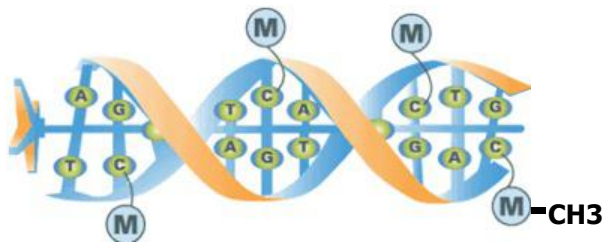




Webinar GISCi

Focus sui Biomarcatori: stato della ricerca, approfondimenti e prospettive per la possibile introduzione nei protocolli di screening cervicale

Ruolo della Metilazione di HPV



Anna Gillio Tos

Torino

Il sottoscritto GILLIO TOS ANNA

ai sensi dell'art. 3.3 sul Conflitto di Interessi, pag. 17 del Reg. Applicativo dell'Accordo Stato-Regione del 5 novembre 2009,

dichiara

X *che negli ultimi due anni NON ha avuto rapporti diretti di finanziamento con soggetti portatori di interessi commerciali in campo sanitario*

che negli ultimi due anni ha avuto rapporti diretti di finanziamento con i seguenti soggetti portatori di interessi commerciali in campo sanitario:

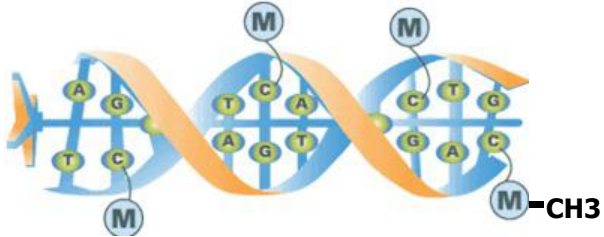
-
-
-



Webinar GISCI

Focus sui Biomarcatori: stato della ricerca, approfondimenti e prospettive per la possibile introduzione nei protocolli di screening cervicale

Ruolo della Metilazione di HPV



Anna Gillio Tos

Torino

Meccanismo

Processo biochimico **FISIOLOGICO** con trasferimento di un **Metile (-CH₃)** su **Citosina** appaiata a **Guanina** (dinucleotidi **CpG** del DNA spesso addensati in isole CpG)

Trasferimento ad opera fam. di enzimi : **DNA Metiltransferasi**

Effetti

Si crea **ingombro sterico**, che impedisce legami con fattori: ad esempio fattori di trascrizione del DNA

REGOLAZIONE QUANTITATIVA dell'**espressione genica**

→ controllo della produzione di una proteina

→ blocco trascrizione, **Silenziamento Genico**

Se il gene non è trascritto, non si ha produzione della proteina

→ Controllo Oncogeni, seq. non codificanti, trasposoni

Metilazione Genica come Biomarcatore Tumorale

Metilazione del DNA → siti CpG, isole CpG

- processo fisiologico
- disregolazione → **metilazione aberrante**

Koch et al. REVIEW **14.700**
Nat Rev Clin Oncol 2018 pubblicazioni

IPER metilazione
IPO metilazione

aumento del rischio
trasformazione
neoplastica

↓
Biomarcatore di progressione

Dove può servire un Biomarcatore di progressione in ambito cervice uterina



Triage HPV pos, Persistenza, II Livello, Autoprelievo

Lorincz A
Acta Cytologica 2016

Cervice uterina: più di **100 geni umani** proposti come biomarcatori tumorali se **iper-metilati**

Nuovi geni vengono studiati e proposti ogni anno con l'aumentare degli approcci di "quasi-genomica"

Feng C et al
Int J Genomics 2018

Nessun singolo gene umano iper-metilato ha raggiunto livelli di Sensibilità e Specificità adeguati comparabili a citologia

Metilazione Genica come Biomarcatore Tum Cervice

Aumento sensibilità e specificità attraverso **panel di geni, tante CpG, analisi genomiche (NGS)**

S5 classifier

Score basato su livelli metilazione in Pyroseq

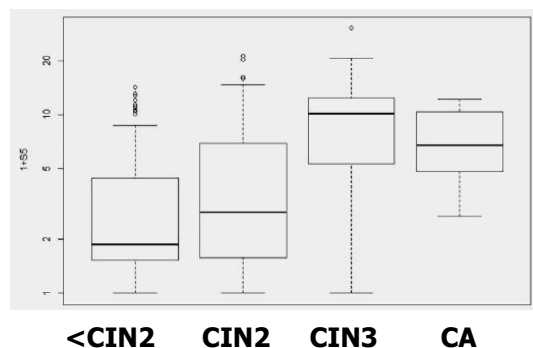
EPB41L3
HPV16 L1, L2
HPV18 L2
HPV31 L1
HPV33 L2

*Louvanto,...Lorincz
Int J Cancer 2014*

*Lorincz et al
Int J Cancer 2016*

*Cook, ...Lorincz
Int J Cancer 2019*

*Louvanto,...Lorincz
Clin Inf Dis 2019*



*AUC per CIN3
0.83
(0.75-0.90)*

Requisiti analitici ideali

Le analisi dovrebbero essere :

- **semplici** (non troppi step per esito)
- ad interpretazione **NON soggettiva**
- effettuabili su **diversi tipi di campione** biol.
- implementabili in piattaf. **high throughput**
- **riproducibili** in laboratori diversi
- con **costi sostenibili**

Analisi complessa, richiede step multipli

Metilazione Genica – Geni Umani

Cervice

Test di metilazione commerciali per lesioni cervice uterina: pochissimi

Schmitz et al.
BMC Cancer 2018

G. assay (Germany) - Test in Real Time PCR (Q-MSP)
geni ASTN1, DLX1, ITGA4, RXFP3, SOX17, e ZNF671
Sensib CIN3 61.2% (< **citologia triage**) , Specific CIN3+ 94.6%

De Strooper et al.
Int J Cancer 2018

Q. Test (Germany) - Test in Real Time PCR(Q-MSP)
geni FAM19A4/miR124-2

Kremer et al.
BMJ Open 2019

Donne >30aa **negative** alla metilazione di FAM19A4/miR124-2: incidenza cumulativa di **CIN3+** a 14 anni FU **pari a cito** triage negative

Dick et al.
Gynecol Oncol 2019

Donne >30aa **positive** alla metilazione: **Sensibilità 88%** per CIN3+, pari **a cito**

Leeman, Quint et al.
Cancer Med 2020

| Popolazione Studio | Outcome CIN3 | Rischio CIN3 |
|-----------------------|-----------------|---|
| 376 donne (età 15-47) | Sensibilità 86% | FAM19A4 metilato OR= 15.02 (4.73-21.93) |
| 204 ctrl | Specificità 71% | miR124-2 metilato OR= 28.95 (7.34-30.75) |
| 103 CIN2, 69 CIN3 | | |

Floore et al.
J Clin Lab Anal 2019



Riproducibilità in 7 laboratori “Intra e Inter-laboratory agreement
...an international study”

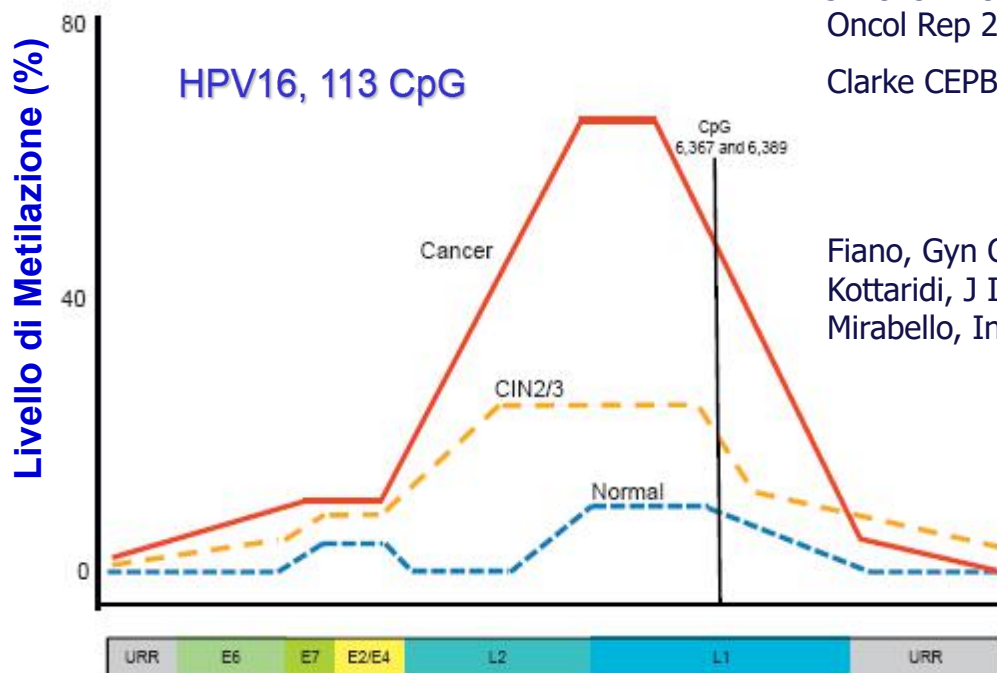
Metilazione Genica – Geni HPV

Cervice

Jimenez-Wences, Oncol Rep 2014
Clarke, CEPB 2012

HPV entra nella cell non metilato, poi acquisisce metilazione, se persiste
La cellula utilizza la metilazione come **meccanismo di difesa contro il virus** (HPV; HBV; EBV;...).
Metilazione virale è verosimilmente massiva e non mirata a CpG specifiche

Lorincz A, Acta Cytologica 2016 **Review**



CpG nel genoma virale HPV16

Jimenez-Wences
Oncol Rep 2014
Clarke CEPB 2012

Le CpG che troviamo metilate ed associate in vari studi sono probabilmente le più **“accessibili”** alla metilaz.

Fiano, Gyn Oncol 2018
Kottaridi, J Inf Dis 2017
Mirabello, Int J Can 2013

Le CpG di una stessa regione hanno livelli di metilazione simili nel campione

Non serve testare tante CpG
Sufficiente **testare poche CpG** per avere buon indicatore di metilaz. virale diffusa

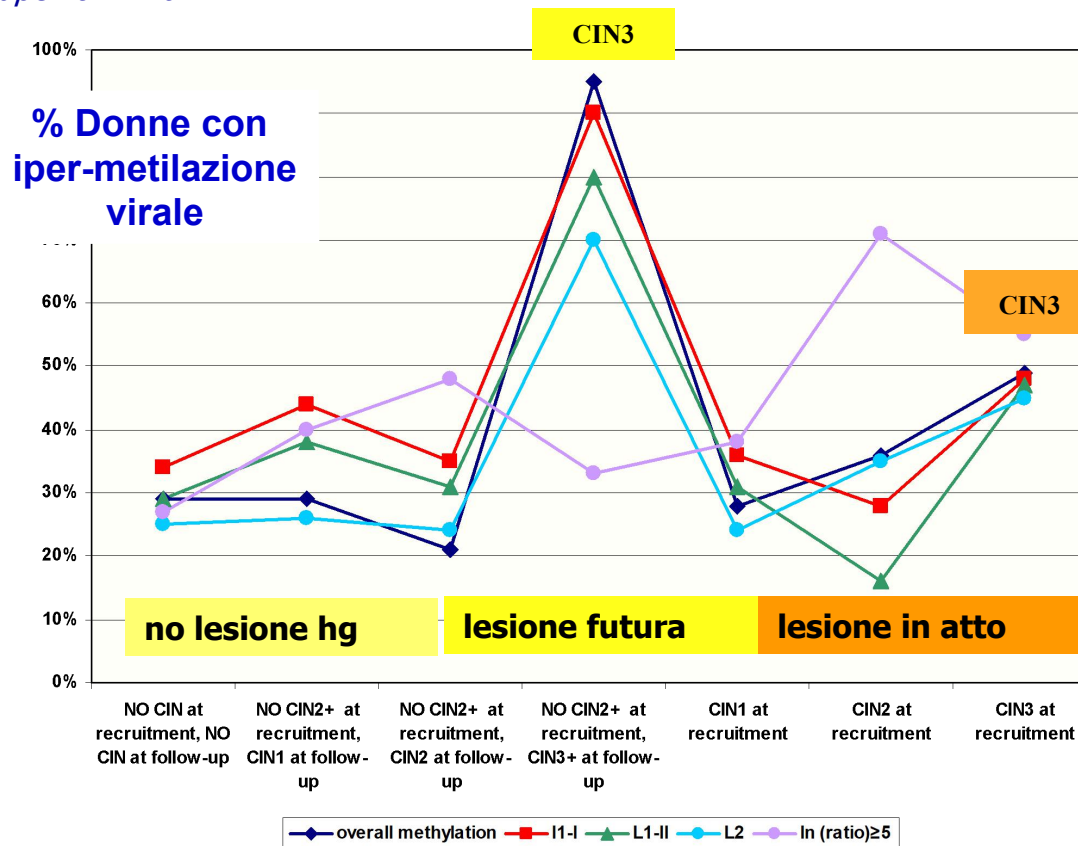
Metilazione Genica – Geni HPV

Cervice

Modificata da

Ronco G, PI

31st Int Pap Conference
Cape Town 2017



- NTCC; Lab TO, PD, FI
- 12 ceppi hrHPV
- 3 regioni HPV: L1 I (**4** CpG)
L1 II (**1** CpG)
L2 (**1** CpG)
- Consensus primer PCR-Pyroseq
- Endpoint CIN3

Iper-Metilazione virale in NTCC:

- **identifica** CIN3 in atto
- **predice** CIN3 futura (3aa)
- **consente** selezione donne **NEG** a metilaz. virale per **allungare intervallo**

Stato di Iper-Metilazione è **indipendente** da:

- Ceppo hrHPV
- regione L1 o L2
- CpG o numero CpG

Metilazione Genica – Geni HPV

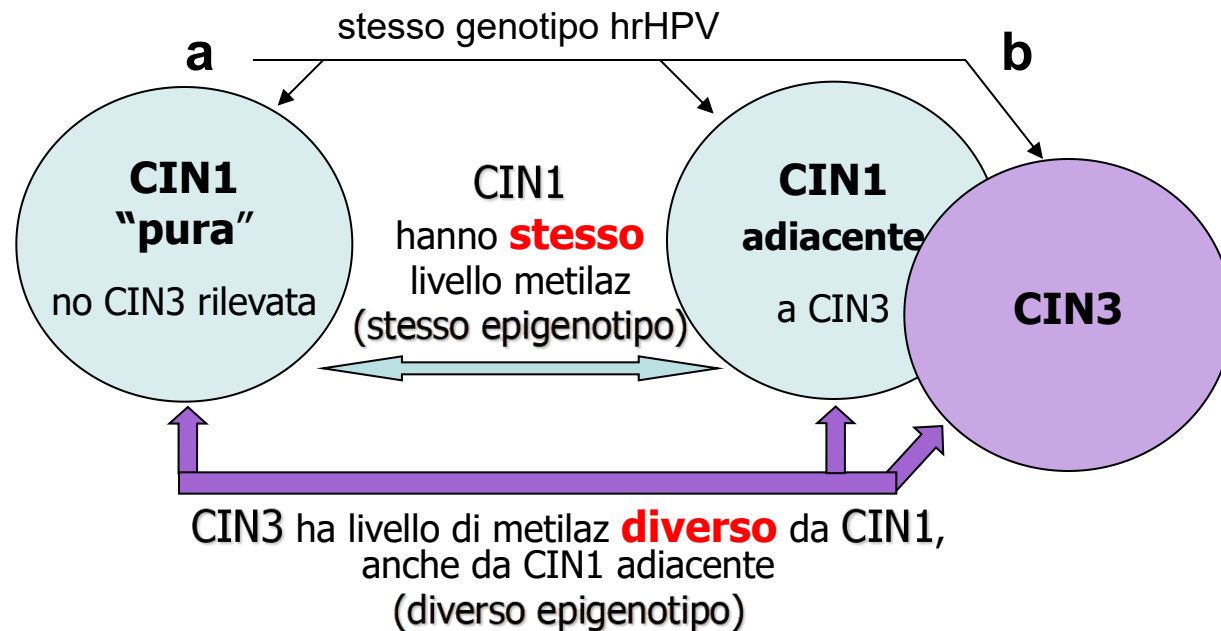
Cervice

Nedjai B,...Cuzick J, Lorincz A
Int J Cancer 2018

Progressione: **“molecular switch” model**

Geni studiati
EP1B41L3, MAL,
HPV16-L1,
HPV16-L2,
HPV16-E2

Indagine su
campione
istologico



Il **diverso stato di metilazione del virus** differenzia l'outcome,
ed è alla base dello switch molecolare che innesca la progressione neoplastica

Previa miglioramenti tecnologici dei saggi molecolari,
un buon **test di metilazione virale** potrebbe sostituire il test HPV

Key Messages

1. Le **alterazioni della metilazione** sono **cruciali** per lo sviluppo della maggior parte dei tumori, quindi sono potenziali **biomarcatori efficaci**
Importante identificare disregolazione metilazione in **CPG rilevanti**
2. I test di metilazione devono essere **semplici e automatizzati, poco costosi, robusti**
Il mondo della biologia molecolare va in questa direzione
3. Ad oggi i test di metilazione su **geni umani** richiedono **combinazioni di geni** per raggiungere livelli di sensibilità e specificità adeguati
4. **Sono molto promettenti** i test di metilazione su **singoli geni virali**
→ in particolare favorirebbero la **selezione di donne Neg per la metilazione, con basso rischio CIN3+, per cui poter allungare l'intervallo di screening**