PROGETTO DI RICERCA - SINOSSI

RICERCA DI BIOMARCATORI NEL CARCINOMA DEL COLONRETTO

Razionale

Il recente sviluppo della terapia a bersaglio molecolare (target therapy) ha permesso di evidenziare che in tumori dello stesso tipo può esistere una eterogenicità genetica e che alcuni tumori che hanno come bersaglio molecolare uno specifico pathway possono essere resistenti alle terapie in forma primaria oppure acquisire resistenza in forma secondaria.
L'azione della terapia a bersaglio molecolare è specifica soltanto per un determinato 'bersaglio' contro cui è diretta e che è presente soltanto ad esempio nelle cellule tumorali. Il bersaglio può essere un recettore presente sulla superficie o all'interno della cellula neoplastica: in entrambi i casi si tratta di elementi indispensabili per la crescita della cellula tumorale e per la disseminazione metastatica, che in questo modo vengono bloccati. Poiché le terapie a bersaglio molecolare colpiscono prevalentemente le cellule tumorali gli effetti collaterali causati da questo tipo di terapie sono più limitati, con notevole miglioramento della qualità della vita dei pazienti affetti da tumore.
Uno degli elementi chiave nella crescita e nella diffusione dei tumori è il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) e gli agenti biologici che hanno come bersaglio EGFR mostrano di dare benefici clinici in diversi tumori umani, sia da soli che in combinazione con le terapie citotossiche (chemioterapie) standard [1]. L'attivazione costitutiva del pathway di EGFR (EGFR/RAS/PI3K), causata ad esempio da mutazioni del gene KRAS, avviene in molti tumori solidi, tra cui anche il cancro del colonretto (CRC) e questo evento in particolare, è stato ampiamente dimostrato compromette la terapia con agenti biologici anti-EGFR.
I MicroRNA (miRNA) sono piccoli frammenti di RNA che regolano l'espressione di diversi geni e funzioni delle cellule agendo come soppressori o oncogeni. Studi recenti hanno evidenziato che i miRNA let-7, miR-143 miR-217 miR-18a* e miR-96 sono responsabili della regolazione negativa del gene KRAS con inattivazione della sua funzione. In particolare, è stato anche dimostrato che un singolo SNP nella regione di legame del miRNA Let-7 (LCS6) all'RNA messaggero del gene KRAS può compromettere il controllo negativo di Let-7 sull'espressione di KRAS e come conseguenza influenzare la risposta a terapie basate sull'uso di agenti biologici anti-EGFR [5].

1506 UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI URBINO CARLO BO

Dipartimento di Scienze Biomolecolari
Sezione di Biochimica e Biologia Molecolare
Via Saffi, 2 – 61029 Urbino PU – Tel. +39 0722 305252 Fax +39 0722 305324

Ma anche i polimorfismi presenti nei geni che fanno parte del pathway di EGFR possono essere in grado di modulare la risposta alle terapie con agenti biologici anti-EGFR come gli SNP funzionali in grado di modulare l'espressione di EGFR, l'espressione di IGF-1 o su componenti della risposta immunitaria evocata dagli agenti biologici anti-EFGR [2] [3] [4].

Obiettivi

Lo scopo del progetto è quello di analizzare il profilo genetico di 100 campioni biologici d'archivio, costituiti da tessuto tumorale e sangue periferico, provenienti da soggetti con tumore del colonretto. Analizzeremo un pannello di otto polimorfismi genetici su DNA genomico estratto da cellule di sangue periferico e il livello di espressione di cinque miRNA su tessuto tumorale. Parallelamente si raccoglieranno dagli archivi le informazioni relative alle terapie standard assunte dagli stessi soggetti e si cercherà una eventuale correlazione tra il profilo genetico studiato e i trattementi assunti alla luce degli esiti clinici ottenuti. Ciò consentirà di identificare eventuali biomarcatori utili per caratterizzare la popolazione di pazienti che può trarre un reale vantaggio da specifici trattamenti innovativi (target therapy).
L'utilizzo dei materiali biologici per effettuare le indagini previste dal progetto è stato opportunamente e previamente autorizzato tramite firma di idoneo Consenso Informato da parte di ciascuno dei soggetti che hanno fornito i campioni. Il loro impiego è pertanto idoneo da un punto di vista etico-amministrativo.

Metodi

Le indagini che verranno condotte sono le seguenti:

- i livelli di espressione di let-7a, miR-143, miR-18a*, miR-217 e miR-96
- I polimorfismi genetici 497 EGFR G/A (rs11543848), EGFR-216 G/T (rs712829), EGF 61 A/G (rs4444903), CCND1 870 G/C (rs605965), COX-2-756 A/G (rs20417), IGF-1 91565 G/A (2.946.834), FcyRγIIIa -158T/G (rs396991), FcyRγ-IIa 131 G/A (rs1801274)

Espressione dei livelli dei miRNA

L'analisi di espressione dei miRNA sarà eseguita su tessuto tumorale paraffinato e fissato in formalina su vetrino (FFPE).
In breve, 3-5 sezioni di tessuto FFPE di spessore 5-10μm saranno prelevati dall'archivio e utilizzati per estrarre i miRNA. Una sezione sarà colorata con ematossilina-eosina e servirà al patologo per identificare la zona tumorale più rappresentativa da cui estrarre i miRNA.

1506 UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI URBINO CARLO BO

Dipartimento di Scienze Biomolecolari
Sezione di Biochimica e Biologia Molecolare
Via Saffi, 2 – 61029 Urbino PU – Tel. +39 0722 305252 Fax +39 0722 305324

I miRNA verranno estratti usando kit disponibili in commercio, seguendo le istruzioni del produttore. La purezza dell'RNA totale e la concentrazione ottenuta dall'estrazione (rapporto 260/280nm) verrà calcolata con lo spettrofotometro NanoDrop 1000 (Technologies Inc., Rockland, DE, USA). Il cDNA verrà generato usando kit in commercio, seguendo le istruzioni del produttore. La Real-Time quantitativa (qRT-PCR) per determinare l'espressione dei miRNA sarà effettuata su una Applied Biosystems 7500 Real-time (Foster City, CA, USA). Come "reference gene" per determinare i valori di espressione verrà usato RNU6B. L'efficienza della qRT-PCR verrà calcolata per ogni miRNA utilizzando la formula E=(10-1/slope-1) x 100 usando il valore Ct rispetto al log del cDNA (in una serie di diluizioni a base 10).
La quantificazione relativa dei miRMA rispetto al "reference gene" sarà espressa come $\Delta Ct = Ct_{(miRNA)} - Ct_{(reference\ gene)}$, dove il Ct è definito come il numero di cicli necessari alla fluorescenza per raggiungere un determinato livello soglia stabilito per la rilevazione del dato, il quale è inversamente correlato alla quantità di miRNA presente nel campioni; pertanto più è alto il livello di espressione del miRNA più il ΔCt è minore.

Genotipizzazione

Il DNA genomico verrà estratto da 1 ml di sangue periferico raccolto in provette con EDTA come coagulante con kit commerciali, secondo le istruzioni del produttore e verrà utilizzato per eseguire la genotipizzazione dei campioni. I primer per la PCR e le condizioni di amplificazione saranno studiate e selezionate con il software PSQ Design (Biotage AB).
Useremo 2 Tecnologie per determinare i genotipi: la High Resolution Melt (HRM) e il pyrosequenziamento™ dopo PCR.
La HRM è una potente tecnica per l'individuazione dei polimorfismi nella sequenza di DNA. Prodotti di PCR combinati con coloranti intercalanti (ad es. EvaGreen) del DNA, possono essere usati a concentrazioni saturanti consentendo di discriminare le variazioni di sequenza causate dalla presenza di SNP direttamente a video senza ulteriori manipolazioni.
Il Pyrosequenziamento™ è una tecnica di sequenziamento molto sensibile e finalizzata a rilevare soprattutto i polimorfismi. I primer di amplificazione e di sequenziamento degli ampliconi, e le condizioni di amplificazione per la genotipizzazione, verranno selezionati tramite il software PSQ design (Biotage AB). I polimorfismi saranno rilevati utilizzando il Software per la determinazione SNP (Biotage AB) in dotazione al pirosequenziatore™.
L'analisi statistica inizierà con una statistica descrittiva, che fornirà sintesi grafiche e numeriche riguardanti i biomarcatori e gli andamenti clinici.
Il test del chi-quadro per le variabili categoriche, il t- test a two-sample o il test ANOVA per le variabili continue, il test log-rank per gli end point tempo-evento ove disponibili saranno

Dipartimento di Scienze Biomolecolari
Sezione di Biochimica e Biologia Molecolare
Via Saffi, 2 – 61029 Urbino PU – Tel. +39 0722 305252 Fax +39 0722 305324

utilizzati per investigare le differenze nelle caratteristiche , nei biomarcatori o negli andamenti clinici tra i vari gruppi di campioni determinati.
Le curve di Kaplan-Meier, il log-rank test ed i modelli proporzionali di Cox, saranno impiegati per esplorare il rapporto dei vari biomarcatori e gli esiti clinici.

BIBLIOGRAFIA

[1] J. Tabernero, "The role of VEGF and EGFR inhibition: implications for combining anti-VEGF and anti-EGFR agents.," *Molecular cancer research,* vol. 5, no. 3, pp. 203-20, Mar. 2007.

[2] F. Graziano et al., "Pharmacogenetic profiling for cetuximab plus irinotecan therapy in patients with refractory advanced colorectal cancer," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 26, no. 9, pp. 1427–1434, 2008.

[3] T. Winder and H.-J. Lenz, "Vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor signaling pathways as therapeutic targets for colorectal cancer.," *Gastroenterology*, vol. 138, no. 6, pp. 2163-76, Jun. 2010.

[4] F. Bibeau et al., "Impact of FcgammaRIIa-FcgammaRIIIa polymorphisms and KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 27, no. 7, pp. 1122–1129, 2009.

[5] F. Graziano et al., "Genetic modulation of the Let-7 microRNA binding to KRAS 3′-untranslated region and survival of metastatic colorectal cancer patients treated with salvage," *Pharmacogenomics,* vol.10, no. 5, pp. 458-64, 2010.

Responsabile della Ricerca
Prof. Mauro Magnani

1506 UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI URBINO CARLO BO

Dipartimento di Scienze Biomolecolari
Sezione di Biochimica e Biologia Molecolare
Via Saffi, 2 – 61029 Urbino PU – Tel. +39 0722 305252 Fax +39 0722 305324