

# Strategie per lo studio della genetica della suscettibilità alle radiazioni ionizzanti

L'impiego di modelli animali portatori di geni che modulano la suscettibilità genetica alle radiazioni ionizzanti può facilitare la mappatura dei loci della risposta individuale alle radiazioni, con importanti ricadute sulla salute umana

*DOI 10.12910/EAI2017-047*

**di Simonetta Pazzaglia, Mirella Tanori, Emanuela Pasquali, Arianna Casciati, Mariateresa Mancuso, Anna Saran, ENEA**

**F**onti di radiazione naturali e artificiali contribuiscono all'esposizione umana costituendo un pericolo per la salute. Oltre alle radiazioni solari e ai raggi cosmici, la radioattività è presente nel suolo, negli edifici, nel cibo che mangiamo e nell'acqua che beviamo.

Alla complessità di questo scenario si aggiunge l'aumento dell'uso delle radiazioni ionizzanti in medicina, sia in campo diagnostico che terapeutico. In particolare, circa il 50% dei pazienti oncologici è trattato con la radioterapia (circa 120.000 ogni anno in Italia). Nonostante molte evidenze suggeriscano l'esistenza di tangibili differenze nella radiosensibilità individuale, attualmente la radioterapia è prescritta senza considerare tali differenze nella risposta dei pazienti. Malgrado siano stati ottenuti importanti progressi verso piani di trattamento personalizzato, riguardanti soprattutto le modalità di erogazione della dose prescritta, gli sforzi per la comprensione dei parametri biologici che definiscono la radiosensibilità individuale non hanno purtroppo ottenuto un successo analogo. Lo sviluppo di saggi biologici per prevedere la risposta del paziente alla radioterapia rappresenta pertanto uno degli obiettivi principali della radioterapia oncologica. Tale tecnologia potrebbe, ad esempio, tradursi in un'ottimizzazione dei protocolli radioterapici, una migliore valutazione della risposta individuale e della prognosi, e facilitare la personalizzazione dei parametri di dose. Dati sperimentali ottenuti da studi sull'uomo e sull'animale suggeriscono che il danno tissutale da radiazioni è in parte geneticamente regolato. L'entità delle reazioni di tossicità alle radiazioni è probabilmente determinata da un

controllo poligenico, non dovuta quindi ad alterazioni di singoli geni, ma risultante dall'interazione di numerosi alleli di resistenza e suscettibilità con penetranza variabile (Figura 1a) e alla loro interazione con fattori ambientali. L'identificazione delle variabili coinvolte nel controllo genetico delle malattie multifattoriali è pertanto estremamente complessa e nonostante i progressi nell'individuazione di geni di suscettibilità per molte malattie complesse, quali distrofia muscolare di Duchenne, fibrosi cistica e malattia di Huntington, i determinanti genetici della suscettibilità dei tessuti alle radiazioni rimangono poco compresi e definiti. L'identificazione di questi geni potrebbe permettere un pre-screening individuale del profilo di rischio prima di un'esposizione medica o professionale, o immediatamente dopo un'esposizione accidentale. Questa conoscenza potrebbe anche essere sfruttata per lo sviluppo di test pre-

dittivi della risposta clinica individuale alle radiazioni. L'impatto di un'analisi accurata sarebbe determinante e avrebbe il duplice obiettivo di individualizzare il trattamento in base al profilo genetico e migliorare la qualità della vita dei pazienti che sopravvivono a lungo termine alle cure oncologiche.

### L'analisi genetica in modelli animali

L'uso di modelli animali per lo studio di tratti genetici complessi offre indubbi vantaggi, tra cui una ridotta eterogeneità genetica, una maggiore precisione nel quantificare il fenotipo e la possibilità di regolare i fattori ambientali (Figura 1b). Questi vantaggi, combinati con l'abilità di manipolare il genoma di topo tramite strategie di accoppiamento selettivo e approcci d'inattivazione genetica specifica, offrono allo studio dei tratti complessi un elevato po-

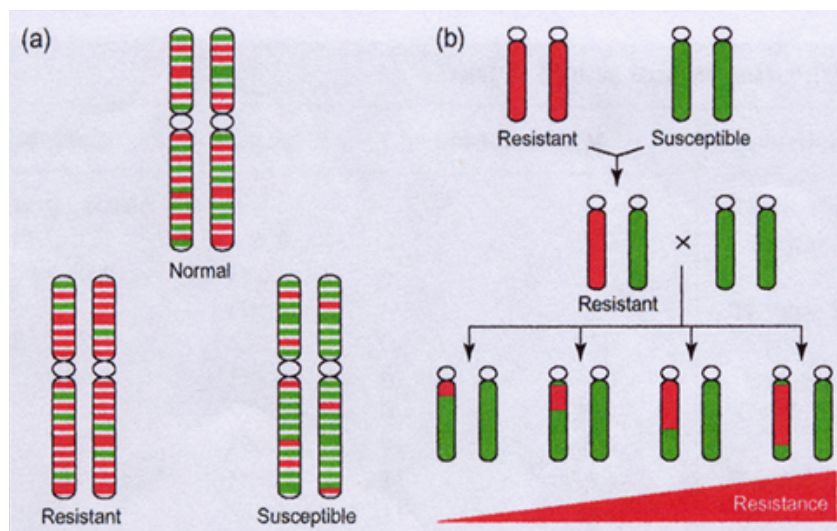


Fig. 1 (a) Schema del controllo poligenico di caratteri complessi nell'uomo. (b) Le differenze fenotipiche tra ceppi murini puri consentono strategie di accoppiamento che facilitano la mappatura dei geni che controllano il fenotipo

Fonte: Balmain A, Nagase H. (1998), *Cancer resistance genes in mice: models for the study of tumour modifiers*, *Trends Genet.* 4, 139-44

tere di risoluzione, consentendo l'identificazione dei geni candidati, la loro localizzazione cromosomica e la possibilità di saggiare l'effetto di singoli geni su uno specifico carattere (fenotipo), la prova definitiva per l'identificazione di un gene candidato. Il topo offre notevoli vantaggi come modello sperimentale. Contrariamente ad altri organismi geneticamente manipolabili, come vermi e mosche, i topi, dopo esposizione ad agenti cancerogeni ambientali, possono sviluppare tumori negli stessi tessuti e con un processo a più stadi molto simile a quanto osservato negli esseri umani. Finora sono stati mappati solo una piccola quantità di loci di suscettibilità alle radiazioni e agli effetti collaterali precoci e tardivi in tessuti sani, e solo alcuni di questi sono stati tradotti in polimorfismi, cioè variazioni, di sequenza nucleotidica in un gene critico, che conferiscono una dimostrata alterazione nel rischio, per esempio geni che controllano il riparo del DNA, il ciclo cellulare, o i *pathway* apoptotici. Un interessante complemento alla mappatura dei loci a carattere quantitativo (QTL) in ceppi geneticamente puri, a elevato tasso di omozigosi essendo derivati da accoppiamenti tra consanguinei, è la mappatura di popolazioni eterogenee attraverso analisi di *linkage disequilibrium* (LD). La mappatura tramite analisi di LD associa particolari caratteri (fenotipi), quali ad esempio elevata radiosensibilità, a combinazioni di marcatori genetici o aptotipi (combinazioni di varianti di sequenza del DNA di un particolare cromosoma, in prossimità o all'interno di un *locus* di interesse, che tendono a essere trasmessi in blocco come un unico segmento). Per l'analisi di LD, devono esistere sia uno squilibrio sostanziale di un fenotipo, che un

numero sufficiente di polimorfismi (variazioni di sequenza del DNA). Sia l'analisi LD che QTL sono quindi tradizionalmente dipendenti da marcatori genetici quali polimorfismi di lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLPs), polimorfismi di lunghezza di sequenza semplice (SSLPs) e polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs). Il LD è un importante strumento per individuare regioni cromosomiche di ampiezza limitata contenenti varianti geniche che controllano un dato fenotipo.

8 ceppi puri di topi (A/J, DBA2/J, P/J, SWR/J, SJL/J, CBA/J, BALB/c, C57BL6/J). Su questa popolazione fondatrice, altamente polimorfica poiché il corredo genetico di ciascun animale era costituito da un diverso riassortimento del 12,5% del genoma di ciascun ceppo progenitore, è stato applicato un protocollo di cancerogenesi cutanea chimica, seguito da allevamento selettivo bidirezionale eseguito accoppiando tra loro gli animali che più rispondevano al trattamento cancerogeno, svilup-

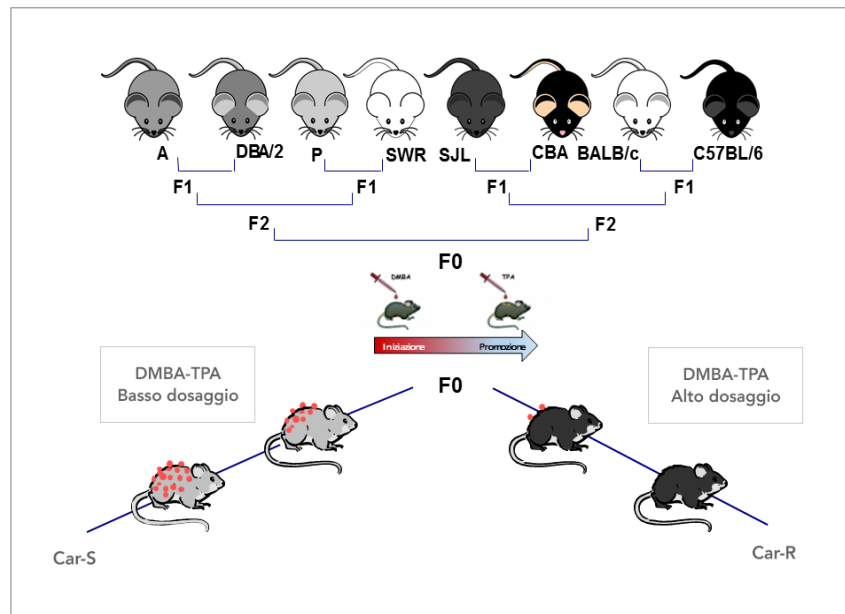


Fig. 2 Schema riepilogativo utilizzato nella selezione bidirezionale per la suscettibilità alla cancerogenesi cutanea a partire da una popolazione fondatrice (F0), generata dall'incrocio bilanciato di 8 ceppi puri di topi

### Selezione del modello murino CarS/R per la suscettibilità alla cancerogenesi cutanea

Negli anni 80 nei Laboratori dell'E-NEA Casaccia ha avuto inizio un programma di accoppiamenti selettivi bidirezionali a partire da una popolazione fondatrice (F0), generata dall'incrocio bilanciato di

pando molti tumori cutanei per la produzione della linea suscettibile, e gli animali con pochi o senza tumori per lo sviluppo della linea resistente. Per segregare tutti i geni di suscettibilità (linea Car-S) e di resistenza (linea Car-R) alla cancerogenesi chimica cutanea e raggiungere il limite di selezione sono state necessarie circa 18 generazioni, evidenziando il con-



tributo di un elevato numero di geni nel controllo del carattere (Figura 2). La selezione ha prodotto una differenza >100 nella suscettibilità alla risposta tumorale della cute tra le due linee. La possibilità di quantizzare il fenotipo, insieme all'elevato grado di polimorfismo, ha reso queste linee particolarmente adatte a studi di *linkage* per la mappatura dei loci modificatori della suscettibilità all'induzione di tumori cutanei.

Con questo tipo di approccio, ad esempio, nella regione distale del cromosoma 6 è stato identificato un polimorfismo nel gene che codifica per la proteina PTHrP (relata all'ormone paratiroideo) associato alla predisposizione allo sviluppo di tumori cutanei. Tale polimorfismo è responsabile di due varianti alleliche del gene, una codificante per un residuo di treonina associato alla linea resistente (Car-R), l'altra codificante per un residuo di prolina associato a quella suscettibile (Car-S). Test funzionali, quali la trasfezione di una linea cellulare di carcinoma a cellule squamose umano con DNA contenente il polimorfismo per il residuo di prolina (suscettibilità), hanno mostrato che le cellule trasfettate crescono in *cluster*, tendono ad impiantarsi e, quando inoculate in topi nudi danno tumori a crescita più veloce rispetto alle cellule non trasfettate o trasfettate con la variante codificante per il residuo di prolina, fornendo una prova diretta dell'associazione di questo polimorfismo con la suscettibilità alla cancerogenesi cutanea [1]. È importante sottolineare come i geni per il controllo della tumorigenesi cutanea segregati nelle linee Car-S/R non controllino solo la cancerogenesi cutanea, ma siano in grado di influenzare anche la tumorigenesi in altri distretti. Esperimenti effettuati incrociando animali della

linea resistente Car R con il ceppo SWR, suscettibile alla tumorigenesi del polmone, hanno dimostrato che un *subset* di alleli derivanti dalla linea Car-R, oltre alla resistenza alla tumorigenesi cutanea, può conferire anche resistenza a quella polmonare. Inoltre, la mappatura attraverso analisi di *linkage* ha anche portato all'identificazione di un *locus* sul cromosoma 1 responsabile del controllo della predisposizione sia alla tumorigenesi cutanea che polmonare. All'interno di questo locus mappano 2 geni - Igfbp5 e Igfbp2 - appartenenti alla famiglia delle "insulin-like growth factor binding proteins", che sono maggiormente espresse negli

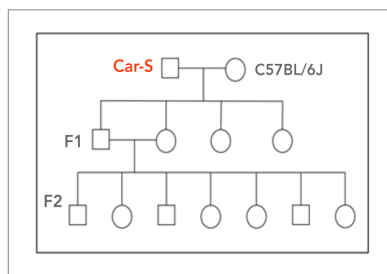


Fig. 3 Esempio di pedigree costituito dai genitori, la loro progenie di prima (F1) e di seconda generazione (F2)

animali resistenti Car-R. I nostri esperimenti hanno inoltre dimostrato che la sovraespressione dei geni Igfbp5 e Igfbp2 in linee cellulari di tumore polmonare inibisce la loro clonogenicità, a sostegno del ruolo di modificatori della tumorigenesi del polmone per questi geni [2]. Un'altra importante peculiarità del nostro modello è che i topi della linea Car-S non sono solo estremamente suscettibili agli agenti utilizzati nella selezione (DMBA/TPA), ma anche ad iniziatori e promotori chimicamente non correlati [3], rendendo il modello di più ampio interesse. In aggiunta, i loci di suscetti-

bilità/resistenza alla cancerogenesi cutanea delle linee Car-S/R, controllano parzialmente anche la risposta alle radiazioni ionizzanti, poiché l'esposizione alle radiazioni è in grado di indurre tumori cutanei in animali Car-S ma non in Car-R [4].

### L'impiego della linea murina Car-S per la dissezione genetica della fibrosi cutanea da radiazioni

La radioterapia è un trattamento loco-regionale con effetti collaterali a carico dell'area trattata. La cute è una delle aree più comuni per il danno da radiazioni, a causa di risposte infiammatorie e fibrotiche. La tolleranza della pelle è spesso un fattore limitante in radioterapia. La severità della risposta cutanea, anche per protocolli di trattamento simili, può variare da paziente a paziente e arrivare fino a compromissioni gravi della funzione del tessuto [5], suggerendo che fattori genetici influenzino in maniera significativa la radiosensibilità della pelle. Nell'uomo, però, l'identificazione di variazioni genetiche causali che modulano la risposta del tessuto alle radiazioni è complessa a causa dell'elevata eterogeneità genetica e di fattori ambientali non controllati. Studi eseguiti nel topo offrono molti vantaggi, compresa la possibilità di generare progenie in numero sufficiente e geneticamente ben definita, di controllare i fattori ambientali e poter quantizzare accuratamente il fenotipo. Nella linea murina Car-S la suscettibilità alla cancerogenesi cutanea è fortemente associata ad una elevata risposta infiammatoria [6]. Proprio quest'ultima caratteristica ha suggerito l'impiego della linea Car-S per uno studio finanziato dall'Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC), che ha come obiet-

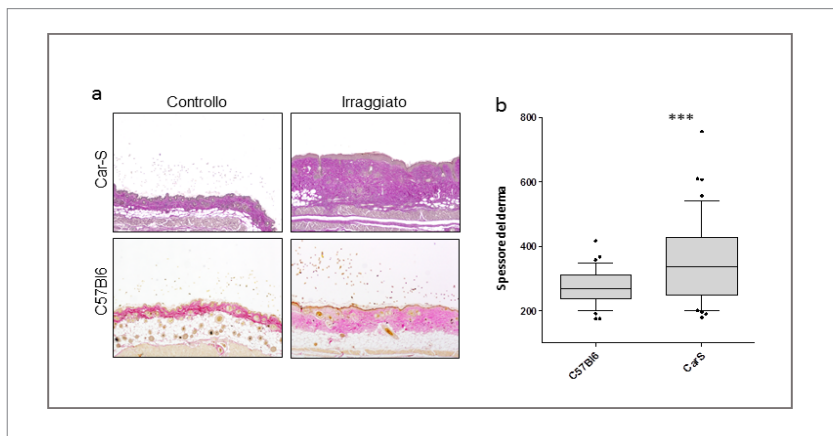


Fig. 4 Analisi della fibrosi cutanea dopo colorazione VanGieson in animali della linea suscettibile Car-S e del ceppo resistente C57Bl6 di controllo o irraggiati (a) e misura dello spessore del derma (b)

tivo l'identificazione delle cause genetiche della differente suscettibilità all'insorgenza di fibrosi cutanea da radiazioni dopo trattamenti radio-terapici.

La strategia sperimentale del progetto ha previsto la generazione di *pedigree* di 2 generazioni (alberi genealogici; Figura 3) e l'analisi fenotipica, cioè la caratterizzazione della risposta cutanea ad una dose molto elevata di raggi X (40 Gy) somministrata alla cute dorsale, eseguita tramite colorazione di VanGieson (Figura 4a) e valutazione dello spessore del derma (Figura 4b) nella progenie derivante da un incrocio tra animali suscettibili (Car-S) e resistenti (C57Bl6) alla

fibrosi cutanea da radiazioni. Ogni *pedigree* è costituito dai ceppi parentali (genitori), la loro progenie di prima generazione (F1) e dalla seconda generazione (F2), ottenuta dall'accoppiamento fratello-sorella dei topi della generazione F1.

Lo studio prevede anche un'analisi genotipica ad alta densità delle popolazioni prodotte che, utilizzando un numero elevato di marcatori genetici del DNA (n = 1500 circa), garantirà una copertura dell'intero genoma ad alta risoluzione, soprattutto grazie all'elevato grado di polimorfismo della linea Car S in cui ogni cromosoma può essere considerato un fine mosaico genetico dei ceppi fondatori. Una forte associazione tra un

dato marcatore genetico e il carattere in esame, ad esempio ispessimento cutaneo, indicherà che nella regione cromosomica adiacente al marcatore si trova un *locus* che controlla quel carattere, fornendo l'opportunità di mappatura ad alta risoluzione e la successiva analisi dei geni candidati associati alla fibrosi cutanea radio-indotta. Una volta identificati, i geni candidati saranno infatti sottoposti a validazione tramite caratterizzazione funzionale eseguita per mezzo di sovraespressione o silenziamento in linee cellulari di fibroblasti che saranno successivamente valutate per la deposizione di collagene dopo irraggiamento.

## Conclusioni

L'impiego di un modello animale basato sulla segregazione di geni rilevanti per la modulazione della suscettibilità genetica alla fibrosi cutanea associata alla radioterapia è vantaggioso per l'identificazione dei loci che controllano la fibrosi cutanea radioindotta, e può avere importanti implicazioni sulla valutazione della risposta individuale, della prognosi e della personalizzazione dei parametri di dose in pazienti sottoposti a radioterapia.

*Per saperne di più:*  
simonetta.pazzaglia@enea.it

## BIBLIOGRAFIA

1. G. Manenti, B. Peissel, M. Gariboldi, F.S. Falvella, D. Zaffaroni, B. Allaria, S. Pazzaglia, S. Rebessi, V. Covelli, A. Saran, T.A. Dragani (2000), A cancer modifier role for parathyroid hormone-related protein, *Oncogene*, 47:5324-8
2. A. Saran, D. Zaffaroni, S. Pazzaglia, B. Peissel, F. Galbiati, M. Spinola, G. Manenti, N. Zanesi, S. Rebessi, M. Mancuso, V. Covelli, T.A. Dragani (2002), Inhibition of both skin and lung tumorigenesis by Car-R mouse-derived cancer modifier loci, *Int J Cancer*, 5:580-3
3. A. Saran, S. Pazzaglia, S. Rebessi, Y. Bouthillier, C. Pioli, V. Covelli, D. Mouton, G. Doria, G. Biozzi (1999), Skin tumorigenesis by initiators and promoters of different chemical structures in lines of mice selectively bred for resistance (Car-r) or susceptibility (Car-s) to two-stage skin carcinogenesis, *Int J Cancer*, 3:335-40
4. S. Pazzaglia, M. Mancuso, S. Rebessi, V. Di Majo, M. Tanori, G. Biozzi, V. Covelli, A. Saran (2002), The genetic control of chemically and radiation -induced skin tumorigenesis: a study with carcinogenesis-susceptible and carcinogenesis-resistant mice, *Radiat Res*, 1:78-83
5. H. Li, Y. You, C. Lin, M. Zheng, C. Hong, J. Chen, D. Li, WW. Au, Z. Chen (2013), XRCC1 codon 399Gln polymorphism is associated with radiotherapy- induced acute dermatitis and mucositis in nasopharyngeal carcinoma patients, *Radiat Oncol*, 8:31-6
6. A. Galvan, F. Vorraro, W.H. Cabrera, O.G. Ribeiro, S. Pazzaglia, M. Mancuso, A. Zolin, S. Milani, A. Saran, O.M. Ibañez, T.A. Dragani (2010), Genetic heterogeneity of inflammatory response and skin tumorigenesis in phenotypically selected mouse lines, *Cancer Lett.*, 1:54-8