



Università politecnica delle Marche
Dipartimento Scienze della Vita e dell'Ambiente
Laurea triennale in scienze Biologiche

Anno accademico
2019/2020

**SVILUPPO E PROGRESSO DELLE TECNICHE DI CITOGENETICA MOLECOLARE
APPLICATE PER STUDIARE L'ORIGINE E L'EVOLUZIONE GENETICA DEI DIVERSI
TIPI DI CANCRO.**

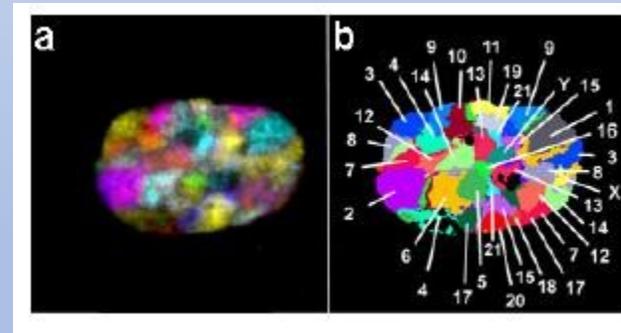
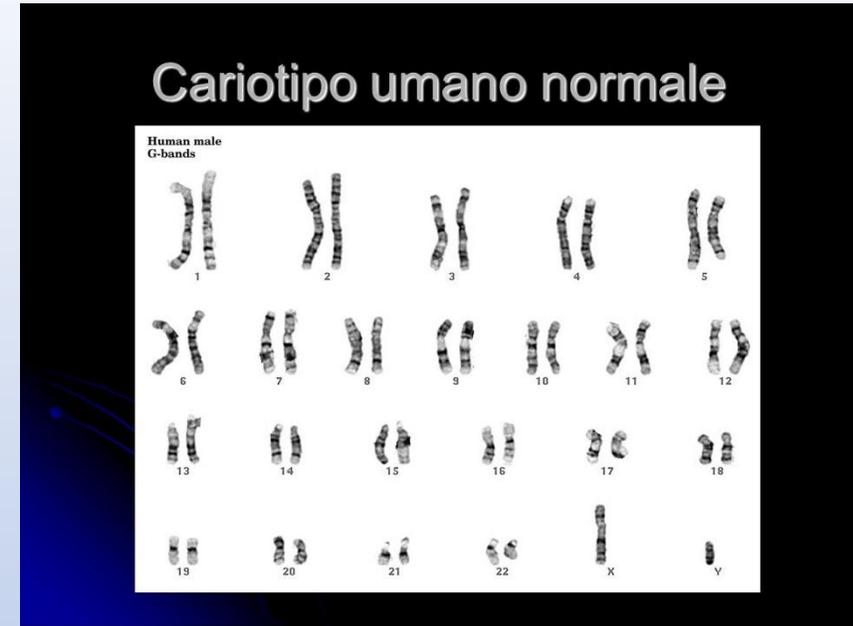
**DEVELOPMENT AND PROGRESS OF TECHNIQUES RELATED TO MOLECULAR
CYTOGENETIC APPLIED IN ORDER TO STUDY THE GENETIC ORIGIN AND
EVOLUTION OF DIFFERENT TYPES OF CANCER.**

Candidata:
Totaro Maria

Relatore:
Barucca Marco

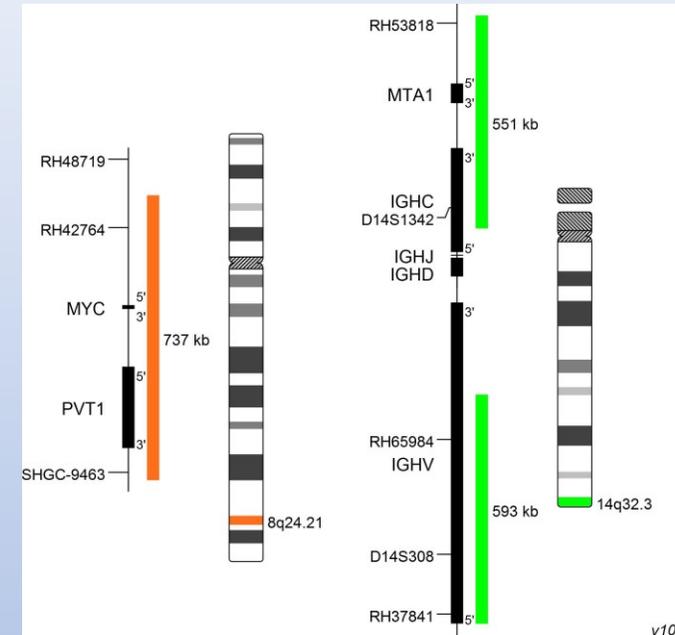
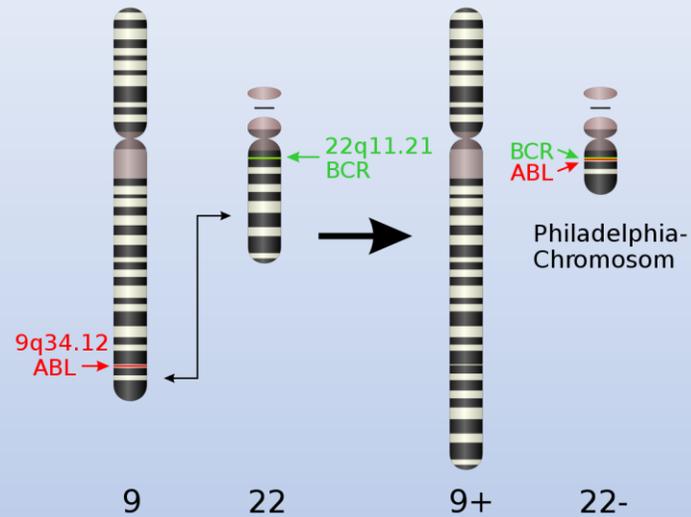
DALLA CITOGENETICA ALLA CITOGENOMICA

- Dal momento che il genoma umano è stato completamente sequenziato, i geni lungo i 46 cromosomi, che sono convenzionalmente conosciuti per il loro aspetto nel transitorio stadio di metafase durante la mitosi, sono adesso completamente mappati.
- La tecnica di colorazione FISH ha rivelato che, durante l'interfase, loro mantengono la loro individualità come territori cromosomici. La posizione dei geni in questi territori sembra essere importante per la loro espressione.
- L'organizzazione strutturale dei cromosomi nel nucleo è diventato un importante oggetto di studio.
- L'emergere della citogenetica molecolare ha espanso il campo della citogenetica trasformandola in citogenomica.



RAPPORTO TRA CITOGENETICA E CANCRO

L'ipotesi che il cancro potesse essere una malattia cromosomica del genoma delle cellule, è stato largamente dimostrato grazie alla citogenetica e alla genomica delle malattie maligne.



Le anomalie cromosomiche potrebbero essere spesso qualificate come “marker” di malignità dato che sono presenti esclusivamente nelle cellule maligne.

La citogenetica riesce così a:

1. Capire le cause genetiche alla base di un cancro
2. Studiarne lo sviluppo
3. Individuare una possibile cura

ALTERAZIONI CROMOSOMICHE ALLA BASE DEL CANCRO

Il genoma è lontano dall'essere stabile.

Errori durante la replicazione e la segregazione sono le regole e non l'eccezione.

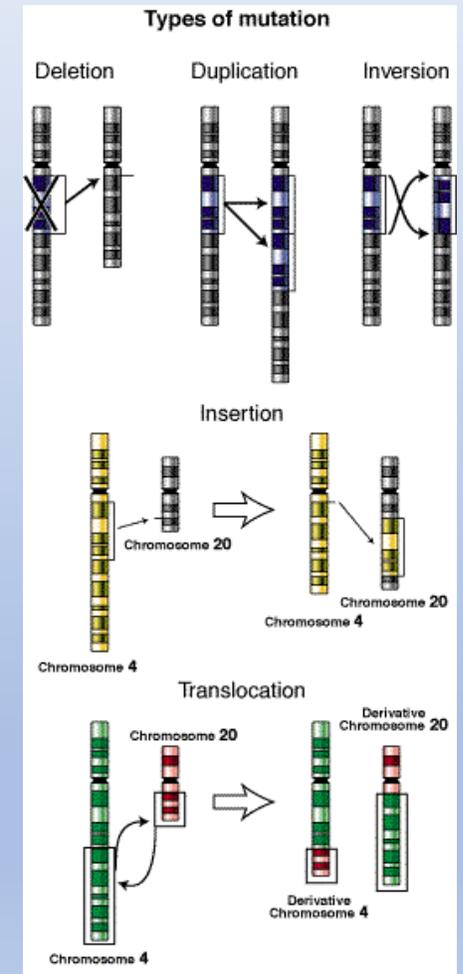
4 tipi di anomalie cromosomiche:

Traslocazioni bilanciate → gene ibrido con acquisizione di funzione (swingers);
proteine con potenzialità oncogeniche

Mal regolazione di un gene → effetto di posizione

Acquisizione di materiale genetico → anelli extracromosomici;
HSR (regioni a colorazione omogenea)

Perdita di informazione genetica → delezioni, traslocazioni, unidisomie parentali
acquisite che coinvolgono geni soppressori di
tumore o guardiani



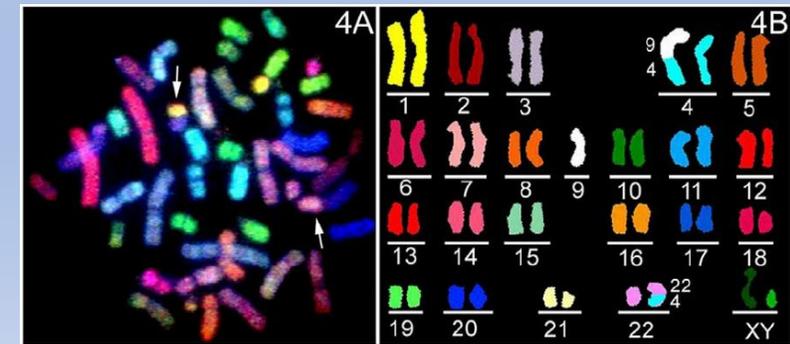
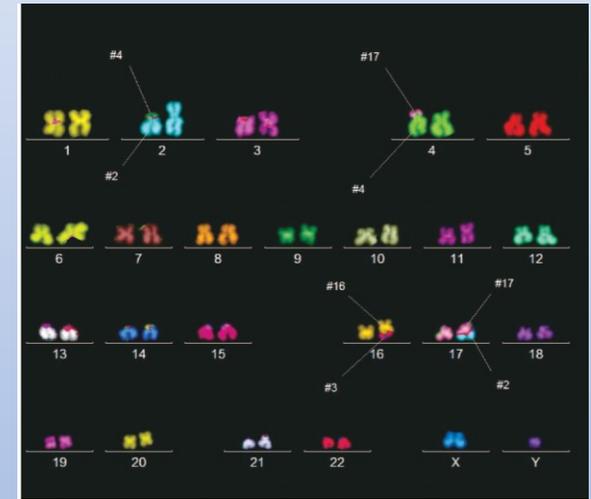
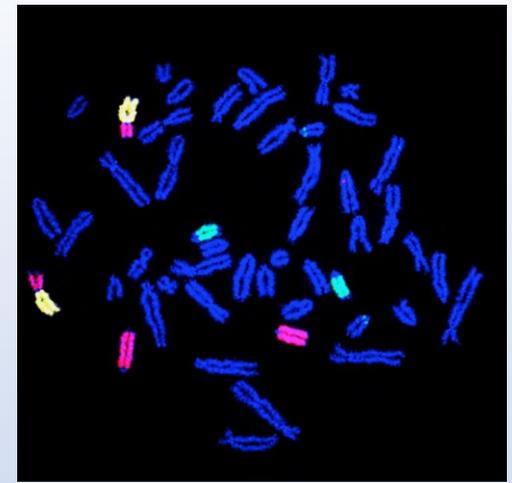
TECNICHE CITOGENETICHE

✓ **FISH:** La FISH è un'affermata tecnica di citogenetica molecolare usata in patologia diagnostica. Può rapidamente diagnosticare l'amplificazione di un gene, riarrangiamenti, microdelezioni e duplicazioni cromosomiche. La metodologia della FISH include l'ibridazione di DNA sonda marcato su entrambi i filamenti direttamente con un fluorocromo (rodamina o fluoro-5-tiocianato) o indirettamente usando apteni (biotina o digossigenina).

✓ **MULTIPLEX-FISH:** La tecnica dell'M-FISH, come suggerisce il nome stesso, usa una serie di cinque differenti coloranti o fluorocromi per l'analisi diretta dell'intero cromosoma in un esperimento di FISH. I cromosomi sono marcati in modo differente in un approccio combinatorio. Immagini separate sono poi catturate per ognuno dei cinque fluorocromi usando uno stretto filtro microscopico a banda passante e uno pseudo colore è assegnato ad ogni combinazione unica di colori per visualizzare l'intera coppia di cromosomi in 24 colori diversi.

✓ **SPECTRAL KARYOTYPING:** La SKY usa cinque fluorocromi con lo stesso approccio di marcatura combinatoria come nell'M-FISH. Ad ogni modo, la cattura delle immagini nella SKY è fatta grazie ad una classificazione di segni spettrali usando una combinazione di epifluorescenze microscopiche.

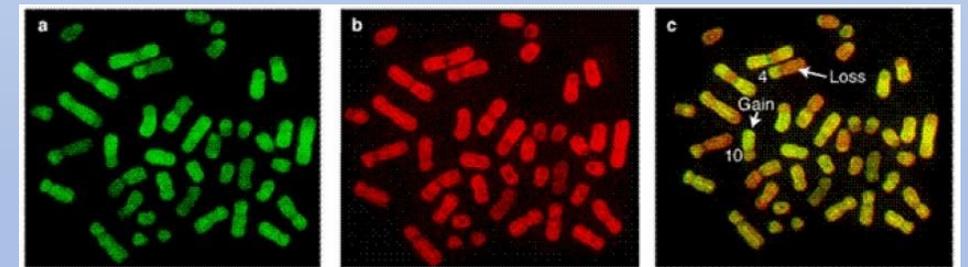
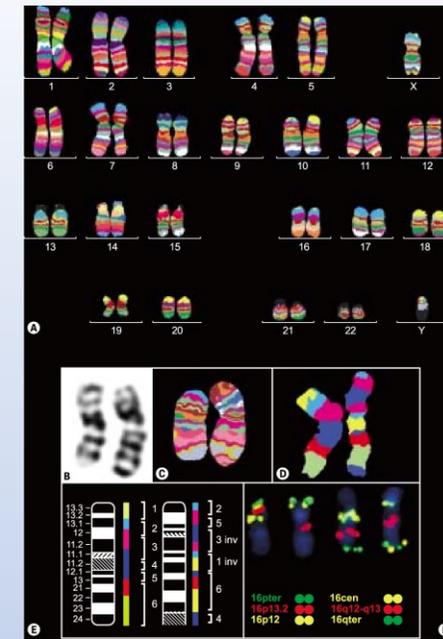
Entrambe le tecniche M-FISH e SKY aiutano ad identificare riarrangiamenti cromosomici, traslocazioni particolari, inserzioni e marker cromosomici.



- ✓ **HIGH RESOLUTION MULTIOLOR-BANDING:** La tecnica mBAND aiuta ad analizzare inversioni cromosomiche peri e paracentriche. Librerie microdissezionate, sovrapposte, sono marcate in modi differenti usando cinque fluorocromi e, uno pseudo bandeggio G multicolore dei cromosomi metafasici con un'alta risoluzione è generato dal cambiamento dei rapporti delle intensità dei fluorocromi lungo il cromosoma.

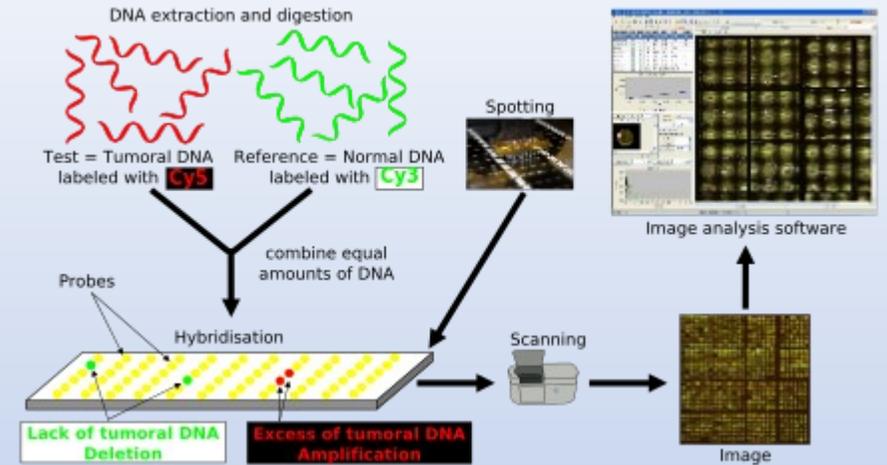
- ✓ **COMBINED BINARY RATIO LABELING:** COBRA FISH è una tecnica usata per distinguere un numero di target simultaneamente. Riesce infatti a discriminare almeno 48 target a differenza dell'M-FISH che può differenziare solo 24 colori.

- ✓ **COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION:** CGH è una tecnica di screening di un genoma esteso che usa DNA genomico per studiare la variazione del numero di copie nelle cellule tumorali. La quantità equimolare di tumori e un normale riferimento di DNA, marcati differenziatamente, sono ibridizzati con cromosomi metafasici umani e la differenza nell'intensità delle radiazioni fluorescenti nei tumori comparati col normale DNA indica lo squilibrio dei cromosomi sia per delezione che amplificazione del DNA tumorale.



RECENTI PROGRESSI DI METODI GENOMICI

- ✓ **ARRAY-CGH:** Nell'array-CGH, i cromosomi metafasici usati nel metodo CGH sono sostituiti da microarray ad alta densità umani saldati con cloni di cromosomi artificiali batterici (BAC). Gli array CGH hanno bisogno di co-ibridazione del test e del riferimento del DNA.



- ✓ **NEXT GENERATION SEQUENCING:** I principi di base del metodo NGS implicano un processo di frammentazione di DNA, ligazione con adattatori e immobilizzazione dei frammenti tramite gli adattatori per creare librerie. Le librerie poi sono soggette ad un processo di amplificazione, generante copie multiple di ogni frammento di DNA che sono poi sequenziate in parallelo con metodi basati sulla fluorescenza o chemiluminescenza, che produce miliardi di corti frammenti di sequenza. Questi frammenti sono poi allineati al genoma umano di riferimento e algoritmi di alta efficienza sono impiegati per attuare la mappa di questi genomi complessi.



CLASSIFICAZIONE DEI VARI TIPI DI CANCRO

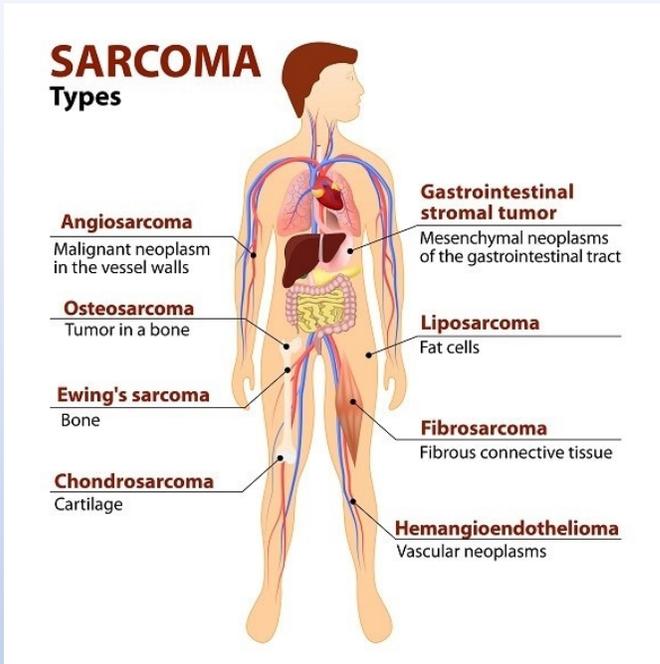
❖ **TUMORI MALIGNI EMATOLOGICI:** I tumori maligni ematologici sono cancri che colpiscono il sistema immunitario come sangue (leucemia), midollo osseo e linfonodi (linfoma).

-LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA (CML) è causata da una traslocazione bilanciata t(9;22) che porta alla fusione dei geni BCR-ABL, scoperta grazie alla doppia fusione del segnale FISH;

-LINFOMI FOLLICOLARI E DELLE CELLULE B sono caratterizzati dalla traslocazione t(14;18) (q32;q21), scoperta grazie alla FISH;

-LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA mostra ricorrenti traslocazioni t(5;11) (q35;p15.5) scoperte grazie all'M-FISH ed altri casi di AML mostrano una complessa variante, quale la t(3;5;8;21) indicata come un fattore prognostico non favorevole dalle tecniche di FISH, M-FISH ed mBAND;

- LEUCEMIA LINFOCITICA CRONICA presenta una mutazione somatica molto ricorrente nel gene SF3B1 (2q) ed è associata con progressioni di malattie più veloci mentre è meno deleteria in pazienti con sindrome mielodisplastica.



❖ Costituiscono l'1% dei tumori solidi con sovrapposizione morfologica di differenti tipi istogenetici.

-approccio classico → cariotipo per individuare traslocazioni nei sarcomi del tessuto liscio.

-M-FISH o COBRA → t(X;18) nel sarcoma sinoviale del cuore e della laringe.

-SKY → t(2;22) (q34;q12) con fusione di EWSR1-CREB1.

○ Terapie definite non ci sono ancora, ma sono stati trovati nuovi target terapeutici come TP53, NF1 e PIK3CA per mutazioni genetiche nei sette sottotipi principali di sarcoma.

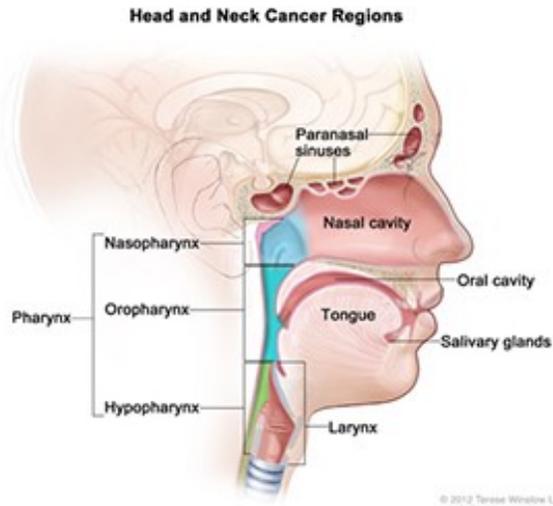
❖ **GLIOMI:** Tumori più frequenti delle cellule del sistema nervoso.

- Tipo di cellula (ependimoma, astrocitoma, oligodendroglioma e gliomi misti come l'oligoastrocitoma)
- Grado (alto o basso)
- Localizzazione (sopratentoriale o sottotentoriale)

Primo evento: mutazione di IDH1/2

- t(1;19), scoperta grazie alla FISH, è caratteristica degli oligodendrogliomi .
- il glioblastoma multiforme (GBM) primario, che nasce de novo nei pazienti più anziani, mostra frequenti amplificazioni EGFR, perdita 10q e mutazioni nel gene PTEN, ma raramente ha mutazioni IDH. D'altro lato, il GBM secondario il quale nasce nei pazienti più giovani, manca dell'amplificazione EGFR ma mostra mutazioni nei geni TP53 e IDH.

❖ CANCRO DELLA TESTA E DEL COLLO



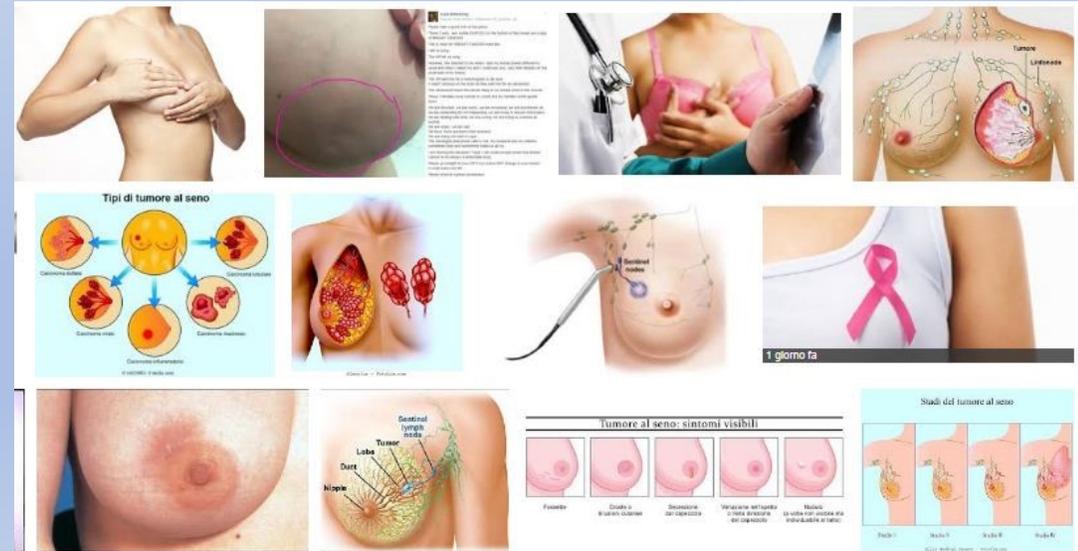
- Il cancro alla bocca o orale è più predominante in persone con dipendenza dal tabacco e alcool a causa della trasformazione maligna di un tratto della membrana mucosa chiamata leucoplachia orale.
- I tumori laringei mostrano incrementi significativi a livello di -4p, +8q, +12q e -18q comparati a tumori ipofaringei e faringei grazie all'analisi CGH che indica differenze nei siti genetici in questi tumori.

- Il carcinoma delle cellule squamose (HNSCC) ha come marker prognostico TP53
 - ↳ basale
 - ↳ mesenchimale
 - ↳ atipico
 - ↳ classico

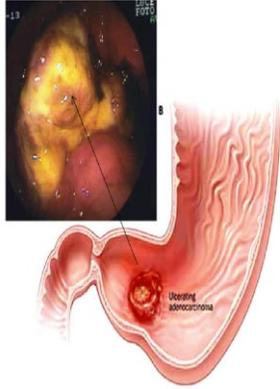
❖ CANCRO AL SENO

- Grazie alla FISH si è scoperta l'amplificazione di HER2(17q) nei primi stadi di cancro al seno metastatico.
- Cura con trastuzumab accoppiato a chemioterapia. I resistenti al farmaco hanno mutazioni di PIK3CA e perdita a livello di PTEN(10).
- Grazie all'NGS si sono scoperti riarrangiamenti genici della famiglia Notch e MAST.

- Il decorso della malattia dipende dal tipo di mutazioni, dagli anni del paziente alla diagnosi e dallo stadio del cancro.



TUMORE GASTRICO

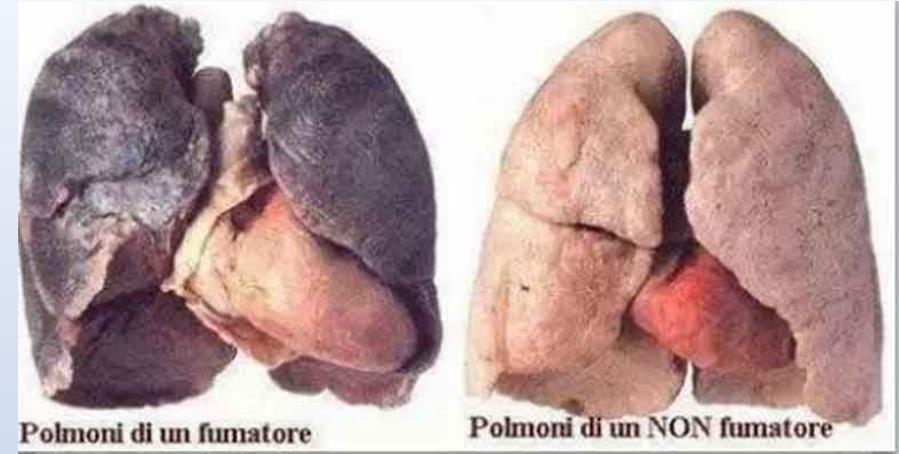


❖ 2 sottotipi dal punto di vista istologico:

- diffuso
- intestinale

- I pazienti GC che hanno un'amplificazione di HER2 sono trattati con trastuzumab e chemioterapia.
- GC è anche conosciuto per possedere le amplificazioni dei geni FGFR2 e KRAS identificate tramite array CGH e FISH
- Tracciando un profilo di espressione grazie ai microarray nei GC sono stati mostrati tre sottotipi molecolari:
 - Tumorigenico
 - Reattivo
 - Similgastrico (associato alla miglior sopravvivenza)

❖ TUMORE AI POLMONI



❑ Cellule non piccole (NSLC) (80%)

- Non fumatori e asiatici: mutazioni di EGFR. Trattati con anti-EGFR (gfitinib)
- Fumatori: fusione tra EML4 e ALK; perdita di copie di TP53, DR4, DR5; guadagno a livello di CDK4 e KRAS; mutazioni in BRAF, AKT1, ERBB2, PIK3CA e fusioni.

❑ Cellule piccole (SCLC) (20%)

- Alterazioni di 3p; amplificazioni di MYC, EGFR e SOX2 (target da confermare per il loro valore terapeutico)

❖ CANCRO COLON-RETTALE

cura con il Cetuximab

PAZIENTI CHE
RISPONDONO AL
FARMACO
EGFR mutato e KRAS
wild-type

PAZIENTI CHE NON
RISPONDONO AL FARMACO
EGFR wild-type e KRAS
mutato

❖ CANCRO OVARICO

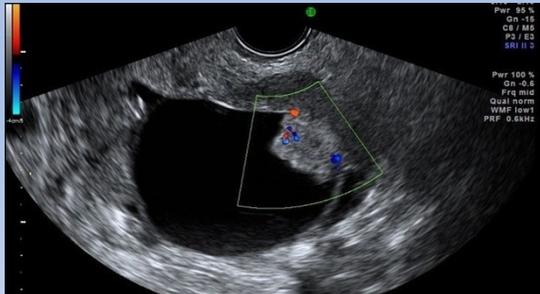
Più dell'80% nasce dall'epitelio superficiale.

Diviso in tre sottotipi istologici:

- cistoadenoma benigno
- tumore di confine
- adenocarcinoma

I pazienti presentano sintomi complessi e a volte mal diagnosticati. Quello di confine è il più difficile da diagnosticare perché è difficile comprendere se si tratta di un tumore individuale o parte di uno in progressione che culmina nel carcinoma ovarico.

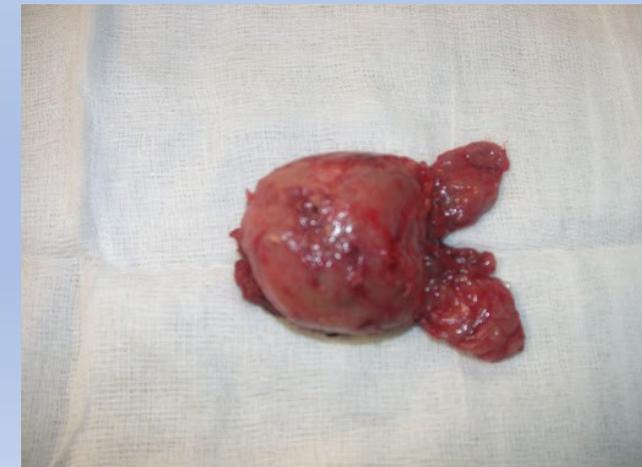
Ulteriori indagini per capire le mutazioni che sono alla base.



❖ CANCRO PROSTATICO

Diagnosticato grazie all'elevato livello nel siero dell'antigene della prostata (PSA).

Alterazioni nel numero di copie di MYC (grazie alla FISH); fusione di TMPRSS2-ERG (grazie a microarray) associato ad un sottotipo androgeno indipendente e letale, questo distingue il PCa dal cancro alla vescica.



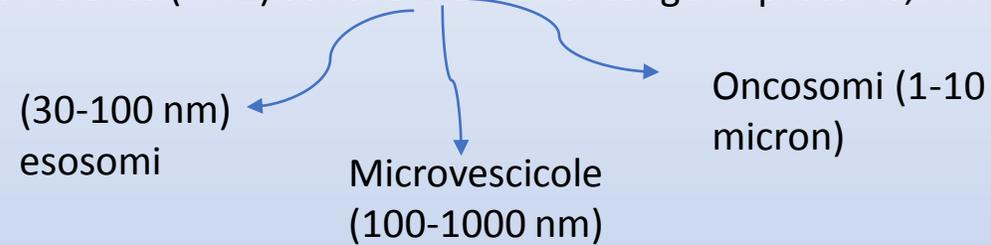
RECENTI STUDI SU microRNA COINVOLTI NELLA PROGRESSIONE O INIBIZIONE DEL CANCRO

Ruolo emergente dei microRNA

Piccoli RNA non codificanti (19-24 pb) che controllano specifici mRNA.

Possono inibire o amplificare geni soppressori di tumore o oncogeni, regolando la traduzione dell'mRNA o fungendo da ligando per miRecettori. Influenzano proteine coinvolte nella via di trasduzione del segnale per lo sviluppo del cancro.

Coinvolte nella comunicazione cellulare col microambiente (TME) sono le EV che contengono proteine, mRNA, DNA, **miRNA**.



Regolazione dell'espressione dei miRNA

Vari meccanismi.

ES.

l'amplificazione di **miR-30d** promuove il carcinoma cervicale;

miR-33b è soppressore del tumore e l'ipermetilazione a monte di esso causa la sua inibizione nel cancro gastrico.

miRNA come oncogeni o geni soppressori di tumore

miR155 è sovra regolato in molti cancri e soprattutto in quelli più aggressivi e resistenti alle terapie ed è correlato ad una scarsa presenza di TP53. (tumore ai polmoni, CLL, ALL);

Nel cancro al seno triplo-negativo, PDGFRbeta, un fattore tirosinchinasico, induce l'espressione di **miR-9** che, sovraregolato, ha come substrato una proteina STARD13 coinvolta nella regolazione della riorganizzazione citoscheletrica, proliferazione e motilità cellulare;

Nel cancro alla prostata **miR-15** e **miR-16** sono inibiti mentre **miR-21** è sovraregolato;

In diversi tumori **let7b** e **let7c** legano e inibiscono gli mRNA codificanti per USP42 e USP44, due componenti degli enzimi multipli deubiquitinanti di H2B che non può agire positivamente sulla cromatina.

Vescicole di miRNA nel cancro

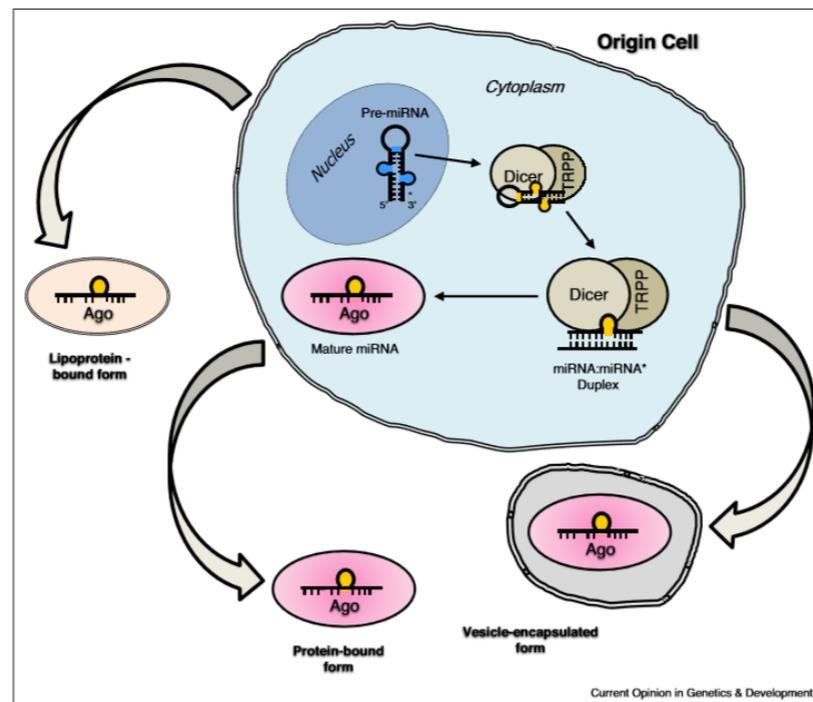
miRNA e altro materiale genetico possono essere trasferiti da una cellula ad un'altra tramite EV.

I miRNA regolano geni classici legando il 3'UTR degli mRNA target oppure i miRecettori.

miR-223 è stato spostato dai macrofagi alle cellule del cancro al seno, attraverso esosomi, dove ha come target Mef2c e ne aumenta l'invasività.

Nella linea cellulare del carcinoma mammario murino 4T1, ECGC attua il suo effetto antitumorale grazie la sovraregolazione di miR-16 nelle cellule tumorali che è successivamente trasferito ai macrofagi associati al tumore (TAM) via esosomi.

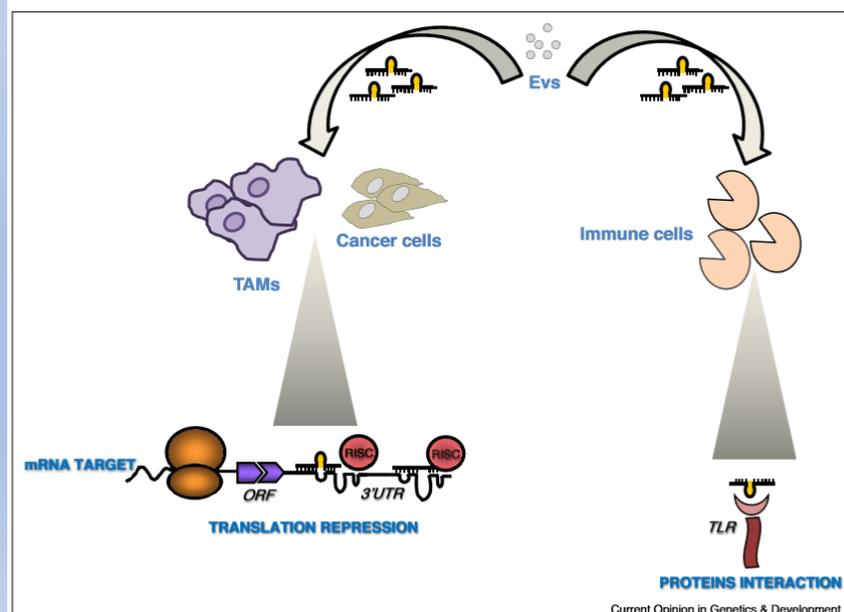
La cellula può processare premiRNA e gli esosomi delle cellule tumorali mammarie potrebbero trasportare premiRNA legati a Proteine Dicer, TRBP e AGO2



miRNA extravescicolari nel cancro
miRNA circolano liberamente nel sangue, com'è possibile se ci sono Rnasi?

Si è scoperto che la più grande frazione di miRNA è localizzata fuori dalle EV con complessi proteici che le proteggono. Sono stati trovati in associazione con lipoproteine (LDL, HDL).

Studi da continuare.



Conclusioni

- Le anomalie cromosomiche sono ritenute causali del cancro e quindi la loro identificazione è fondamentale per evitare la genesi tumorale. La comprensione della base di queste tecniche e la loro applicazione è critica nella diagnosi accurata del cancro. Le analisi citogenetiche tradizionali e i metodi basati sulla FISH hanno senza dubbio giocato un ruolo centrale nella diagnosi di molti tumori tuttavia necessitano di lavoro intenso e di molto tempo. Inoltre, il focus che inizialmente era puntato solo in diagnostica, è stato spostato alla prognosi con l'uso di microarray e tecnologie NGS che ha fornito nuovi target terapeutici che migliorano il potere della classificazione del cancro e che consentono anche prime diagnosi e trattamenti più appropriati per i pazienti aprendo la strada verso medicine personalizzate.
- Infatti la designazione di obiettivi per nuovi farmaci sta creando un nuovo paradigma per la terapia del cancro. L'industria farmaceutica ha messo alla prova tutte le sue abilità nella chimica, lasciando speranza per una numerosa progenie di farmaci altamente specifici.
- Una delle più grandi sfide odierne è una miglior comprensione dei meccanismi selettivi di secrezione e distribuzione dei miRNA extracellulari nei confronti delle cellule del TME. Inoltre, la specificità della comprensione (se esiste) migliorerà il nostro lavoro nell'utilizzo dei miRNA come terapeutici singoli o, più probabilmente, in combinazione con terapie anti-cancro esistenti. Infine, uno studio più ampio del pattern di miRecettori e la loro distribuzione topografica all'interno delle cellule del TME espanderà la nostra comprensione in questa nuova affascinante branca della biologia del cancro ed estenderà le nostre armi contro di esso con l'obiettivo di aumentare il numero di vite salvate di pazienti a cui è stato diagnosticato il tumore.

Negli ultimi anni la citogenetica ha fatto passi da gigante grazie all'estensione dello studio dei cromosomi non solo durante la metafase, ma anche in interfase e questo ha permesso di dar vita alla citogenomica.

Applicando questi studi alle cellule tumorali si è arrivato a capire che le varie alterazioni geniche e cromosomiche, spesso frequenti nei genomi, sono utilizzabili come marker citologici di malignità in quanto specifiche per ogni tumore.

Così le differenti tecniche citogenetiche quali FISH, M-FISH, SKY, COBRA FISH, mBAND, CGH, arrayCGH e NGS, hanno consentito non solo la scoperta di alcune cause genetiche che sono alla base dei vari tipi di cancro, ma anche lo studio della progressione della malattia e una sua possibile cura addirittura in modo paziente-specifico.

Lo studio dei tumori e delle loro cause continua ancora oggi e tra le ultimissime ricerche di questi anni, possiamo riscontrare lo studio di particolari micro RNA endo ed extra vescicolari che possono adiuvarlo allo sviluppo o all'inibizione della formazione di cellule cancerogene andando a regolare oncogeni o geni soppressori di tumori.

