UNIVERSITA' del SALENTO

Dip . di Scienze e Tecnologie Biologiche ed Ambientali

Fondazione Umberto Veronesi
PER IL PROGRESSO DELLE SCIENZE

# MiPEO

## *Mitochondria in Progression of Ephitelial Ovarian cancer*

## Il DNA mitocondriale: un nuovo approccio diagnostico e prognostico nel carcinoma ovarico

*Jesi, 8 Maggio 2014*

*II Giornata Internazionale Sensibilizzazione e Prevenzione Tumore Ovarico*

Flora Guerra
Ricercatore Fondazione
Umberto Veronesi

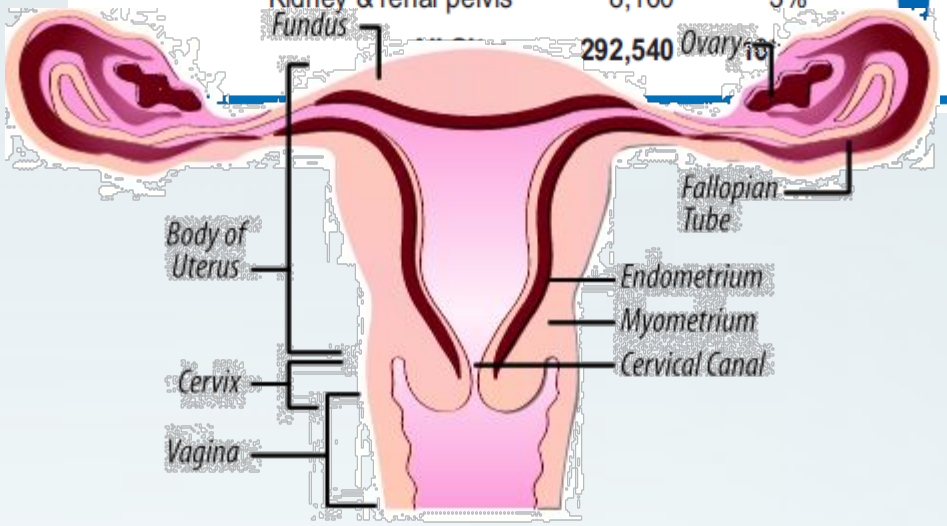
# MiPEO

*Mitochondria in Progression of Ephitelial Ovarian cancer*

## CARCINOMA OVARICO

Estimated Deaths

| Males | | | Females | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Lung & bronchus | 88,900 | 30% | Lung & bronchus | 70,490 | 26% |
| Prostate | 27,360 | 9% | Breast | 40,170 | 15% |
| Colon & rectum | 25,240 | 9% | Colon & rectum | 24,680 | 9% |
| Pancreas | 18,030 | 6% | Pancreas | 17,210 | 6% |
| Leukemia | 12,590 | 4% | Ovary | 14,600 | 5% |
| Liver & intrahepatic bile duct | 12,090 | 4% | Non-Hodgkin lymphoma | 9,670 | 4% |
| Esophagus | 11,490 | 4% | Leukemia | 9,280 | 3% |
| Urinary bladder | 10,180 | 3% | Uterine Corpus | 7,780 | 3% |
| Non-Hodgkin lymphoma | 9,830 | 3% | Liver & intrahepatic bile duct | 6,070 | 2% |
| Kidney & renal pelvis | 8,160 | 3% | Brain & other nervous system | 5,590 | 2% |
| | 292,540 | | **All Sites** | **269,800** | **100%** |




*(Jemal et al, Cancer Statistics 2009)*

# Epithelial Ovarian Cancer (EOC)

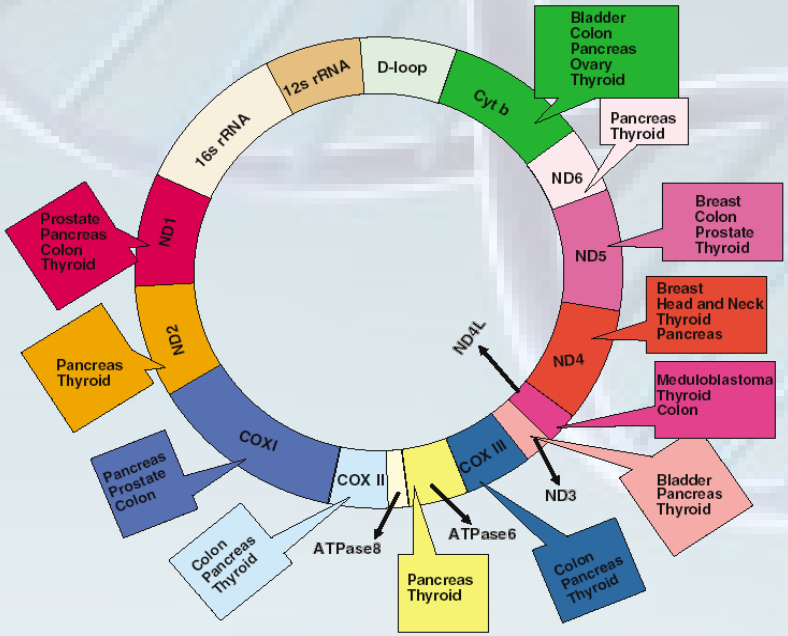
- Epiteliale (90%)
- Cellule germinali(5%)
- Stromale (4%)

**Tipo I:** sieroso a basso grado, endometroide a basso grado, a carcinoma a cellule chiare e mucinoso, genralmente indolente, presente allo stadio I.
**Tipo II:** sieroso ad alto grado, endometroide ad alto grado, carcinosarcomi e carcinomi indifferenziati. E' il più aggressivo ed presente negli stadi più avanzati.

- Età media di comparsa: 65 anni
- 75-80% delle pazienti presenta al momento della diagnosi carcinomi allo stadio III o IV dal momento che spesso è asintomatico e I pochi sintomi sono spesso confusi con altre patologie.

**INDIVIDUAZIONE DI FATTORI DIAGOSTICI E PROGNOSTICI**

# Caratteristiche dei Tumori




*(Chatterjee et al., 2006; Brandon, 2006)*

*(Hanahan and Weinberg, 2000).*

**Genetiche**: mutazioni del DNA mitocondriale

**Metaboliche**: assemblaggio delle subunità dei complessi, funzionalità della mitocondriale, alterazione dei meccanismi di trasporto etc..

# Progetto MiPEO

*Mitochondria in Progression of Epithelial Ovarian cancer*

- **La genotipizzazione del mtDNA per la definizione della natura metastatica in tumori endometriali ed ovarici diagnosticati simultaneamente: marker diagnostico**

- **Effetti delle mutazioni del mtDNA sull'attività mitocondriale post-chemio: marker prognostico**

# IL DNA MITOCONDRIALE COME MARKER DI DIAGNOSI (1)

Circa l'1-2% delle donne con neoplasie ginecologiche presenta due o più tumori simultanei primari indipendenti nel tratto genitale (Ayhan et al., 1992; Eisner et al., 1989; Tong et al., 2008).

Tumori sincroni dell'endometrio e dell'ovaio rappresentano circa il 50-70% di tutti i casi di neoplasia sincrona del tratto genitale femminile (Ayhan et al., 1992; Eisner et al., 1989; Tong et al., 2008).

## STRUMENTI DI DIAGNOSI:

- Parametri istologici e chirurgici;
- LOH di oncosoppressori;
- Analisi di ploidia;
- MSI;
- Espressione di β-catenina;
- Analisi di mutazioni in *P53*, *K-RAS*, *PTEN* e *CTNNB1*.

*Singh, Histopathology, 2010*

Contents lists available at ScienceDirect

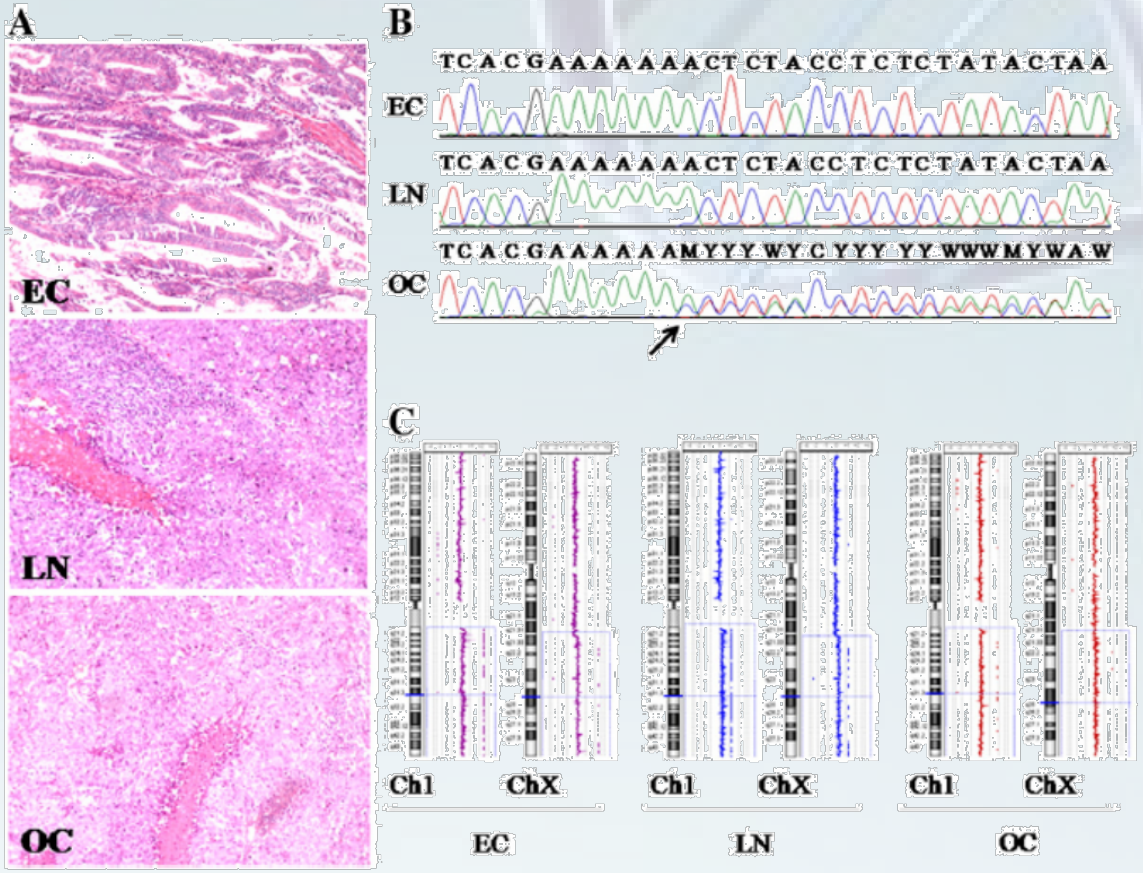
Gynecologic Oncology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ygyno

Case Report

# Mitochondrial DNA genotyping reveals synchronous nature of simultaneously detected endometrial and ovarian cancers

Flora Guerra [a,1], Ivana Kurelac [a,1], Pamela Magini [a], Antonella Cormio [b], Donatella Santini [c], Claudio Ceccarelli [c], Giuseppe Gasparre [a,*]

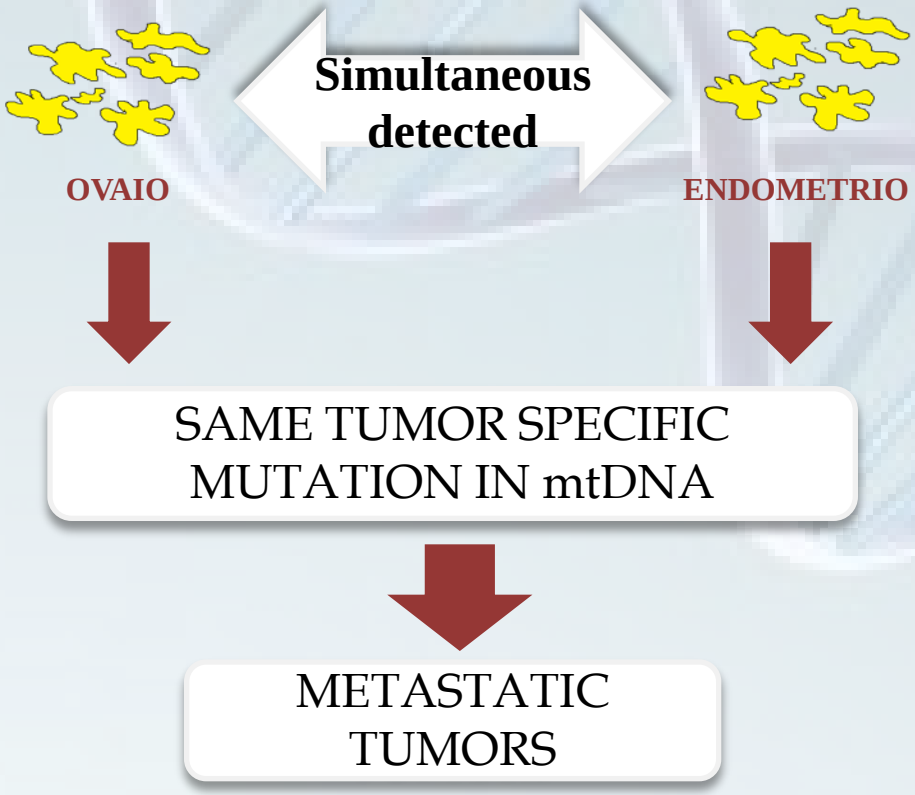



- La localizzazione per la β-catenina è risultata eterogenea per il EC e nucleare per il OC ed il LN;
- La genotipizzazione per PTEN, K-RAS e TP53 non è risultata informativa;
- La **genotipizzazione del DNA mitocondriale** è uno strumento più economico, ma ugualmente efficace al aCGH, quando informativo!

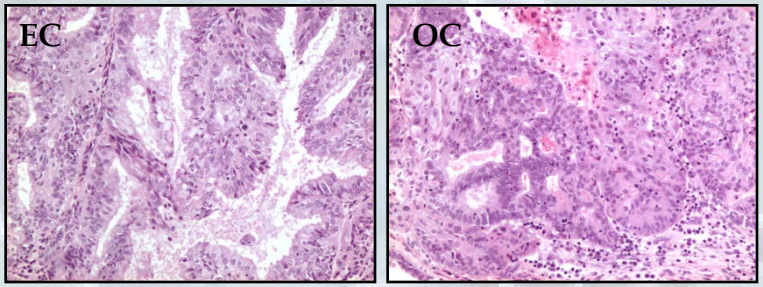
# La genotipizzazione del mtDNA rivela la clonalità di carcinomi endometriali ed ovarici sincroni

Le mutazioni somatiche del mtDNA sono eventi estremamente comuni nei carcinomi umani (Brandon, 2006)

L'individuazione di mutazioni somatiche mitocondriali nel carcinoma endometriale ed ovarico di una stessa paziente potrebbe essere considerato un marker inequivocabile di clonalità delle due lesioni neoplastiche dal momento che è virtualmente impossibile che una stessa mutazione possa comparire in due tumori indipendenti



# IL DNA MITOCONDRIALE COME MARKER DI DIAGNOSI (1)




Caso S7: Carcinomi ovarico ed endometriale indipendenti

Diagnosi Istologica:

- 5/11 (45.5%) sospetta sincronia (S1, S5, S7, S9 e S11)
- 5/11 (45.5%) sospetta metastatizzazione (S3, S4, S6, S8 e S10)
- 1/11 (9%) impossibilità di effettuare la diagnosi (S2).

**Table 1. Pathological stage based on Scully's criteria**

| *Patients* | *Age* | *OC FIGO stage* | *EC FIGO stage* | *OC Histology* | *EC Histology* | *S/M (final diagnosis)* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| S1 | 50 | IIIC | IIA | E G2 | E G2 | S |
| S2 | 57 | IIIB | IB | U G3 | U G3 | UN |
| S3 | 70 | - | IIIC | U G3 | U G3 | M (primary EC) |
| S4 | 52 | - | IIA | CC | CC | M (primary EC) |
| S5 | 58 | IC | IB | E G1 | E G1 | S |
| S6 | 59 | - | IIIC | SP G3 | SP G3 | M (primary EC) |
| S7 | 54 | IB | IB | E G1 | E G1 | S |
| S8 | 55 | IIIB | - | E G2 | E G2 | M (primary OC) |
| S9 | 49 | IC | IB | M | E G2 | S |
| S10 | 70 | IIIC | - | CC | CC | M (primary OC) |
| S11 | 40 | IIC | IB | SP | SP | S |

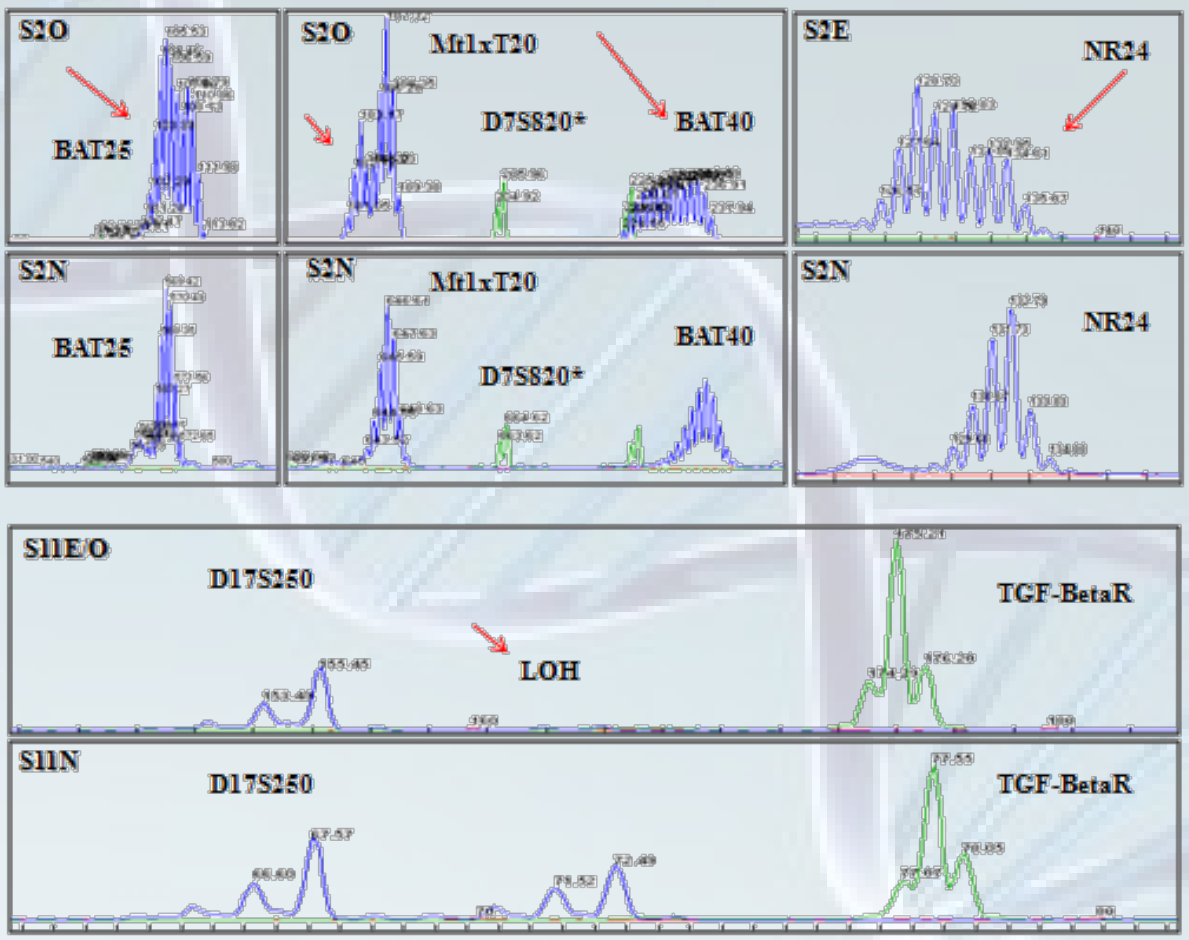
Abbreviations: OC= Ovarian Cancer, EC= Endometrial Cancer, S= Synchronous, M=Metastatic, E= Endometriod, G= Grade, U= Undifferentiated, SP= Serous Papillary, M= Mucinous, CC= Clear Cells.

*Guerra F et al., 2014, Modern Pathology*

# IL DNA MITOCONDRIALE COME MARKER DI DIAGNOSI (1)

**Sincrono**

**Metastatico**

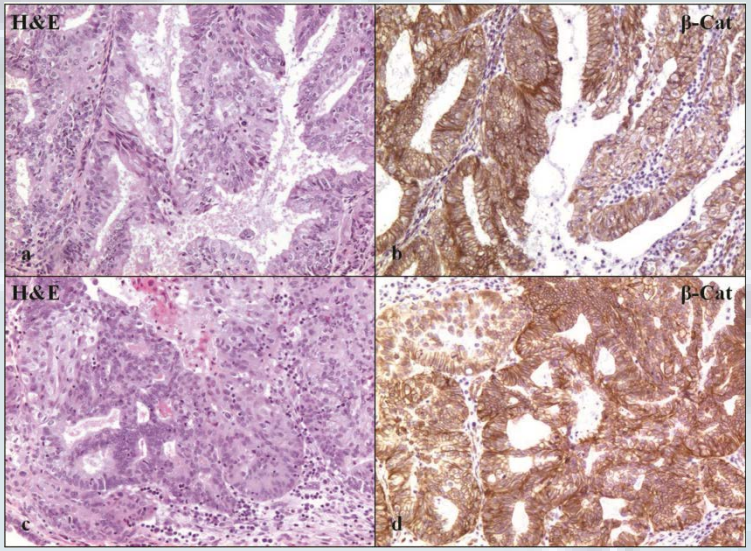



Analisi di instabilità dei microsatelliti:

- 9/11 (82%) MSS;
- 2/11 (18%) MSI (S2 and S11).

*Guerra F et al., 2014, Modern Pathology, In press*

# IL DNA MITOCONDRIALE COME MARKER DI DIAGNOSI (1)




Caso S7: Carcinomi ovarico ed endometriale indipendenti (H&E), ma la localizzazione di membrana per la la β-catenina è presente in entrambi i tumori.

Analisi IHC per la β-catenina:

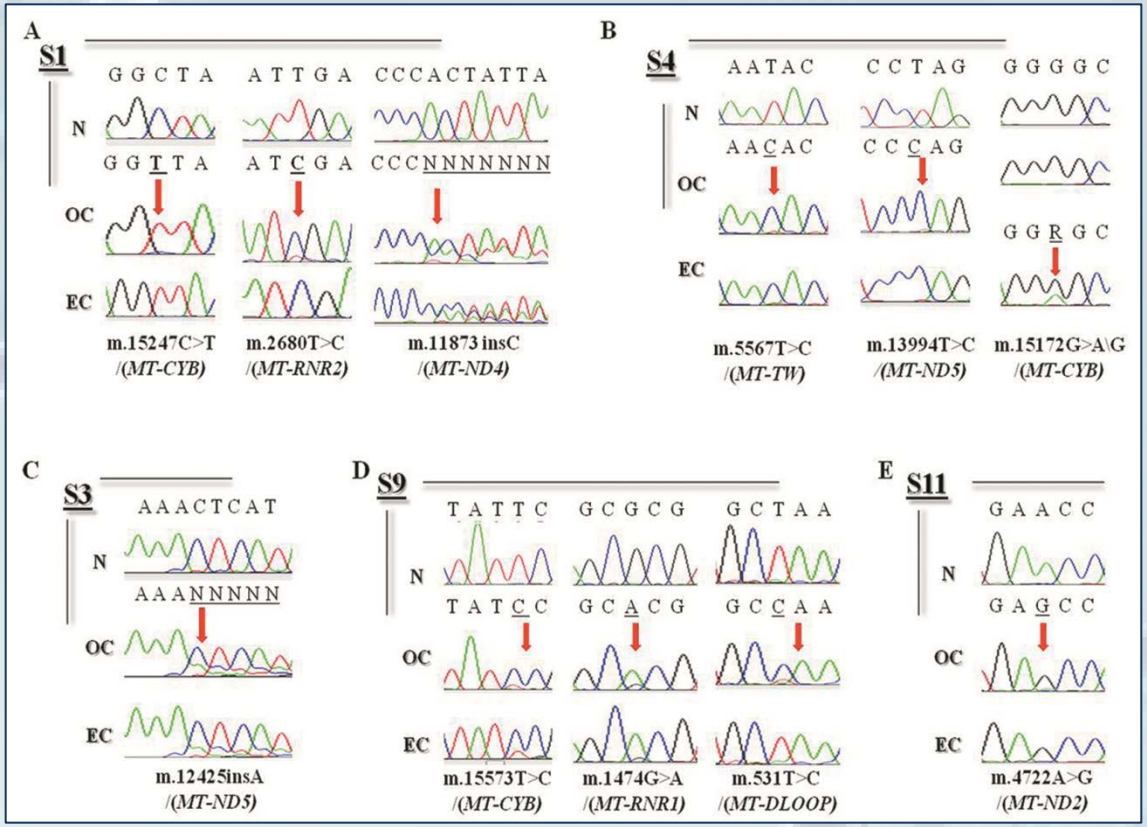
- 5 casi (45.5%) identica ed omogenea localizzazione di tipo membranoso in entrambi i campioni di EC ed OC, tumori metastatici;
- Negli altri 6 casi, data la localizzazione eterogenea, l'analisi non è stata informativa.

Localizzazione nucleare e/o mutazioni della *CTNNB1* sono correlate alla diagnosi di sincronia, mentre una localizzazione nucleare e l'assenza di mutazioni alla metastatizzazione *(Irving et al, Hum Pathol, 2005)*.
Correlazione fra **i pattern di IHC della β-catenina** e le **mutazioni tumore specifiche in *CTNNB1***

La combinazione dei due metodi è risultata informativa nel 54% dei casi

Abbiamo individuato **mutazioni tumore-specifiche di *CTNNB1*** in 4 casi. Per 3 casi è stata identificata la stessa mutazione somatica in entrambi i tumori endometriale ed ovarico, ma la localizzazione della β-catenia è risultata eterogenea e poco chiara. In un caso , S2 è stata trovata la mutazione solo nel carcinoma endometriale con una localizzazione nucleare omogena della β-catenina per cui è stato supposto che si trattasse di un tumore sincrono

# IL DNA MITOCONDRIALE COME MARKER DI DIAGNOSI (1)




Le pazienti S1, S3, S4, S9 e S11 con mutazioni del mtDNA tumore-specifiche sono affette dalla patologia neoplastica metastatizzante. Il sequenziamento del **mtDNA è risultato informativo nel 45%** dei casi.

Nei casi S1, S9 ed S11 la diagnosi per screening del mtDNA è in contrasto con la diagnosi istopatologica.

# Concludendo.....

| Samples | Tissue | Histopatological diagnosis | β-catenin localization | CTNNB1 mutations | MSI | Molecular diagnosis | MtDNA mutations | Gene | Het | mtDNA diagnosis |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| S1 | EC | S | M | c.100G>A | - | UN | m.11873insC | *MT-ND4* | Y | M |
| | | | | | | | m.15247C>T | *MT-CYB* | N | |
| | OC | | NM | | - | | m.2680T>C | *MT-RNR2* | Y | |
| S2 | EC | UN | N | c.101G>A | MSI-L | S | - | - | | UN |
| | OC | | NM | - | MSI-H | | | | | |
| S3 | EC | M | M | - | - | M | m.12425insA | *MT-ND5* | Y | M |
| | OC | | M | - | - | | | | | |
| S4 | EC | M | M | - | - | M | m.5567T>C | *MT-TW* | Y | M |
| | OC | | M | - | - | | m.13994T>C | *MT-ND5* | Y | |
| S5 | EC | S | NM | - | - | UN | - | - | | UN |
| | OC | | M | - | - | | | | | |
| S6 | EC | M | NM | - | - | UN | - | - | | UN |
| | OC | | M | - | - | | | | | |
| S7 | EC | S | M | - | - | M | - | - | | UN |
| | OC | | M | - | | | | | | |
| S8 | EC | M | NM | | - | UN | - | - | | UN |
| | OC | | NM | c.101G>A | - | | | | | |
| S9 | EC | S | NM | c.104T>G | - | UN | m.1474G>A | *MT-RNR1* | Y | M |
| | OC | | NM | | - | | m.15573T>C | *MT-CYB* | Y | |
| S10 | EC | M | M | - | - | M | - | - | | UN |
| | OC | | M | - | - | | | | | |
| S11 | EC | S | M | - | LOH | M | m.4722A>G | *MT-ND2* | Y | M |
| | OC | | M | - | | | | | | |

# Progetto MiPEO

*Mitochondria in Progression of Epithelial Ovarian cancer*

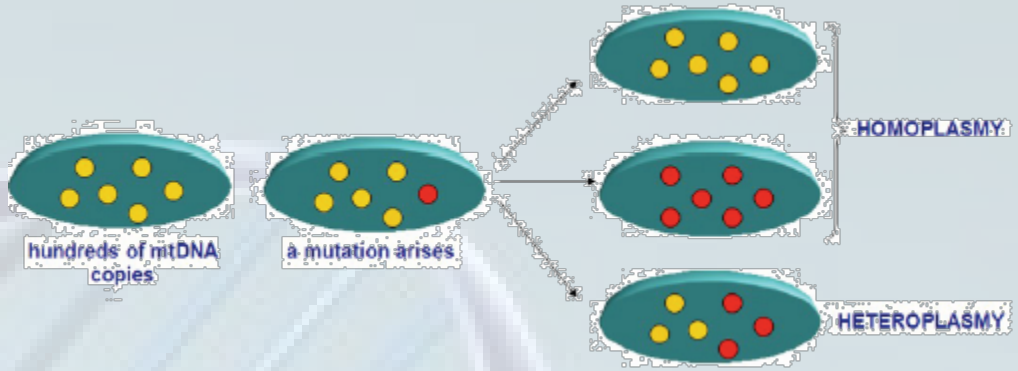
- **La genotipizzazione del mtDNA per la definizione della natura metastatica in tumori endometriali ed ovarici diagnosticati simultaneamente: marker diagnostico**

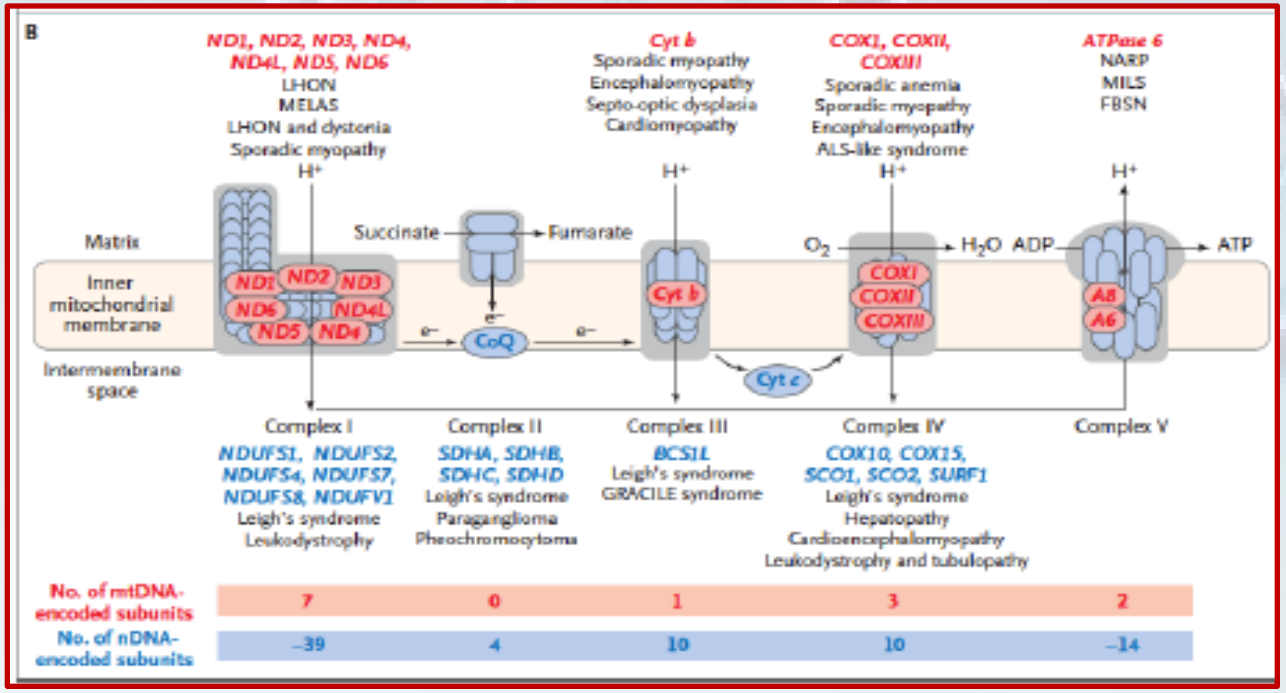
- **Effetti delle mutazioni del mtDNA sull'attività mitocondriale post-chemio: marker prognostico**

Fondazione Umberto Veronesi
PER IL PROGRESSO DELLE SCIENZE

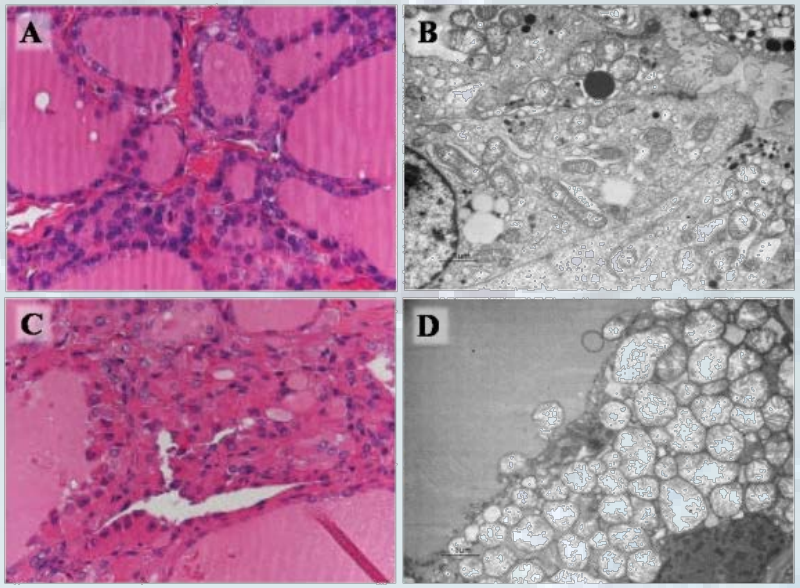
# Progetto MiPEO

## *Mitochondria in Progression of Epithelial Ovarian cancer*



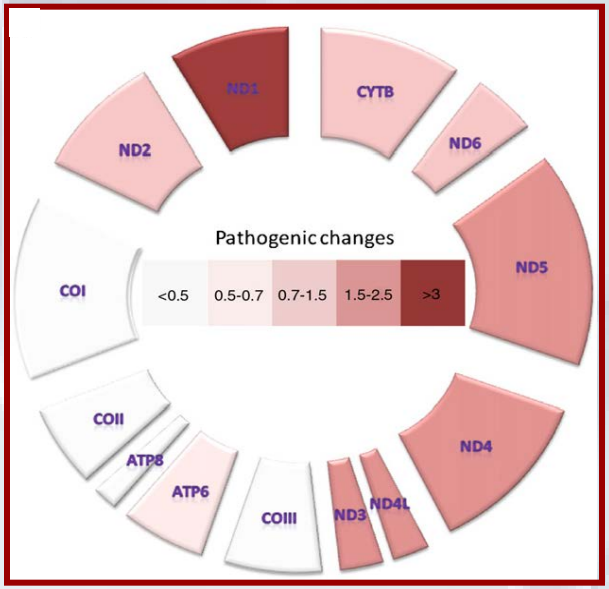



# GLI ONCOCITOMI




- Aberrante iperplasia mitocondriale;
- Riconoscibili da un' intensa colorazione in ematossilina/eosina;
- Generalmente poso aggressivi e poco proliferanti;
- Si manifestano negli epiteli di organi endocrini;

- Mutazioni *distruttive* del mtDNA, in particolare del Complesso I, possono essere considerate univocamente marker di fenotipo oncocitico.




*Gasparre G. et al, PNAS, 2007*

# IL DNA MITOCONDRIALE COME MARKER DI PROGNOSI (2)

Mutazioni omoplasmiche distruttive del CI

↓

Disassemblaggio del CI

↓

↑NADH

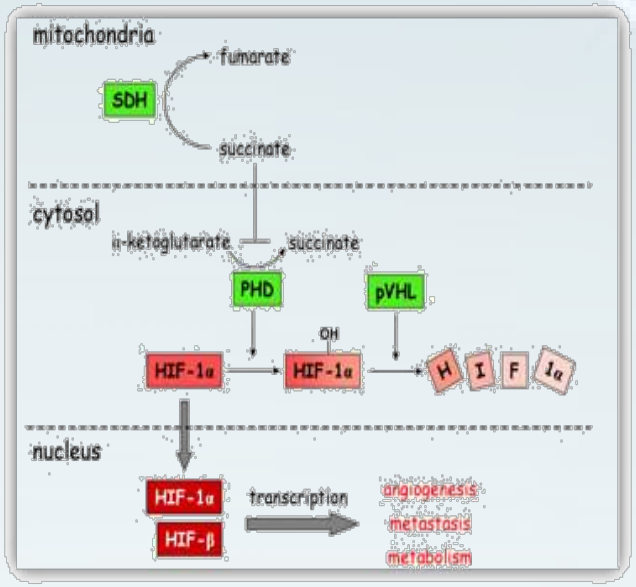
↓ ⊕

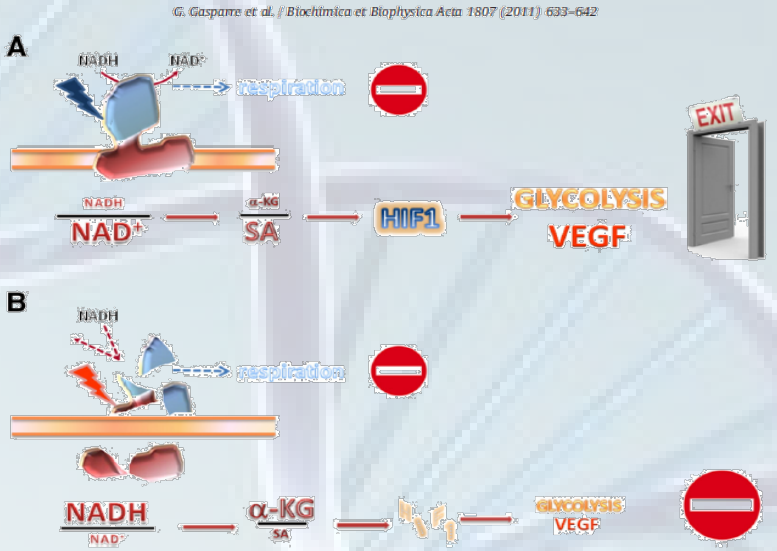
HMG Advance Access published January 18, 2010

*Human Molecular Genetics, 2010* 1–14
*doi:10.1093/hmg/ddp566*

## The genetic and metabolic signature of oncocytic transformation implicates HIF1α destabilization

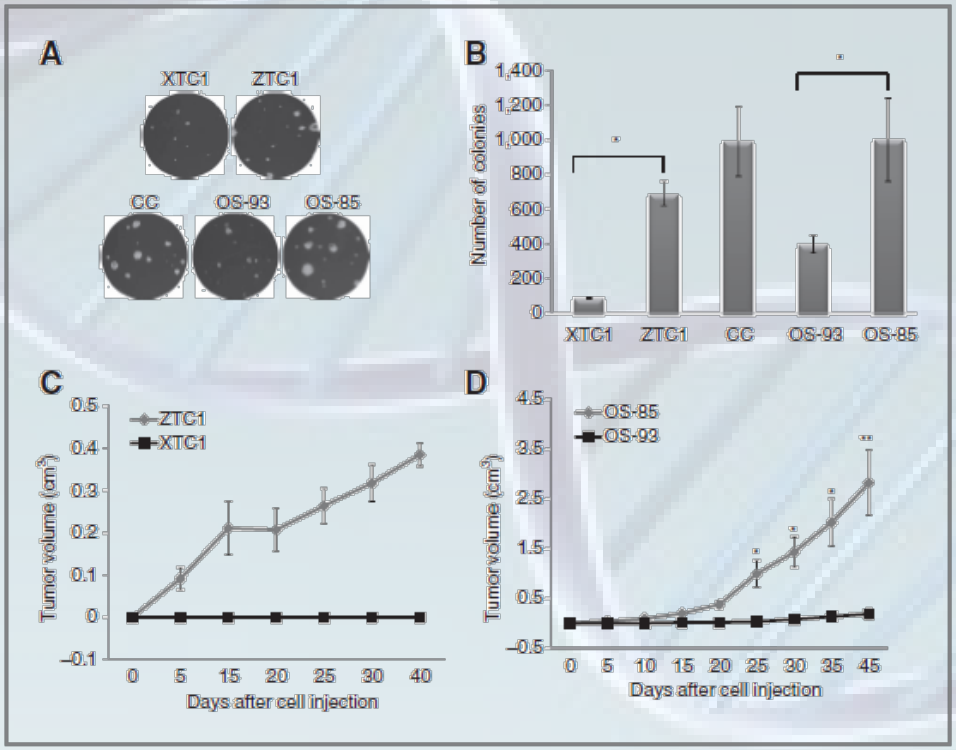
Anna Maria Porcelli[1], Anna Ghelli[1], Claudio Ceccarelli[2], Martin Lang[3], Giovanna Cenacchi[2], Mariantonietta Capristo[1], Lucia Fiammetta Pennisi[3], Isabella Morra[4], Enrica Ciccarelli[5], Antonio Melcarne[6], Anna Bartoletti-Stella[3], Nunzio Salfi[2], Giovanni Tallini[7], Andrea Martinuzzi[8], Valerio Carelli[9], Marcella Attimonelli[10], Michela Rugolo[1], Giovanni Romeo[3,*] and Giuseppe Gasparre[3,10]

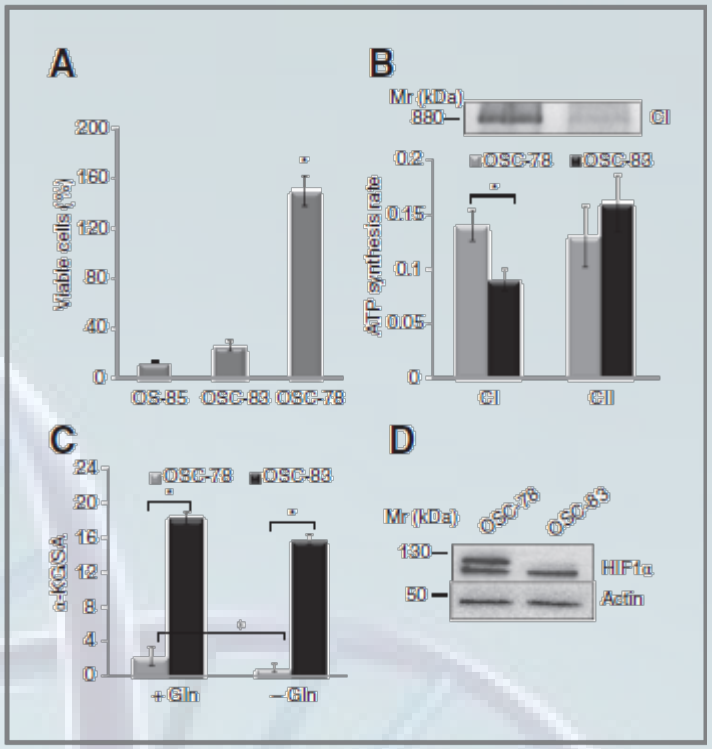


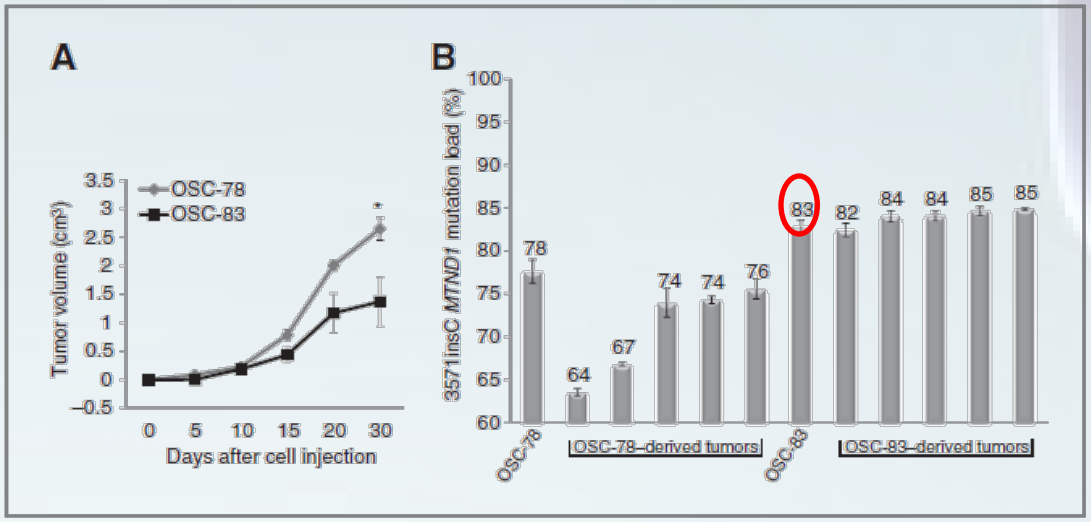




**Mutazioni omoplasmiche distruttive mitocondriali svolgono un' azione anti-proliferativa tumorale**

# ONCOGIANO



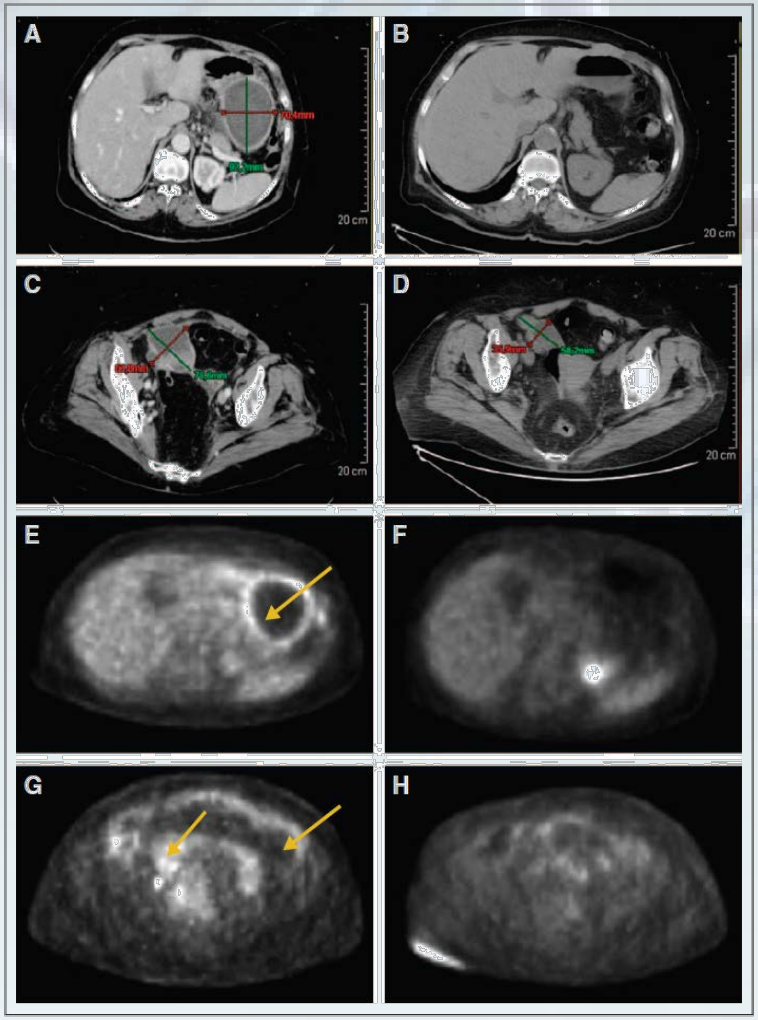




**Gene a codifica mitocondriale che mutato sopra-soglia ha effetto antiproliferativo sulla massa tumorale**

*Gasparre G. et al, Cancer Res, 2012*

# Associazione della benignità: *Oncogiano in vivo*

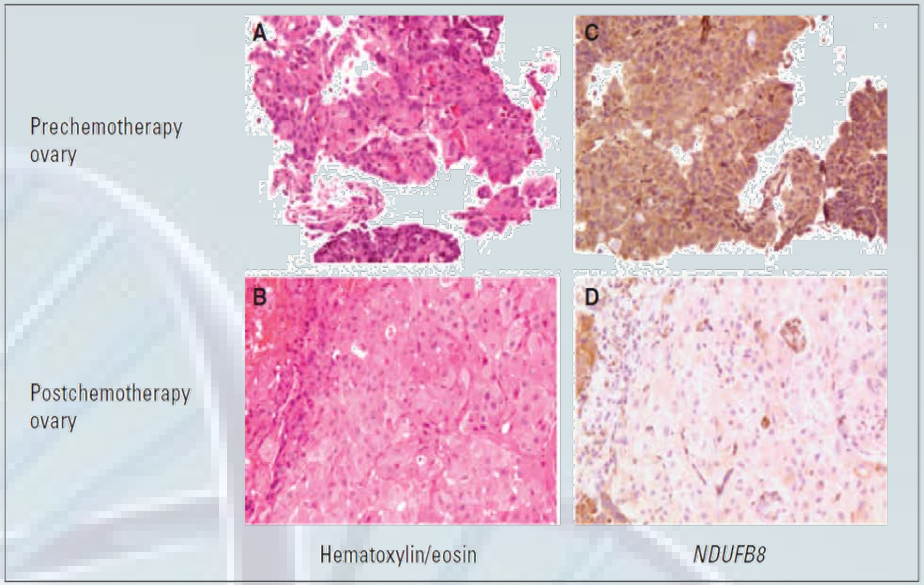



Gastric mass

Pelvic masses

Gastric mass

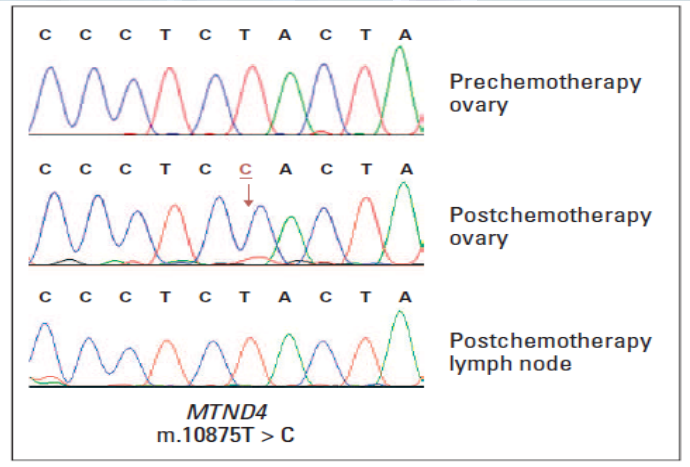
Pelvic masses

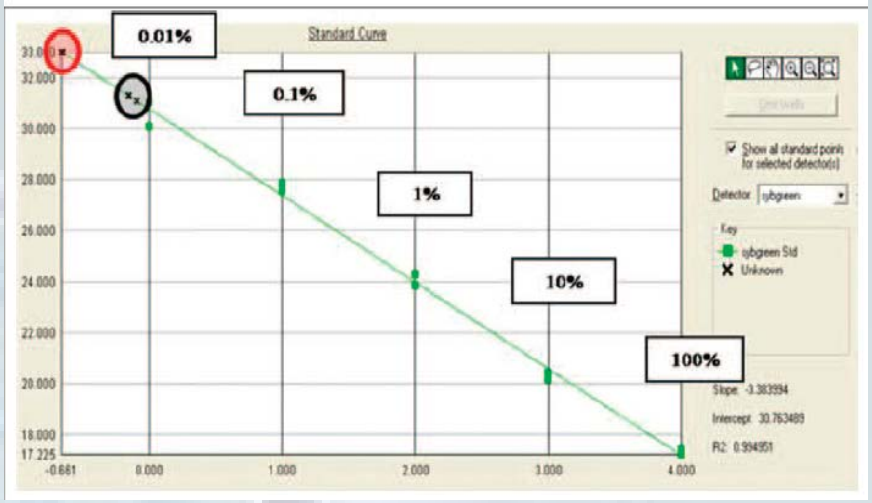


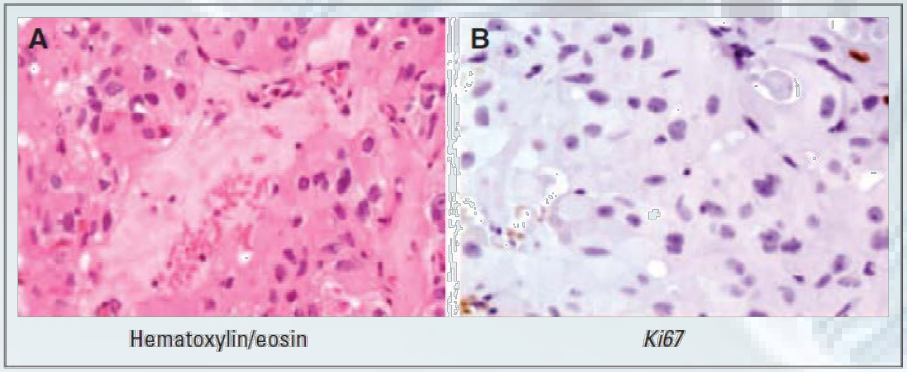

- Dopo la chemioterapia combinata carboplatino/paclitaxel la massa residua è oncocitica

*Guerra F. et al., JCO, 2012*

# Associazione della benignità *in vivo*




- Mutazioni del mtDNA potrebbero essere implicate nella chemioresistenza;
- Quando distruggono il CI potrebbero conferire caratteristiche di benignità alle recidive!

*Guerra F. et al., JCO, 2012*

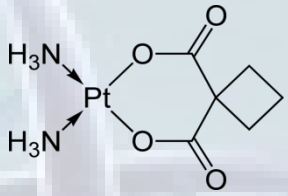
# Protocollo clinico

Diagnostic laparoscopy

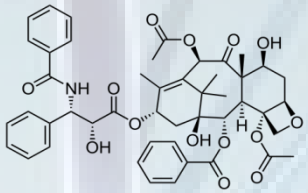
Cytoreductive surgery

Adjuvant chemotherapy

Epitelial ovarian cancer (EOC)




CARBOPLATIN




PACLITAXEL

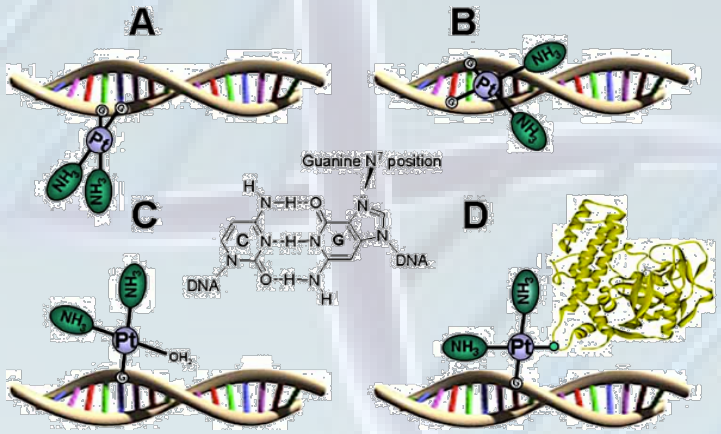
Diagnostic laparoscopy

Neoadjuvant chemotherapy

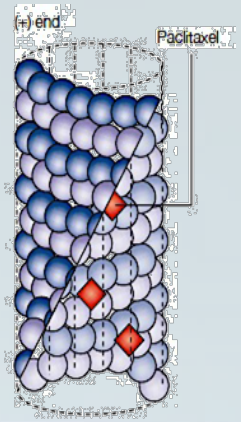
Surgery

# Meccanismi d' azione

## CISPLATINO




## PACLITAXEL




**Cisplatin Preferentially Binds Mitochondrial DNA and Voltage-Dependent Anion Channel Protein in the Mitochondrial Membrane of Head and Neck Squamous Cell**

[CANCER RESEARCH 52, 1895–1901, April 1, 1992]

**Mitochondri**
**Ovarian Car**

**Paul A. Andrews**
*Department of Pharmac*

*Neurobiol Dis.* 2011 March ; 41(3): 661–668. doi:10.1016/j.nbd.2010.11.017.

**Cisplatin induced Mitochondrial DNA Damage In Dorsal Root Ganglion Neurons**

**Jewel L. Podratz, Andrew M. Knight, Lauren E. Ta, Nathan P. Staff, Jennifer M. Gass, Konstantin Genelin, Alexander Schlattau, Liselle Lathroum**, and **Anthony J. Windebank***
Department of Neurology, Mayo Clinic College of Medicine, Mayo Clinic, Rochester, MN USA

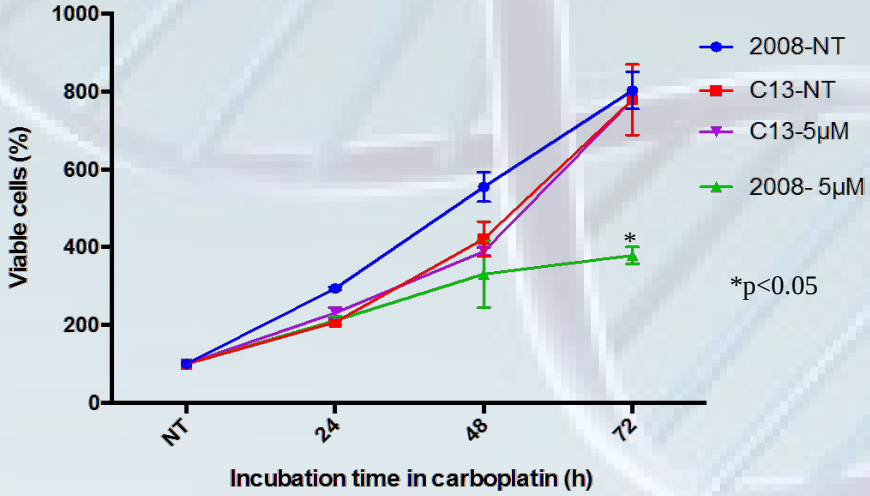
| SAMPLE | POST-CHEM | MUTATION | AA MUTATION | GENE | PSIC | HETEROPLASMY | SOMATIC MUTATION | DATABASE |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| EOC1 | Y | T15958C | | *MT-TP* | | Y | N | Frequent |
| | | C4904A | I145M | *MT-ND2* | 0.272 | N | N | Novel |
| EOC2 | Y | | | | | | | |
| EOC3 | Y | | | | | | | |
| EOC4 | Y | | | | | | | |
| EOC5 | N | G3380A | R25Q | *MT-ND1* | 1.000 | Y | Y | HmtDB-rare |
| | | T5814C | | *MT-TC* | | Y | Y | HmtDB-rare |
| | | T8412C | M16T | *MT-ATP8* | 0.711 | N | N | |
| EOC6 | Y | T14514C | V55M | *MT-ND6* | 0.067 | N | N | HmtDB rare |
| EOC7 | Y | A12950C | N205T | *MT-ND5* | 0.527 | N | | Frequent |
| | | G14831A | L29S | *MT-ATP8* | 0.994 | N | | Novel |
| EOC8 | N | T15029C | F95L | *MT-CYB* | 0.658 | N | N | Novel |
| | | C6489A | L196I | *MT-COI* | 0.990 | N | N | HmtDB Unfreq dis assoc |
| | | A11873C | T372P | *MT-ND4* | 0.999 | N | Y | Novel |
| EOC9 | Y | | | | | | | |
| EOC10 | N | G14831A | A29T | *MT-CYB* | 0.000 | N | Y | HmtDB-rare |
| | | C7868T | L95F | *MT-COII* | 0.000 | N | N | HmtDB RareLHON assoc |
| EOC11 | Y | | | | | | | |
| EOC12 | Y | G13810A | A492T | *MT-ND5* | 0.000 | N | N | HmtDB-rare |
| EOC13 | N | G8514A | E52K | *MT-ATP8* | 0.995 | N | N | HmtDB-rare |
| EOC14 | Y | T6121Y | I73T | *MT-COI* | 0.998 | Y | Y | Novel |
| EOC15 | Y | | | | | | | |
| EOC16 | | A12599G | M88T | *MT-ND5* | 0.000 | N | N | HmtDB-rare |
| | | G9837R | G211S | *MT-COIII* | 1.000 | Y | Y | Novel |
| EOC17 | | | | | | | | |
| EOC18 | Y | | | | | | | |
| EOC19 | N | | | | | | | |
| EOC20 | N | C10696T | A76V | *MT-ND4L* | 0.964 | N | Y | Novel |
| | | T15255C | V170A | *MT-CYB* | 0.995 | Y | Y | |
| EOC21 | Y | A15974G | | *MT-TP* | | Y | Y | |
| EOC22 | N | | | | | | | |
| EOC23 | N | C15315T | A190T | *MT-CYB* | 0.206 | Y | N | HmtDB -rare |
| | | A12961G | S209G | *MT-ND5* | 0.092 | N | N | HmtDB -rare |
| EOC24 | | | | | | | | |
| EOC25 | | 12241 delC | | *MT-TS* | | N | N | Novel |
| EOC26 | Y | | | | | | | |
| EOC27 | Y | G6261A | A120T | *MT-COI* | 0.998 | N | N | HmtDB Unfreq dis assoc |
| EOC28 | Y | C4640A | I57M | *MT-ND2* | 0.934 | N | N | HmtDB Unfreq LHON assoc |
| | | A10446G | | *MT-TR* | | N | N | HmtDB-very rare |
| EOC29 | | | | | | | | |
| EOC30 | Y | | | | | | | |

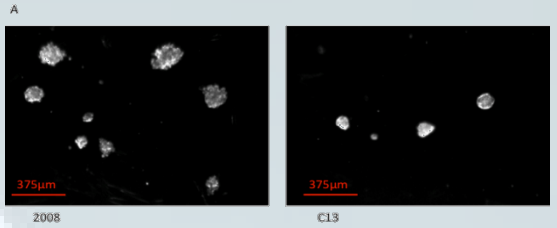
# Screening di mutazioni nel mtDNA *ex vivo*

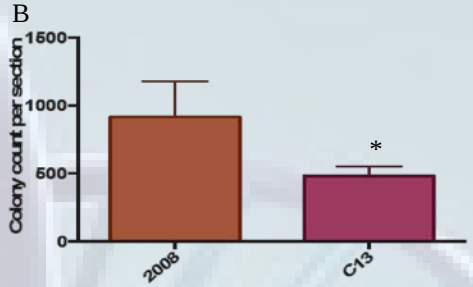
| Sample | Base change | Amino Acid Change | MT-Gene | Het., | DB | Human NT Site Variability Normal | Human NT Site Variability Patient | PSIC/ΔG |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| EOC5 | G3380A | R25Q | *ND1* | + | HmtDB | 0.0 | 0.0 | 1 |
| | T5814C | N/A | *TC* | + | HmtDB | 0.011 | 0.0 | From -18.10 to -18.40 Kcal/mol |
| EOC8 | 11873insC | 372X | *ND4* | + | Novel | | | - |
| EOC10 | G14831A | A29T | *CYB* | - | HmtDB | 0.012 | 0.007 | - |
| EOC14 | T6121C | 173T | *COI* | + | Novel | | | 0.998 |
| EOC16 | G9837A | G211S | *COIII* | + | Novel | | | 1 |
| EOC20 | C10696T | A76V | *ND4L* | - | Novel | | | 0.964 |
| | T15255C | V170A | *CYB* | + | Novel | | | 0.995 |
| EOC21 | A15974G | N/A | *TP* | + | HmtDB | 0.00027 | 0 | From -18.70 to -18.50Kcal/mol |

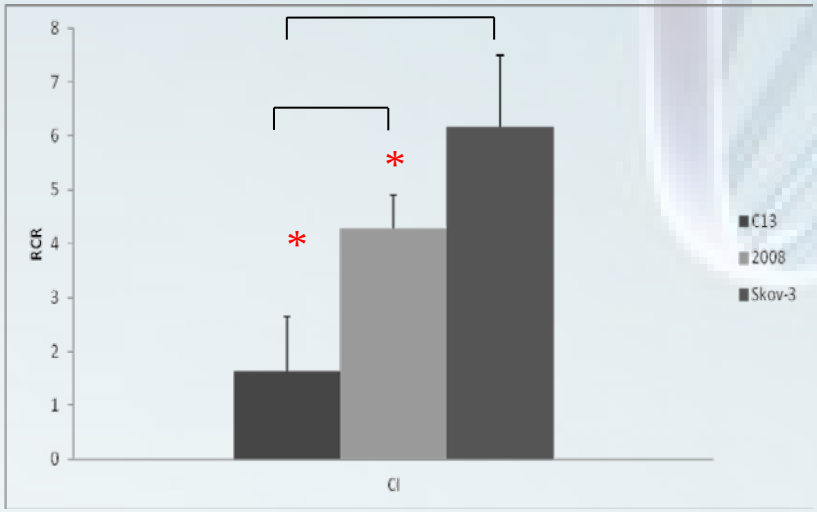
# Studio *in vitro*

La linea cellulare **2008** è stata ottenuta da una paziente con cistiadenoma ovarico sieroso, mentre la linea cellulare chemioresistente, **C13**, è stata ottenuta dopo 13 mesi di selezione con il cisplatino.



# GRAZIE PER L'ATTENZIONE……

Fondazione Umberto Veronesi
PER IL PROGRESSO DELLE SCIENZE

FIDAPA - BPW Italy

ROTARACT CLUB JESI

DiSTeBA, UNIVERSITA' DEL SALENTO
Prof. Vincenzo Zara
Dr. Alessandra Ferramosca
Dr. Annalea Conte

OSPEDALE Vito Fazzi, Lecce
Dr. Graziana Ronzino
Dr. Andrea Tinelli

U.O. GENETICA MEDICA, POL. S.ORSOLA-MALPIGHI (BO)
Dr. Giuseppe Gasparre
Dr. Giulia Girolimetti
Dr. Ivana Kurelac
Dr. Maria Antonietta Calvaruso

DIP. DI ANATOMIA PATOLOGICA, POL. S.ORSOLA-MALPIGHI (BO)
Dr. ssa Donatella Santini
Dr. Claudio Ceccarelli

SSD DI ONCOLOGIA GINECOLOGICA, POL. S.ORSOLA-MALPIGHI (BO)
Dr. Pierandrea Deiaco
Dr.ssa Anna Myriam Perrone
Dr.ssa Martina Procaccini

IRCSS, ISTITUTO IN TECNOLOGIE AVANZATE E MODELLI ASSISTENZIALI IN ONCOLOGIA, ARCISPEDALE SANTA MARIA NUOVA (RE)
Dr. Martino Abrate
Dr. Dario Vincenzo Mandato

UNIVERSITA' DI TORINO, LABORATORIO DI IMMUNOGENETICA
Prof.ssa Ada Funaro
Dr.ssa Rossella Parrotta
Dr.ssa Simona Morone