

**La Poliposi Adenomatosa Familiare (FAP):
un modello per lo studio della familiarità
neoplastica**

Modena , 10 dicembre 2008

Biologia Molecolare della FAP

Tiziana Venesio

**Anatomia Patologica
IRCC- Candiolo (To)**

Poliposi Adenomatosa Familiare

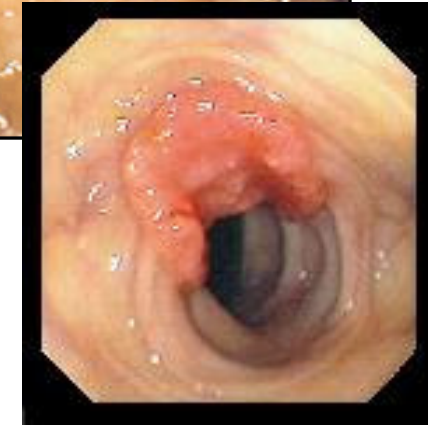
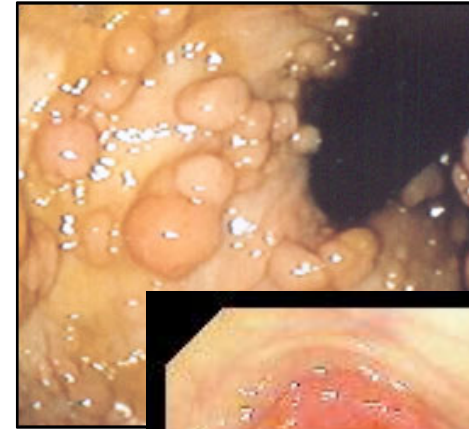
• è caratterizzata dalla comparsa di centinaia-
migliaia di polipi adenomatosi che conferiscono un
elevato rischio di cancro in giovane età (ca. 40 aa)

• considerevole varietà fenotipica
gli affetti possono sviluppare anche:
lesioni retiniche, tumori desmoidi , osteomi mandibolari

Oltre alla "poliposi classica" esiste:

Poliposi Adenomatosa Familiare Attenuata (AFAP)

- i pazienti mostrano < 100 adenomi, l'insorgenza dei polipi e del cancro è
tardiva e l'espressione delle manifestazioni extracoliche è limitata



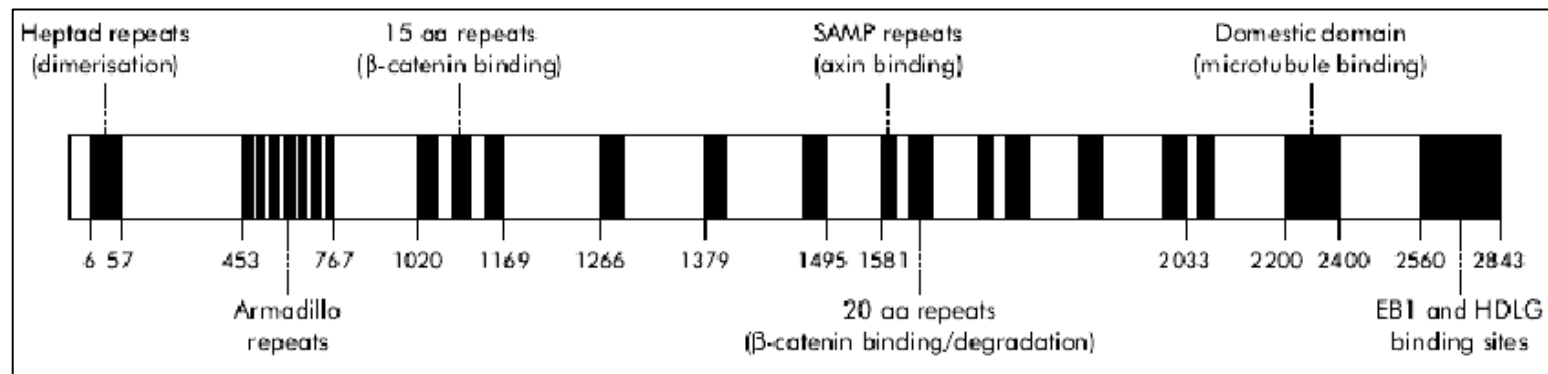
Poliposi Adenomatosa Familiare

Il protagonista storico...

Condizione autosomica dominante in *linkage*
con le mutazioni sul gene *APC*

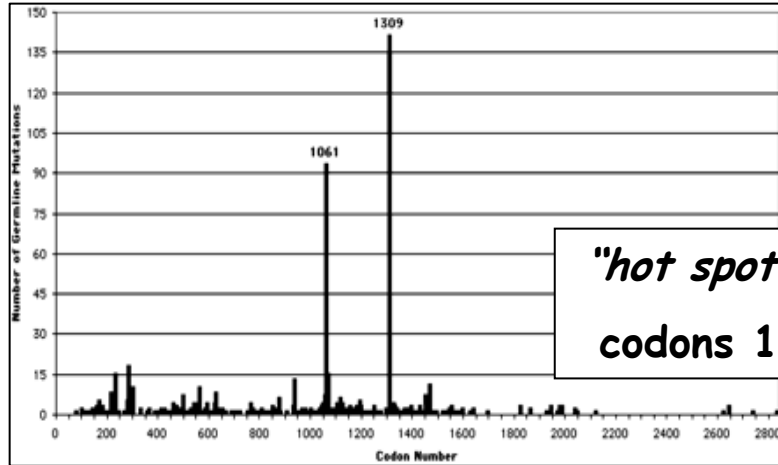
APC

- è un gene oncosoppressore
- identificato con l'analisi di *linkage* e *positional cloning* su 5q21
- 100 Kb, **15 esoni**, ORF 8538 bp, 2843 aa
- l'esone 15 copre il **75%** della regione codificante
- riportate **>800 mutazioni**
- OMIM 175100 Seq Acc ID: M74088



Le mutazioni di APC

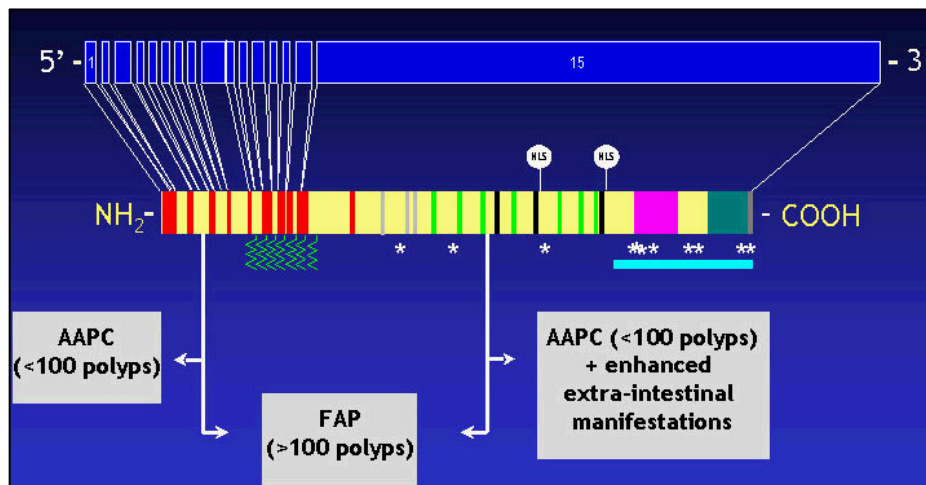
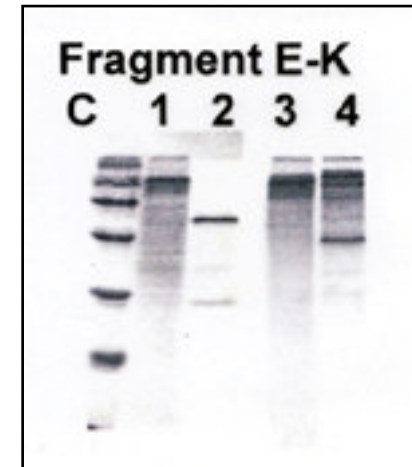
Il 90% delle alterazioni identificate sino ad ora determinano la formazione di una **proteina tronca**



Thierry Soussi
APC database
<http://perso.curie.fr>

**"hot spot" mutazionali
codons 1061 e 1309**

Saggio funzionale utilizzato
Protein Truncation Test (PTT)



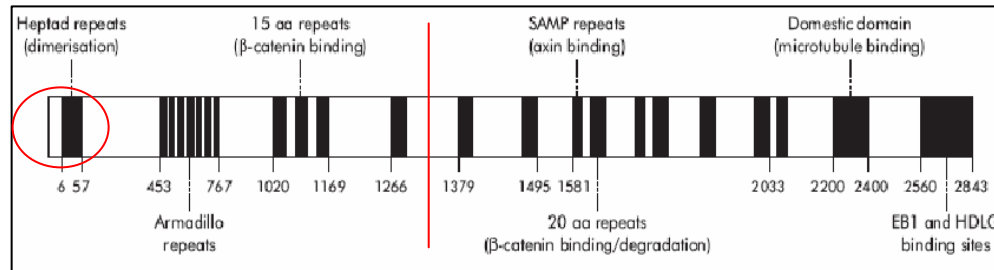
Le mutazioni vengono identificate

- nel **70%** dei pazienti con poliposi classica
- nel **10%** dei pazienti AFAP
- esiste una certa correlazione **genotipo-fenotipo**

Le mutazioni di APC

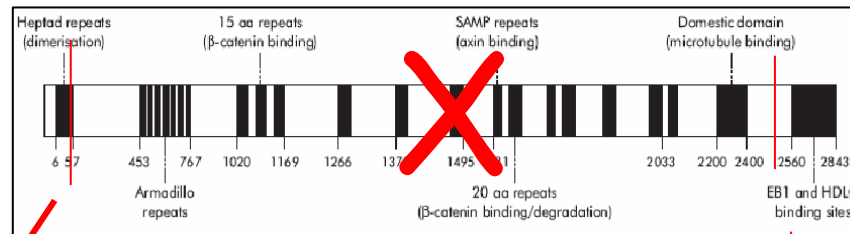
Quale relazione funzionale fra le mutazioni e il fenotipo ?

Il modello "dominante negativo"



Proteina tronca + prodotto wild-type

OMODIMERO
con poca o nulla attività
di oncosoppressore



La proteina tronca non è in grado di formare l'omodimero con il wild-type

La proteina tronca non è stabile e viene degradata.
L'omodimero contiene solo wild-type.

In entrambi i casi fenotipo attenuato

Le mutazioni di APC

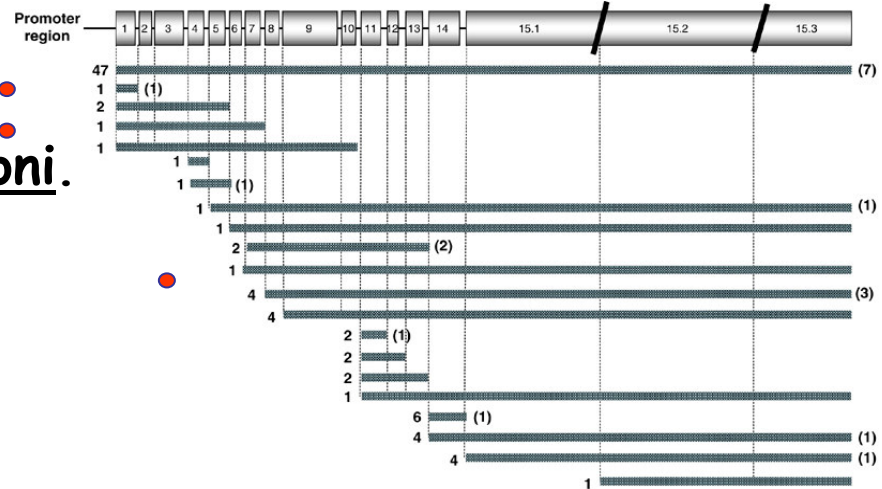
Il restante 10% di mutazioni ?

a) 6-7% dei casi presentano delezioni.
 50% delezioni dell'intero gene
 La maggior parte con fenotipo classico

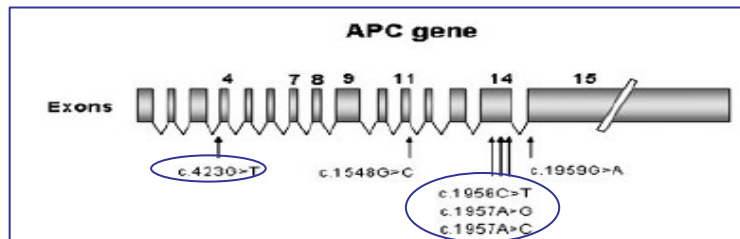
b) Mutazioni "missenso"

c) Alterazioni nella trascrizione: splicing alternativi e sbilanciamenti delle isoforme di mRNA

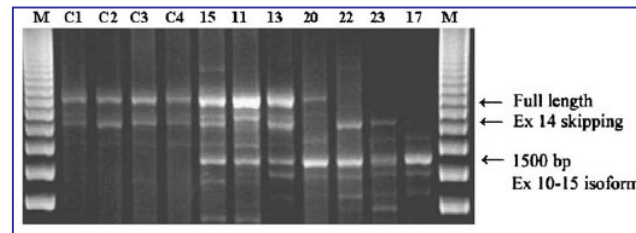
Nielsen et al., EJHG 2007



Aretz et al., Human Mutat, 2004



Venesio et al., J Mol Med, 2007

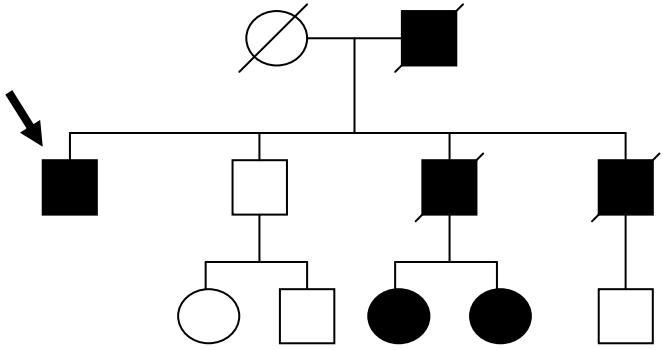


Interessano prevalentemente le forme attenuate

La correlazione genotipo-fenotipo

La poliposi associata ad *APC* è una sindrome autosomica dominante

...ma il 30% dei casi sono apparentemente sporadici

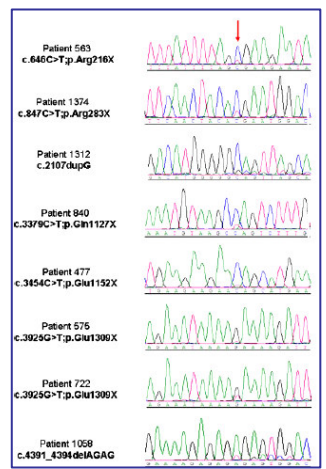
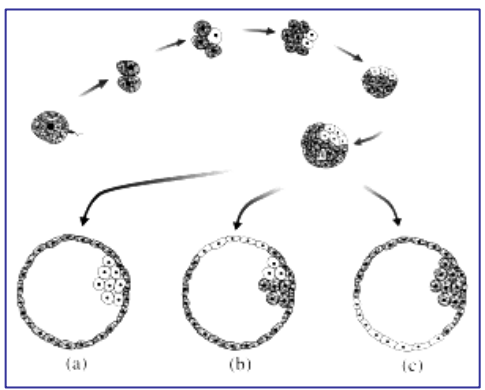


mutazioni "de novo"

Nel 20% di questi casi e' presente un mosaicismo somatico

Aretz et al., Hum Mut, 2007

Hes et al., Gut, 2008



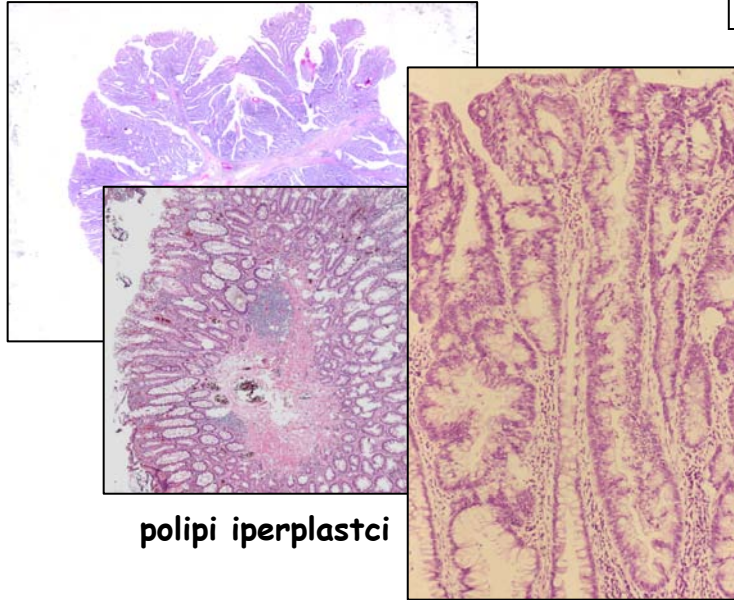
Il mosaicismo si associa al fenotipo AFAP indipendentemente dalla mutazione.

Il fenotipo dipende dalla percentuale di cellule interessate dalla mutazione

La correlazione genotipo-fenotipo

I pazienti affetti da FAP/AFAP mostrano una consistente variabilità fenotipica

La stessa mutazione può associarsi ad un fenotipo diverso



polipi iperplastci

adenomi serrati

- variabilità nel numero dei polipi
- presenza di carcinomi
- presenza di manifestazioni extracoliche
- variabilità nell'istotipo dei polipi

Geni modificatori ?

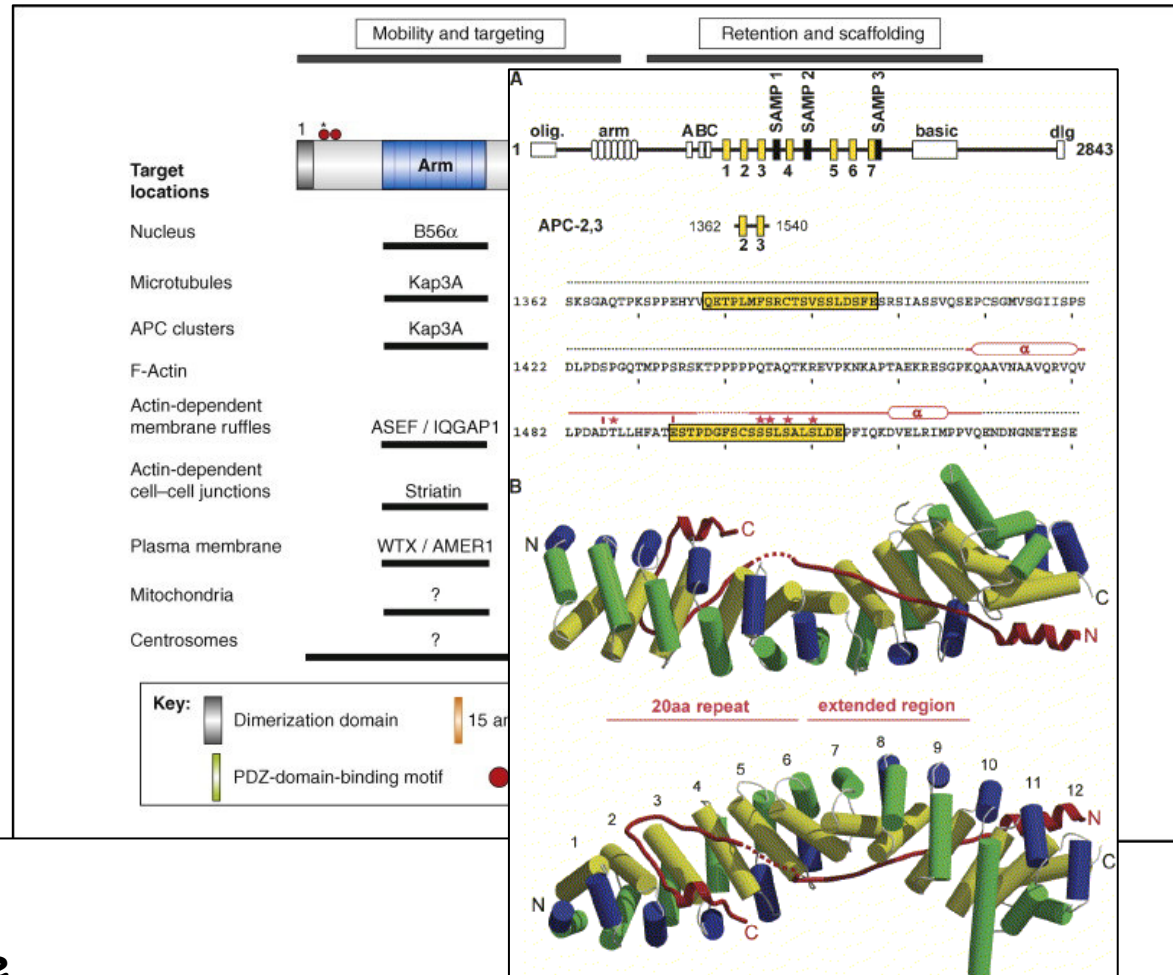
(Mom1) locus on chrom 1p35-36= Phospholipase PLA2

(Mom2) locus on chrom 18q21-23

NAT1, NAT2 (N-acetyltransferase) loci on 8p22

?

La proteina di APC

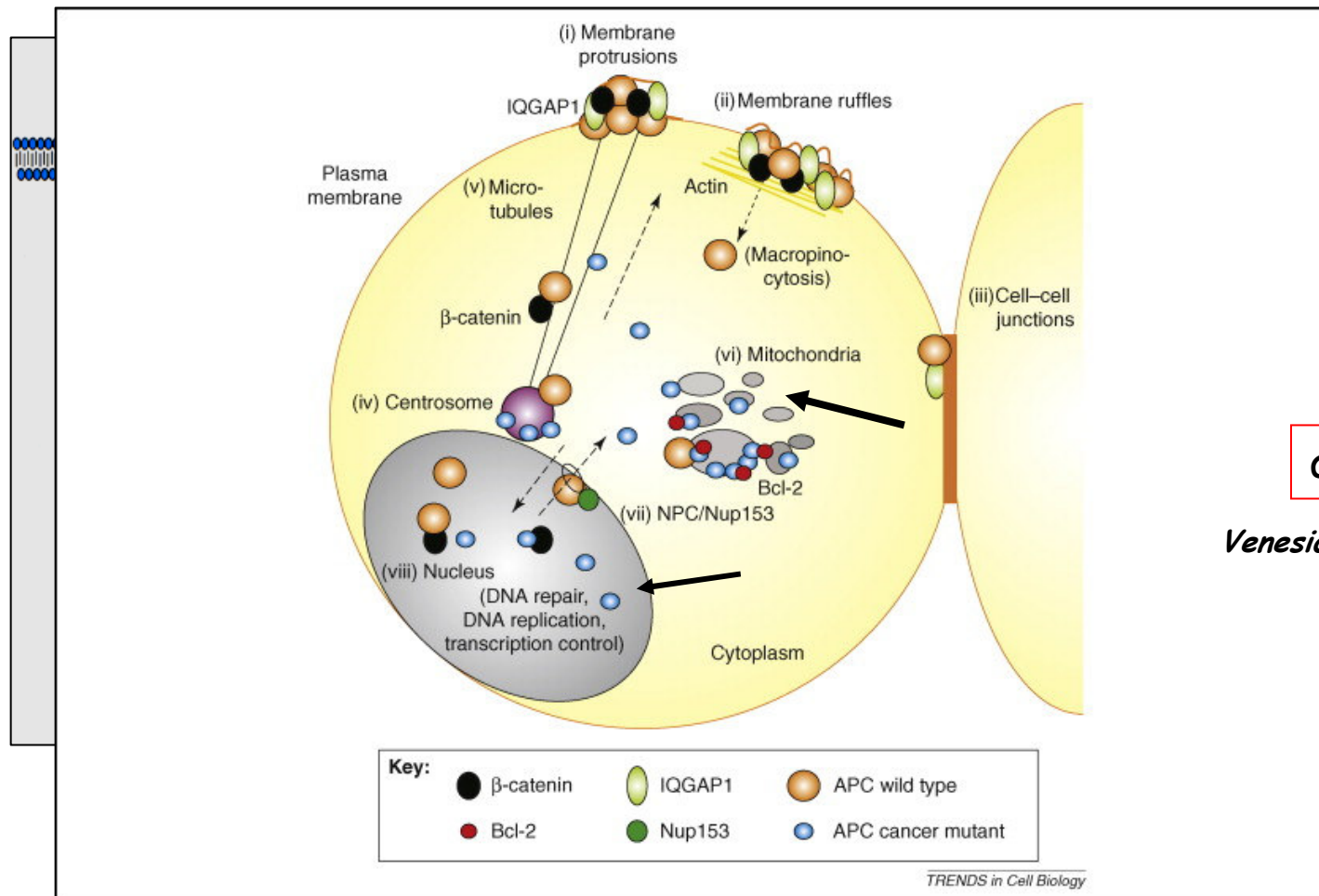


- 2843 aa, 312 kd
- è in grado di **dimerizzare**,
- **citoplasmatica**
- Interagisce con : β -catenin, axin, PP2A, ASEF, i microtubuli
- Seq Acc ID: NP_000029.2

Le funzioni della proteina di APC

E' una proteina multifunzionale che prende parte a diversi processi cellulari

Il ruolo principale è regolare i livelli citoplasmatici di β -catenina nel *pathway* Wnt



adesione

migrazione

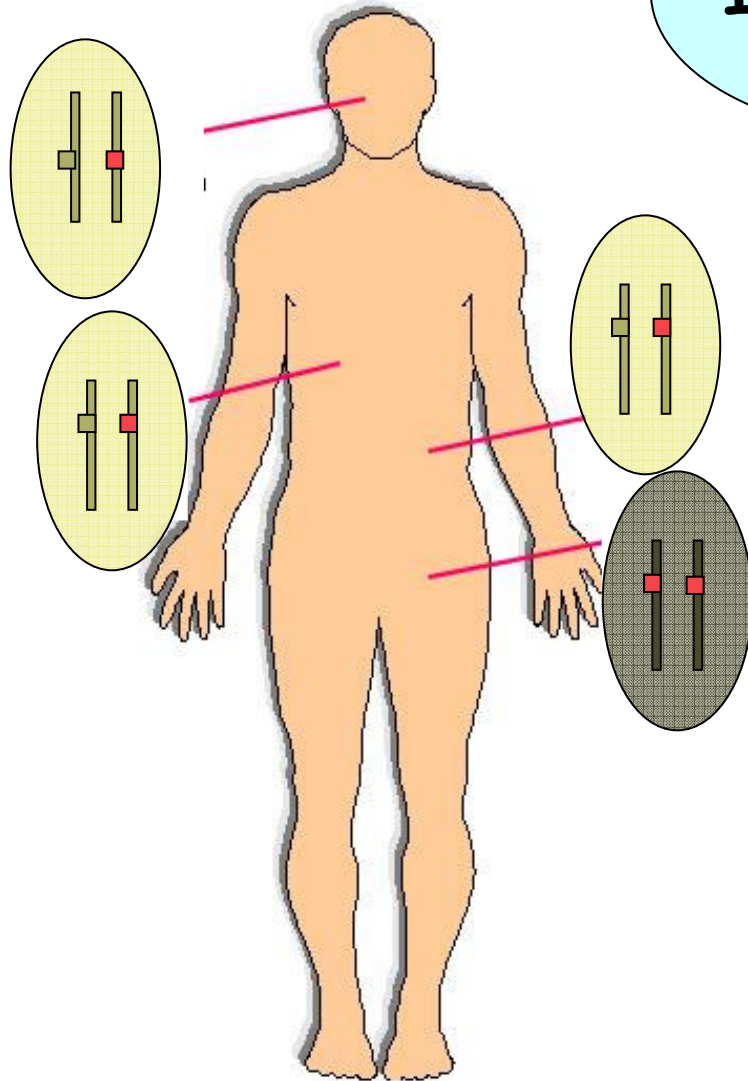
mitosi

apoptosi

Venesio et al., Mod Pathol, 2003

Riparo del DNA

I due "hits"



FAP/AFAP
modello dei due "hits":
il primo costitutivo,
il secondo somatico

→ INIZIO DEL PROCESSO
DI TUMORIGENESI

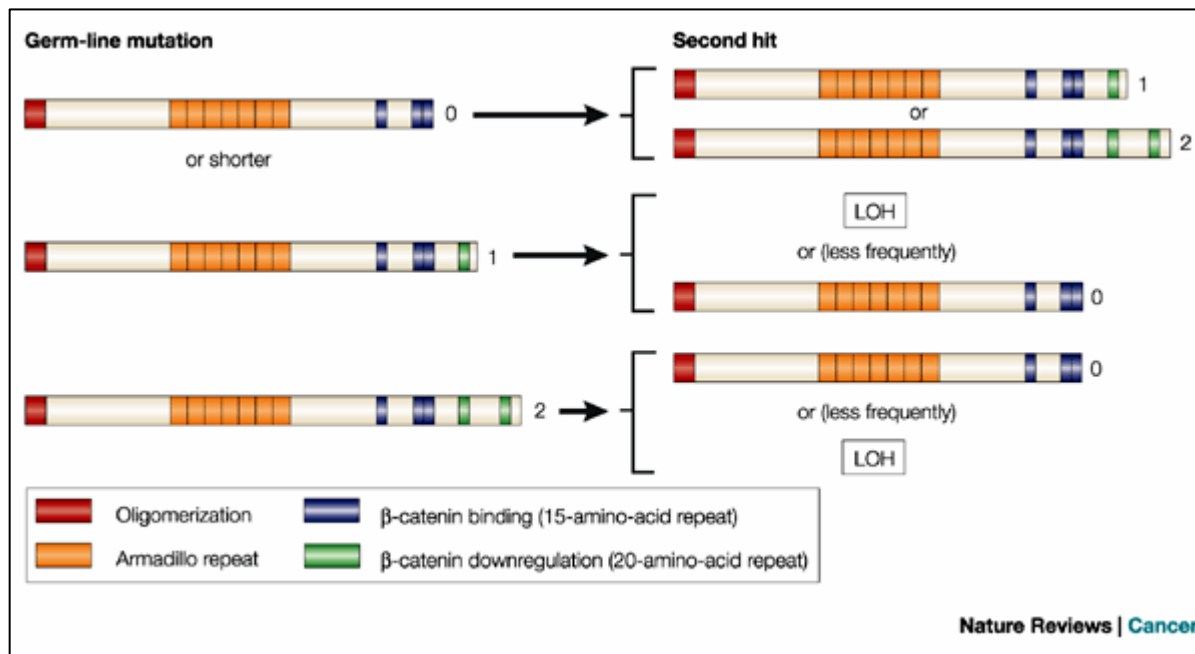
?

Per la progressione è
richiesto l'accumulo di altre
mutazioni

I due "hits"

APC è un oncosoppressore particolare

Interdipendenza dei due "hits" di *APC*



Una delle due alterazioni deve interessare il dominio di legame con β -catenina

Queste mutazioni vengono selezionate perché danno il maggior vantaggio selettivo

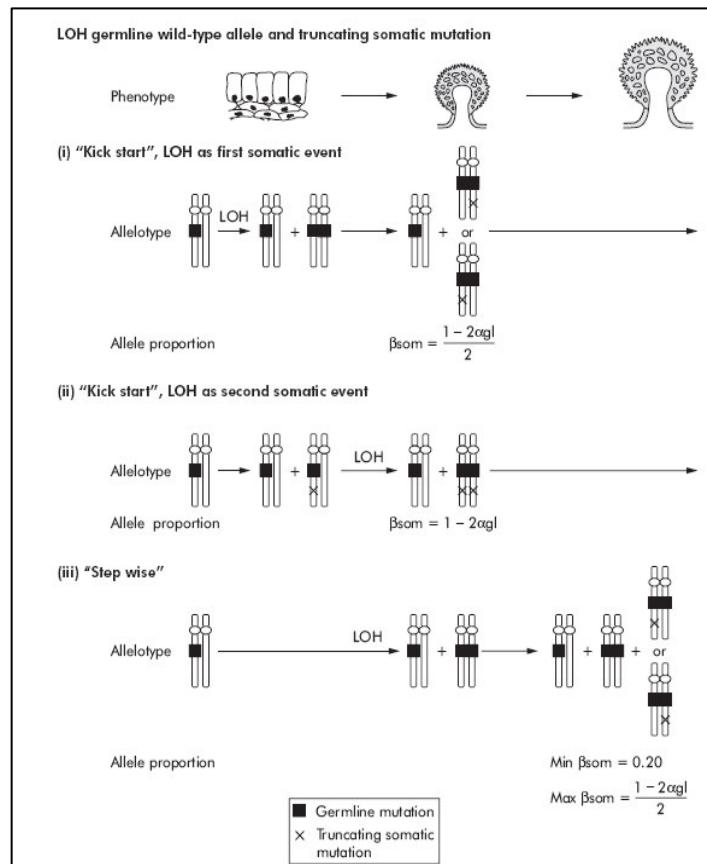
Il livello citoplasmatico appropriato di β -catenina per sostenere la trasformazione

Just-right signaling model

I tre "hits"

Gli adenomi AFAP acquisiscono le mutazioni vantaggiose sul sito di legame con β -catenina solo più tardi

Le mutazioni somatiche vengono identificate nel 30-60% delle lesioni FAP/AFAP.



Una parte delle lesioni possono acquisire 2 lesioni somatiche:

delezione /mutazione allele wild-type
+
delezione/mutazione allele mutato

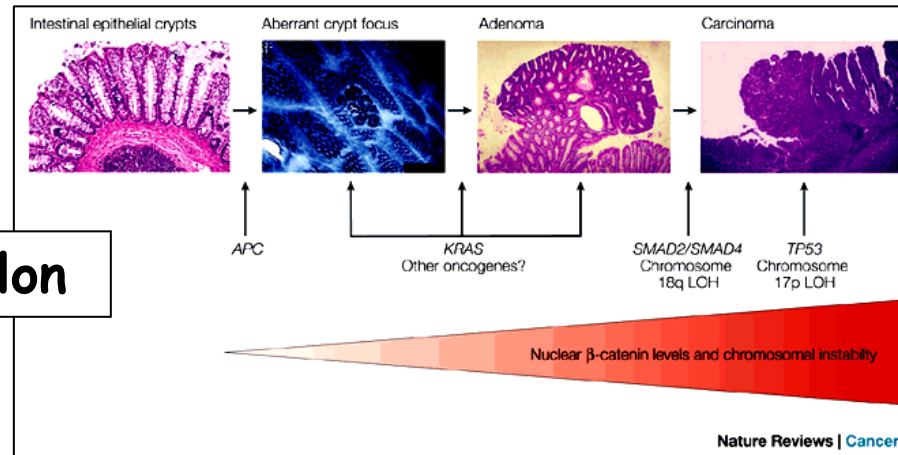


modulazione del fenotipo

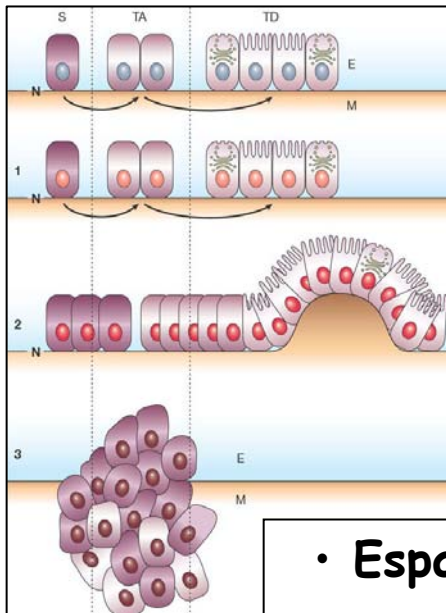
La carcinogenesi di APC

APC è il "gatekeeper" del colon

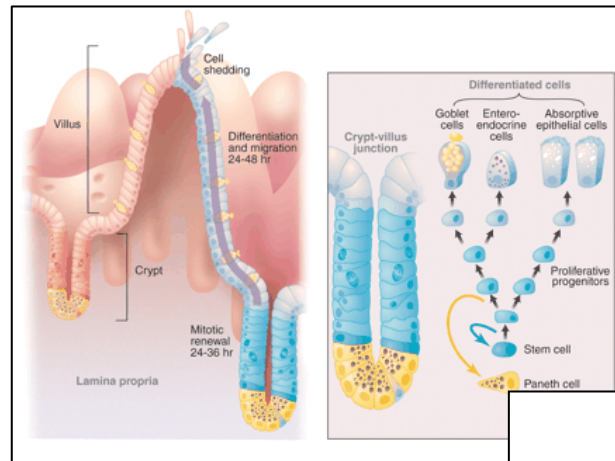
Sequenza adenoma-carcinoma



Ruolo "chiave" nella trasformazione iniziale della mutazione in eterozigosi



• Espansione del comparto staminale



Yeung et al., Cancer Res, 2008

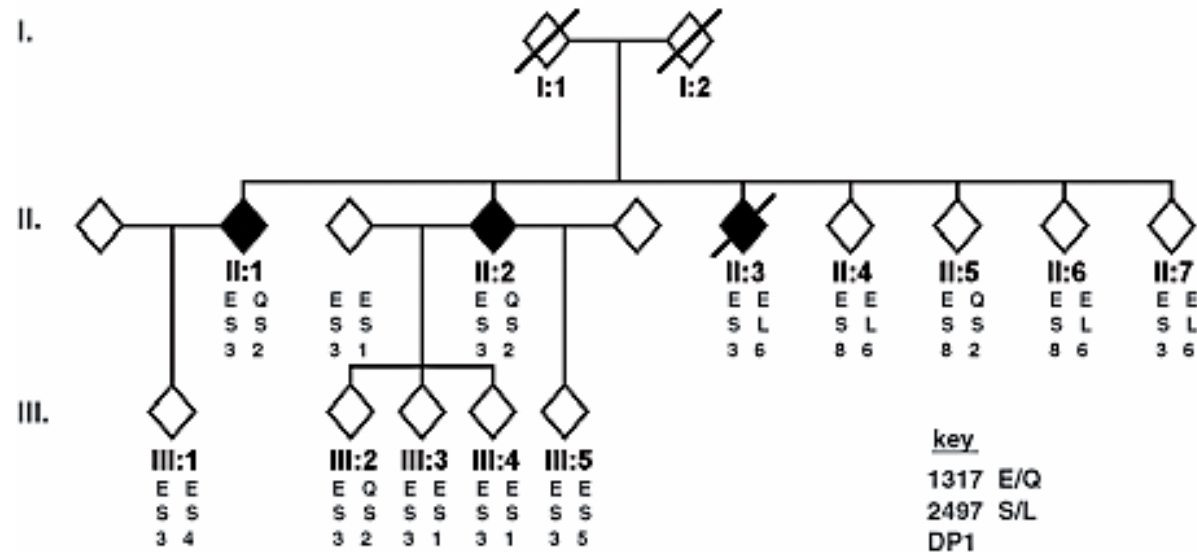
Studio di proteomica delle normali cripte di pazienti FAP vs. le cripte di controlli normali

• 13% delle proteine ha un'espressione anomala nelle cripte del paziente FAP

Poliposi
Adenomatosa
Familiare

L'altro protagonista...

Al-Tassan et al., Nature Genet, 2002



Famiglia N

Nella predisposizione della poliposi e del cancro coloretta è coinvolto un gene diverso da *APC*

L'altro protagonista

- Analisi germinale di APC negativa
- Analisi somatica di APC

Sequenziato intero *APC* ORF di 11 adenomi e 1 carcinoma

Eccesso di trasversioni $G>T$: 15/18

Mutazioni somatiche associate ad un alterato sistema BER

BER (Base Excision Repair)

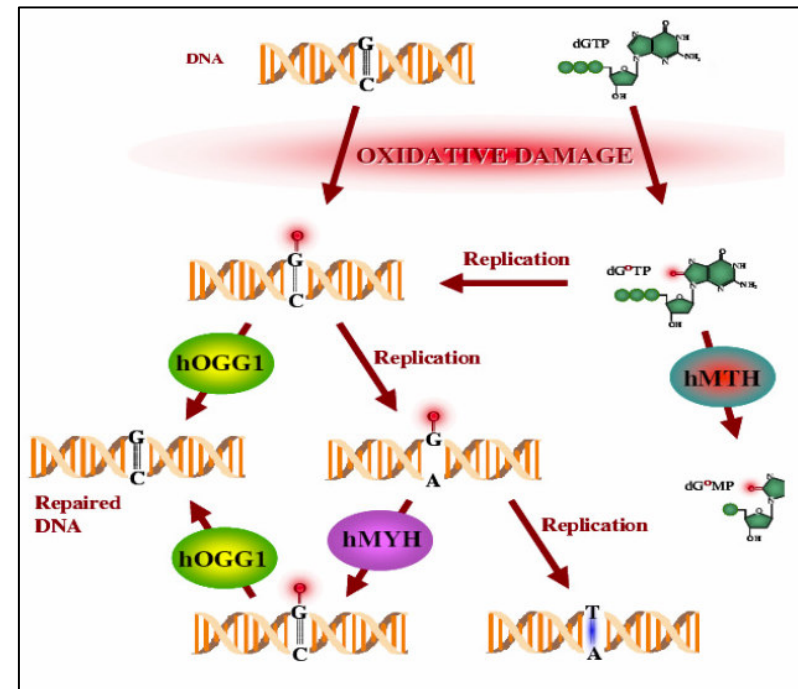
Ripara il DNA danneggiato da ossidazione

- specie reattive all'ossigeno (ROS)
- metilazione
- deaminazione
- idrossilazione

OGG1 (mutM)

MUTYH (mutY)

MTH (mutT)



L'altro protagonista

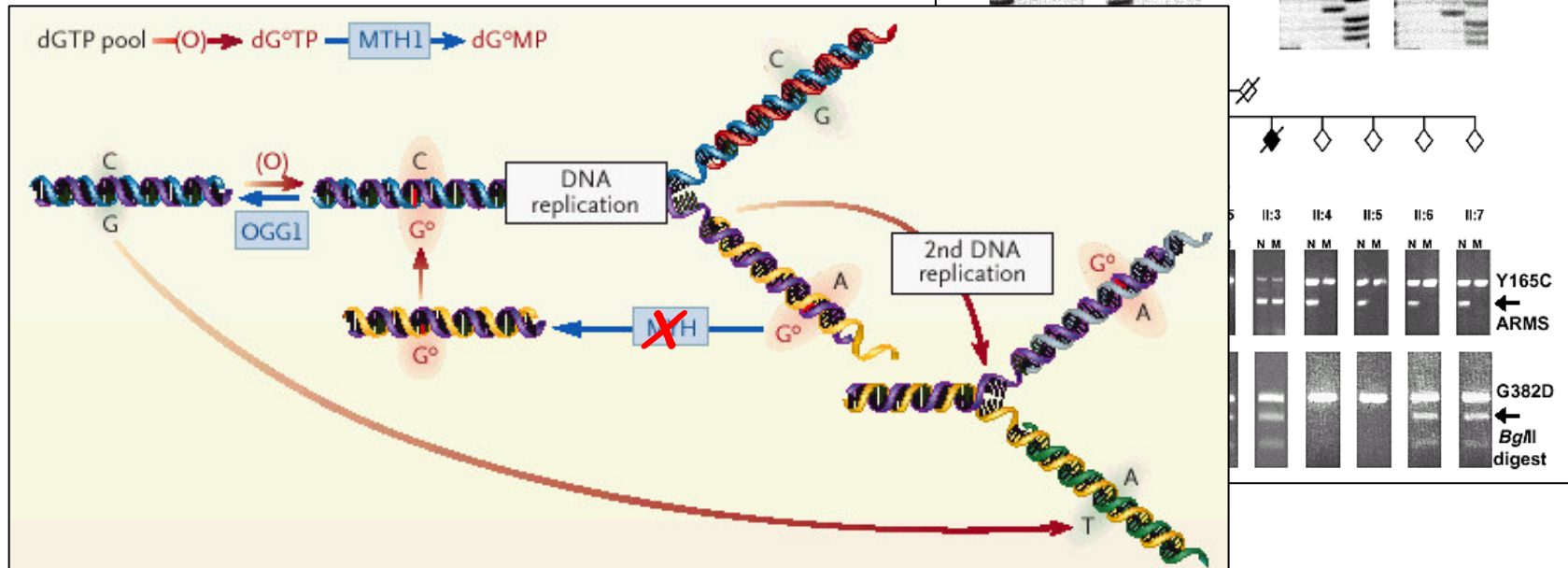
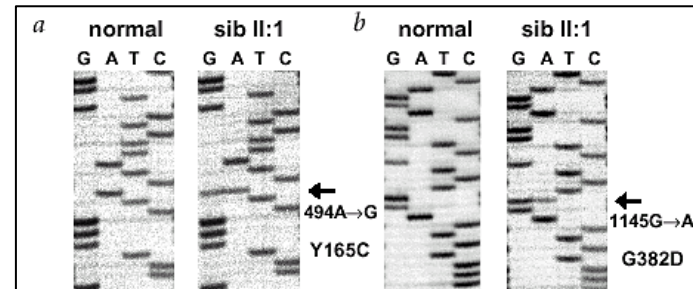
- Analisi costituzionale dei geni del sistema BER nei componenti affetti della famiglia

MUTYH

Identificate 2 mutazioni bialleliche

esone 7 : Y165C

esone 13 : G382D



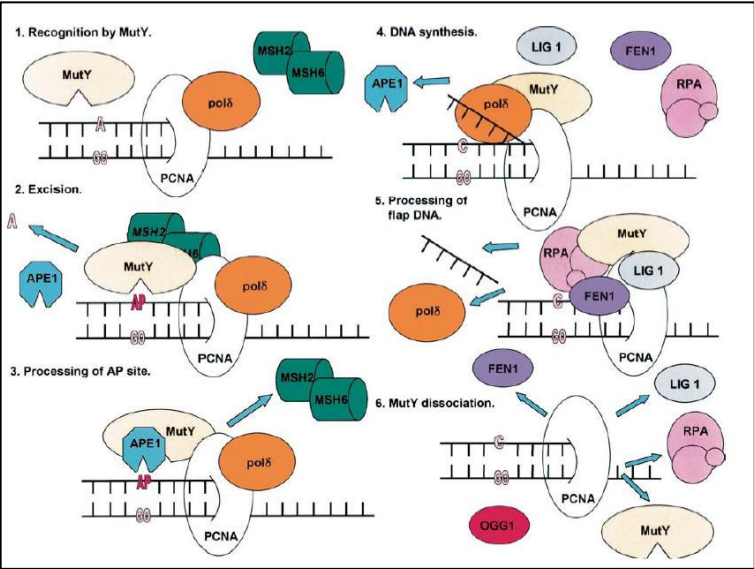
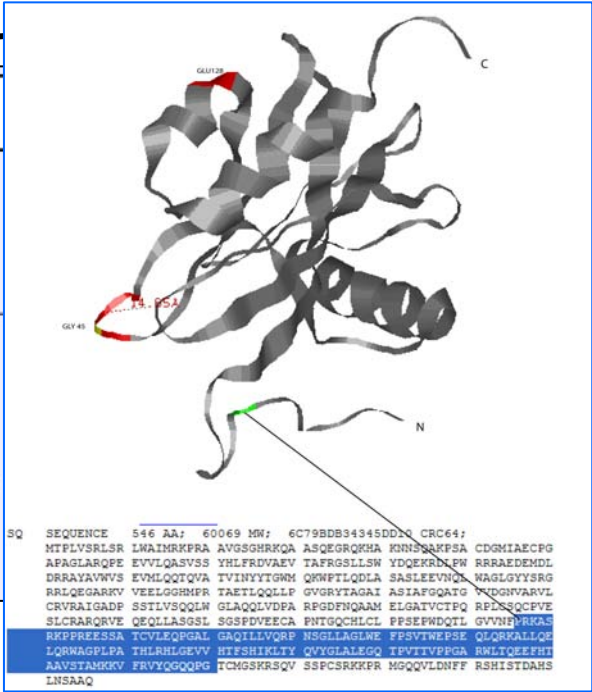
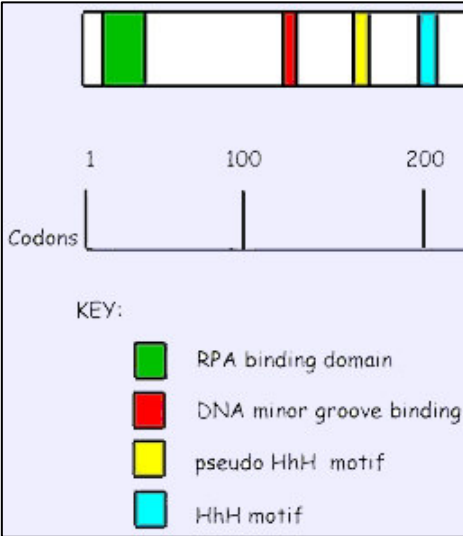
L'ossidazione origina un prodotto stabile sulla guanina, 8-oxoG o G^o, che si appaia con una adenina. Alla successiva divisione del DNA si forma una G>T

MUTYH

MUTYH e' un gene di 7.1 Kb , mappa su 1p34.3-1p32.1

- domini conservati coinvolti
- nel legame con il DNA
 - nell'interazione con altre proteine
 - segnali di riconoscimento per il nucleo e mitocondri

Codifica per u



**Coinvolgimento indiretto in altri sistemi
 dei riparo del DNA attraverso
 l'interazione con MSH6 (MMR), PCNA e
 APE1 (ricombinazione)**



Le mutazioni di *MUTYH*



Sieber et al., NEJM, 2003

Sampson et al., Lancet, 2003

- fenotipo recessivo
- AFAP/adenomi multipli con >15 adenomi
- prevalenti mutazioni missenso Y165C e G382D

Gismondi et al., Int. J. Cancer, 2004

Venesio et al., Gastroenterology, 2004

- Y165C e G382D, ma anche altre mutazioni (esoni 13, 12, 14 e 3)
- presenza di adenocarcinomi alla diagnosi (età media 50 aa)

Le mutazioni di *MUTYH*

- 80% è portatore di Y165C o G382D
- 20% è portatore di altre mutazioni

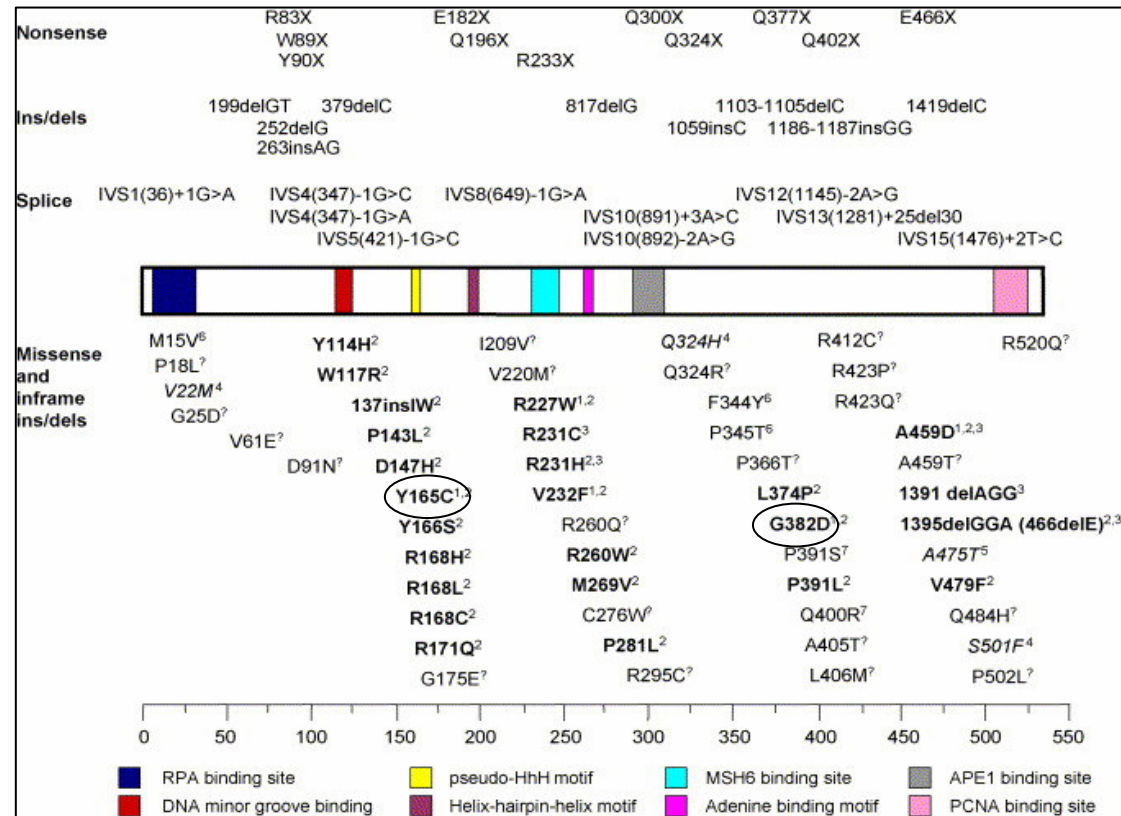
interessano la maggior parte degli esoni

possono coinvolgere lo *splicing* (anche introniche)

- Studi *in vitro* disponibili solo per alcune mutazioni

casistiche di poliposi/CCR 2004-2007

Cheadle and Sampson, DNA repair, 2007

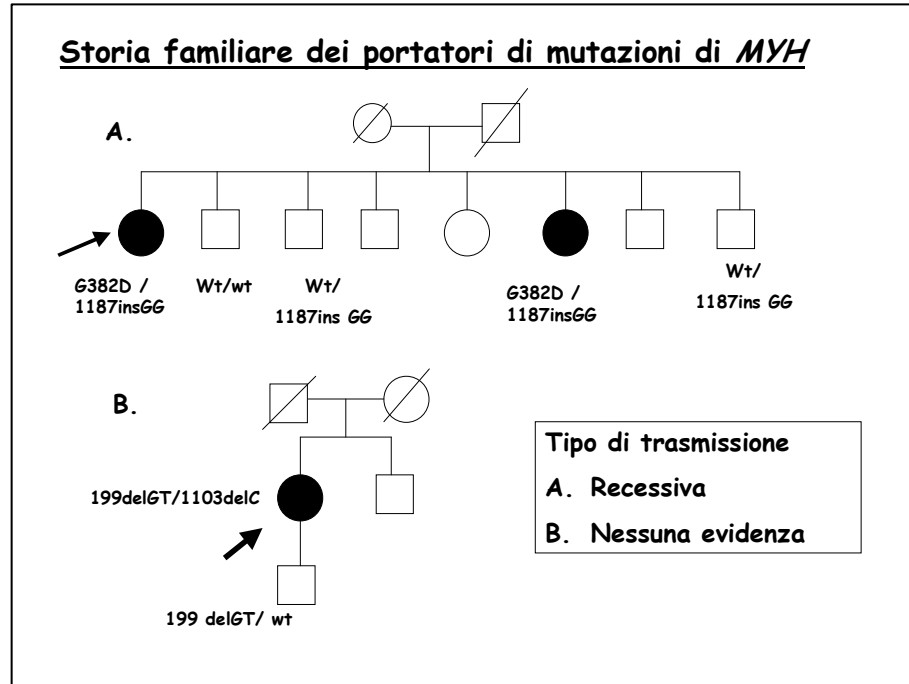


- Non è stata identificata una correlazione genotipo-fenotipo

Le mutazioni di *MUTYH* e la poliposi

Quali poliposi ?

Poliposi a trasmissione recessiva o senza evidente familiarità



Poliposi attenuate

- 70-80% delle mutazioni
- trasmissione recessiva
- "adenomi multipli"


Poliposi classiche

- 20-30% delle mutazioni

- Eta' media alla diagnosi : 47-50 aa
- Numero di adenomi : 15-250
media 40-50
- Presenza di manifestazioni extra - coliche:
estremamente rare, ma 10-15% dei casi con polipi duodenali
- Presenza di carcinomi : riportata nel 50-70% dei casi alla diagnosi

L'espressione di *MUTYH*

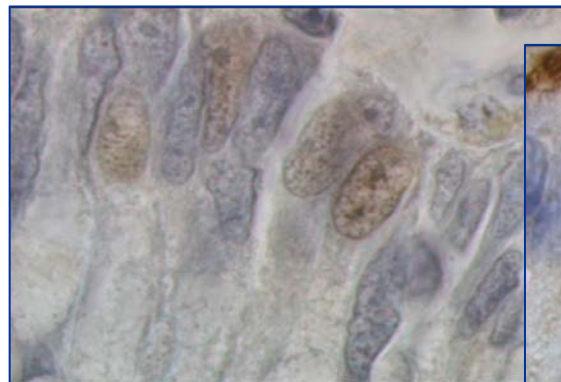
Parker and Eshleman, *Cell Mol Life Sci*, 2003

					
	Isoform	Amino acids	AUG 1, 2 or 3	Probable cellular location	Comments
Type 1	MutY α 1	546 aa	1	mitochondria	33bp insert
	MutY α 2	536 aa	1	mitochondria	3bp CAG insert
	MutY α 3 ^a	535 aa	1	mitochondria	same as Slupska et al. [17]
Type 2	MutY α 4	429 aa	3	nucleus	similar to MutY γ 4 isoform
	MutY β 1	532 aa	2	nucleus	same 33-bp insert as MutY α 1
	MutY β 3	521 aa	2	nucleus	similar to MutY γ 3 isoform
	MutY β 5	521 aa	2	nucleus	
	MutY γ 2	522 aa	2	nucleus	
	MutY γ 3	521 aa	2	nucleus	similar to MutY β 3 isoform
	MutY γ 4	429 aa	3	nucleus	similar to MutY α 4 isoform

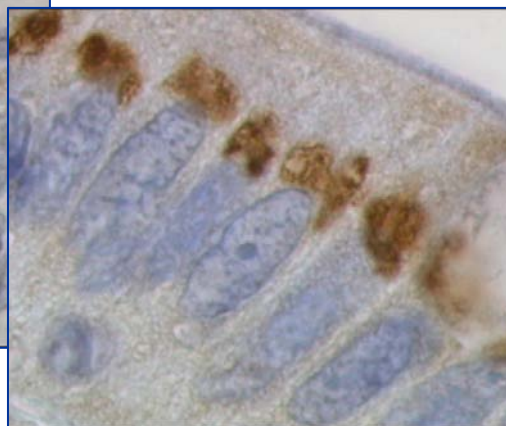
MUTYH origina 10 trascritti alternativi

MUTYH è espresso sia nel nucleo che nei mitocondri.

I pazienti MAP con mutazioni costituzionali bialleliche di *MUTYH* mostrano nelle cellule della mucosa colica e degli adenomi un'espressione della proteina citoplasmatica compartimentalizzata



Controllo



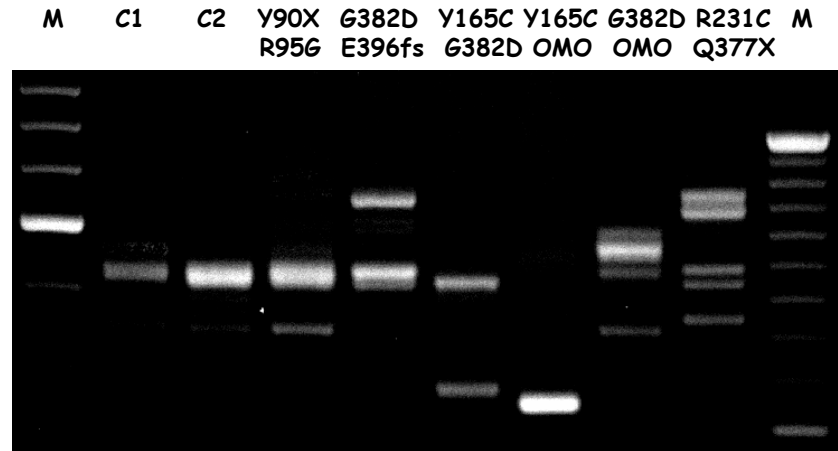
Paziente MAP

Di Gregorio et al., *Gastroenterology*, 2006

L'espressione di *MUTYH*

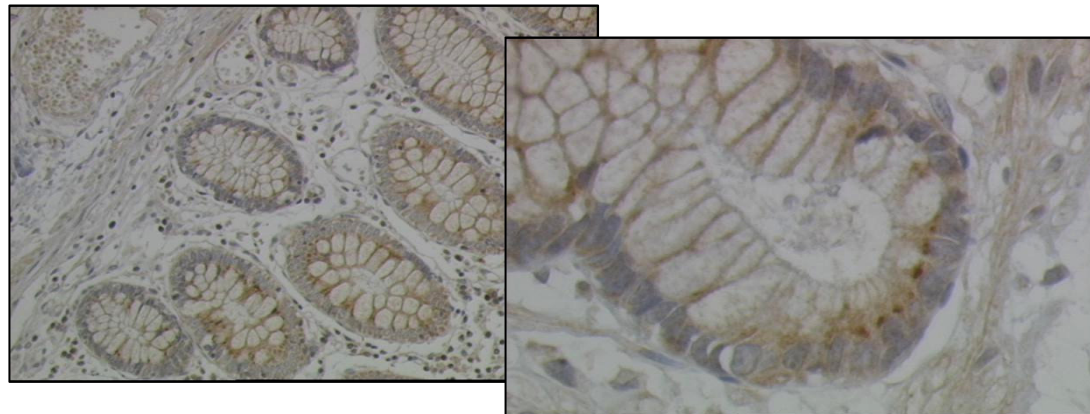
Analisi sulla possibile correlazione fra trascrizione ed espressione della proteina

a. Mutazioni bialleliche costituzionali diverse cambiano il pattern delle isoforme di mRNA



b. L' espressione positiva della proteina in IIC può essere eterogenea

Distribuzione e dimensione dei granuli citoplasmatici



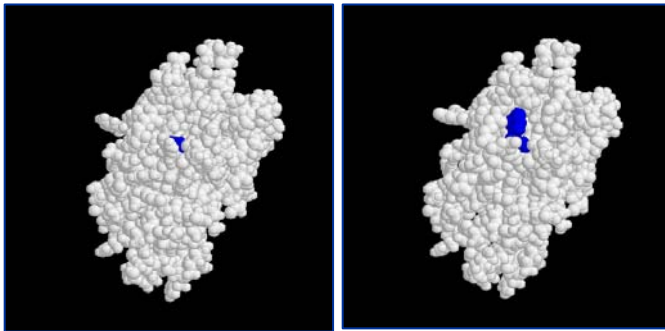
L'espressione di *MUTYH*

Metodi

- *Pyrosequencing* per valutare i livelli di trascrizione associati alle diverse mutazioni

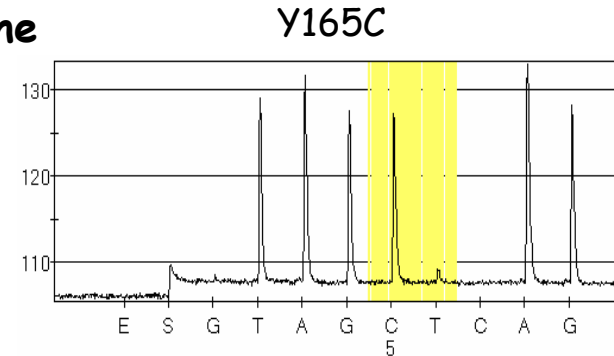
443 wt

G443W

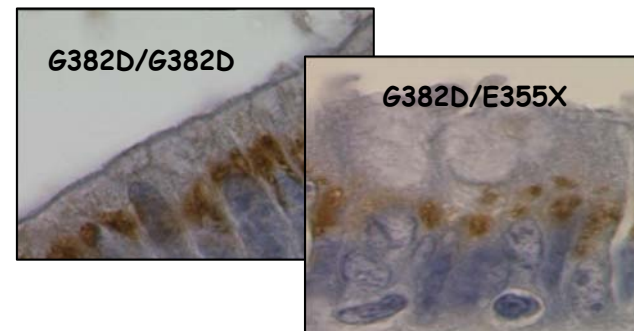


$$\Delta\Delta G \text{ G443W} = 2.96$$

- Analisi IIC dell'espressione proteica nella mucosa e negli adenomi di portatori con mutazioni germinali diverse



- Analisi strutturale con *SDM* per predire i cambiamenti di stabilità delle proteine



Risultati preliminari

Mutazioni diverse si associano a differenti aree dei granuli citoplasmatici

La carcinogenesi di *MUTYH*

Lipton et al, *Cancer Res*, 2003

Danno Ossidativo

MUTYH inattivato
costitutivamente

formazione di un prodotto stabile sul DNA
(7,8-diidro-8-oxoG-guanina) che può appaiarsi
per errore con una adenina

- successiva trasversione G>T

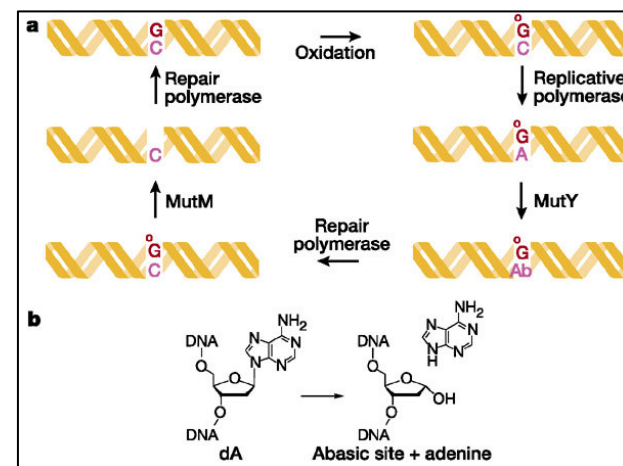
Inserimento di trasversioni G>T in geni target.
APC e *KRAS* sono geni target somatici

- Poche mutazioni su *p53*, *BRAF*, *SMAD4*, *TGFBRII*

Le MAP seguono solo in parte la sequenza adenoma-carcinoma.

La progressione può essere rapida.

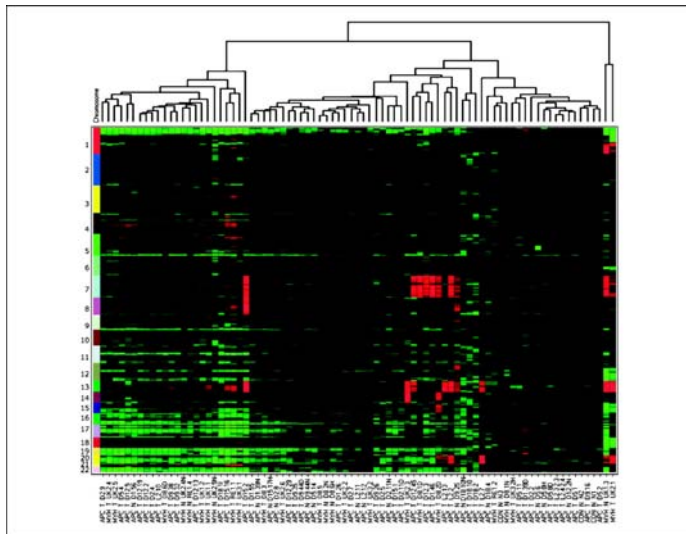
Intervengono altri fattori. Quali ?



La carcinogenesi di *MUTYH*

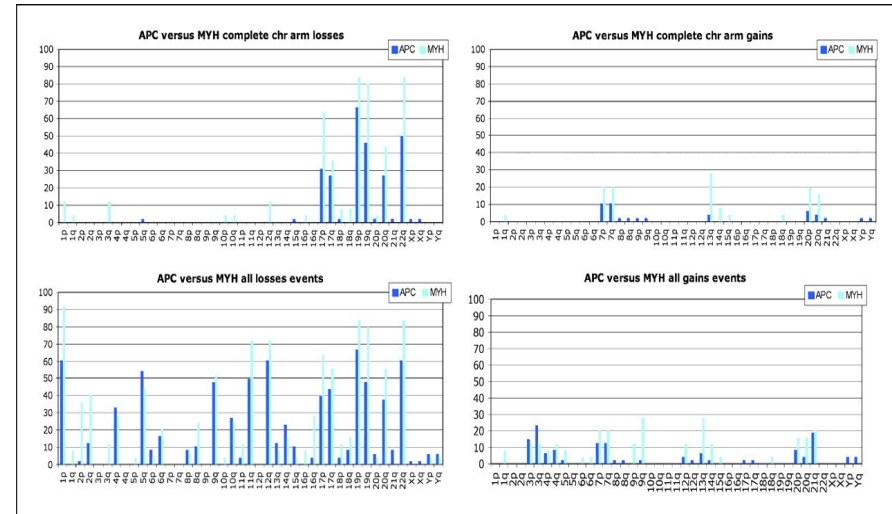
**Aneuploidie : 80 % delle MAP
60% delle FAP**

**Delezioni cromosomi 1p, 17, 19 e 22
Duplicazioni cromosomi 7 e 13**



Gaspar et al, Am J Pathol, 2008

Cardoso et al, Cancer Res, 2006



**Identificati 166 geni espressi
differenzialmente nel topo e nell'uomo
che distinguono le FAP dalle MAP**

La carcinogenesi di *MUTYH*

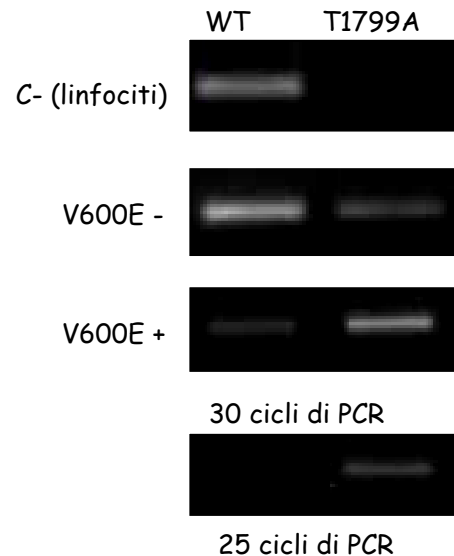
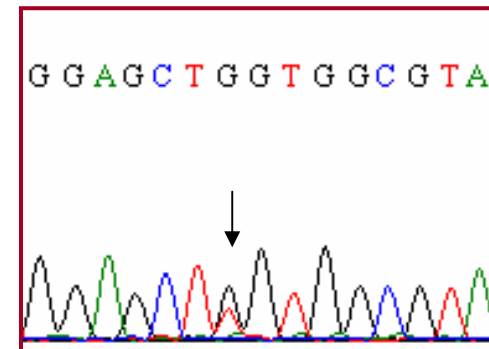
Metodi

Analisi mutazionale geni nucleari e mitocondriali

Risultati geni nucleari

- Le lesioni MAP sono frequentemente mutate su *KRAS* (40-80%)
- La frequenza di G>T sul codone 12 degli adenomi MAP vs adenomi FAP o vs polipi sporadici è significativa (p= 0.008 e p= 0.023)

Codone 12 G > T



- Poche mutazioni *BRAF*^{V600E} (11-17%).

Nessuna differenza nella frequenza rispetto ai controlli

G>T sul codone 12 di *KRAS* può essere considerato un marcatore di MAP

La carcinogenesi di *MUTYH*

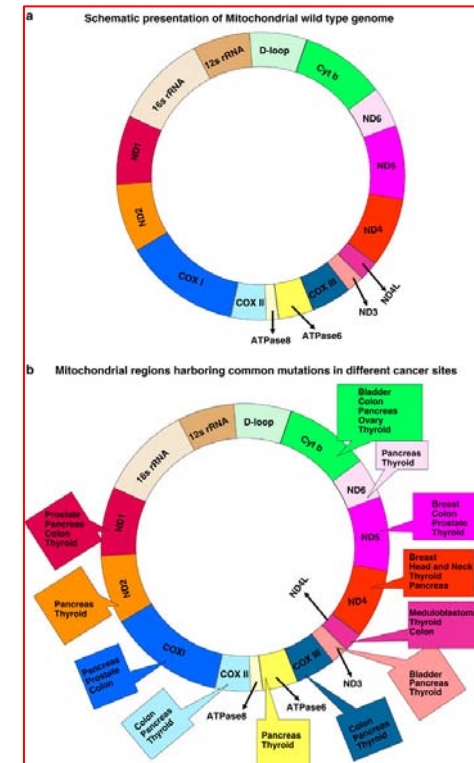
Risultati geni mitocondriali

- Identificata una percentuale elevata di mutazioni in alcune regioni codificanti del DNA mitocondriale (*citocromo ossidasi e ATPasi*)(25-80%)
- Queste percentuali diventano estremamente significative vs le lesioni FAP se si considerano le sole trasversioni G>T

Paziente	Istotipo	Posizione (nt)	Variante nucleotidica	Sostituzione aminoacidica	Proteina codificata
M7	AT	7644	T→C	L→L	CO II
M4	AT	7742	A→C	T→P	CO II
M1, M6, M7	AT + ADK	7763	G→A	E→K	CO II
M6, M10	AT + ADK	7768	A→G	M→M	CO II
M7	ADK	9025	G→A	G→S	ATPasi 6
F5	AT	9055	G→A	A→T	ATPasi 6
M4	AT	9062	T→A	L→O	ATPasi 6
M1	ADK				
S27	ATV				
M7, S30	AT				
M4	AT				
S7	HP				
M11, F2	AT + ADK				

AD-MAP	21%
ADK-MAP	67%
AD-FAP	0%
AD-SPORADICI	0%

Le mutazioni sulla regione COII della *citocromo ossidasi* sono specifiche delle lesioni MAP e associate con la progressione

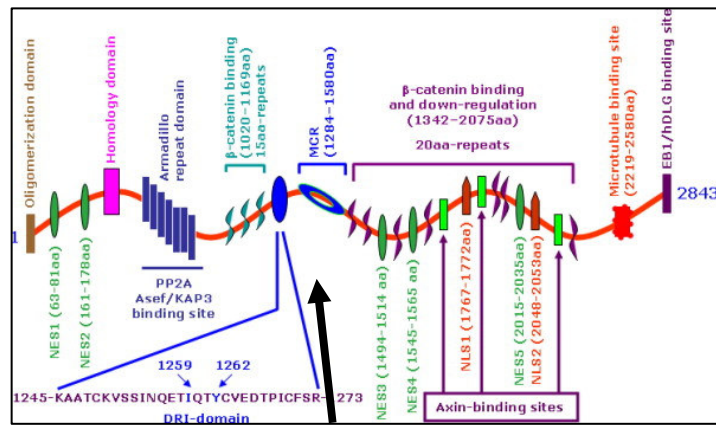


Esiste una relazione tra APC e MUTYH ?

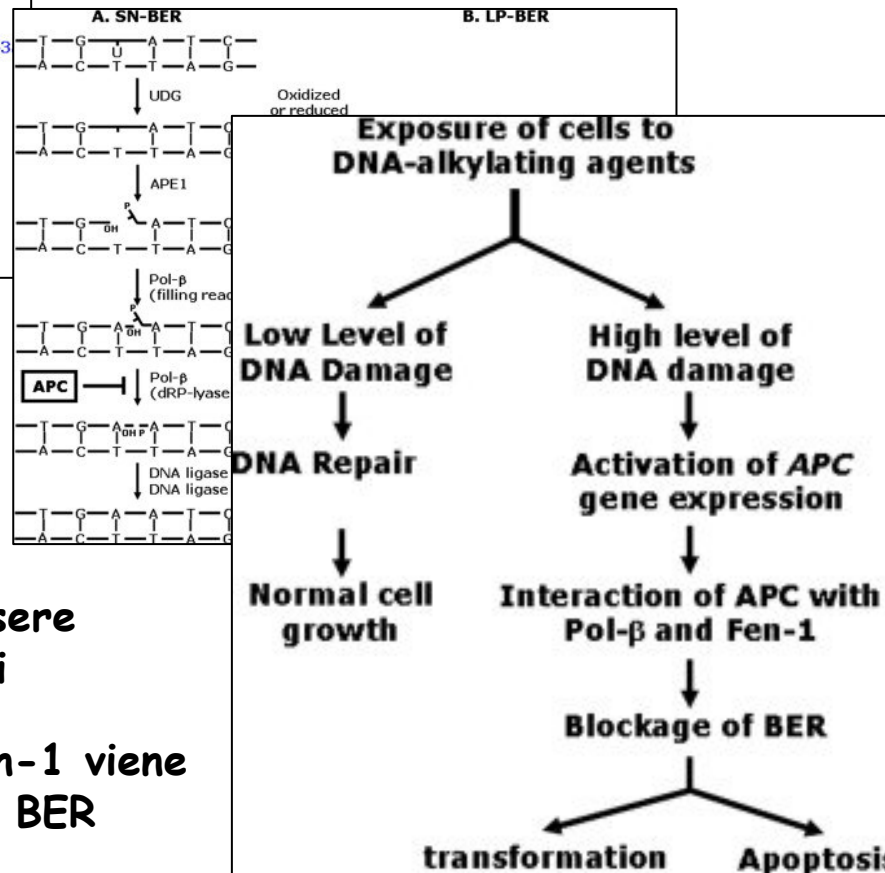
APC è coinvolto nel riparo del DNA, modulando il BER

Jaiswal et al., Biochemistry, 2006

Balusu et al., Biochemistry, 2007



Interazione con Pol-β e Fen-1



- L'espressione di APC può essere indotta da agenti alchilanti
- La funzione di Pol-β e Fen-1 viene alterata con blocco del BER

Conclusioni

Una dettagliata correlazione genotipo-fenotipo dovrebbe portare ad ampliare le prospettive terapeutiche



...c'è ancora molta strada da fare...