

DANNO AL DNA, INSTABILITÀ GENOMICA E CANCEROGENESI

Margherita Bignami, Filomena Mazzei, Ettore Meccia, Pietro Pichierri, Maria Teresa Russo
Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

In quasi tutte le tipologie di cancro studiate fino ad oggi, la trasformazione di una cellula sana in una tumorale è associata ad una profonda instabilità genomica con accumulo di mutazioni geniche e/o cromosomiche che colpiscono diversi oncogeni e soppressori tumorali nella stessa cellula (1). Poiché la probabilità per ogni gene di subire mutazioni è molto bassa, non è sorprendente che disfunzioni nei sistemi che controllano la fedeltà della replicazione del DNA, la segnalazione della presenza di danno al DNA e la riparazione del danno stesso, siano associate a malattie caratterizzate da un aumentato rischio di insorgenza di neoplasie. È bene inoltre ricordare che agenti di tipo fisico, chimico o biologico in grado di danneggiare le molecole di DNA sono presenti in maniera ubiquitaria nell'ambiente che ci circonda. Infine una quota non minoritaria del danno sul DNA deriva da fonti di danno endogeno (2), quale le specie reattive dell'ossigeno presenti nel *milieu* cellulare come prodotto del normale metabolismo aerobico della cellula.

Per difendersi da questi possibili attacchi alla stabilità del genoma nella cellula si sono evoluti una serie di sistemi di riparazione del danno al DNA, con un alto livello di conservazione delle proteine dai batteri all'uomo. Esempi di *pathways* di riparazione del danno al DNA coinvolti nella eziopatogenesi di tumori umani sono il *mismatch repair* (MMR) e il *base excision repair* (BER)(1). Nel primo caso si tratta di un sistema che controlla la fedeltà della replicazione del DNA attraverso l'eliminazione dei *mismatches* del DNA causati da errori delle polimerasi replicative, mentre il BER rimuove dal genoma sia delle basi ossidate che i *mismatches* ad esse associate. Mutazioni germinali nei geni del *mismatch repair* sono associate all'insorgenza di un cancro colo-rettale di tipo non poliposico (*Hereditary nonpolyposis colorectal cancer*, HNPCC), mentre soggetti portatori di mutazione bi-allelica nel gene del BER *MUTYH* sono a rischio aumentato di poliposi adenomatosa e cancro colo-rettale. Sebbene le malattie ereditarie con difetti in questi *pathways* siano rare nella popolazione umana, alterazioni in questi geni sono spesso presenti nei cancri sporadici. L'analisi di questi *pathways* rappresenta quindi un buon modello di studio dei meccanismi che sottendono il processo di trasformazione neoplastica.

In aggiunta ai processi sopra descritti, un'altra fonte d'instabilità genomica nei tumori può derivare dall'instaurazione di una condizione cronica di stress replicativo mediata dall'attivazione di oncogeni. In questi casi la perdita di regolazione del processo di replicazione si associa all'induzione di danno al DNA con conseguenti mutazioni e/o riarrangiamenti cromosomici secondari allo stress stesso.

I principali meccanismi molecolari in grado di limitare questa instabilità genomica sono quelli che controllano la stabilità del macchinario di replicazione e la risposta al danno in fase S del ciclo cellulare: i cosiddetti *replication* e *intra-S-phase checkpoint*. Questi *pathways*, intercorrelati tra loro e con i meccanismi di recupero della replicazione, sono spesso deregolati in sindromi di predisposizione al cancro e fragilità cromosomica come la sindrome di Werner (3, 4).

Stato di sviluppo

Per decenni lo stress ossidativo cronico è stato considerato un fattore importante di rischio nel processo di tumorigenesi, sebbene non siano ancora chiarite le connessioni causali tra questi due eventi. In accordo con un importante ruolo della riparazione del danno ossidativo al DNA nella cancerogenesi, topi *knock-out* per i sistemi di rimozione di una delle principali base ossidate, la 8-ossiguanina (8-oxoG), mostrano un fenotipo mutatore e un'umentata suscettibilità all'insorgenza di tumori (5). Tuttavia l'entità di questi fenotipi varia molto in funzione del gene coinvolto. Le singole inattivazioni dei geni del BER Ogg1 o Mutyh sono associate ad aumenti modesti nei livelli di ossidazione del DNA, rilevati solo in età avanzata, e limitatamente ad alcuni tessuti (6). Il modesto fenotipo mutatore di questi topi si riflette inoltre in un'umentata suscettibilità a tumori del tratto gastrointestinale osservabile nella seconda metà della vita dell'animale. Il ruolo protettivo di questi geni nei confronti del processo neoplastico associato a stress ossidativo appare tuttavia molto più ovvio quando ambedue le funzioni geniche di MUTYH e OGG1 sono inattive, con un considerevole aumento nei livelli spontanei di danno al DNA e nella frequenza di tumori del tratto gastrointestinale, del polmone e dell'ovaio (7). L'umentato rischio di cancerogenesi colo-rettale potrebbe anche essere collegato con la deregolata risposta infiammatoria dei topi MUTYH-difettivi in un modello di colite cronica (8).

Contrariamente a difetti nei geni del BER il fenotipo associato all'inattivazione dei geni del MMR (hMSH2, hMLH1, hPMS2, hMSH6) è molto più pronunciato, con una comparsa dei tumori in uno stadio precoce della vita dell'animale. Questo fenotipo estremo, probabilmente dipendente dal massiccio fenotipo mutatore associato a difetti nel MMR, è la conseguenza di un doppio effetto, la mancata riparazione degli errori commessi dalle polimerasi replicative, e l'accumulo di lesioni premutagene conseguenti alla mancata rimozione di basi ossidate del DNA (9-12).

In ambedue le sindromi umane con difetti nel MMR e nel BER il target principale del processo di tumorigenesi è rappresentato dal colon. Tuttavia nel caso del gene *MUTYH* si tratta di una forma di cancro colo-rettale conseguente a mutazioni germinali bialleliche. Affinché queste abbiano un ruolo patogenetico nello sviluppo dell'adenomatosi colo-rettale è necessaria tuttavia una completa perdita di funzione della proteina. Dal momento che la maggior parte delle mutazioni identificate nei pazienti sono di tipo missenso, e quindi con incerto significato biologico, la diagnosi molecolare non è sufficientemente informativa a fornire una consulenza genetica adeguata in famiglie con varianti di incerta patogenesi.

Il progetto del Network Nazionale Italiano sui Tumori eredo-familiari (inTEF), finanziato da Alleanza Contro il Cancro si è posto come obiettivo quello di creare una rete italiana di centri che si occupano di tumori eredo-familiari, principalmente HNPCC e *MYH Associated Polyposis* - MAP ma anche tumori mammari, allo scopo di favorire sia l'integrazione delle attività di ricerca e cliniche dei centri che in Italia si occupano di questo tipo di tumori, che la loro partecipazione a consorzi collaborativi internazionali. Il nostro Reparto, nell'ambito della rete inTEF, ha intrapreso uno studio dei meccanismi alla base dei processi di tumorigenesi nel cancro colo-rettale di pazienti affetti da MAP e in modo particolare sul ruolo che il danno ossidativo svolge nella eziopatogenesi di questo tumore (Figura 1).

In questo scenario è stato allestito un saggio funzionale che permettesse di identificare le conseguenze fenotipiche di mutazioni nel gene *MUTYH* identificate in pazienti italiani affetti da MAP. Questo saggio funzionale si basa sull'utilizzo di una linea cellulare derivata da un topo *knock-out* per *Mutyh* in cui è stato trasfettato un vettore contenente il cDNA del gene *MUTYH* umano sia in forma *wild-type* (WT) che in forma mutata (13). Un aumentato livello di danno ossidativo basale, un'inefficiente attività riparativa e una ipersensibilità agli effetti tossici di un agente ossidante, sono stati identificati come dei buoni parametri funzionali sempre associati *in vivo* con l'espressione di varianti patogenetiche del gene *MUTYH*.

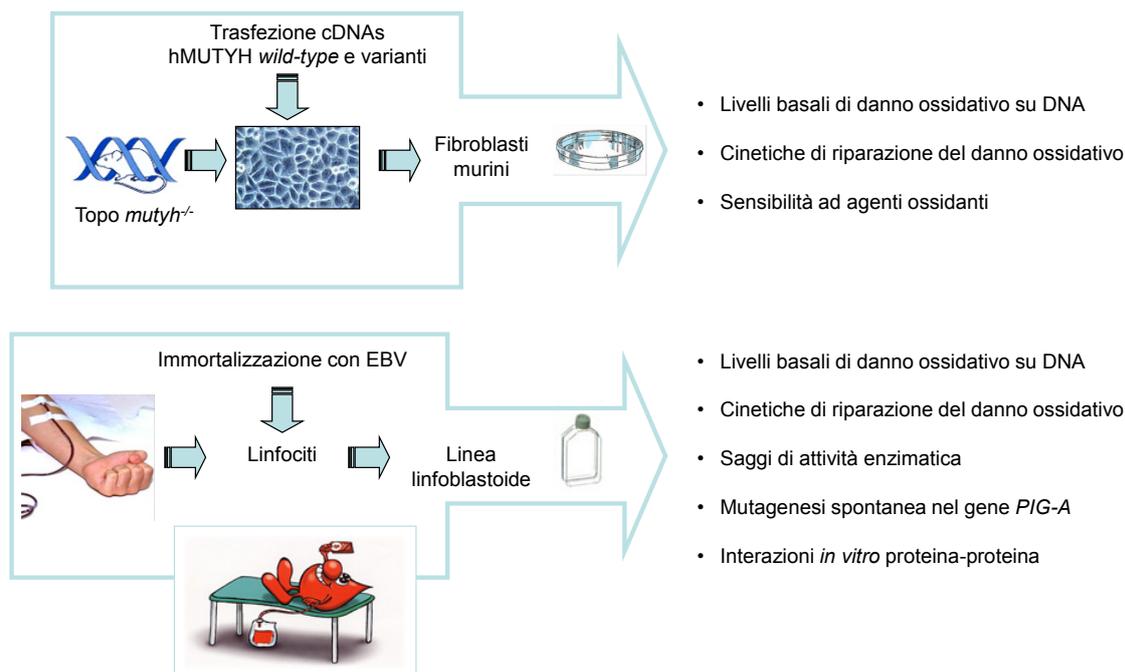


Figura 1. Strategie di studio per analizzare il significato funzionale di varianti patogenetiche del gene MUTYH

In parallelo, uno studio *in vitro* basato sull'uso di proteine MUTYH purificate, sia *wild-type* che mutanti, ha permesso un'accurata caratterizzazione dell'attività funzionale (14). Mentre l'attività DNA-glicosilasica è stata stimata misurando la quantità di prodotto formato con elettroforesi su gel denaturanti, utilizzando la tecnica della Risonanza Plasmonica di Superficie (*Surface Plasmon Resonance*, SPR), adatta allo studio delle interazioni DNA-proteina, è stato possibile dimostrare che in tutte le varianti di MUTYH analizzate la riduzione della capacità glicosilasica era associata ad una diminuzione dell'affinità di legame della proteina con il substrato. Questi saggi funzionali *in vitro* e *in vivo* hanno permesso di individuare le conseguenze biologiche di varianti della proteina MUTYH umana e di costruire delle correlazioni genotipo-fenotipo.

A fronte della necessità di maggiori informazioni circa la funzionalità delle varianti identificate nel gene *MUTYH*, è stata sicuramente importante, e lo sarà ancora di più nel futuro, la collaborazione tra centri e laboratori nazionali impegnati nello studio delle varianti di questo gene. È da sottolineare il ruolo fondamentale che ha avuto a tal fine la rete inTEF nel favorire questa collaborazione, attraverso incontri periodici e le possibilità di coordinamento e condivisione offerte dal sito web (www.iss.it/itef). Un risultato concreto è stato anche la condivisione delle informazioni sulle varianti italiane di MUTYH a disposizione di diversi gruppi in un database comune ospitato dal server dell'ISS.

Conclusioni e prospettive future

Le competenze del gruppo hanno portato alla costruzione di un modello sperimentale in grado di analizzare a livello funzionale le varianti di *MUTYH* identificate in pazienti italiani

affetti da MAP. La conoscenza del significato funzionale delle mutazioni saranno utilizzate per il miglioramento della diagnosi molecolare e la consulenza genetica in famiglie con mutazioni con patogenicità incerta. Si tratta di un esempio di come la ricerca di base possa poi essere utilizzata dai clinici e dai genetisti al fine di migliorare la consulenza genetica.

Conseguenza diretta di questo lavoro è stata la partecipazione alla creazione del network inTEF e del sito web ad esso collegato, allo scopo di fornire informazioni scientifiche attendibili e validate in un contesto nazionale utile al fine di ampliare le conoscenze sulla patogenicità delle mutazioni identificate e di creare una base più avanzata per progredire ulteriormente in questo processo.

Il passaggio successivo è e sarà quello di studiare le relazioni genotipo-fenotipo utilizzando linee linfoblastoidi derivate dai pazienti con MAP. Questo approccio ha il vantaggio rispetto al modello cellulare descritto precedentemente, di poter analizzare la funzione biologica anche di eterozigoti composti e di chiarire l'associazione genotipo-fenotipo nei singoli pazienti. La determinazione in queste cellule della frequenza di mutazione nel gene *PIG-A* (15) ci permetterà inoltre di conoscere il fenotipo mutatore associato ad ogni mutazione o a combinazioni di mutazioni. Uno studio più meccanicistico sull'attività e funzionalità delle diverse varianti prevede l'utilizzo di oligonucleotidi sintetici a forma di *hairpin* (*beacons*), aventi una molecola fluorescente e un *quencher* ai terminali opposti del filamento e contenente un *mismatch* 8-oxoG:A. L'attività specifica delle proteine della riparazione (MUTYH), dopo l'introduzione e poi il processamento del *beacon* nelle cellule dei pazienti, è correlata all'emissione di fluorescenza, che può essere seguita mediante microscopia per fluorescenza e citofluorimetria a flusso ottenendo un risultato sia quantitativo, rispetto alla funzionalità della proteina, che qualitativo (localizzazione della proteina variante).

Un altro aspetto che stiamo recentemente affrontando e che verrà sviluppato negli anni a venire è collegato all'uso di approcci di genomica funzionale per una identificazione di relazioni di *synthetic lethality* tra geni della riparazione del DNA e della *DNA damage response*, in particolare quelli collegati alla fase di replicazione del DNA, e il loro possibile utilizzo per nuovi approcci terapeutici nella cura dei tumori. Come mostrato nella Figura 2, nelle cellule normali i danni al DNA e/o blocchi della replicazione ("A" o "B") possono attivare *pathway* specifici di risposta al danno che possono compensarsi tra loro. Questa ridondanza funzionale permette di terminare la duplicazione del genoma in maniera accurata. Nelle cellule tumorali alcuni meccanismi di salvaguardia della replicazione possono essere alterati rendendo le cellule dipendenti per la sopravvivenza da *pathway backup*, che agiscono anche su "bersagli" per loro non ottimali. Dal momento che tra il *pathway* normale e quello di *backup* esiste una relazione genetica di *synthetic lethality* l'inibizione del *pathway backup* può determinare in maniera specifica la morte delle cellule tumorali.

Uno dei limiti maggiori degli attuali approcci terapeutici nella cura dei tumori è la loro aspecificità, ovvero l'impossibilità di discriminare tra cellule sane e malate con la conseguenza di significativi effetti secondari che spesso limitano l'efficacia della cura (16, 17). Lo sfruttamento dell'evidenza sperimentale che durante lo sviluppo tumorale mutazioni od eventi epigenetici determinano la perdita della funzione di *pathway* coinvolti nella risposta al danno od allo stress replicativo potrebbe risultare una via molto elegante per la *target therapy* dei tumori o per migliorare l'efficacia terapeutica delle attuali cure basate largamente su approcci che determinano l'induzione di danno citotossico nelle cellule in replicazione.

I nostri studi più recenti hanno dimostrato che la deplezione sperimentale di una delle proteine responsabili dell'integrità del genoma durante la replicazione, la proteina Werner (WRN) determina la dipendenza delle cellule da un secondo *pathway*, normalmente di *backup*. La concomitante down-regolazione dei due *pathway* risulta in un aumento della

morte cellulare dopo trattamento con agenti che bloccano la replicazione del DNA (18). Questa relazione di *synthetic lethality* appare mantenuta per altre proteine coinvolte nei *checkpoint* della fase S oppure nella stabilità dell'apparato di replicazione, e che possono essere mutate o silenziate epigeneticamente in tumori sporadici. Quindi, lo sviluppo dei nostri studi può portare a definire sia i meccanismi molecolari coinvolti nella risposta allo stress replicativo e la loro regolazione, sia, tramite l'uso di screening basati su RNAi in modelli di cellule pre-cancerose o tumorali, le diverse relazioni di *synthetic lethality* che possono esistere tra questi *pathway*.

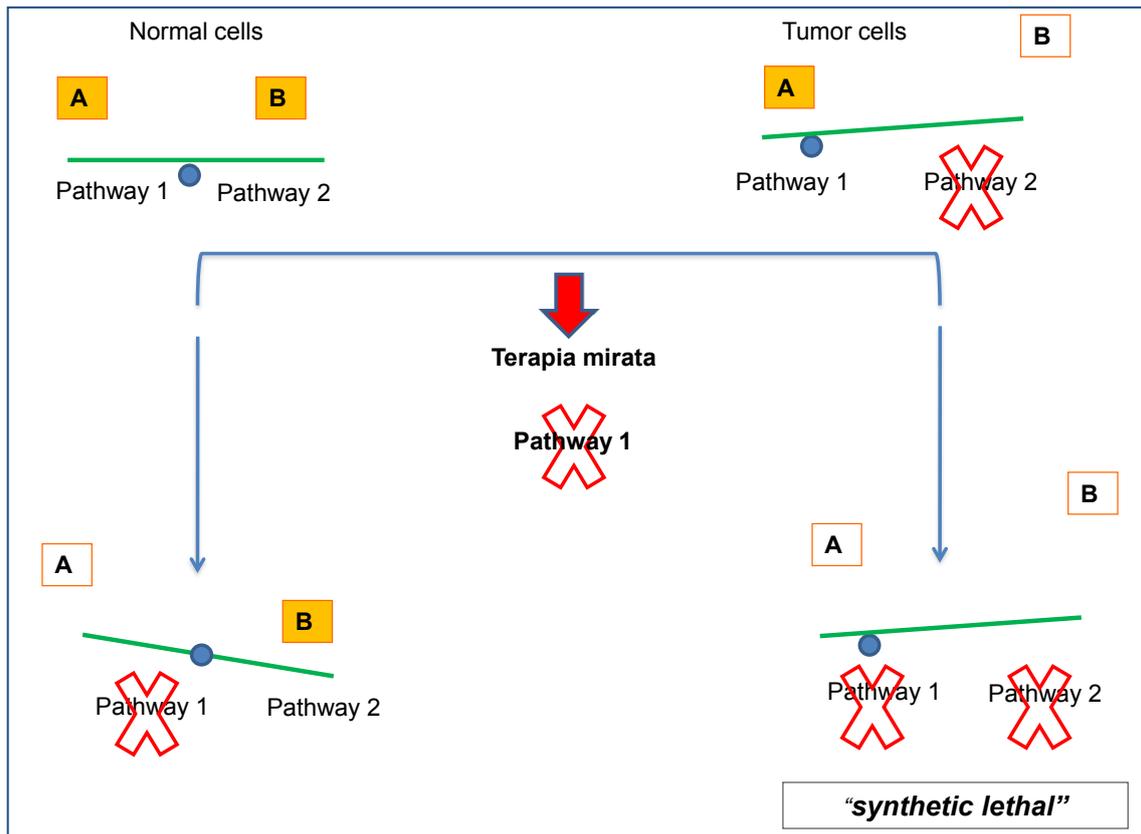


Figura 2. Terapia mirata dei tumori basata sulla *synthetic lethality*

Bibliografia

1. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11(3):220-8.
2. Chiera F, Meccia E, Degan P, Aquilina G, Pietraforte D, Minetti M, Lambeth D, Bignami M. Overexpression of human NOX1 complex induces genome instability in mammalian cells. *Free Radic Biol Med* 2008;44:332-42.
3. Ammazalorso F, Pirzio LM, Bignami M, Franchitto A, Pichierri P. ATR and ATM differently regulate WRN to prevent DSBs at stalled replication forks and promote replication fork recovery. *EMBO J* 2010;29:3156-69.

4. Pirzio LM, Pichierri P, Bignami M, Franchitto A. Werner syndrome helicase activity is essential in maintaining fragile site stability. *J Cell Biol* 2008;180:305-14.
5. Russo MT, De Luca G, Degan P, Bignami M. Different DNA repair strategies to combat the threat from 8-oxoguanine. *Mutat Res* 2007;614:69-76.
6. Russo MT, De Luca G, Degan P, Parlanti E, Dogliotti E, Barnes DE, Lindahl T, Yang H, Miller JH, Bignami M. Accumulation of the oxidative base lesion 8-hydroxyguanine in DNA of tumor-prone mice defective in both the Myh and Ogg1 DNA glycosylases. *Cancer Res* 2004;64:4411-4.
7. Xie Y, Yang H, Cunanan C, Okamoto K, Shibata D, Pan J, Barnes DE, Lindahl T, McIlhatton M, Fishel R, Miller JH. Deficiencies in mouse Myh and Ogg1 result in tumor predisposition and G to T mutations in codon 12 of the K-ras oncogene in lung tumors. *Cancer Res* 2004;64:3096-02.
8. Casorelli I, Pannellini T, De Luca G, Degan P, Chiera F, Iavarone I, Giuliani A, Butera A, Boirivant M, Musiani P, Bignami M. The Mutyh base excision repair gene influences the inflammatory response in a mouse model of ulcerative colitis. *PLoS One* 2010;5(8):e12070.
9. Russo MT, Blasi MF, Chiera F, Fortini P, Degan P, Macpherson P, Furuichi M, Nakabeppu Y, Karran P, Aquilina G, Bignami M. The oxidized deoxynucleoside triphosphate pool is a significant contributor to genetic instability in mismatch repair-deficient cells. *Mol Cell Biol* 2004;24:465-74.
10. Russo MT, De Luca G, Casorelli I, Degan P, Molatore S, Barone F, Mazzei F, Pannellini T, Musiani P, Bignami M. Role of MUTYH and MSH2 in the control of oxidative DNA damage, genetic instability, and tumorigenesis. *Cancer Res* 2009;69:4372-9.
11. Blasi MF, Ventura I, Aquilina G, Degan P, Bertario L, Bassi C, Radice P, Bignami M. A human cell-based assay to evaluate the effects of alterations in the MLH1 mismatch repair gene. *Cancer Res* 2006;66:9036-44.
12. Macpherson P, Barone F, Maga G, Mazzei F, Karran P, Bignami M. 8-oxoguanine incorporation into DNA repeats *in vitro* and mismatch recognition by MutSalpha. *Nucleic Acids Res* 2005;33:5094-105.
13. Molatore S, Russo MT, D'Agostino VG, Barone F, Matsumoto Y, Albertini AM, Minoprio A, Degan P, Mazzei F, Bignami M, Ranzani GN. MUTYH mutations associated with familial adenomatous polyposis: functional characterization by a mammalian cell-based assay. *Hum Mutat* 2010;31:159-66.
14. D'Agostino VG, Minoprio A, Torreri P, Marinoni I, Bossa C, Petrucci TC, Albertini AM, Ranzani GN, Bignami M, Mazzei F. Functional analysis of MUTYH mutated proteins associated with familial adenomatous polyposis. *DNA Repair (Amst)* 2010;9:700-7.
15. Araten DJ, Golde DW, Zhang RH, Thaler HT, Gargiulo L, Notaro R, Luzzatto L. A quantitative measurement of the human somatic mutation rate. *Cancer Res* 2005;65:8111-7.
16. Casorelli I, Tenedini E, Tagliafico E, Blasi MF, Giuliani A, Crescenzi M, Pelosi E, Testa U, Peschle C, Mele L, Diverio D, Breccia M, Lo-Coco F, Ferrari S, Bignami M. Identification of a molecular signature for leukemic promyelocytes and their normal counterparts: Focus on DNA repair genes. *Leukemia* 2006;20:1978-88.
17. Al-Ejeh F, Kumar R, Wiegmanns A, Lakhani SR, Brown MP, Khanna KK. Harnessing the complexity of DNA-damage response *pathways* to improve cancer treatment outcomes. *Oncogene* 2010;29:6085-98.
18. Franchitto A, Pirzio LM, Prosperi E, Saporita O, Bignami M, Pichierri P. Replication fork stalling in WRN-deficient cells is overcome by prompt activation of a MUS81-dependent *pathway*. *J Cell Biol* 2008;183:241-52.