificate negli astrocitomi e negli oligodendrogliomi, individua la regione compresa tra i geni *UPK1A* in 19q13.13 e *TGFBI* in 19q13.1 come comune ad entrambi i tipi tumorali (Fig. 2).

Anche relativamente al cromosoma 19q, l'analisi al *Coffalyser* ha riscontrato una più frequente delezione interstiziale in corrispondenza del *locus* 19q12 (*CCNE1*). Il gene *CCNE1*, la cui sonda è localizzata nell'esone 11, codifica per la proteina Ciclina E1. Tale *locus* è stato riscontrato come deletato nel 79% degli astrocitomi di basso grado analizzati, nel 62,1% degli oligodendrogliomi e nel 14,4% dei GBM.

Il *pool* di sonde fornite dal *kit* per l'MLPA, utilizzato in questo studio, contiene anche 3 sonde per l'analisi del braccio lungo del cromosoma 1 (1q) e 2 sonde per il braccio corto del cromosoma 19 (19p). L'analisi di tali *loci* ha evidenziato la presenza di delezioni a carico delle regioni pericentromeriche dei due cromosomi in accordo con la teoria della traslocazione sbilanciata i cui punti di rottura s'ipotizzano essere localizzati in queste regioni.

L'applicazione della metodica MLPA ha permesso anche la rilevazione di regioni soggette a guadagno di funzione sia sul cromosoma 1p sia sul 19q. In particolare, tali guadagni si sono dimostrati essere più frequenti nei tumori astrocitari, compresi i GBM, rispetto agli oligodendrogliomi. I guadagni di funzione, soprattutto a carico del 19q, sono stati già descritti nei GBM soprattutto di tipo primario. *Huhn et al.* [30] hanno identificato, in una casistica di GBM, *gains* simultanei a carico dei cromosomi 7 e 19 nel 30% dei soli tumori resistenti a radioterapia [31]. *Burton et al.* [32] e *Korshounov et al.* [33] hanno osservato che il guadagno sul cromosoma 19q è associato ad una minor sopravvivenza dei pazienti affetti da GBM. Il meccanismo molecolare attraverso cui un guadagno di funzione sul cromosoma 19 possa influenzare globalmente la sopravvivenza dei pazienti rimane sconosciuto [34].

Un risultato interessante, ottenuto da un'attenta analisi dei risultati dell'MLPA e confermato successivamente dall'analisi dell'amelogenina, è stata la rilevazione di delezioni a carico del cromosoma Y. Perdite o delezioni a carico di questo cromosoma sono già state precedentemente identificate in pazienti con GBM con la metodica CGH e HR-CGH [31]. In particolare, le delezioni a carico del cromosoma Y sono state riscontrate in altre neoplasie tra cui il carcinoma della prostata (16-53%), le neoplasie a cellule papillari del rene (10-80%), il carcinoma a cellule squamose della testa e del collo (50%) e dell'esofago (62%), l'adenocarcinoma di *Barret* (76%), l'adenocarcinoma gastrico (60%) e pancreatico (36%), i disordini ematologici (10-25%) [35].

In conclusione, la metodica MLPA applicata all'analisi della perdita di eterozigosi di 1p/19q si è dimostrata, nella nostra casistica, una tecnica robusta ed affidabile in grado di fornire, rispetto alle metodiche convenzionali quali i microsatelliti o la FISH, informazioni più complete. L'impiego di questa tecnica ha consentito l'identificazione del grado di estensione delle delezioni sui cromosomi presi in esame e delle eventuali perdite combinate. Secondariamente, ha permesso di evidenziare la presenza di delezioni interstiziali e di regioni soggette a guadagno di funzione.

Alla luce dei risultati ottenuti in questo studio, le prospettive prevedono l'analisi del significato delle delezioni sui cromosomi 1 e 19 in relazione alla sopravvivenza dei pazienti e agli eventuali trattamenti di radio e chemioterapia. Parallelamente, si tratterà di approfondire l'identificazione, all'interno delle regioni di delezione minima, di eventuali geni oncosoppressori coinvolti nella gliomagenesi.

Infine, relativamente alle osservazioni sul cromosoma Y, potrebbe essere interessante approfondire lo studio con una mappa di delezione dell'intero cromosoma.

BIBLIOGRAFIA

1. Grzendowski M., Wolter M., Riemenschneider M.J., Knobbe C.B., Schlegel U., Meyer H.E., Reifenberger G., Stühler K. (2010), *Neuro Oncol* **12(3)**, 243-256;
2. Van Nifterik K.A., Van der Berg J., Van der Meide W.F., Ameziane N., Wedekind L.E., Steenbergen R.D.M., Leenstra S., Mafleur M.V.M., Slotman L.J.A., Sminia P. (2010), *Br J Cancer* **103(1)**, 29-35;
3. Snuderl M., Eicchler A.F., Ligon K.L., Vu Q.U., Silver M., Betensky R.A., Ligon A.H., Wen P.Y., Louis D.N., Iafrate A.J. (2009), *Clin Cancer Res* **15(20)**, 6430-6446;
4. Vogazianou A.P., Chan R., Bäcklund L.M., Pearson M., Liu L., Langford C.F., Gregory S.G., Colling V.P., Ichimura K. (2010), *Neuro Oncol* **12(7)**, 664-678;
5. Griffin C.A., Burger P., Morsberger L., Yonescu R., Swierczynski S., Weingart J.D., Murphy K.M. (2006), *J Neuropathol Exp Neurol* **65(10)**, 984-988;
6. Barbashina V., Salazar P., Holland E.C., Rosenblum M.K., Ladanyi M. (2005), *Clin Cancer Res* **11(3)**, 1119-1128;
7. Iuchi T., Namba H., Iwadate Y., Shishikura S., Kageyama H., Nakamura A. (2002), *Genes Chromosomes Cancer* **35**, 170-175;
8. Gil-Salú J.L., Nieto A., Rodríguez-Guatiérrez J.F., Almarcha J. (2007), *Neurocirugía (Astur)* **18(4)**, 285-293;
9. Hashimoto N., Murakami M., Takahashi Y., Fujimoto M., Inazawa J., Mineura K. (2003), *Cancer* **97(9)**, 2254-2261;
10. Gresner S. M., Rieske P., Wozniak K., Piaskowski S., Jaskolski D. J., Skowronski W., Sikorska B., Papierz W., Liberski P. P. (2007), *Acta Eurobiol Exp* **67**, 103-112;
11. Dong Z., Pong J.C.S., Ng M.H., Poon W.S., Zhan W.S., Ng H.W. (2004), *Br J Cancer* **91**, 1105-1111;
12. Kelly J.J.P., Blough M.D., Stechinshin O.D.M., Chan J.A.W., Beauchamp D., Perizzolo M., Demetrick D.J., Steele L., Auer R.N., Hader W.J., Westgate M., Parney I.F., Jenkins R., Cairncross J.G., Weiss S. (2010), *Neuro Oncol* **12(7)**, 745-755;
13. Boulay J.L., Miserez A.R., Zwifel C., Wasner M., Van Meir E., Tolnay M., Reifenberger G., Merlo A. (2007), *PLoS One* **6(e576)**, 1-9;
14. Batchelor T. T., Betensky R. A., Esposito J. M., Pham L.D., Dorfman M.V., Piscatelli M., Jung S., Rhee D., Louis D. N. (2004), *Clin Cancer Res* **10**, 228-233;
15. Ueki K., Nishikawa R., Nakazato Y., Hirose T., Hirato J., Funada N., Fujimaki T., Hojo S., Kubo O., Ide T., Usui M., Ochiai C., Ito S., Takahashi H., Mukasa A., Asai A., Kirino T. (2002), *Clin Cancer Res* **8**, 196-201;

16. Eoli M., Bissola L., Bruzzone M. G., Pollo B., Maccagno C., De Simone T., Valletta L., Silvani A., Bianchessi D., Broggi G., Boiardi A., Finocchiaro G. (2006), *Int J Cancer* **119**, 84-90;
17. Ishii D., Natsume A., Wakabayashi T., Hatano H., Asano Y., Takeuchi H., Shimato S., Ito M., Fujii M., Yoshida J. (2007), *Neurol Med Chir* **47**, 341-350;
18. Smith J. S., Alderete B., Minn Y., Borell T. J., Perry A., Mohapatra G., Hosek S.M., Kimmel D., O'Fallon J., Yates A., Feurstein B. G., Burger P. C., Scheithauer B. W., Jenkins R. B. (1999), *Oncogene* **18(28)**, 4144-4152;
19. Fathi A. R., Vassella E., Arnold M., Curschmann J., Reinert M., Vajatai I., Weis J., Deiana G., Mariani L. (2007), *Strahlenther Onkol* **183(9)**, 517-522;
20. Ramirez C., Bowman C., MAurage C.A., Dubois F., Blond S., Porchet N., Escande F. (2010), *Neuro Oncol* **12(5)**, 490-499;
21. Jankowski S., Currie-Fraser E., Xu L., Coffa J. (2008), *J Biomol Tech* **19**, 238-243;
22. Natté R., Van Eijk R., Cleton-Jansen A. M., Oosting J., Kouwenhove M., Kros J.M., Van Duinem S. (2005), *Brain Pathol* **15(3)**, 192-197;
23. Weller M., Berger H., Hartmann C., Schramm J., Westphal M., Simon M., Goldbrunner R., Krex D., Steinbach J. P., Ostertag C. B., Loeffler M., Pietsch T., Von Deimling A. (2007), *Clin Cancer Res* **13(23)**, 6933-6937;
24. Franco-Hernández C., Martínez-Glez V., De Campos J.M., Isla A., Vaquero J., Gutiérrez M., Casartelli C., Rey J.A. (2009), *Cancer Genet Cytogenet* **190**, 93-96;
25. Laboussière M., Ibdaih A., Wang X.W., Marie Y., Boisselier B., Falet C., Paris S., Laffaire J., Carpentier C., Crinière E., Ducray F., El Hallani S., Mokhtari K., Hoang-Xuan K., Delattre J.Y., Sanson M. (2010), *Neurology* **74**, 1886-1890;
26. Choi Y.M., Bae S.M., Kim Y.W., Lee H.N., Kim Y.W., Park T.C., Ro D.Y., Shin J.C., Shin S.J., Seo J.S., Ahn W.S. (2007), *Int J Gynecol Cancer* **17(3)**, 687-696;
27. Nishimura T., Nishida N., Itoh T., Komeda T., Fukuda Y., Ikai I., Yamaoka Y., Nakao K. (2005), *Genes Chromosomes Cancer* **42(1)**, 34-43;
28. Nomoto S., Haruki N., Tatematsu Y., Konishi H., Mitsudomi T., Takahashi T., Takahashi T. (2000), *Genes Chromosomes Cancer* **28(3)**, 342-346;
29. De Oliveira S.I., Andrade L.N.S., Onuchic A.C., Nonogaki S., Fernandes P.D., Pinheiro M.C., Rohde C.B.S., Chammas R., Jancar S. (2010), *BMC Cancer* **10**, 200-212;

30. Huhn S.L., Mohapatra G., Bollen A., Lamborn K., Prados M.D., Feuerstein B.G. (1999), *Clin Cancer Res* **5**, 1435-1443;
31. Vranová V., Necessalová E., Kuglík P., Cejpek P., Pesáková M., Budíniská E., Relichová J., Veselská R. (2007), *Oncol Rep* **17**, 457-464;
32. Burton E.C., Lamborn K.R., Feuerstein B.G., Prados M., Scott J., Forsyth P., Passe S., Jenkins R.B., Aldape K.D. (2002), *Cancer Res* **62**, 6205-6210;
33. Korshunov A., Sycheva R., Golanov A. (2005), *Cancer* **104**, 825-832;
34. Toedt G., Barbus S., Wolter M., Felsberg J., Tews B., Blond F., Sabel M.C., Hofmann S., Becker N., Hartmann C., Ohgaki H., Von Deimling A., Wiestler O.D., Hahn M., Lichter P., Reifenberger G., Radlwimmer B. (2010), *Int J Cancer* , Epub ahead of print, May 2010;
35. Bianchi N.O. (2009), *Mutat Res* **682**, 21-27;

SEMINARI

17 Novembre 2009: “ALK e tumorigenesi”, Prof. Roberto Chiarle;

30 Novembre 2009: “Use of MAR epigenetic regulators for therapeutic expression”, Prof. Nicolas Mermond;

14 Dicembre 2009: “Controllo funzionale dei linfociti T da parte di adenosina trifosfato (ATP) extracellulare”, Prof. Fabio Grassi;

14 Gennaio 2010: “Clinical significance of antinuclear antibodies in autoimmune liver disease”, Prof. Pietro Invernizzi;

20 Gennaio 2010: “LSD1, Lysine Specific Demethylase 1, insight into a new epigenetic regulator involved in neuronal gene regulation”, Dott.ssa Elena Battaglioli;

28 Gennaio 2010: “Dal difetto genetico all’infiammazione”, Prof. Luigi Maiuri;

9 Febbraio 2010: “R&D of magnetic-nanoparticles and carriers for drug”, Dott. Giovanni Baldi;

10 Febbraio 2010: “Anticorpi nel Laboratorio Analisi, luci e colori al servizio del paziente”, Dott. Matteo Vidali;

3 Marzo 2010: “Basi genetiche del diabete di tipo 1 e della sclerosi multipla: l’esempio della popolazione sarda”, Prof. Francesco Cucca;

5 Marzo 2010: “The wonders of yeast: yeast as a model organism”, Prof. Steve Ellis;

8 Marzo 2010: “Chromosome 5q deletions in MDS: genotype/phenotype relationships”, Prof. Steve Ellis;

9 Marzo 2010: “Desatinib: transforming an adverse event into a new therapeutic target”; Prof. Steve Ellis

12 Marzo 2010: “Marcatori biologici per la diagnosi precoce della malattie neurodegenerative”, Prof. Elio Scarpini;

14 Giugno 2010: “Fenotipo e cellule staminali tumorali nei gliomi maligni”, Prof. Davide Schiffer, Dott.ssa Marta Mellai, Dott.ssa Valentina Caldera;

15 Giugno 2010: “Nuove strategie anticancro: i microRNA come agenti differenziativi per i tumori solidi”, Prof.ssa Carola Ponzetto;

5 Luglio 2010: “Role of membrane lipids in neuronal synapses”, Dott.ssa Paola Camoletto;

6 Settembre 2010: “Ruolo delle microvescicole nella comunicazione tra cellule”, Prof. Giovanni Camussi;

17 Settembre 2010: “Prevention and cure of autochthonous mammary carcinomas in her2 transgenic mice?”, Prof. Federica Cavallo

22 Settembre 2010: “Le cellule staminali tumorali: dalla biologia alla clinica”, Prof. Ruggero De Maria;

23 Settembre 2010: “Preventing Persisters: Targeting epigenetic changes in cancer chemotherapy”, Prof. Steve Ellis

SEZIONE 2

CORSI FREQUENTATI

21 Maggio, 31 Maggio e 18 Giugno 2010: Lezioni Oncologia Prof. Albano

COMUNICAZIONI CONGRESSI

59° Congresso Nazionale SINch, Milano 27-30 Ottobre 2010: “Mutations of IDH1 and IDH2 genes in astrocytic and oligodendrocytic gliomas”, M. Mellai, A. Piazzini, M. Giordano, A. Comino, C. Modellini, M. Lanotte, P. Cassoni, D. Schiffer.

XIII Congresso Nazionale SIGU, Firenze 14-17 Ottobre 2010, “Le mutazioni dei geni IDH1 e IDH2 nei gliomi e le loro correlazioni molecolari”, M. Mellai, A. Piazzini, O. Monzeglio, M. Giordano, P. Cassoni, D. Schiffer.

XV Congresso Nazionale AINO, Fiumicino (FR) 3-6 Ottobre 2010, “Le mutazioni dei geni IDH1 e IDH2 nei tumori neuro-epiteliali e le loro correlazioni molecolari”, M. Mellai, A. Piazzini, O. Monzeglio, G. Valente, D. Schiffer.

IX Meeting EANO, Maastricht 16-19 Settembre 2010, “Significance of IDH1 and IDH2 mutations in gliomas and their correlations”, M. Mellai, O. Monzeglio, A. Piazzini, E. Andreoli, D. Schiffer.

XLVI Congresso Internazionale AINP – XXXVI AIRIC, Squillace (CZ) 23-25 Maggio 2010: “Significance of IDH1 and IDH2 mutations in gliomas and their correlations”, M. Mellai, O. Monzeglio, A. Piazzini, E. Andreoli, D. Schiffer.

XXII Congresso Nazionale SIGU, Torino 8-10 Novembre 2009, “Analisi della perdita di eterozigotà nei gliomi mediante microsatelliti e Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)”, M. Mellai, A. Piazzini, M. Giordano, P. Cassoni, D. Schiffer.

XIV Congresso Nazionale AINO, Padova 4-7 Ottobre 2009, “Ipermetilazione di MGMT in relazione ad alterazioni genetiche nei gliomi di basso grado”, M. Mellai, A. Piazzini, O. Monzeglio, V. Caldera, L. Annovazzi, A. Comino, G. Valente, D. Schiffer.