

Associazione delle mutazioni nel DNA circolante (ctDNA) e delle variazioni dei miRNAs circolanti, mediante biopsie liquide, in pazienti con carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC)

Progetto di ricerca di: **Alessandro Perez**

INTRODUZIONE

Il cancro del polmone rappresenta la neoplasia a più elevata incidenza e mortalità con una frequenza relativa rispetto ad altre neoplasie di circa il 12%. In Italia, l'Istituto Superiore di Sanità stima che nel 2008 i nuovi casi di tumore al polmone sono stati 32.102, dei quali circa 25.000 riguardano uomini e circa 7.000 donne. In pratica, 4 nuovi casi ogni ora. I principali responsabili dell'incremento dell'incidenza dei tumori polmonari sono l'inquinamento atmosferico, l'esposizione ad agenti tossici di origine industriale e, soprattutto, l'aumento costante del consumo di sigarette sebbene recenti studi suggeriscono che l'incidenza di cancro al polmone sia in costante aumento anche fra i non fumatori. Il processo di cancerogenesi polmonare si sviluppa attraverso una serie di mutazioni genetiche che coinvolgono geni il cui prodotto controlla la proliferazione cellulare, la differenziazione e l'apoptosi. A livello molecolare si osserva un aumento dell'espressione di oncogeni e l'inibizione di geni oncosoppressori.

Gli istotipi maligni più frequenti sono due: il carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC, oltre l'80%), che comprende l'adenocarcinoma, il carcinoma epidermoide o squamoso, e il carcinoma a grandi cellule; il carcinoma polmonare a piccole cellule (SCLC, meno del 20%). Nel NSCLC le anomalie genetiche più frequenti sono le alterazioni dei geni oncosoppressori p53 e FHIT (fragile histidine triad). In circa il 30% degli adenocarcinomi polmonari l'oncogene K-ras è mutato prevalentemente a livello del codone 12; ras è una GTPasi ovvero una proteina in grado di transitare da uno stato disattivato a uno attivato, e viceversa, scambiando GTP con GDP. Uno stato mutato della proteina è responsabile della continua attivazione dei relativi pathways di segnalazione come quello di PI3K-Akt-mTOR (sopravvivenza cellulare) e MAPK-ERK (proliferazione cellulare). L'EGFR è, invece, espresso in circa l'80% dei carcinomi squamosi; è un recettore ad attività tirosin chinasi il quale in seguito a dimerizzazione, attivazione dell'attività chinasi intracellulare e autofosforilazione dei residui tirosinici del dominio C-terminale, determina l'attivazione di pathways di segnalazione come quello di PI3K-Akt-mTOR, MAPK-ERK e JNK pathway. Una sua attivazione incontrollata è alla base dei processi biologici responsabili dell'evento tumorale; proliferazione cellulare, inibizione dell'apoptosi, angiogenesi e fenomeni di migrazione, adesione e invasione. Nel SCLC si osserva un'amplificazione genica della famiglia myc nel 18% dei casi. Alterazioni di p53 hanno un'incidenza di mutazione o di perdita allelica nel 90% dei SCLC. Anche le mutazioni del gene oncosoppressore RB, con la contemporanea perdita dell'allele nativo, sono state riportate in più del 90% dei SCLC. Il gene KIT è espresso in più del 70% dei casi. Alla luce di queste evidenze, è sempre crescente l'interesse della comunità medico-scientifica nell'applicazione e sviluppo della targeted therapy ovvero una modalità terapeutica che usa farmaci diretti contro "bersagli molecolari" attivati nella cellula neoplastica. In genere, i bersagli della terapia molecolare sono costituiti da proteine, più spesso da proteine con attività tirosin chinasi. La proteina bersaglio ideale dovrebbe avere un ruolo patogenetico ed essere presente in tutte le cellule neoplastiche di tutti i pazienti affetti da un determinato tumore.

L'istotipo più studiato risulta essere il NSCLC dal momento che è il più frequente; nel 30% dei casi è diagnosticato solo in fase avanzata e risulta essere, anche, il meno sensibile ai trattamenti chemioterapici e/o farmacologici. La diagnosi è, ad oggi, affidata alla tomografia X-ray o computerizzata seguita da esame istologico del tessuto prelevato tramite broncoscopia o attraverso uno specifico ago guidato da CT attraverso il torace. Lo stadio precoce della malattia è, principalmente, trattato chirurgicamente con o senza la successiva somministrazione di adiuvanti chemioterapici; pazienti ad uno stadio avanzato della malattia, invece, vengono sottoposti a chemioterapia e radioterapia. In alternativa esistono anche gli inibitori di EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) e ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase) per pazienti che portano la suddetta mutazione o la traslocazione. Con la recente scoperta che le alterazioni genetiche sono responsabili dell'inizio e progressione dell'evento tumorale, l'interesse verso l'introduzione di biomarkers di nuova generazione è sempre crescente. Una biopsia liquida risulta essere un biomarker facilmente isolabile da un qualsiasi fluido corporeo ed è rappresentativo del tessuto da cui si origina, proprio come una biopsia tradizionale. Il loro uso in clinica può dare informazioni rilevanti a fronte di una bassa invasività; dalla diagnosi precoce ed informazioni di tipo prognostico, al monitoraggio nel tempo della malattia, individuazione di target terapeutici e meccanismi di resistenza e allo studio dell'evento metastatico. È stato recentemente proposto che, fra i markers rilasciati nel circolo, i microRNAs (miRNAs) risulterebbero avere un'elevata stabilità e pertanto assumerebbero un elevato potenziale diagnostico, prognostico e nel monitoraggio della risposta ai trattamenti farmacologici. I miRNAs sono molecole endogene di RNA non codificante, a singolo filamento, composte da 19-22 nucleotidi. Modulano l'espressione genica attraverso la degradazione dell'RNA messaggero e/o l'inibizione dell'inizio della traduzione e sono coinvolti in diversi processi biologici quali la crescita cellulare, la proliferazione e l'apoptosi intervenendo nei relativi pathways di segnalazione. Si stima che ogni singolo miRNA possa avere come bersaglio migliaia di mRNA e il 10-30% di tutti i geni codificanti risponda a tale meccanismo di regolazione. A differenza dei mRNA i microRNAs mostrano un'elevata stabilità in differenti campioni biologici tra cui plasma e siero e ciò fa di loro un potenziale biomarker sierologico per la diagnosi e prognosi di differenti tipi di tumori solidi.

I primi studi effettuati sui miRNAs circolanti hanno dimostrato come la variazione dei suoi livelli possa verificarsi sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Un valido esempio è fornito dall'incremento dei livelli circolanti di miR-1, miR-423 e miR-208 in associazione a svariate patologie cardiache come l'infarto del miocardio, l'arresto cardiaco e il danno al miocardio. Lo studio effettuato da Lawrie et al è stato il primo ad avere riportato che i livelli circolanti di miR-155, miR-210 e miR-21 fossero significativamente più elevati, rispetto a soggetti sani, nel siero di pazienti affetti da linfoma diffuso a grandi cellule B. Chen et al ha, invece, effettuato la prima analisi sul siero di pazienti affetti da NSCLC allo scopo di dimostrare il potenziale dei miRNAs nella diagnosi del tumore del polmone. Nel suddetto lavoro, attraverso solexa deep sequencing, è stato paragonato il pattern di miRNAs di pazienti con NSCLC col pattern di pazienti sani. Gli autori, nello specifico, hanno identificato due miRNAs NSCLC-specifici, miR-25 e miR-223, altamente espressi nel siero di pazienti NSCLC rispetto a pazienti sani. Ulteriori studi sono stati effettuati allo scopo di verificare il valore prognostico e predittivo dei miRNAs. A tal proposito Hu et al, confrontando i profili miRNAs risultanti da pazienti affetti da NSCLC con elevata e bassa aspettativa di vita, è stato in grado di identificare quattro miRNAs i cui livelli differivano significativamente fra i due gruppi. In particolare alti livelli di miR-486 e miR-30d ma bassi livelli di miR-1 e miR-499 erano strettamente correlati a sopravvivenza media bassa ed elevata mortalità.

SCOPO DELLA RICERCA

Il presente progetto mira a verificare l'efficacia diagnostica, prognostica e predittiva dei miRNAs circolanti, provenienti da biopsie liquide, nella caratterizzazione, studio e trattamento del tumore del polmone. La ricerca sarà mirata alla comprensione dei meccanismi molecolari e genetici che intervengono nella genesi e progressione del carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC), relazionando i profili d'espressione dei miRNAs circolanti ai più diffusi profili genici dei pazienti con mutazioni predittive di risposta alla terapia mirata (EGFR, KRAS, ROS1, ALK, c-MET).

FASI DELLA RICERCA

1. Confrontare tecniche differenti, sia in termini economici che pratici, per l'identificazione di un completo profilo miRNA: TaqMan® Array Human MicroRNA A Cards v2.0, Ion Torrent™ next-generation sequencing
2. Confrontare il profilo miRNA ottenuto da biopsie liquide e quello ottenuto da biopsia tissutale convenzionale
3. Identificare le mutazioni somatiche, del DNA codificante, a carico dei principali geni coinvolti nel NSCLC e confrontare i risultati ottenuti da biopsie liquide e quelli ottenuti da biopsia tissutale convenzionale
4. Associare il profilo d'espressione dei miRNAs circolanti con i profili genici dei pazienti con mutazioni predittive di risposta alla terapia mirata; tale approccio permetterà non solo di identificare miRNAs specifici con potenziale ruolo di biomarker ma anche di identificare il ruolo di tali microRNAs nei pathways di segnalazione responsabili dell'evento tumorale.
5. Se l'associazione miRNAs circolanti/profilo genici verrà confermata, la ricerca verrà traslata in vitro su cellule di adenocarcinoma non a piccole cellule wild type e linee cellulari ingegnerizzate al fine di portare le mutazioni somatiche d'interesse.

APPROCCIO METODOLOGICO

Lo studio, innanzitutto, prevede l'individuazione di pazienti con caratteristiche idonee agli obiettivi preposti, pertanto pazienti con diagnosi di NSCLC e pazienti sani come controllo. Agli stessi verrà somministrato un consenso informato all'interno del quale saranno riportate informazioni riguardo le generalità, lo stile di vita, la storia della malattia e dove autorizzeranno le analisi sul campione fornito.

A ogni paziente verrà prelevato un campione di sangue attraverso una siringa vacutainer contenente EDTA. Attraverso centrifugazione a 2000 rpm per 20 minuti il plasma verrà separato dalla parte corpuscolata del sangue e conservato a -80 °C fino al successivo utilizzo. Si procederà, quindi, all'estrazione del ctDNA attraverso QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen) e dei miRNAs circolanti attraverso PAXgene Blood miRNA Kit (Qiagen). Contestualmente la stessa estrazione verrà effettuata, anche, su biopsie tissutali usando QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen) per il DNA e QiaGen miRNeasy Mini Kit (Qiagen) per i miRNAs. La quantità e qualità degli acidi nucleici verrà valutata con NanoDrop ND-2100 Bioanalyzer (NanoDrop Technologies) e l'integrità verrà valutata attraverso 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

Lo studio sui miRNAs potrà avvenire sia attraverso TaqMan® Array Human MicroRNA A+B Cards v2.0 (Life Technologies) che attraverso Ion Torrent™ next-generation sequencing (Life Technologies) e confermato attraverso qRT-PCR. Lo studio sul ctDNA sarà effettuato attraverso chip-Digital PCR (QuantStudio™ 3D Digital PCR System, Life Technologies) oppure attraverso ddPCR (droplet digital PCR, Biorad QX200). I dati ricavati dallo studio effettuato sui miRNAs e sul ctDNA avranno lo scopo di verificare l'esistenza di un'associazione fra un determinato profilo miRNA ed uno specifico profilo genico in pazienti con mutazioni predittive di risposta alla terapia mirata. Qualora venga stabilita l'associazione e identificati putativi miRNA d'interesse, sarà necessario uno studio molecolare e biochimico, mirato, da effettuare in vitro su linee cellulari di adenocarcinoma non a piccole cellule wild type (A-549, ATCC® CCL-185™) e linee cellulari con la mutazione d'interesse. Su di esse, l'analisi dell'espressione proteica per mezzo di Western Blot potrà chiarire il ruolo dei miRNAs all'interno dei pathways di segnalazione coinvolti nell'evento tumorale. Contestualmente verranno individuati putativi miRNAs la cui variazione dell'espressione può essere utile nella diagnosi e nel monitoraggio della malattia nel tempo.

Una volta individuati i miRNAs e accertato il loro ruolo in determinati pathways di segnalazione, sarà interessante ampliare la ricerca in campo farmacologico per un loro putativo utilizzo nella terapia targeted personalizzata.

BIBLIOGRAFIA

- Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY. 2008. "Characterization of microRNAs in serum: A novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 18:997–1006.
- Eliņa Zandberga, Viktors Kozirovskis, Arturs A bols, Diana Andrejeva, Gunta Purkalne and Aija Line "Cell-Free MicroRNAs as Diagnostic, Prognostic, and Predictive Biomarkers for Lung Cancer" *Genes, Chromosomes & Cancer* 52:356–369 (2013)
- Geoffrey R Oxnard, Cloud P Paweletz, Yanan Kuang, et al. "Noninvasive detection of response and resistance in EGFR-mutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA" *Clinical Cancer Research* (2014)
- Hu Z, Chen X, Zhao Y, Tian T, Jin G, Shu Y, Chen Y, Xu L, Zen K, Zhang C, Shen H. 2010. Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 28:1721–1726.
- Huan Zhang, Yuliang Su, Fangxiu Xu, Jinyu Kong, Herbert Yu, Biyun Qian "Circulating MicroRNAs in Relation to EGFR Status and Survival of Lung Adenocarcinoma in Female Non-Smokers" *PlosOne* (2013)
- Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, Banham AH, Pezzella F, Boulwood J, Wainscoat JS, Hatton CS, Harris AL. 2008 "Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma". *Br J Haematol* 141:672–675
- Lopez Massimo, *Oncologia Medica Pratica*
- Maria Moksnes bjaanæs, Ann Rita Halvorsen, Steinar Solberg, Lars Jørgensen, Tommaso A. Dragani, Antonella Galvan, Francesca Colombo, Marco Anderlini, Ugo Pastorino, Elin Kure, Anne-Lise Børresen-Dale, Odd Terje Brustugun and Åslaug Helland "Unique microRNA-profiles in EGFR-mutated lung adenocarcinoma" *Int. J. Cancer*: 135, 1812-1821 (2014)
- Orazio Fortunato, Mattia Boeri, Carla Verri, Davide Conte, Mavis Mensah, Paola Suatoni, Ugo Pastorino and Gabriella Sozzi "Assessment of Circulating microRNAs in Plasma of Lung Cancer Patients" *Molecules* 2014, 19, 3038-3054
- Paola Ulivi and Wainer Zoli "miRNAs as Non-Invasive Biomarkers for Lung Cancer Diagnosis" *Molecules* 2014, 19, 8220-8237
- Yunlong Zhang, Qian Yang, Siwang Wang "MicroRNAs: a new key in lung cancer" *Cancer Chemother Pharmacol* 2014