

Acta Iº Reunión de Genética y Epigenética del Cáncer

29 de Noviembre 2007

Participantes

En el grupo de Epigenética y Genética del cáncer participan más de 100 investigadores pertenecientes a 10 laboratorios de investigación y 6 hospitales

A la reunión asistieron miembros de 9 de los grupos que componen la sub-línea de investigación.

Jesus M. Paramio PhD CIEMAT Madrid
Núria Sala, IDIBELL-ICO Barcelona
Rubén Pío Osés CIMA Pamplona
Dolores Odero CIMA Pamplona
Xabi Agirre CIMA Pamplona
Montserrat Sanchez-Céspedes, (CNIO) Madrid
Lorena Di Lisio (CNIO), Madrid
Juan Torres lanzas Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia
Africa García-Orad Carles Dpto. Genética (UPV/EHU) Leioa
Jose Gonzalez Castaño Universidad Autonoma Madrid
Beatriz Blázquez (H. Basurto)
F. Marco (H. Basurto)
Idoia Martin Guerrero (UPV/EHU) Leioa
Elena Prado (UPV/EHU) Leioa
Maialen Martin (UPV/EHU) Leioa
Esperanza Martín (UPV/EHU) Leioa
Elisabeth Lopez (UPV/EHU) Leioa

Objetivo

El objetivo de esta primera reunión ha sido la presentación de los proyectos de investigación de cada grupo con la finalidad de buscar líneas comunes de estudio en las que se aborde un problema desde distintos ángulos, compartiendo tecnología, infraestructura y capital humano. Ya se están realizando colaboraciones entre el CNIO, el Hospital de Murcia y el CIMA de Navarra, centrados en el estudio del cáncer de pulmón. Se está iniciando una colaboración entre la UPV/EHU y dos grupos del CIMA de Navarra centrándose en patologías oncohematológicas.

Conclusiones:

1-Próxima reunión se realizara a finales de Mayo o principios de Junio en la UPV/EHU, por falta de otra propuesta. En esa reunión se decidirá donde será la siguiente.

2-Cada grupo establecerá contactos directamente con grupos en los que hayan visto puntos en común y los resultados de las redes de colaboración que se vayan creando se presentarán en la próxima reunión.

Presentaciones

A continuación se resumen las exposiciones de cada uno de los investigadores.

Jesus M. Paramio CIEMAT Madrid

A pesar de los grandes avances en el conocimiento de las bases moleculares del cáncer, sólo una pequeña parte de éstos ha revertido en avances terapéuticos de aplicación clínica. Esto se debe, en parte, a la complejidad de este grupo de enfermedades, en las que el tumor se encuentra formado por un grupo heterogéneo de células tumorales, estromales, inmunes y vasculares. En consecuencia, es preciso conocer las bases moleculares de esta patología en un entorno *in vivo*. En este sentido, las técnicas de manipulación genética del ratón han permitido obtener modelos cada vez más similares a sus contrapartidas humanas. Nuestro grupo ha generado recientemente diversos modelos con una alta susceptibilidad al desarrollo espontáneo de carcinomas escamosos (SCC). El análisis bioquímico y genómico sugiere que en estos tumores los procesos que tiene lugar son análogos a los reportados en tumores similares en pacientes humanos. Además se han observado procesos de supresión de la actividad de p53 como promotor de apoptosis que podrían ser debidos a eventos epigenéticos. Por otro lado, se han caracterizado cambios en la expresión de microRNA previos al desarrollo tumoral que permiten explicar los cambios génicos observados. Finalmente, datos preliminares obtenidos por análisis global de la expresión génica indican que una firma molecular obtenida en tumores murinos permite la estratificación de pacientes humanos en función de parámetros clínicos.

Núria Sala, IDIBELL-ICO Barcelona

Después de presentar al equipo formado por investigadores del Grupo de Nutrición, Ambiente y Cáncer del Servicio de Epidemiología e investigadores del Laboratorio de Investigación Translacional (LRT), del ICO, se enumeraron los objetivos del grupo. Estos se pueden resumir en el estudio de la variabilidad genética y alélica que se asocia al desarrollo y progresión del cáncer, centrándonos esencialmente en el cáncer gástrico (CG) y de su interacción con factores ambientales. También forman parte de los objetivos del grupo el estudio la interacción entre factores genéticos entre si y con factores ambientales y el de la base molecular de las asociaciones e interacciones identificadas. Como ejemplo de la metodología de estudio se presentó el proyecto Europeo EurGast (QLRT-2000-01049) que utilizó material de la cohorte europea EPIC y está en la base de los distintos proyectos actualmente en curso del grupo. La cohorte europea EPIC es una cohorte de más de 500.000 individuos de población general de 10 países Europeos, entre los cuales España, incluidos entre los años 1992 y 1998. De cada individuo hay información detallada de estilos de vida y dieta, material biológico y un seguimiento de su historia clínica (especialmente cáncer). El proyecto EurGast es un estudio caso (n=243)–control (n=1141) anidado en la cohorte europea EPIC, con el objetivo de analizar la asociación entre CG, su localización y tipo histológico, y polimorfismos en genes candidatos de las distintas vías de la cancerogénesis gástrica. Aunque los resultados obtenidos permitieron identificar algunas asociaciones significativas e incluso se observaron algunas interacciones entre factores genéticos y factores ambientales, también se concluyó que el tamaño muestral era insuficiente para identificar asociación con el tipo histológico y con la localización del CG y para identificar interacciones significativas entre factores genéticos y factores ambientales. Ello animó al grupo a diseñar un nuevo proyecto, el EurGast II, en el cual, para un mínimo de 500 muestras de CG y sus respectivos controles (n=2000), se analizan más de 400 SNPs de genes candidatos, seleccionados tanto por su posible efecto funcional como por su capacidad de ser SNPs marcadores (tagSNPs) de los principales bloques de haplotipos en sus respectivos genes. Para la selección de SNPs se utilizan distintas bases de datos, entre las cuales la de HapMap, y programas como el Haploview. También se trabaja en la creación de un consorcio de cohortes europeas de CG, el cual permitiría recoger un número suficiente de casos (entre 1000 y 2000) para realizar un análisis global del genoma e identificar nuevos genes y vías de cancerogénesis gástrica. Finalmente se enumeran brevemente otros proyectos del grupo, como son el estudio de los factores genéticos, ambientales y de expresión fenotípica asociados a la progresión de lesiones precursoras de cáncer gástrico y de úlcera péptica en una población españolas de alto riesgo; el estudio de la expresión y la variabilidad

alélica de GAS6 y sus receptores TAM (TYRO3, AXL y MERTK) en enfermedades con un componente inflamatorio y de proliferación celular; y el estudio de la asociación entre aductos aromáticos del ADN, susceptibilidad genética y cáncer de pulmón, estómago, mama y colon y recto.

Montserrat Sanchez-Cespedes, (CNIO) Madrid

Montse Sanchez-Cespedes presentó algunas de las líneas de trabajo que desarrolla su grupo en la actualidad.

Uno de los proyectos es el estudio y caracterización genético/molecular del gen LKB1. Dicho gen está claramente implicado en el desarrollo del cáncer de pulmón, especialmente el de célula no pequeña, que comprende el 80% de los tumores de pulmón. Este gen se halla inactivado en aproximadamente un 30-50% de este tipo de tumores, especialmente mediante mutaciones y deleciones en homocigosis que se traducen en una ausencia completa de proteína LKB1. El grupo ha demostrado que las líneas celulares derivadas de cáncer de pulmón deficientes en LKB1, son incapaces de activar (fosforilar) completamente el sensor energético AMPK (AMP dependent protein kinase) en condiciones de stress energético y de inhibir a mTOR. Además, esta deficiencia se observa también en tumores primarios de pulmón. También se ha evaluado la distribución de la proteína LKB1 en tejidos normales y en tumores de pulmón, mediante el uso de inmunohistoquímica. Además del trabajo anteriormente mencionado, el grupo ha estudiado otras alteraciones genético/moleculares en el cáncer de pulmón. Entre ellas destaca el estudio de los perfiles de expresión de 70 tumores de pulmón, utilizando una plataforma de microarrays de cDNA (plataforma Oncochip, CNIO). Los resultados muestran la capacidad de esta tecnología para discriminar los tipos histológicos principales de tumores pulmonares y los tejidos normales del pulmón. También, se observa grandes similitudes en los patrones de expresión de los tumores con mutaciones en EGFR. Los resultados también permitieron identificar la presencia de amplificación génica en PIK3CA, especialmente en tumores de tipo escamoso, significativamente relacionada con sobreexpresión génica. Esto es de especial relevancia ya que las mutaciones en PIK3CA, frecuentes en otros tipos de cáncer (p.e. colon y mama), son relativamente raras en cáncer de pulmón. Nuestros datos apoyan que la amplificación génica es el mecanismo principal de activación oncogénica de PIK3CA en este tipo de cáncer y, por lo tanto, puede constituir un marcador de selección de pacientes candidatos a futuras terapias con inhibidores de PI3K. Además de PIK3CA, el grupo también trabaja en la identificación de nuevas regiones amplificadas que contengan oncogenes relevantes en el cáncer de pulmón, utilizando para ello microarrays de CGH. Estos trabajos se han realizado en colaboración con distintos grupos clínicos (A Lopez-Encuentra) y anatomopatológico (F Lopez-Rios), del Hospital 12 de Octubre de Madrid y con los miembros de la red de cáncer Manuel Morente y Giovanna Roncador, del CNIO.

Otro de los proyectos que se llevan a cabo en el laboratorio es el estudio del gen BRG1, que codifica para una proteína con actividad ATPasa del complejo remodelador de cromatina SWI/SNF. Nuestros resultados son altamente interesantes y muestran que BRG1 se encuentra inactivado en aproximadamente el 40% de tumores de pulmón de célula no pequeña. Estos proyectos se están desarrollando en colaboración con el equipo de investigadores de Jun Yokota (Universidad de Tokio) y con los investigadores LM Montuenga y R Pío (CIMA).

.....

Rubén Pío Osés CIMA Pamplona

El Dr. Rubén Pío presentó los principales proyectos de investigación del grupo en el que participan también los Dres Luis Montuenga, Fernando Lecanda y Alfonso Calvo. Los proyectos de este grupo están centrados en la caracterización molecular del carcinoma pulmonar, con especial interés en los eventos tempranos de la carcinogénesis. Desde el punto de vista traslacional, los proyectos de investigación están dirigidos principalmente a diseñar estrategias moleculares de detección precoz, estratificación mediante técnicas moleculares del riesgo de cáncer de pulmón y diseño de nuevas estrategias terapéuticas en cáncer de pulmón, incluyendo el bloqueo de la metástasis. Entre otros proyectos del grupo presentados en la sesión, el Dr Pío describió los siguientes:

- Modelos animales de carcinogénesis pulmonar inducida por inflamación crónica con cristales de sílice
- Alteraciones en el cáncer de pulmón de moléculas implicadas en el metabolismo del RNA

- Diseño de un array de splicing para la determinación de formas de splicing anormales en muestras clínicas de cáncer de pulmón

.....

Dolores Otero CIMA Pamplona

María Dolores Otero ha presentado los 4 proyectos que están desarrollando los miembros de su grupo sobre "mecanismos moleculares en el desarrollo y progresión de leucemias mieloides", y ha desarrollado los objetivos de dos de ellos.

1. Nuevas estrategias genéticas y expresión diferencial de microRNAs en pacientes con leucemia mieloide aguda y cariotipo normal.
2. Mecanismos de transformación, incidencia y significado clínico de la sobreexpresión de los genes EVI1 y GATA2.
3. Mecanismos genéticos de activación de proteínas con actividad tirosina quinasa en leucemias mieloides, estado de la vía de transducción de señal JAK-STAT.
4. Análisis bioinformático a gran escala de genes implicados en translocaciones cromosómicas en cáncer.

.....

Xabi Agirre CIMA Pamplona

El objetivo de los trabajos de nuestro grupo ha sido el análisis de las alteraciones que puede sufrir el mecanismo epigenético de metilación en la Leucemia Aguda Linfoblástica (LAL) y la Leucemia Mieloide Crónica (LMC). Estos trabajos los hemos realizado en colaboración con el grupo del Dr. José Román Gómez (Hospital Reina Sofía de Córdoba), Dr. Antonio Jiménez Velasco (Hospital Carlos Haya de Málaga) y la Dra. María José Calasanz (Departamento de Genética. Universidad de Navarra).

En cuanto a la LAL, hemos analizado la metilación de 50 genes (genes implicados en distintas vías de señalización) en 300 muestras de pacientes con esta neoplasia y como conclusión podemos decir que la LAL se caracteriza por una inactivación simultánea de múltiples genes relacionados con el cáncer y que este fenotipo metilador establece distintos subgrupos en cuanto al pronóstico de esta enfermedad.

En el caso de la LMC, lo que hemos observado es que ocurre una hipometilación de regiones repetitivas del genoma (LINE-1, Alu...) y de promotores de genes específicos (HAGE-1, PRAME), y que esta hipometilación se asocia con una progresión de esta enfermedad.

Por último, en un estudio reciente en cuanto a la implicación de los miRNAs en la LMC, hemos observado una expresión diferencial de 10 miRNAs entre muestras de Médula Ósea de muestras de pacientes con LMC y muestras de donantes sanos.

.....

Lorena Di Lisio (CNIO), Madrid

Non Hodgkin lymphomas are a group of lymphoproliferative disorders characterized by multiple chromosomal aberrations. A noteworthy number of projects are now trying to better identify their clinical and genetical features.

In the last few years, a new type of non-coding small RNAs has been described, the microRNAs, which implication in cellular processes such as cell apoptosis, development, differentiation and cancer has been demonstrated. Moreover, microRNA profiling has been described as a useful tool for classifying cell lines, tissue cell origin and human tumors. Additionally, a growing number of microRNAs are being found to be deregulated in different types of lymphomas and other malignancies, in which they are thought to act as tumor suppressors inhibiting the expression of different oncogenes.

The objective of the work is to explore the miRNA expression profile in around 200 samples from lymphoma cases and normal samples using the miRNA microarray platform from Agilent Technologies. We will also study the gene expression profile and chromosomal status of these same samples using Agilent microarrays (gene expression and CGH) platforms.

In collaboration with the Spanish National Tumor Bank Network, we are collecting a series of 20 cases for the most common B-cell lymphomas, some healthy subjects and cell lines.

Since microarray technology for miRNAs is a recent application, it will be also performed qPCR with Applied Biosystems technology for validation.

So far, we have analyzed 19 MCL samples and 5 healthy controls with the three platforms. Taken together, MCL seems to combine a disease-specific miRNA signature that correlates

with different sets of genes whose expression is associated with this lymphoma. But, we still need to find an appropriate tool to analyze expression, CGH and microRNA profile together to obtain a correlation between all these data obtained with the three different platforms.

.....

Juan Torres lanzas Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia

Realizó una breve intervención en la que presentó la estructura del grupo clínico asistencial dividido en varias líneas:

- 1- Tumores Pulmonares y Mediastínicos
 - a. Aislamiento de células tumorales en sangre periférica en pacientes con cáncer de pulmón
 - b. Marcadores Tumorales en CP
 - c. VEGF y su receptor soluble en pacientes con cáncer de pulmón
 - d. Papel de las colinesterasas en el cáncer de pulmón
 - e. Banco de Tumores pulmonares con seguimiento clínico(LBA,T. Tumoral, T. Sano, Sangre y Suero)
 - f. PET
 - g. Investigación Clínica.

- 2- TGF-Beta
 - a. Detección de moléculas interactoras con los complejos activados por TGFbeta, Smad2/3/4, en diferentes líneas celulares y durante la transición epitelio mesénquima utilizando un ensayo proteómico de detección por cromatografía líquida y posterior secuenciación en tandem mediante Maldi-TOF
 - b. Detección de nuevas proteínas interactoras con Smad2 y Smad3 mediante un sistema de doble híbrido Cyto-trap utilizando librerías de expresión provenientes de pulmón adulto y fetal.
 - c. Estudio de modificaciones en las proteínas Smads por la actividad enzimática nuclear de Sirt1 y su posible efecto sobre la respuesta celular a TGFbeta.
 - d. Estudio dinámico de las moléculas que participan en la cascada de señalización de TGFbeta utilizando fusiones con diferentes proteínas fluorescentes (GFP; CFP; YFP; activated blue GFP, KAEDE).
 - e. Estudio de la implicación de la ruta de TGFbeta sobre la fibrosis hepática en un modelo de rata de fibrosis hepática inducido por ligadura de colédoco.
 - f. Estudio de la implicación de la ruta de activación de TGFbeta sobre el papel del óxido nítrico (NO) y del estrés oxidativo en la cirrosis hepática experimental.
 - g. Estudio del fosfoproteoma inducido por TGFβ durante la transformación tumoral.

- 3- Pez Cebra
 - a. Caracterizar los dos componentes de la telomerasa (zfTERT y zfTR) y la longitud telomérica a lo largo del ciclo de vida del animal.
 - b. Caracterizar el promotor de la telomera.
 - c. Generar animales transgénicos que expresen TERT fusionado a la proteína roja fluorescente (dsRED) bajo el control de promotores específicos de epitelios (K5) y linfocitos (rag2 y/o lck) con el fin de analizar in vivo los procesos de tumorigénesis inducida por carcinógenos (tanto la formación como la metástasis).
 - d. Escrutinio a gran escala de pequeñas moléculas en embriones que expresen la GFP bajo la dirección del promotor de zfTERT con el fin de identificar compuestos que activen o repriman la expresión de la telomerasa.
 - e. Los compuestos más interesantes serán posteriormente probados en el peces adultos y en modelos murinos en ensayos de tumorigenesis o en

- ensayos de envejecimiento según repriman o activen la telomerasa
- f. Realizar experimentos de mutagénesis analizando aquellas mutaciones que afecten positivamente o negativamente la expresión de la telomerasa. Se estudiarán para detectar nuevas dianas para el tratamiento del cáncer.

4- Cáncer de mama

Por otro lado ofertó para el resto de los grupos las muestras del Banco de tumores pulmonares con seguimiento clínico.

Africa García-Orad Carles Dpto. Genética (UPV/EHU) Leioa

Presentó el grupo de Trabajo en el que participa la universidad y 5 hospitales del País Vasco (Cruces, Basurto, Galdacano, Txagorritux, Santiago, Aranzazu) con un total de 15 investigadores.

Hizo especial hincapié en uno de los proyectos que realiza el grupo de la UPV en colaboración con el Clínic de Barcelona E Campos y el Hospital de Txagorritxu la Dra Mait e Ardanaz en el que se están estudiando las características genéticas de los individuos que pueden dar susceptibilidad a desarrollar Leucemia Linfática Crónica (LLC). El estudio se ha realizado en más de 700 pacientes y más de 700 controles. Los primeros análisis se han centrado en un gen de reparación del ADN, ATM por ser este un gen central en la reparación de las roturas del ADN y por presentar la ventaja, para el estudio, de que todo el gen se puede analizar como un bloque haplotípico. Resultados preliminares están sugiriendo que existen variantes de ATM que confieren una cierta susceptibilidad a desarrollar LLC.

Además de este proyecto se presentaron otros asociados a mecanismo de acción de nuevas drogas. Inhibidores de las desacetilasas de histonas en linfomas Hodgkin, que se está realizando en colaboración con JF Garcia del M. De Anderson y MA Piris y Margarita Sanchez Beato del CNIO y Mecanismo de acción de los inhibidores del proteosoma en colaboración con J. Gonzalez Castaño de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y otros más clínicos caracterización molecular, genética y epigenética y su implicación en el diagnóstico y tratamiento en Leucemias linfoblásticas agudas (UPV. , Hospital de cruces Dra A. Navajas, MA piñan A. Lopez) y en Carcinomas Difuso de Células grandes (H-. Aranzazu ,M. Vaquero; Galdacano I Zabalza)