

Searching for Novel Diagnostic-Prognostic Biomarkers in Gastric Cancer

Pesquisa de Novos Biomarcadores em Cancro do Estômago

Giovanni Corso, M.D. Porto, 2011

Tese de Doutoramento

Programa Doutoral em Medicina e Oncologia Molecular

SUMMARY

The general goal of this working plan was to identify molecular parameters that can predict prognosis, response to treatment and thus improving the management of GC. Specifically, we aimed in this project to study the role of *EGFR* signalling cascade in GC, to identify novel therapeutic and prognostic biomarkers.

Our goal was achieved by following a bottom-up approach that addressed the role of alterations of selected genes (namely E-cadherin) in GC progression.

In order to accomplish our goal data information on 500 GC patients were collected and observed with clinical, familial, diagnostic, surgical, pathological, and follow-up data. The biological material of 500 GCs included tumor and normal gastric tissue flash frozen, directly collected in the operating room. All materials were obtained from the Department of Human Pathology and Oncology, section of General Surgery and Surgery Oncology, University of Siena, Italy.

During the working plan we:

1. *Address the role of MSI as molecular biomarkers.* We studied the frequency of MSI in GC, and verified the clinico-pathologic associations in sporadic and in cases with familial clustering of GC.
2. *Analyse of the -77T/C XRCC1 polymorphism in GC risk development.* We considered the potential tumor risk in patient carriers of -77T/C variation.
3. *Address the role of E-cadherin deregulation in GC progression.* We searched for the presence of somatic E-cadherin mutations as well as E-cadherin promoter hypermethylation and loss of heterozygosity in a large series of GC patients and selected families which fulfil the HDGC criteria as well as EOGC cases searching for the presence of E-cadherin germline mutations.
4. *Address the role of EGFR activation in GC progression.* We searched for the presence of *EGFR* somatic mutations within the kinase domain and the repeated region of the gene.

The mutation screening was extended also at the other oncogenes in the *MAPK/PI3K* pathway, namely *KRAS*, *BRAF*, *MLK3*, *PIK3CA*.

With this working plan we verified that:

1. MSI tumors showed peculiar clinico-pathologic features and better prognosis when compared to stable tumors. Considering these results, a peculiar subset of tumors with instability at all five loci and a very good prognosis has been observed. Moreover, we verified that in our gastric carcinoma MSI do not represents a standard biomarker of hereditary or familial setting, opposing to what is observed in colon cancer where MSI phenotype is the hallmark of the HNPCC syndrome,.
2. We found that the -77C/C variaton was associated with increased risk of GC located in the upper third region, specifically the cardia zone. Moreover, this polymorphism is associated to smoking habits and with familial aggregation for lung cancer. These results suggested us that part of GC can be underlied by the same genetic factor of lung cancer.
3. Structural alterations, in particular LOH and somatic mutations, of *CDH1* gene were assessed as predictive biomarkers of worse prognosis. Hypermethylation results from this study could be used to define the basis for the use of demethylating agents as possible novel anticancer therapy. Considering the very low frequency of E-cad germline mutations (2.3%) in juvenile GC patients and the high incidence of non-pathogenic mutations, we revised the clinical criteria for *CDH1* genetic screening and recommend this screening in GC cases with age at onset ≤ 35 years and with diffuse histotype.
4. We identified a novel mechanism of *EGFR* activation in GC, located at the polyadenylation site in the 3'-UTR region. The presence of *EGFR* A-13 repeat mutations and the information of the mutation status of the *MAPK/PI3K* pathway could be used as novel biomarkers to include GC patients for target therapies using *EGFR* inhibitors in advanced GC patients, in particular with cetuximab-plus protocol.

SUMÁRIO

Este projeto de doutoramento teve como principal objetivo a identificação de parâmetros moleculares com poder preditivo de prognóstico ou resposta à terapia, contribuindo assim para um melhoramento na gestão e aconselhamento dos doentes com cancro gástrico. Em particular, no decorrer deste projecto foram estudadas várias moléculas envolvidas na via de sinalização do *EGFR* com o intuito de identificar novos biomarcadores de prognóstico e terapia.

Este objectivo foi alcançado seguindo uma abordagem retrospectiva que incidiu no estudo do papel desempenhado por alterações em genes (nomeadamente Caderina-E) previamente seleccionados na progressão do cancro gástrico.

Para completar os nossos objectivos; informação relativa às características clínicas, familiares, de diagnóstico, cirúrgicas, patológicas e dados de seguimento clínico de 500 casos de cancro gástrico foram recolhidas e analisadas. O material biológico recolhido incluía tecido tumoral e normal congelado, colhido diretamente na sala de operações. Todo o material foi obtido no Departamento de Patologia Humana e Oncologia, secção de Cirurgia Geral e Cirurgia Oncológica, da Universidade de Siena, Itália.

Durante o plano de trabalho foram estabelecidos os seguintes objectivos:

1. *Determinação do uso do fenótipo “MSI” como potencial biomarcador molecular.* Procedeu-se ao estudo da frequência de “MSI” em cancro gástrico e da sua correlação com as características clinic-patológicas e agregação familiar dos carcinomas gástricos.
2. *Análise do polimorfismo -77T/C XRCC1 no desenvolvimento de cancro gástrico.* Neste objectivo, foi avaliado o risco de desenvolvimento tumoral em portadores da variação -77T/C.
3. *Determinação do papel da desregulação da Caderina-E na progressão de cancro gástrico.* Este objectivo foi alcançado através da pesquisa de mutações do gene da Caderina-E, da determinação do estado hipermetilação do seu promotor e do estudo de perda de heterozigotia numa série alargada de cancro gástrico. Adicionalmente, procedeu-se à análise de mutações germinativas no gene da Caderina-E em casos de cancro gástrico que preenchiem os critérios de HDGC e EOGC.
4. *Estudo do papel da activação do EGFR na progressão de cancro gástrico.* Este objectivo foi alcançado através da determinação da presença de mutações somáticas no domínio de cinase do *EGFR*; a pesquisa mutacional foi alargada a outros oncogenes

envolvidos na via de sinalização das *MAPK/PI3K*, tais como, *KRAS*, *BRAF*, *MLK3* e *PIK3CA*.

Com este plano de trabalho nós verificámos que:

1. Os tumores MSI analisados apresentam características clinico-patológicas específicas e um melhor prognóstico quando comparados com tumores estáveis. Tendo em conta estes resultados, verifica-se uma correlação positiva entre tumores com instabilidade de microssatélites em todos os locus analisados e um melhor prognóstico. Adicionalmente, observa-se que nos carcinomas gástricos a presença de MSI não representa um biomarcador de hereditabilidade ou agregação familiar, ao contrário do que se verifica nos tumores colorectais, nos quais a presença do fenótipo MSI é uma das características principais da síndrome de “HNPCC”.
2. A presença da variação -77C/C está associada a um risco aumentado de cancro gástrico no terço superior do estômago, nomeadamente na região da cárdia. Adicionalmente, a presença do polimorfismo está também associada a fumadores activos e a casos com agregação familiar de cancro do pulmão. Estes resultados sugerem que uma parte dos cancro gástrico podem ter um factor etiológico comum aos tumores do pulmão.
3. As alterações estruturais, em particular perda de heterozigotia e mutações somáticas, do gene *CDH1* são determinadas como preditivas de um pior prognóstico. Os resultados de hipermetilação obtidos neste estudo permitem definir uma possível base para uso de agentes que revertem a metilação como uma nova terapia anti-cancro. Tendo em conta a baixa frequência de mutações germinativas da Caderina-E (2.3%) em doentes jovens com cancro gástrico e a alta incidência de mutações não patogénicas, propusemos uma revisão dos critérios clínicos para pesquisa de alterações da Caderina-E e recomendamos que esta pesquisa seja feita em pacientes com cancro gástrico difuso e com idade ≤ 35 anos.
4. Um novo mecanismo de activação do *EGFR*, localizado na região de poliadenilação do 3'-UTR, em cancro gástrico. A determinação da presença de mutações na repetição A-13 do *EGFR* em associação com informação acerca do estado mutacional da via *MAPK/PI3K* poderão ser factores usados como marcadores de resposta a terapias alvo em doentes com CG avançado, como no caso do protocolo plus-cetuximab.