DR.SSA MAURA MASSIMINO
DIRETTORE SC PEDIATRIA
TEL: 02-2390-2593/2588 FAX: 02-23902648
E-MAIL: maura.massimino@istitutotumori.mi.it

Al Fondo di Giò ONLUS IL FONDO DI GIO

"Ruolo dell'epigenomica attraverso metodiche ad alta processività per una maggiore comprensione biologico/funzionale in tumori pediatrici del sistema nervoso centrale"

Introduzione

I tumori del sistema nervoso centrale (SNC) rappresentano i tumori solidi più frequenti nell'età pediatrica, secondi per incidenza solo alle leucemie, costituendo il 20-25% dei tumori pediatrici. Si stima che ogni anno in Italia circa 1500 bambini di età compresa tra 0 e 15 anni e circa 800 adolescenti siano colpiti da tumori; tra questi, circa 400 bambini sviluppano tumori del sistema nervoso centrale. Le cause dello sviluppo delle neoplasie cerebrali pediatriche rimangono in gran parte sconosciute. A causa della mancanza di un fattore scatenante noto e dell'ampia eterogeneità anatomica, istologica e molecolare, i tumori pediatrici del sistema nervoso centrale sono oggetto di intensi studi sugli aspetti biologici compresi gli eventi epigenomici.

L'epigenomica è il campo di studio che analizza le modifiche epigenetiche su larga scala nel genoma di un organismo. Queste modifiche, che includono processi come la metilazione del DNA e la modifica degli istoni, non alterano la sequenza del DNA stesso, ma influenzano l'espressione genica e la funzione cellulare. L'epigenomica si concentra sulla mappatura e la comprensione di questi cambiamenti, il loro ruolo nella regolazione genica e la loro implicazione in salute, sviluppo e malattia. In particolare, le modifiche negli stati di metilazione del DNA a livello cellulare sono state a lungo investigate in relazione alle patologie legate all'invecchiamento, allo sviluppo e alle malattie. Particolarmente nel contesto del cancro, è stato evidenziato il ruolo chiave della metilazione del DNA nella genesi e nella progressione tumorale.

PEDIATRIC CNS TUMORS	ANATOMICAL CLASSIFICATION	METHYLATION BASED CLASSIFICATION
Medulloblastoma (MDB)		WNT SHH GROUP 3 GROUP 4
Embryonal tumors (PNET)		CNS NB-FOXR2 CNS EFT-CIC CNS HGNET-MN1 CNS HGNET-BCOR
Atypical/Teratoid Rhabdoid Tumor (ATRT)		ATRT-TYR (Group 1) ATRT-SHH (Group 2A) ATRT-MYC (Group 2B)
Ependymoma (EPN)	Supratentorial (ST)	ST-EPN-RELA ST-EPN-YAP1 ST-SE
	Posterior fossa (PF)	PF-EPN-A PF-EPN-B
	Spine predominant (SP)	SP-SE SP-MPE SP-SE
High-grade Glioma/ Diffuse Intrinsic Pontine Glioma HGG/DIPG	Hemispheric	H3K27M H3G34R/V IDH1
	Histone/IDH WT	HGG-WT subtype LGG-like PXA-like

L'analisi delle caratteristiche di metilazione del DNA ha rivelato nuove caratteristiche molecolari condivise. In effetti, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), nella prima versione del 2016 e nel successivo aggiornamento del 2021, ha incluso il profilo di metilazione come strumento di classificazione, suddividendo i tumori pediatrici del sistema nervoso centrale in nuovi gruppi e sottogruppi.

Obiettivi

Considerando la rilevanza della profilazione per metilazione entro i tumori del SNC, ci prefiggiamo di classificare una casistica retrospettiva di medulloblastoma, il più comune tumore pediatrico maligno del sistema nervoso centrale e con una notevole eterogeneità sia istologica che biologica. Dal 2016 l'OMS ha delineato quattro gruppi e rispettivi sottogruppi secondo caratteristiche molecolari condivise: WNT – attivati, SHH – attivati, gruppi 3 e 4 non WNT/non SHH. I gruppi WNT e SHH sono associati all'attivazione dei pathway molecolari in cui sono coinvolti, mentre i sottogruppi eterogenei 3 e 4 presentano proprie caratteristiche genomiche ed epigenomiche. Il nostro obiettivo e' di implementare le procedure di laboratorio che prevedono l'utilizzo della metodica Infinium MethylationEPIC v2.0 (Illumina) e di testare nuove metodiche di ultima generazione quali sequenziamento massimo parallelo che possano migliorare l'accuratezza della classificazione molecolare.

Metodi

Infinium MethylationEPIC v2.0

Per rivelare il profilo di metilazione degli 47 pazienti ad alto rischio di Medulloblastoma che sono stati oggetto del nostro studio, il DNA genomico è stato estratto dai campioni FFPE con il kit DNA Blood & Tissue (cod. 69504, Qiagen). La concentrazione e la qualità del DNA sono state valutate rispettivamente con il fluorometro Qubit 3.0 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e con il sistema TapeStation 4200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Per ogni campione, 500 ng di DNA sono stati elaborati per l'analisi di metilazione utilizzando il kit Illumina Infinium MethylationEPIC v2.0 (Illumina, San Diego). In breve, il gDNA è stato convertito attraverso l'utilizzo del bisolfito utilizzando il kit di metilazione EZ DNA (Zymo Research, Irvine, USA). Tenendo conto che il materiale proviene da campioni FFPE, per ripristinare il DNA convertito in bisolfito è stato utilizzato il kit di ripristino del DNA Infinium FFPE (Illumina, San Diego). Il DNA è stato purificato con il kit ZR-96 DNA Clean & Concentrator-5 (Zymo Research, Irvine, USA) ed eluito in 10 µl di DiH2O. Dopo una fase di amplificazione, incubazione notturna, frammentazione, precipitazione e risospensione, il DNA è stato ibridato sui BeadChip. Infine, i chip sono stati scansionati con l'iScan (Illumina, San Diego). Il trattamento dell'immagine è stato eseguito dal sistema Illumina iScanTM e i file IDAT contenenti dati di intensità sono stati estratti.

Analisi bioinformatiche

Per i controlli di qualità dei dati (QC) è stato utilizzato il software GenomeStudio (v 2011.1). Erano necessari i file IDAT e il file Manifest contenente informazioni su ciascun sito CpG, compresi il nome del gene e la posizione relativa alle isole CpG. In breve,il software ha convertito IDATs a β-value, in modo da determinare lo stato della metilazione per ogni sito CpG all'interno di ogni campione. Successivamente, il numero di siti CpG rilevati è stato controllato per avere più di 779.000 siti CpG (per FFPE/campioni degradati). Infine, abbiamo esaminato che conversione con bisolfito fosse avvenuta correttamente e la specificità delle sonde (Infinium I e Infinium II) in ogni campione.

Dopo i QC, gli IDATs sono stati elaborati con un classificatore basato sulla metilazione del DNA del tumori del sistema nervoso centrale, sviluppato dal gruppo di Heildeberg, sul sito www.molecularneuropathology.org (Capper et al., 2018). Questo tool online (noto come classificatore DKFz per i tumori CNS) ci ha permesso di prevedere le varianti del numero di copie (CNV), la classificazione e la metilazione del promotore MGMT.

Sequenziamento Nanopore

Il sequenziamento Nanopore utilizza nanopori incorporati in una membrana elettro-resistente attraversata da una corrente ionica. Quando una molecola di DNA o RNA transita attraverso il poro, provoca una specifica alterazione nel flusso di corrente, dipendente dalle basi (tipicamente 3-meri) presenti nel poro. Durante il passaggio della molecola, vengono effettuate numerose misurazioni e le variazioni di corrente sono convertite da un software di basecalling nella sequenza genomica corrispondente. Tutti i dispositivi di sequenziamento della Oxford Nanopore si basano sulle Flow Cell, che ospitano i nanopori. Ogni Flow Cell contiene 512 canali, ciascuno capace di sequenziare frammenti di DNA indipendenti. Poiché ogni canale contiene quattro nanopori, una Flow Cell è composta da circa 2048 nanopori.

MinKNOW è un software sviluppato da Oxford Nanopore Technologies per gestire i dispositivi di sequenziamento Nanopore. Ha un'interfaccia grafica intuitiva che consente di controllare numerosi parametri di sequenziamento, inclusi compiti fondamentali quali:

i) acquisizione dei dati;

ii) analisi in tempo reale;

iii) basecalling locale;

iv) analisi post-corsa.

Inoltre, il software consente di monitorare il processo di sequenziamento e risolvere eventuali problemi, garantendo così un corretto funzionamento del sistema. Prima del sequenziamento, il software esegue un controllo della Flow Cell denominato Mux Scan, classificando ciascuno dei quattro pori di ogni canale. Il poro più attivo viene definito "G1", mentre il meno attivo è chiamato "G4". All'inizio del sequenziamento, viene utilizzato il poro "G1" e ogni 1,5 ore questo processo viene ripetuto per mantenere il sequenziamento ottimale.

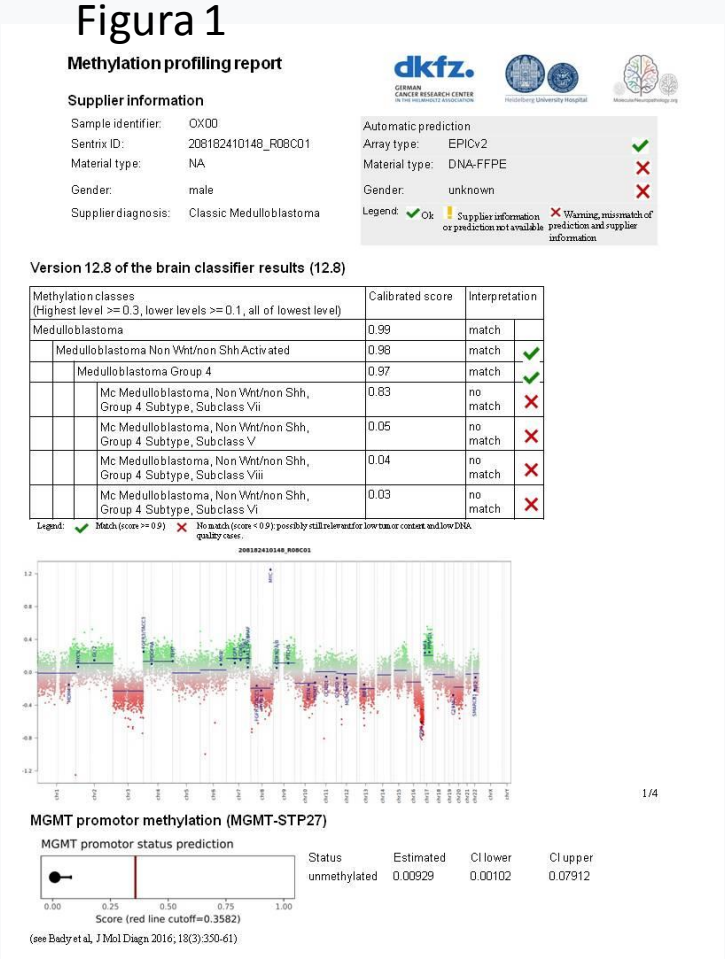
Risultati

Classificazione di campioni tissutali attraverso il classificatore DKFZ

Il classificatore DKFz, sviluppato dal Centro tedesco di ricerca sul cancro, è uno strumento all'avanguardia utilizzato per la diagnosi molecolare dei tumori del SNC. Questo classificatore rappresenta un enorme passo avanti nella comprensione e nella gestione dei tumori cerebrali, grazie alla sua capacità di analizzare dettagliatamente i profili genetici ed epigenetici dei campioni tumorali. Il classificatore DKFz si basa su un ampio database che contiene i profili di metilazione del DNA di migliaia di tumori del SNC, raccolti da numerosi centri di ricerca a livello internazionale. Questo vasto database consente al sistema di confrontare i dati del campione del paziente con quelli presenti nel database, facilitando una diagnosi accurata.

Un elemento chiave del classificatore DKFz è il "calibrated score" (CS). Questo punteggio rappresenta il livello di confidenza del sistema nella classificazione del tumore. In altre parole, il calibrated score indica quanto il profilo di metilazione del campione analizzato corrisponde ai profili di riferimento nel database. Un alto CS suggerisce che il campione ha un'alta corrispondenza con un tipo specifico di tumore nel database, offrendo grande certezza diagnostica. Al contrario, un basso CS indica una corrispondenza meno precisa, suggerendo che il tumore potrebbe essere raro, presentare caratteristiche atipiche o necessitare di ulteriori analisi. In Figura 1 sono mostrati a titolo esemplificativo gli output delle analisi di classificazione e il relativo report per un campione.

Figura 1



Methylation profiling report

Supplier information

Sample identifier:	OX00
Sentrix ID:	208182410148_R08C01
Material type:	NA
Gender:	male
Supplier diagnosis:	Classic Medulloblastoma

Automatic prediction		
Array type:	EPICv2	✓
Material type:	DNA-FFPE	✗
Gender:	unknown	✗

Legend: ✓ Ok ! Supplier information or prediction not available ✗ Warning, mismatch of prediction and supplier information

Version 12.8 of the brain classifier results (12.8)

Methylation classes (Highest level >= 0.3, lower levels >= 0.1, all of lowest level)	Calibrated score	Interpretation	
Medulloblastoma	0.99	match	
Medulloblastoma Non Wnt/non Shh Activated	0.98	match	✓
Medulloblastoma Group 4	0.97	match	✓
Mc Medulloblastoma, Non Wnt/non Shh, Group 4 Subtype, Subclass Vii	0.83	no match	✗
Mc Medulloblastoma, Non Wnt/non Shh, Group 4 Subtype, Subclass V	0.05	no match	✗
Mc Medulloblastoma, Non Wnt/non Shh, Group 4 Subtype, Subclass Viii	0.04	no match	✗
Mc Medulloblastoma, Non Wnt/non Shh, Group 4 Subtype, Subclass Vi	0.03	no match	✗

Legend: ✓ Match (score >= 0.9) ✗ No match (score < 0.9): possibly still relevant for low tumor content and low DNA quality cases.

208182410148_R08C01

1/4

MGMT promotor methylation (MGMT-STP27)

MGMT promotor status prediction

Status	Estimated	CI lower	CI upper
unmethylated	0.00929	0.00102	0.07912

Score (red line cutoff=0.3582)

(see Bady et al, J Mol Diagn 2016; 18(3):350-61)

Esempio di report ottenuto da tool online www.molecularneuropathology.org

Basandoci sui profili di metilazione sul totale di 47 campioni analizzati, imponendo come cut off di calibrated score (CS) > 0.7, i campioni sono stati classificati come segue:

- 1 tumore Embrionale con rosette multistrato (CS=0.99)
- 1 Pineoblastoma (CS=0.77)
- 45 Medulloblastomi, a loro volta classificati come

	n.campioni	SHH	WNT	G3	G4
	45	8	4	6	27
femmine	19	4	2	2	11
maschi	26	4	2	4	16

Inoltre sfruttando il profilo delle CNV abbiamo individuato le amplificazion/delezioni maggiormente rappresentative per tale patologia, in particolare:

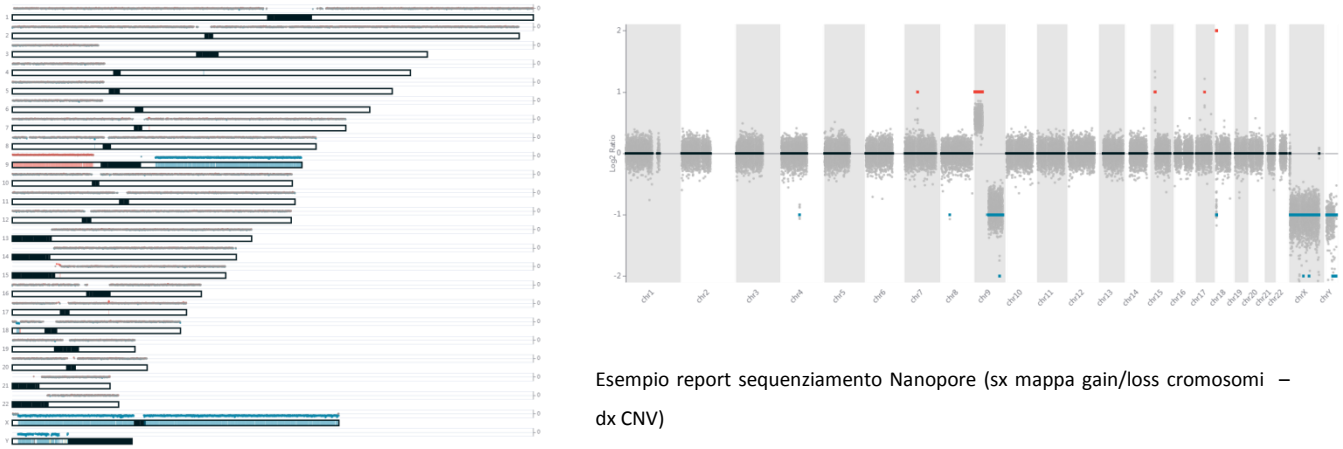
- 11 campioni presentano l'oncogene MYC amplificato
- 7 campioni presentano MYCN amplificato
- 21 campioni presentano alterazioni nel numero di copie a carico del chr17, potenzialmente associate a alterazioni dell'espressione di p53.

Abbiamo fatto ulteriori analisi per meglio comprendere il significato biologico dei dati ottenuti.
Il pacchetto MixOmics R è stato utilizzato per l'analisi dei componenti principali (PCA), i pacchetti minfi e missMethyl sono stati utilizzati per la pre-elaborazione e l'estrazione dei valori β e M. Attraverso il pacchetto limma abbiamo poi analizzato la metilazione differenziale tra i gruppi e tra i campioni appartenenti allo stesso gruppo. I siti CpG deregolamentati sono stati abbinati ai geni utilizzando i browser del genoma e la funzione getMappedEntrezIDs. Infine, per l'analisi di arricchimento è stato utilizzato il pacchetto clusterProfiler.

Utilizzzo della metodica Nanopore per la profilazione di metilazione

Abbiamo poi messo a punto un protocollo per poter replicare il profilo di metilazione e delle CNV ottenuto con Illumina Infinium MethylationEPIC v2.0, con metodiche di sequenziamento di terza generazione, in particolare su Nanopore (Oxford Nanopore Technologies). Il sequenziamento di terza generazione è una metodica molto più rapida ed economica rispetto al classico sequenziamento di seconda generazione (NGS), in quanto è un sequenziamento "diretto", basato su long reads: il DNA non viene pre-amplificato e le informazioni ottenute dal sequenziamento sono disponibili in real-time.
Le librerie di Nanopore sono state ottenute a partire dagli stessi DNA genomici precedentemente estratti per la metilazione con Array, seguendo il protocollo Reduced Rappresentation Methylation Sequencing poi sequenziate su GridIon con flowcell: FLO-MIN114. Il protocollo RRMS permette di ottenere direttamente informazioni sulle citosine metilate, senza previa conversione a bisolfito. Ho ottenuto le librerie seguendo il protocollo SQK-LSK114, e sequenziato su flow-cell FLO-MIN114. Il sequenziamento è durato circa 30 ore, con doppio caricamento. Ho poi fatto il basecalling dei file BAM ottenuti su Nanopore attraverso la pipeline wf-human-variation. Attraverso il software EPI2ME ho poi ottenuto un report con le informazioni relative al profilo di metilazione e delle CNV dei campioni analizzati (Figura 2).

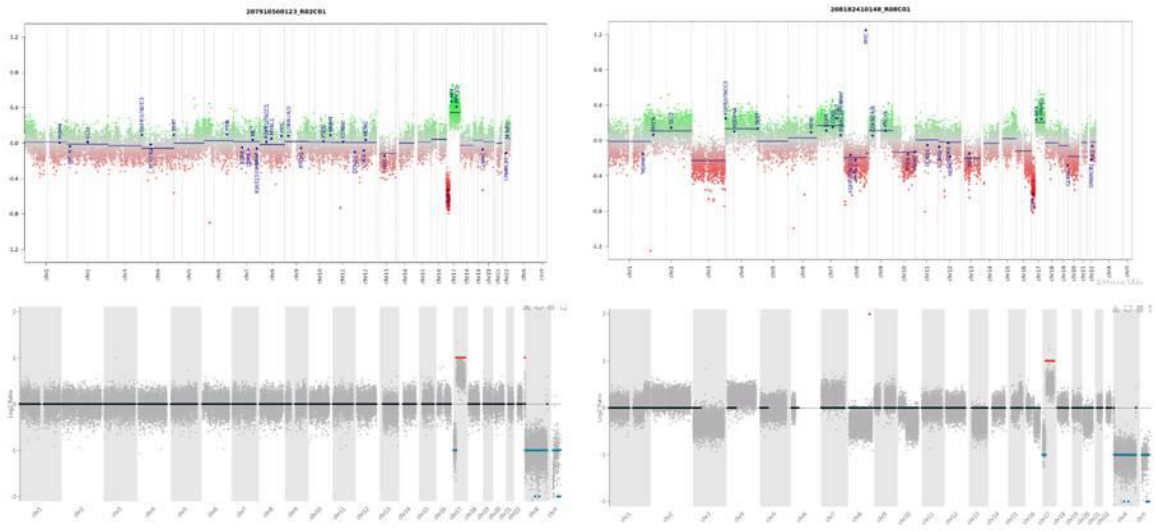
Figura 2



Esempio report sequenziamento Nanopore (sx mappa gain/loss cromosomi – dx CNV)

Abbiamo ottenuto un profilo delle CNV caratteristico di ciascun campione. Ho confrontato il profilo delle CNV ottenuto con Nanopore e con Illumina Infinium MethylationEPIC v2.0 : 5/5 campioni analizzati hanno profili di CNV del tutto sovrapponibili Figura 3.

Figura 3



Confronto CNV : Illumina Infinium MethylationEPIC v2.0 – Nanopore RRMS (FFPE sample sx – FF sample dx)

Conclusioni

L'uso del classificatore DKFz offre numerosi benefici. Innanzitutto, migliora l'accuratezza della diagnosi dei tumori del SNC, permettendo di distinguere tra tipi di tumori che altrimenti potrebbero apparire simili con metodi tradizionali. Inoltre, una diagnosi precisa consente ai medici di sviluppare piani di trattamento personalizzati, adattati alle caratteristiche molecolari specifiche del tumore di ciascun paziente. Questo approccio, noto come oncologia di precisione, può migliorare significativamente l'efficacia delle terapie e la prognosi del paziente. Inoltre, la caratterizzazione dettagliata dei tumori supporta la ricerca e lo sviluppo di nuove terapie mirate, identificando specifiche mutazioni o alterazioni epigenetiche su cui i nuovi farmaci possono agire.

I dati ottenuti dalle analisi svolte hanno permesso di sottomettere un abstract (Oriani et al. Titolo: *"Shedding light on genes linked to pathogenicity in pediatric medulloblastoma via differential methylation analysis"*) per il congresso SIC 2024. L'abstract è stato accettato per il congreso SIC 2024, e verrà presentato come poster.

Milano 12 agosto 2024