



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

**Dottorato di Ricerca in Biochimica e Biologia Molecolare
Ciclo XXVIII**

IDENTIFICAZIONE DI miRNA CORRELATI AD EGFR: NUOVI POTENZIALI BIOMARCATORI DI RISPOSTA ALLA TERAPIA DI 2^a-3^a LINEA IN PAZIENTI CON NSCLC METASTATICO

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Andrea Mozzarelli

Tutor:

Dott. Alberto Cavazza

Dottoranda: Dott.ssa Alessandra Bisagni

INDICE.....	I-III
ABSTRACT.....	1
INTRODUZIONE.....	3
1. Epidemiologia e classificazione del carcinoma del polmone.....	3
2. Trattamento del NSCLC.....	7
3. Erlotinib e Gefitinib.....	9
4. Alterazioni genetiche classiche associate al NSCLC.....	11
5. Alterazioni genetiche associate a resistenza ai TKIs nel NSCLC.....	13
6. I microRNA.....	13
6.1. Biogenesi, meccanismo d'azione e funzioni dei miRNA.....	13
6.2. MiRNA coinvolti nel pathway di EGFR nel NSCLC.....	16
6.3. MiRNA con ruolo diagnostico e prognostico nel NSCLC.....	18
SCOPO DELLA RICERCA.....	20
MATERIALI E METODI.....	21
7. Pazienti.....	21
8. Linee Cellulari.....	23

9. Estrazione di RNA.....	24
9.1. Estrazione di RNA da tessuto paraffinato.....	24
9.2. Estrazione di RNA da cellule.....	24
9.3. Quantificazione di RNA.....	25
10. Real-Time qPCR.....	26
10.1. Retro-trascrizione.....	26
10.2. Real-Time qPCR.....	27
10.3. Analisi dei dati di espressione.....	29
11. Trasfezione cellulare.....	30
12. Citofluorimetria a flusso.....	33
13. Western blot.....	34
14. MTT Assay.....	36
15. Analisi statistica.....	37
RISULTATI.....	39
16. Caratteristiche cliniche dei pazienti.....	39
17. Espressione di miRNA capaci di legarsi ad EGFR mRNA in campioni di pazienti con NSCLC metastatico trattati con Erlotinib in 2a-3a linea.....	41
17.1. Profiling dei miRNA.....	41

17.2. Heat map di espressione dei miRNA.....	44
18. Studio del ruolo biologico di miR-133 in modelli <i>in vitro</i>	46
18.1. Efficienza di trasfezione.....	46
18.2. Effetto di miR-133b sull'espressione di EGFR.....	48
18.3. Effetto di miR-133b sulla crescita cellulare.....	51
18.4. Effetto sulla crescita cellulare del trattamento combinato di miR-133b mimic + Erlotinib.....	51
DISCUSSIONE.....	53
BIBLIOGRAFIA.....	60
PUBBLICAZIONI.....	IV-V

ABSTRACT

Lung cancer is the most common cancer and the leading cause of cancer-related mortality worldwide. Surgical resection remains the main treatment of choice for non-small cell lung cancer (NSCLC), and chemotherapy is not always effective. Therefore, novel therapeutic strategies have been developed such as Erlotinib and Gefitinib, small-molecule inhibitors of the tyrosine kinase domain (TKIs) of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). It has been found that EGFR is overexpressed or mutated in most NSCLC and its alteration frequently correlates with a poor prognosis. EGFR is an important therapeutic target for NSCLC. However, the clinical response of tumors to existing anti-EGFR agents is often limited.

MicroRNAs (miRNAs) are short, endogenous, non-coding small RNAs of about 20-24 nucleotides that bind specific target mRNAs to repress gene expression, either via inducing translational repression or transcript degradation. They play important roles in cellular processes including development, proliferation, cell cycles progression, apoptosis, differentiation, migration and metabolism. Aberrant miRNAs expression is altered in autoimmune, cardiovascular and cancer diseases, and recently they have been demonstrated to be diagnostic and prognostic markers in lung cancer.

This project was aimed at determining whether six EGFR-related miRNAs are deregulated in patients with NSCLC and whether these miRNAs correlate with response to Erlotinib treatment in patients with lung cancer. The expression of miR-7, miR-21, miR-133a, miR-133b, miR-146a, and miR-146b, involved in the EGFR pathway in a cohort of 33 lung cancer patients (8 responder and 25 non-responder) receiving Erlotinib in 2nd- or 3rd-line were analyzed. The patients with disease stabilization on Erlotinib for at least 6 months were considered responders.

The results suggested that miR-7, -133b and -146a might be involved in the response to treatment with Erlotinib. Overall, miR-133b showed the higher differential expression between responder and non-

responders. It was also investigated the ability of miR-133b to regulate EGFR expression in two lung cancer cell lines (A549 and H1299). MiR-133b effect on cell growth was determined. The relationship between miR-133b and sensitivity to Erlotinib in NSCLC cells was also explored. Increasing miR-133b expression led to a down-regulation of EGF Receptor and EGFR-related signaling in A549 cell lines. H1299 cell lines were less sensitive to miR-133b up-regulation, probably due the existence of alternative pathways. Combination of miR-133b and Erlotinib increased the efficacy of Erlotinib treatment only in A549 cell lines. Overall, these results indicate that miR-133b might enhance/restore sensitivity to Erlotinib in a fraction of patients.

INTRODUZIONE

1. Epidemiologia e classificazione del carcinoma del polmone

In questi anni incidenza e mortalità dei tumori sono diminuite grazie a prevenzione primaria, programmi di screening, miglioramenti diagnostici e soprattutto miglioramento dei programmi terapeutici. Tuttavia, il cancro del polmone rappresenta la prima causa di morte per neoplasia in Italia e in tutto il mondo. I nuovi casi per anno, in Italia, sono più di 40.000.

Il fumo di tabacco rappresenta il principale fattore di rischio per l'insorgenza dei tumori del polmone, e si ritiene sia responsabile dell'85% dei casi osservati. Negli ultimi anni negli uomini l'incidenza è diminuita in relazione alla diminuzione del consumo di tabacco, invece nelle donne si è registrata un'inversione di tendenza con aumento del consumo di tabacco e conseguente aumento dell'incidenza. [1, 2]

La classificazione istopatologica raccomandata è quella della World Health Organization (WHO). Storicamente il carcinoma del polmone era suddivisibile in due grandi classi: carcinoma polmonare a piccole cellule o microcitoma (Small Cell Lung Cancer, SCLC) e carcinoma polmonare non a piccole cellule (Non Small Cell Lung Cancer, NSCLC), ma i molti e recenti progressi in clinica, radiologia, istologia e biologia molecolare del cancro del polmone hanno costituito la base per un'accurata revisione. Il corretto inquadramento patologico è fondamentale per definire l'approccio terapeutico. [3, 4]

A seguito della revisione, le neoplasie polmonari sono attualmente riconducibili a tre tipologie principali: Adenocarcinoma, Carcinoma Squamoso e Carcinoma Neuroendocrino. Questi istotipi sono identificati da panel di antigeni mediante metodica immunoistochimica (IHC). Questi cambiamenti sono stati necessari e supportati da una combinazione di studi clinico-patologici e dai più recenti studi di analisi delle alterazioni genetiche del cancro del polmone.

L'adenocarcinoma rappresenta approssimativamente il 40-50% di tutti i tumori al polmone. È un tumore a prevalente sviluppo periferico. Gli adenocarcinomi sono caratterizzati dall'espressione di specifici marker come TTF-1 (Trascriptional Thiroid Factor1), napsina A e CK7. Il carcinoma a cellule squamose comprende approssimativamente il 30% di tutti i casi di cancro al polmone. È composto da cellule epiteliali con diversi gradi di differenziazione associati a metaplasia. È più frequente nei bronchi prossimali. Secondo la classificazione WHO 2015 i sottotipi a cellule chiare, a piccole cellule e papillare sono stati ritirati e sostituiti dai sottotipi cheratinizzanti e non-cheratinizzanti, con la sola conservazione del sottotipo basaloide. I carcinomi squamosi esprimono i marker p63 (fattore trascrizionale di differenziazione squamosa), p40 e desmocolina-3.

Il carcinoma neuroendocrino è un tumore a prevalente localizzazione centrale con rapida diffusione locale ed ematica e con caratteristico coinvolgimento del sistema nervoso centrale; costituisce circa il 15% dei carcinomi polmonari. Con la nuova classificazione del WHO 2015, il carcinoma neuroendocrino raggruppa al suo interno il carcinoide (tipico e atipico), il carcinoma a piccole cellule (SCLC) e il carcinoma a grandi cellule neuroendocrino (LCNEC). Questi ultimi due sono caratterizzati da un elevato indice mitotico e dal frequente riscontro di necrosi diffusa.

L'assenza di un riconoscibile istotipo definisce il carcinoma a grandi cellule (nei campioni chirurgici) e il carcinoma non a piccole cellule NOS (in campioni biotici e citologici): tali entità rappresentano quindi le forme indifferenziate di carcinoma del polmone e sono attualmente poco rappresentate. Il carcinoma a grandi cellule si presenta per lo più come una grande massa periferica con margini poco definiti; spesso ha una crescita molto rapida. Il suo comportamento clinico è simile a quello di un adenocarcinoma ma la sua diagnosi è in genere una diagnosi di esclusione rispetto agli altri istotipi. Come già detto, questo carcinoma non possiede una specifica espressione immunoistochimica tanto che è possibile ricollocare il singolo tumore in uno dei diversi istotipi, con poche eccezioni (Figura 1).

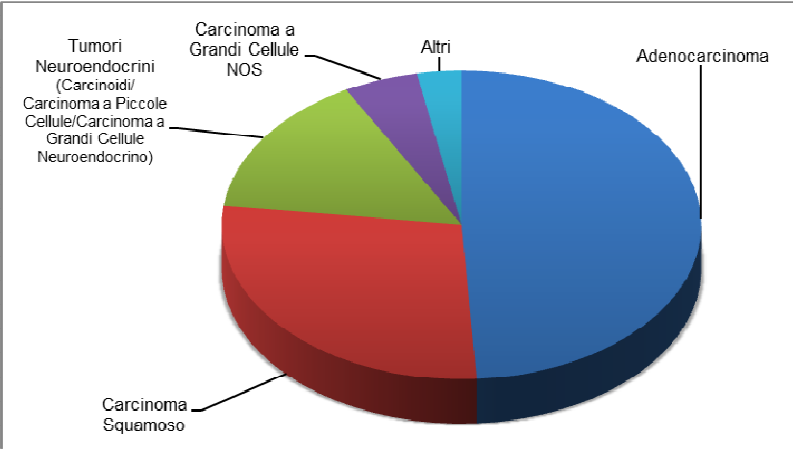


Figura 1: Classificazione istopatologica del carcinoma del polmone non a piccole cellule.

Il sistema di classificazione TNM consente una descrizione anatomica della malattia neoplastica, ricorrendo alla valutazione di tre parametri: l'estensione del tumore primitivo (T), l'estensione di metastasi nei linfonodi regionali (N) e l'assenza o la presenza di metastasi a distanza (M) (Tabella 1).

Classificazione	Descrizione
Tx	Il tumore primitivo non può essere definito, oppure sono presenti cellule tumorali nell'escreato o nel liquido di lavaggio bronchiale, ma non è visualizzato con le tecniche per immagini o con la broncoscopia.
T0	Assenza di evidenza del tumore primitivo
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumore di 3 cm o meno nella sua dimensione massima, circondato da polmone o da pleura viscerale, e alla broncoscopia non si rilevano segni di invasione più proximale del bronco lobare (bronco principale non interessato da malattia)
T1a	Tumore non superiore a 2 cm nel diametro maggiore
T1b	Tumore superiore a 2 cm ma non superiore a 3 cm
T2	Tumore superiore a 3 centimetri ma non superiore a 7 cm, o tumore con una qualunque delle seguenti caratteristiche:

	- interessamento del bronco principale, 2 cm o più distale alla carina; - invasione della pleura viscerale; - associato ad atelettasia o polmonite ostruttiva che si estende alla regione ilare, ma non interessa il polmone in toto
T2a	Tumore superiore a 3 cm ma non superiore a 5 cm nel diametro maggiore
T2b	Tumore superiore a 5 cm ma non superiore a 7 cm nel diametro maggiore
T3	Tumore superiore a 7 cm o che invade direttamente alcune delle seguenti strutture: parete toracica (inclusi i tumori del solco superiore), diaframma, nervo frenico, pleura mediastinica, pericardio parietale; o tumore del bronco principale a meno di 2 cm distalmente alla carina, ma senza interessamento della carina stessa; o associato ad atelettasia o polmonite ostruttiva del polmone in toto, o nodulo separato nel medesimo lobo del tumore primitivo
T4	Tumore di qualunque dimensione, che invade direttamente alcune delle seguenti strutture: mediastino, cuore, grandi vasi, trachea, nervo laringeo ricorrente, esofago, corpo vertebrale, carina; nodulo/i separato/i in un lobo ipsilaterale ma differente rispetto al lobo del tumore primitivo
Nx	I linfonodi regionali non possono essere valutati
N0	Assenza di metastasi nei linfonodi regionali
N1	Metastasi nei linfonodi peribronchiali e/o ilari ipsilaterali e intrapolmonari, incluso il coinvolgimento per estensione diretta
N	
N2	Metastasi nei linfonodi mediastinici e/o sottocarenali ipsilaterali
N3	Metastasi nei linfonodi mediastinici controlaterali, ilari controlaterali, scaleni ipsi- o contro-laterali, sovraclaveari
M0	Assenza di metastasi a distanza
M	
M1a	Noduli tumorali in un lobo controlaterale rispetto al tumore primitivo; tumore con noduli pleurici o versamento neoplastico pleurico o pericardico
M1b	Metastasi a distanza

Tabella 1: Classificazione TNM nel carcinoma del polmone.

Abbinando tra loro le categorie di T, N ed M, si ottengono 24 combinazioni TNM. Queste categorie sono poi stratificate in stadi; gli stadi sono indicati con i numeri romani: 0, I, II, III, IV. Il carcinoma in situ è considerato stadio 0, i casi con metastasi a distanza sono

considerati di stadio IV. Questa classificazione in stadi consente di stimare la prognosi e di definire la terapia più adatta (Tabella 2).

Stadio	T	N	M
Carcinoma occulto	Tx	N0	M0
Stadio 0	Tis	N0	M0
Stadio IA	T1a,b	N0	M0
Stadio IB	T2a	N0	M0
Stadio IIA	T2b	N0	M0
	T1a,b,T2a	N1	M0
Stadio IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadio IIIA	T1a,b, T2a,b	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
	T4	N0, N1	M0
Stadio IIIB	T4,	N2	M0
	Qualunque T	N3	M0
Stadio IV	Qualunque T	Qualunque N	M1

Tabella 2: Stadiazione del carcinoma del polmone.

2. Trattamento del NSCLC

L'approccio terapeutico nel NSCLC prevede l'utilizzo di tre diverse modalità terapeutiche (chirurgia, radioterapia, chemioterapia) che vengono usate spesso in combinazione, con l'obiettivo primario di migliorare la sopravvivenza e la qualità della vita dei pazienti.

La terapia chirurgica rappresenta il trattamento di scelta per i pazienti con NSCLC in stadio iniziale di malattia (stadio I e II). In casi selezionati per lo stadio IIIA, la chirurgia viene preceduta da chemioterapia neoadiuvante con lo scopo di ridurre il volume della massa tumorale e, al contempo, ridurre la quota di malattia micro-metastatica potenzialmente presente. Gli stadi IIIB-IV sono considerati inoperabili. Per ridurre il rischio di recidive, generalmente si preferisce la chemioterapia adiuvante post-chirurgica per i pazienti sottoposti a resezione radicale in stadio I-II o IIIA con buon performance status, assenza di patologie concomitanti e buona ripresa post-chirurgica.

La radioterapia può essere utilizzata con intenti curativi o palliativi. Lo standard terapeutico per la malattia iniziale non operabile (soprattutto in stadio I) è la radioterapia stereotassica ablativa, che consiste nella somministrazione di dosi elevate di radiazioni in una o poche frazioni. Nei pazienti con malattia localmente avanzata inoperabile lo standard terapeutico è costituito dalla chemio-radioterapia concomitante. Non vi sono indicazioni univoche sul migliore regime di chemioterapia da utilizzare. In alternativa, si può utilizzare un approccio sequenziale (chemioterapia seguita dalla radioterapia). L'utilizzo della sola radioterapia è riservato ai pazienti non idonei a ricevere un trattamento di chemioterapia, con l'intento di mantenere sotto controllo la sintomatologia e di migliorare la qualità della vita.

La chemioterapia è il trattamento più utilizzato negli stadi avanzati o metastatici del NSCLC. Con poche eccezioni, la malattia metastatica (stadio IV) non è operabile, quindi l'unica opzione terapeutica è la terapia sistemica, il cui obiettivo non è la guarigione ma la cronicizzazione della malattia. In questi ultimi anni il trattamento del paziente con carcinoma metastatico si è modificato radicalmente con l'introduzione nella pratica clinica di nuovi farmaci chemioterapici cosiddetti di terza generazione (Vinorelbina, Taxani, Gemcitabina, Pemetrexed) e di farmaci a bersaglio molecolare (Gefitinib, Erlotinib, Afatinib, Crizotinib).

La dimostrazione dell'efficacia di nuove combinazioni, una migliore integrazione della chemioterapia con le modalità di trattamento loco-regionale (chirurgia e radioterapia) hanno contribuito ad una svolta importante nel trattamento di questa patologia. [5]

A partire dal 2000 sono stati compiuti diversi e importanti studi che hanno definito meglio le combinazioni di trattamento in seconda linea in pazienti con NSCLC dimostrando una non inferiorità dei trattamenti di combinazione con cisplatino ed agenti di terza generazione come Taxani, alcaloidi della vinca, Gemcitabina rispetto al trattamento di sola chemioterapia. [6, 7, 8, 9, 10, 11]

Successivi studi randomizzati di fase III hanno documentato i vantaggi nell'utilizzo di inibitori tirosinchinasici in prima linea in pazienti con

mutazioni attivanti di EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) in termini di Progression Free Survival (PFS) ed Overall Survival (OS) [12, 13, 14, 15, 16, 17].

In base a questi dati Gefitinib ed Erlotinib sono stati registrati in Europa per l'impiego in prima linea in pazienti con mutazioni attivanti di EGFR. Inoltre lo studio TITAN, che confrontava Erlotinib vs. chemioterapia (Docetaxel o Pemetrexed) in pazienti con progressione durante o immediatamente dopo 4 cicli di chemioterapia di prima linea a base di platino, non ha evidenziato significative differenze di efficacia tra Erlotinib e chemioterapia in questa tipologia di pazienti a prognosi sfavorevole. In base a questo studio, Erlotinib è stato approvato indipendentemente dallo stato mutazionale di EGFR, definendolo come alternativa alla chemioterapia nel trattamento di seconda linea. [18]

3. Erlotinib e Gefitinib

Le protein-chinasi sono enzimi ubiquitari che catalizzano la fosforilazione di proteine trasferendo un gruppo fosfato dall'ATP al gruppo ossidrilico della catena laterale dei residui di tirosina, serina o treonina (Figura 2).

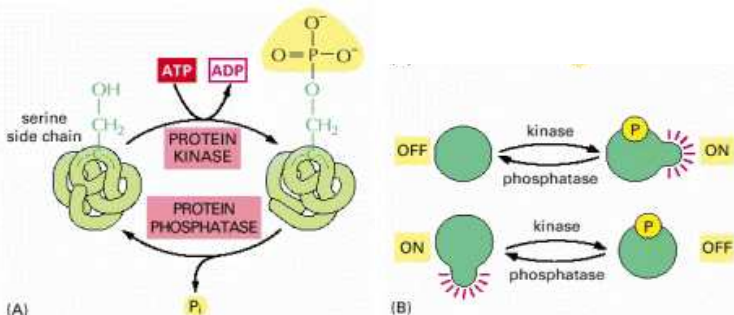


Figura 2: Meccanismo di funzionamento di una protein-chinasi: l'enzima catalizza il trasferimento di un gruppo fosfato da una molecola di ATP ad una proteina bersaglio. La fosforilazione di una proteina si traduce in una modifica della sua funzionalità. (da Alberts B, *Molecular Biology of the Cell*).

Sono fondamentali in tutte le vie di trasduzione del segnale influenzano la trascrizione di geni e la sintesi del DNA.

Esistono 3 tipi di protein-chinasi: le tirosin-chinasi che fosforilano solo i residui di tirosina; le serina/treonina chinasi che fosforilano i residui di serina e treonina; ed infine le protein-chinasi che fosforilano tutti e 3 i residui.

In particolare le tirosina-chinasi (TK) possono catalizzare la fosforilazione di un residuo di tirosina all'interno della stessa chinasi (autofosforilazione) oppure in altre proteine a valle della via di trasduzione del segnale. In particolare le TK recettoriali sono costituite da un dominio extracellulare che lega un ligando (fattori di crescita o citochine) e da un' α -elica transmembrana che lo unisce ad un dominio intracellulare con il residuo di tirosina che si autofosforila (Figura 3).

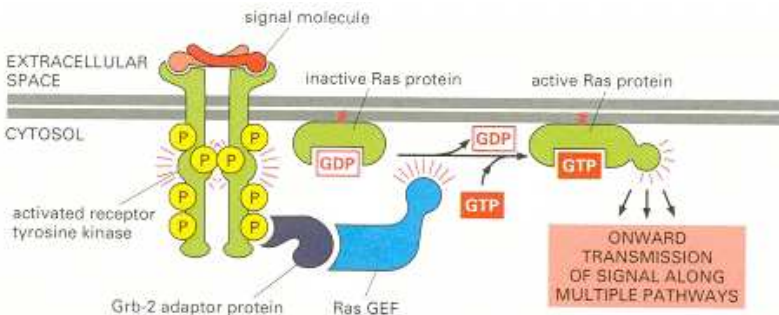


Figura 3: Attivazione della TK recettoriale (da *Alberts B, Molecular Biology of the Cell*) Quando il dominio extracellulare della TK recettoriale lega il fattore di crescita o la citochina, avviene un cambiamento conformazionale nella TK che dimerizza con un'altra TK; questo porta ad autofosforilazione del dominio intracellulare e ad attivazione della TK. La proteina Grb2 riconosce la TK fosforilata, si lega tramite il suo dominio SH2 che viene fosforilata a sua volta e attiva Ras. Ras innesca la fosforilazione a cascata di una serie di chinasi intracellulari che infine attivano la trascrizione genica.

Le TK sono coinvolte nella proliferazione, sopravvivenza e nel differenziamento cellulare. Riarrangiamenti genomici e amplificazioni geniche possono trasformare le TK in oncogeni: forme mutate che sono costitutivamente attive anche senza la presenza del ligando specifico.

Nel NCSLC, EGFR (TK recettoriale) può essere overespresso o mutato risultando costitutivamente attivo; in questi casi la terapia prevede l'utilizzo di inibitori delle tirosin-chinasi (TKI). Gefinitib (Iressa®) ed Erlotinib (Tarceva®) sono piccole molecole che selettivamente inibiscono l'attività tirosin-chinasica di EGFR. Entrambi sono inibitori competitivi dell'ATP ed impediscono l'attivazione della TK di EGFR (Figura 4). [19, 20]

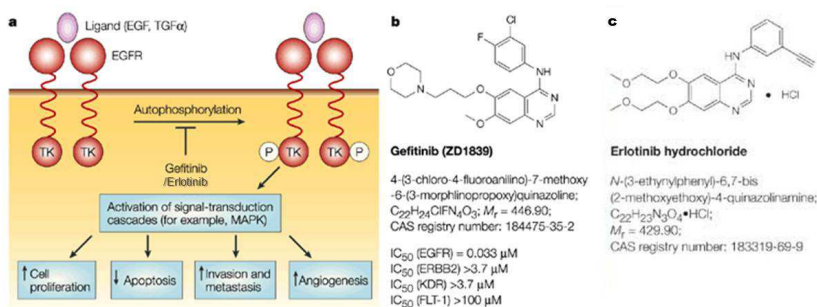


Figura 4: a) Illustrazione semplificata della trasduzione del segnale attraverso il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR). b) Struttura di Gefitinib. c) struttura di Erlotinib. MAPK, proteinchinasi attivata da mitogeni; P, gruppo fosfato; TGF, fattore di crescita trasformante; TK, dominio tirosin-chinasico. (da M Muhsin, J Graham & P Kirkpatrick. *Nature reviews* 2003; 3:556-557 e Dowell, J D.Minna and P Kirkpatrick, *Nature reviews* 2005; 4:13-14 modificate).

4. Alterazioni genetiche classiche associate al NSCLC

L'EGFR (erbB-1 o HER1), come già accennato, è una proteina che appartiene alla famiglia dei recettori erbB; la famiglia di questi recettori, oltre che da EGFR, è composta da HER2 (ErbB-2), HER3 (ErbB-3) e da HER4 (ErbB-4). Nel 10-15% degli adenocarcinomi di pazienti caucasici e nel 40% degli asiatici sono state identificate mutazioni attivanti di EGFR: delezioni dell'esone 19 (E746-A750) e mutazioni dell'esone 21 (L858R). Queste mutazioni rappresentano i bersagli molecolari specifici per i TKIs e devono essere studiate tempestivamente per selezionare i pazienti candidati al trattamento con tali farmaci (Figura 5). [21, 22, 23, 24]

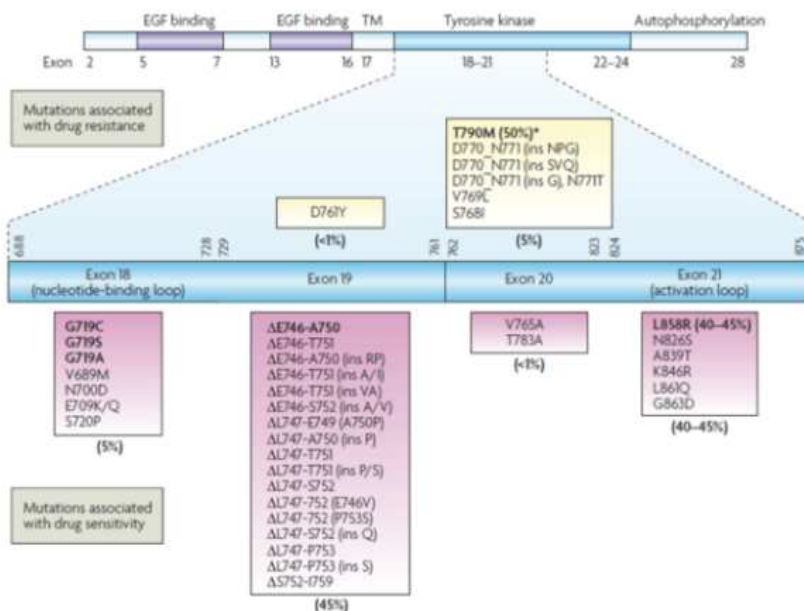


Figura 5: Mutazioni attivanti di EGFR (da Sharma SV, Bell DW, Settleman J, et al. *Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer*. *Nat Rev Cancer* 7: 169-81, 2007).

K-RAS (Kirsten rat sarcoma) è un oncogene coinvolto nella trasduzione del segnale mediato da EGFR e presenta mutazioni nel 20% degli adenocarcinomi dei fumatori. Le mutazioni in k-RAS sono mutualmente esclusive rispetto a quelle di EGFR.

Lo studio delle mutazioni di EGFR mediante il sequenziamento degli esoni 18-21 deve essere considerata la metodica più attendibile per l'identificazione dei pazienti ad alta probabilità di risposta ai TKIs. Per contro, la mutazione di KRAS costituisce un fattore predittivo negativo al trattamento con TKIs.

5. Alterazioni genetiche associate a resistenza ai TKIs nel NSCLC

La resistenza ai TKIs viene classificata in primaria (preesistente al trattamento) o secondaria al trattamento. Alterazioni in ALK e ROS-1 possono definire la resistenza primaria ai TKIs. La traslocazione EML4-ALK (Echinoderm Microtubule associated protein Like 4-Anaplastic Lymphoma Kinase) attiva una specifica tirosinchinasi coinvolta nei processi di proliferazione e sopravvivenza cellulare. Questa traslocazione, presente nel 5% circa degli adenocarcinomi polmonari, è più comune nei non fumatori e induce una crescita tumorale che può essere efficacemente trattata con Crizotinib. La traslocazione ROS-1, che riguarda circa il 3% della popolazione degli adenocarcinomi, mostra un fenotipo tumorale sensibile a Crizotinib e a farmaci antiangiogenetici. [25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33]

Da tempo è noto che la somministrazione prolungata di Gefitinib ed Erlotinib in pazienti con mutazioni attivanti porta ad acquisire una resistenza secondaria. La resistenza secondaria o acquisita può essere data dalla presenza di altre mutazioni di EGFR ma la più comune è la mutazione T790M (>90% dei casi). Questa mutazione è dovuta alla sostituzione nucleotidica C>T in posizione 2369 nell'esone 20 (Figura 5). Il meccanismo con il quale tale mutazione conferisce resistenza ai TKIs non è stato ancora completamente chiarito. La mutazione T790M è stata osservata generalmente con bassa frequenza (<5%) anche in pazienti non trattati con inibitori tirosin chinasi di EGFR (resistenza de novo).

6. I microRNA

6.1. Biogenesi, meccanismo d'azione e funzioni dei miRNA

Il dogma centrale della biologia molecolare ideato da Francis Crick nel 1958 affermava l'esistenza di un flusso di informazioni alla base

dell'espressione genica: dal DNA, depositario dell'informazione genetica, alle proteine, molecole effettrici delle funzioni cellulari, attraverso l'intermediazione di molecole di RNA messaggero (mRNA). Non tutti gli RNA trascritti a partire dal DNA sono mRNA. Oltre agli RNA di trasporto (tRNA) e agli RNA ribosomiali (rRNA), che prendono comunque parte alla sintesi delle proteine, vi sono anche RNA la cui funzione non riguarda direttamente l'espressione del codice genetico e che perciò sono chiamati non coding RNA (ncRNA). Essi comprendono una vasta famiglia di RNA di piccole dimensioni che contribuiscono alla regolazione dell'espressione delle proteine.

A questo gruppo appartengono i microRNA (o miRNA), piccole molecole di RNA a singolo filamento di 20-22 nucleotidi. La prima fase della loro sintesi consiste nella trascrizione di una breve sequenza genomica da parte di una RNA polimerasi II. Da tale trascritto originano i cosiddetti microRNA primari (pri-miRNA). I pri-miRNA vengono poi riconosciuti da uno specifico enzima e trasformati in miRNA immaturi (pre-miRNA). Il pre-miRNA è trasportato nel citoplasma e riconosciuto da un altro enzima, che taglia la sequenza nucleotidica in più punti completando la maturazione dei miRNA nella forma finale di RNA a doppio filamento di 22 nucleotidi. A questo punto i miRNA possono andare in contro a due destini: se sono parzialmente complementari agli mRNA ne bloccano la traduzione in proteine, se invece la complementarietà è perfetta procedono alla loro degradazione riducendo la quantità di miRNA e della proteina prodotta. Nello svolgimento delle loro funzioni regolatorie, risulta fondamentale la sequenza dei primi 6-8 nucleotidi all'estremità 5', definita "seed sequence", che si appaia in modo complementare con il sito di legame sul 3'UTR dell'mRNA bersaglio (Figura 6). [34]

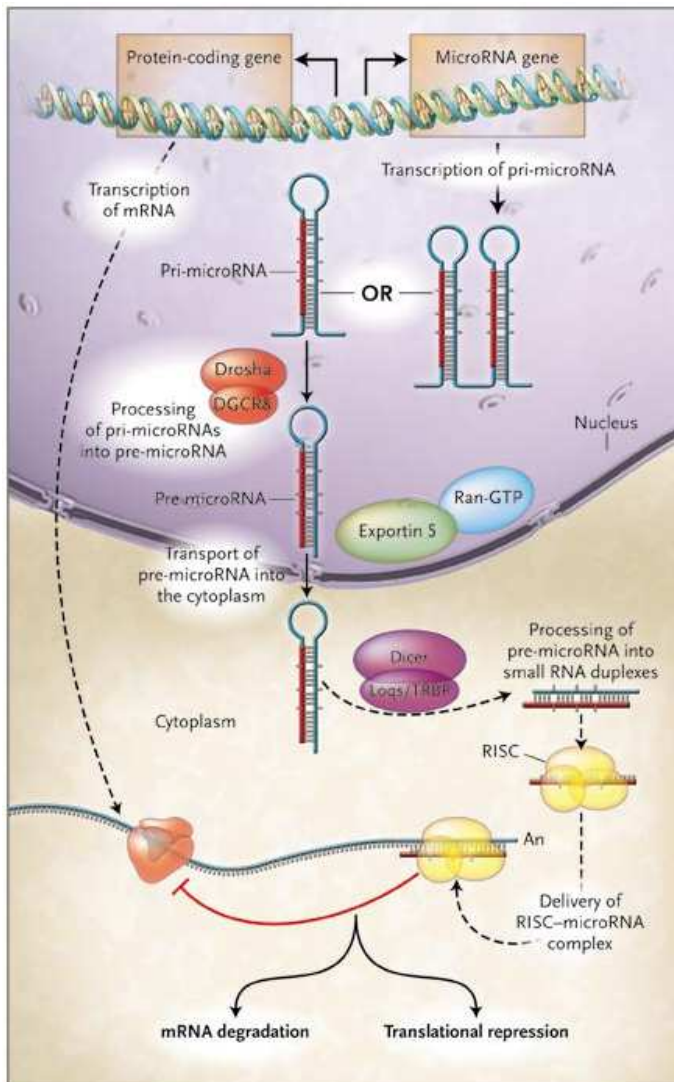


Figura 6: Maturazione e funzione dei miRNA. I miRNA sono espressi da tutti gli organismi pluricellulari oggi noti. (da Chang-Zheng Chen. *MicroRNAs as Oncogenes and Tumor Suppressors*. *n engl j med* 2005; 353 (17): 1768-1771).

I miRNA sono importanti regolatori dell'espressione dei geni. Una alterazione dell'espressione dei miRNA sembra essere associata ai cambiamenti pato-fisiologici. È stato dimostrato che i miRNA possono avere profili di espressione specifici per stadi di sviluppo, tessuti e varie patologie. Ciò comporta che ciascun tessuto è caratterizzato da uno specifico set di miRNA, il cui profilo di espressione è distintivo di quel tessuto. Ad oggi nell'uomo sono stati identificati circa più di 720 miRNA (<http://www.mirbase.org> – Sanger). Centinaia di miRNA sono stati clonati e sequenziati e le ricerche informatiche suggeriscono che il numero totale possa addirittura superare le mille unità e che regolino il 30-60% dei geni di tutto il genoma.

Nell'ambito della nomenclatura il prefisso "mir" è seguito da un trattino e un numero, quest'ultimo spesso indica l'ordine della sua scoperta (es. miR-16 è stato scoperto prima di miR-21). I miRNA con sequenze identiche ad eccezione di uno o due nucleotidi sono seguiti da un'ulteriore lettera minuscola, essi formano le cosiddette famiglie di miRNA (es. miR-133a, miR-133b e miR-133c). Quando due microRNA maturi provengono dalle opposte catene dello stesso pre-miRNA, sono indicati con un suffisso -3p o -5p (es. miR-128-3p e miR-128-5p). La specie d'origine è indicata con un prefisso di tre lettere, ad esempio, *hsa* per l'uomo (*Homo sapiens*), *oar* per la pecora (*Ovis aries*), *dhs* per *Drosophila*, *mmu* per il topo (*Mus muris*), *rno* per il ratto (*Rattus norvegicus*). In generale quando si parla di miRNA umani si omette il prefisso *hsa*.

6.2. MiRNA coinvolti nel pathway di EGFR nel NSCLC

I miRNA possono avere un ruolo fondamentale nella genesi e nella progressione dei tumori: l'espressione di specifici miRNA nelle cellule tumorali è diversa rispetto alle corrispondenti cellule sane. [35, 36]

Inoltre lo stesso miRNA può avere una differente azione e colpire diversi target nei diversi tumori. A seconda del tipo di funzione biologica i miRNA possono essere classificati in oncogeni (oncomiR) oppure oncosoppressori. Gli oncomiR si trovano in regioni amplificate o

sono sovraespressi nel tumore determinando un aumento della proliferazione cellulare, dell'angiogenesi, dell'invasività e una riduzione dell'apoptosi. I miRNA oncosoppressori si trovano in regioni delete o silenziate nel tumore e producono l'effetto biologico contrario (Figura 7). [37]

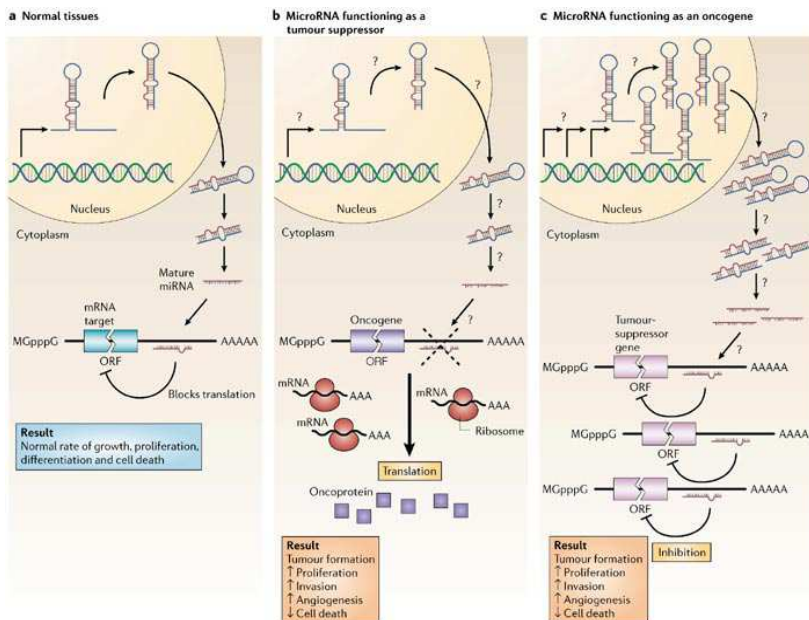


Figura 7: a) Nei tessuti normali, il corretto funzionamento dei microRNA (miRNA) determina una riduzione oppure un blocco nella traduzione delle proteine. b) Nel caso di miRNA oncosoppressori, una riduzione o eliminazione dei miRNA possono verificarsi a causa di difetti in ogni fase della biogenesi dei miRNA e, infine, portare all'espressione inadeguata del miRNA bersaglio. c) Nel caso di miRNA oncogenici, un aumento della quantità di miRNA potrebbe essere prodotta in tempi inadeguati o nei tessuti sbagliati, eliminando l'espressione di un miRNA oncosoppressore e portare a progressione del tumore. (da Aurora Esquela-Kerscher & Frank J. Slack. *Oncomirs — microRNAs with a role in cancer*. *Nature Reviews Cancer* 2006: 6, 259-269).

Molti studi sono stati effettuati per comprendere il meccanismo di funzionamento di specifici miRNA nel NSCLC, ma soprattutto per comprendere le loro interazioni con i principali biomarcatori già noti ed

utilizzati in clinica. Alcuni di questi miRNA sono espressi in maniera differente nei tessuti e nel sangue di pazienti con NSCLC rispetto a soggetti sani emergendo come potenziali biomarcatori diagnostici. Altri, invece, sono up-regolati oppure down-regolati e sono associati alla sopravvivenza indicando che i miRNA potrebbero essere potenziali biomarcatori prognostici. [38, 39, 40, 41, 42, 43]

Regolando l'espressione genica, i miRNA influenzano profondamente una vasta gamma di vie di segnalazione intracellulari. Studi su linee cellulari hanno identificato diversi miRNA coinvolti direttamente o indirettamente nella regolazione del pathway di EGFR nel NSCLC.

Una ricerca sistematica in 10 database informatici del gruppo di lavoro di Chan e coll ha individuato 138 miRNA che potenzialmente riconoscono EGFR come bersaglio. Escludendo quelli che erano risultati in meno di 3 database, i restanti 25 miRNA sono stati suddivisi in 3 gruppi: miRNA confermati da dati sperimentali o letteratura associati al tumore del polmone (miR-7, miR-128b, miR-155, miR-342-3p, miR-548-5p, miR-548n e miR-891b), miRNA confermati da dati sperimentali o letteratura associati ad altre malattie diverse dal tumore del polmone (miR-146a, miR-146b-3p, miR-146b-5p e miR-200a), infine miRNA risultati correlati ad EGFR da almeno 3 database (miR-27a, miR-27b, miR133a, miR-133b, miR-141, miR-302a, miR-302b, miR-302c, miR-302d, miR-370, miR-491-5p, miR-539, miR-548-3p e miR-875-5p). [44, 45]

6.3. MiRNA con ruolo diagnostico e prognostico nel NSCLC

A seguito dei primi studi che hanno dimostrato la grande stabilità dei miRNA nel siero e nel plasma, è risultato evidente che i miRNA presenti in circolo potrebbero essere potenziali biomarcatori non invasivi per la diagnosi precoce di vari tipi di cancro e di altre malattie. In uno studio di espressione di miRNA nel siero, Chen e collaboratori hanno individuato un panel specifico di 10 miRNA in grado di distinguere i pazienti con NSCLC dai pazienti sani con alta sensibilità

e specificità e soprattutto questo panel è correlato con lo stadio di malattia. [46]

Negli studi di Rabinowits l'espressione di 12 miRNA, tra cui miR-17-3p, miR-21, miR-106a, miR-146, miR-155, miR-191, miR-192, miR-203, miR-205, miR-210, miR-212 e miR-214, potrebbe essere utile come test di screening per prevedere l'insorgenza di adenocarcinoma del polmone. [47]

Contemporaneamente agli studi sul ruolo diagnostico dei miRNA, l'attenzione dei ricercatori si è rivolta anche al loro potenziale prognostico. Infatti diversi gruppi di studio hanno dimostrato che l'up- o la down-regolazione di miRNA sono associati alla sopravvivenza. Raponi e collaboratori, per esempio, hanno dimostrato che miR-146b è associato a ridotta sopravvivenza nei pazienti con carcinoma a cellule squamose (SCC). Recentemente, uno studio di Landi ha dimostrato un'associazione tra scarsa/ridotta sopravvivenza in pazienti maschi, fumatori ed affetti da SCC, e un panel di miRNA (let-7e, miR-34a, miR-34c-5p, miR-25, e miR-191). [48, 49]

SCOPO DELLA TESI

Questo lavoro di tesi è volto ad individuare biomarcatori in grado di identificare precocemente i soggetti che rispondono alla terapia con Erlotinib. Questo aumenta l'efficacia del farmaco ed evita/riduce possibili fenomeni di tossicità per il trattamento di pazienti che probabilmente non risponderebbero alla terapia offrendo loro precocemente altre opzioni terapeutiche. In particolare, il lavoro si è focalizzato sulla determinazione dell'esistenza di una correlazione tra la risposta all'Erlotinib e i livelli di espressione di miRNAs coinvolti nella via di segnalazione di EGFR in campioni di NSCLC di pazienti "responders" e "non-responders" ad Erlotinib, prima dell'inizio della terapia.

La ricerca si è focalizzata su miR-133b, che ha mostrato la maggiore espressione differenziale tra il gruppo di pazienti "responders" e quello dei "non-responders", conducendo indagini funzionali su miR-133b mediante modelli *in vitro*.

MATERIALI E METODI

7. Pazienti

La valutazione dei livelli di espressione di miRNA è stata eseguita su campioni biotici e pezzi chirurgici fissati in formalina ed inclusi in paraffina (FFPE) provenienti da pazienti affetti da adenocarcinoma del polmone non a piccole cellule (NSCLC) (Figura 8).



Figura 8: Blocchetti di tessuto fissato in formalina ed incluso in paraffina (FFPE – Formaline Fixed Paraffine Embedded).

Tali campioni appartengono all'archivio della Struttura Complessa di Anatomia Patologica dell'Azienda Ospedaliera “S.M.Nuova” - IRCCS di Reggio Emilia. La selezione dei blocchetti di tessuto paraffinato è stata effettuata da un patologo esperto nel campo della patologia polmonare. L'estrazione di RNA, la retro-trascrizione e l'amplificazione dei miRNA di interesse sono state realizzate nel Laboratorio dell'Infrastruttura della Ricerca. Lo studio è stato approvato da Comitato Etico Provinciale il 17 settembre 2014. Il consenso informato necessario per l'utilizzo dei tessuti e per la gestione dei dati sensibili è stato raccolto dal personale della S.C. di Oncologia che ha seguito i pazienti in follow-up.

La casistica analizzata è composta da 33 pazienti affetti da NSCLC seguiti presso il servizio di oncologia medica dal 1° gennaio 2009 al 31 dicembre 2014 che hanno ricevuto un trattamento con Erlotinib in seconda o terza linea.

La risposta al trattamento è stata valutata mediante indagine strumentale a cadenza trimestrale a partire dall'inizio del trattamento con Erlotinib: la risposta radiologica è stata confrontata con l'immagine fornita mediante la stessa metodica al basale e valutata in accordo a criteri RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors) dal personale del Servizio di Radiologia dell'ASMN. Si sono considerati "pazienti responder" tutti quelli con risposta completa, risposta parziale o con stabilità di malattia superiore/uguale ai sei mesi. In caso di dubbia progressione radiologica, è stato richiesto al personale del Servizio di Radiologia un secondo parere per confermare/escludere la progressione. I pazienti "responders" erano complessivamente 8 (7 femmine ed 1 maschio), i pazienti "non-responders" erano 25 (12 femmine e 13 maschi) (Figura 9).

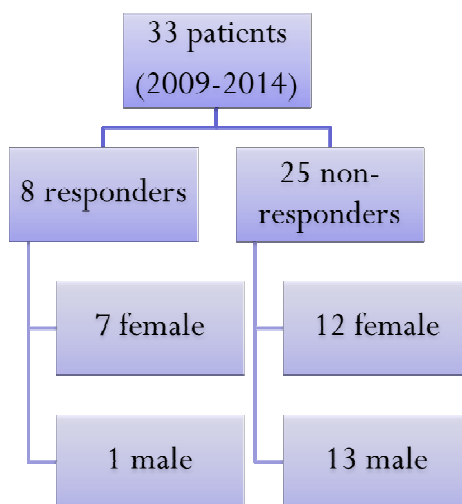


Figura 9: Schema di arruolamento dei pazienti.

8. Linee cellulari

Per comprendere il ruolo di miR-133b in modelli *in vitro*, sono state utilizzate due linee cellulari di adenocarcinoma polmonare: A549 ed H1299. Entrambe le linee cellulari crescono in monostrato in aderenza.

La linea cellulare A549 deriva da cellule basali epiteliali alveolari di adenocarcinoma umano. EGFR è wild-type. Le A549 hanno una bassa espressione di ErbB2 ed ErbB3, nessuna espressione di EGF e K-RAS mutato. La linea cellulare H1299 è una linea cellulare di carcinoma non a piccole cellule del polmone umana derivata dal linfonodo. Lo status di EGFR è wild-type, inoltre presenta un leggero aumento del numero di copie del gene. Le H1299 hanno una bassa espressione di ErbB3, non esprimono ErbB2 e ErbB4, p53 è mutato, infine PTEN e K-RAS sono wild-type (Tabella 3). [50, 51]

Linea cellulare	Origine	EGFR Status	Altre caratteristiche
A549	cellule basali epiteliali alveolari di adenocarcinoma umano	Wild-type	K-Ras mutato No espressione di EGF Bassa espressione di ErbB2 ed ErbB3
H1299	carcinoma non a piccole cellule del polmone umana derivato dal linfonodo	Wild-type Leggero aumento del numero di copie del gene	k-Ras, PTEN wildtype p53 mutato Bassa espressione di ErbB3 No espressione di ErbB2 and ErbB4

Tabella 3: Caratteristiche delle linee cellulari.

Le linee sono state coltivate in terreno di coltura RPMI con il 10% di FBS e 1% di penicillina-streptomicina. Le linee cellulari sono state mantenute a 37°C con un percentuale di CO₂ pari al 5%.

9. Estrazione di RNA

9.1. Estrazione di RNA da tessuto paraffinato

I campioni, colorati con ematossilina-eosina (EE), sono stati esaminati al microscopio per identificare aree tumorali. Dal prelievo più rappresentativo sono state ricavate 5 sezioni dello spessore di 5 μm e poste in tubi eppendorf. L'estrazione dell'RNA totale è stata eseguita con High Pure miRNA Isolation Kit (Roche), seguendo le istruzioni del produttore, che consente la purificazione dell'RNA totale.

Ai campioni è stata aggiunta una soluzione di Paraffine Tissue Lysis Buffer, 10% di SDS e Proteasi K, e incubati a 55°C per tutta la notte. Il giorno successivo, i campioni sono stati centrifugati a 13.000 giri per 1 minuto, poi, eliminato il sovrantante, sono stati addizionati di Bindig Buffer e trasferiti in tubi eppendorf contenenti una colonnina con filtro. Infine i campioni sono stati sottoposti a tre lavaggi con Wash buffer seguiti da centrifugazione a 13.000 giri per 30 secondi, ed eluiti in 50 μL di Elution Buffer. I campioni sono stati quantificati e poi conservati a -80°C fino al successivo utilizzo.

9.2. Estrazione di RNA da cellule

L'estrazione dell'RNA totale da cellule è stata eseguita con mirVana™ RNA Isolation Kit (Ambion, Life Technologies), seguendo le istruzioni del produttore. I campioni sono stati omogenati e lisati con Soluzione di Lisi a temperatura ambiente per 5 minuti. Al campione omogenato è stata aggiunta una soluzione di Homogenate Additive e lasciato ad incubare in ghiaccio per 10 minuti, poi è stata aggiunta la stessa quantità di fenolo-cloroformio che mediante centrifugazione a 10.000 giri per 5 minuti ha permesso la separazione del campione in tre fasi: una fase acquosa contenente RNA, da prelevare; un'interfase, in cui si trova il DNA, ed una fase organica comprendente le proteine. La fase acquosa è stata trasferita in un nuovo tubo eppendorf alla quale è stato aggiunto etanolo 100%. Il lisato è stato poi trasferito in un tubo

eppendorf contenente un filtro Cartridge e centrifugato a 10.000 giri per 15 secondi per legare l'RNA al filtro, infine la soluzione eluita è stata scartata. Quest'ultima operazione è stata ripetuta due volte. Ogni campione ha subito diversi lavaggi con Wash Solution. Ai campioni sono stati aggiunti 50 μ L di soluzione di eluizione priva di RNasi e centrifugati a 12.000 giri per 1 minuto. I campioni sono stati quantificati e poi conservati a -80°C fino al successivo utilizzo (Figura 10).

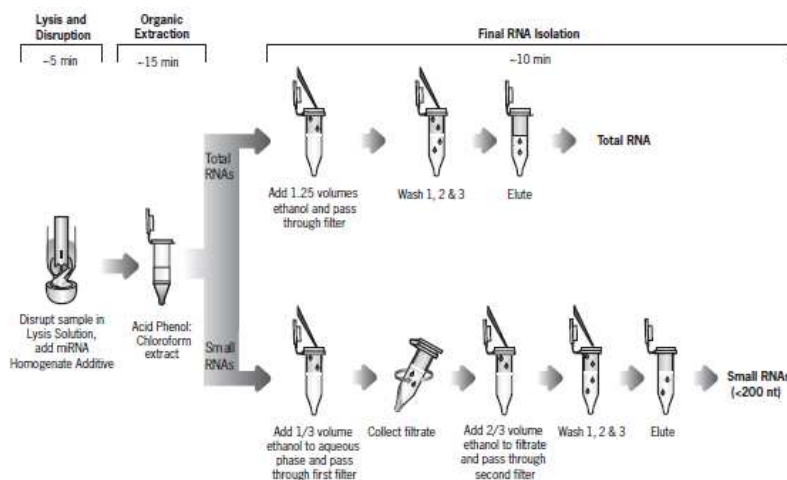


Figura 10: Rappresentazione schematica dei passaggi di estrazione di RNA da cellule mediante mirVana™ RNA Isolation Kit (Ambion, Life Technologies).

9.3. Quantificazione di RNA

Un'aliquota (1 μ L) di RNA è stata utilizzata per la quantificazione ed il controllo di qualità del campione mediante spettrofotometro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). La lettura dell'assorbanza del campione avviene a 260 nm (per acidi nucleici), 280 nm (per proteine) e 230 nm (per composti organici, quali fenoli, o residui di estrazione). Dal rapporto dei valori di densità ottica ottenuti dalle diverse assorbanze si può capire se il campione è contaminato da proteine o solventi

organici che potrebbero interferire con le reazioni di retro-trascrizione per gli esperimenti di espressione genica. Per un campione di RNA non contaminato il rapporto A260/280 deve essere compreso tra 1.8 e 2.1 mentre il rapporto A260/230 deve essere superiore a 2.

10. Real-Time qPCR

Ad oggi le tecniche di determinazione dei miRNAs prevedono l'impiego della tecnica di RT-PCR (RetroTrascriptase-PCR) e della Real-Time qPCR (Real-Time quantitative Polimerase Chain Reaction). Nella RT-PCR una trascrittasi inversa produce un filamento di DNA a partire da una sequenza di RNA: in questo modo il filamento di miRNA viene convertito in cDNA. La Real-Time qPCR permette di quantificare in maniera relativa la concentrazione di una determinata sequenza di cDNA presente in un campione. La quantificazione degli acidi nucleici avviene attraverso l'amplificazione e la misurazione della fluorescenza emessa da un fluoroforo: la fluorescenza aumenta in proporzione all'accumulo dei prodotti di PCR. [52, 53, 54, 55, 56, 57]

Il principio alla base di questa tecnica è: maggiore è il numero delle "molecole stampo" (miRNAs) presenti all'inizio della reazione e minore sarà il numero di cicli di amplificazione necessari per raggiungere un valore di prodotto rilevabile.

Il saggio di quantificazione TaqMan™ MicroRNA per microRNA è altamente sensibile e specifico. Come già accennato precedentemente, è un protocollo in due fasi composto da trascrizione inversa con un primer specifico per miRNA, seguita da Real-Time qPCR con sonde TaqMan. Le tecniche qui descritte prevedono l'impiego di un termociclatore, ossia un sistema capace di modificare la temperatura della reazione e mantenerla stabile per un determinato periodo di tempo dipendente dalla metodica utilizzata (Tabella 4).

10.1. Retro-trascrizione

La Retro-trascrizione è stata allestita utilizzando primer commerciali

(Applied Biosystems, Foster City, CA). Da 10 ng di RNA totale sono stati retro-trascritti specifici microRNA utilizzando il kit Taqman® MicroRNA Reverse Transcription, seguendo le indicazioni del produttore (Tabella 4).

Miscela di reazione (per campione)	
Componente	Quantità (μL)
RNA totale	5
Multiscribe™ Reverse Transcriptase 50 U/μL	
Buffer RT 10x	1,5
dNTPs 100 mM	0,15
Inibitore Rnasi 20U/μL	0,19
RT primer 5x	3
Acqua	4,16
Protocollo di reazione	
Durata (min)	Temperatura (°C)
30	16
30	42
5	85
Infinito	4

Tabella 4: Composizione della miscela di reazione e protocollo di retrotrascrizione per miRNA.

10.2. Real-Time qPCR

La Real-Time qPCR è stata allestita utilizzando il cDNA prodotto e una sonda taqman specifica per ciascun microRNA (TaqMan MicroRNA Assay Kit, ABI) seguendo le indicazioni del produttore (Tabella 5 e Figura 11).

Miscela di reazione (per campione)	
Componente	Quantità (µL)
cDNA (prodotto della RT)	1,33
TaqMan Universal Master Mix 2x	10
miRNA TM assay 20x	1
Acqua	7,67

Protocollo di reazione	
Durata	Temperatura (°C)
2 min	50
10 min	95
15 sec	95
60 sec	60
Infinito	4

Tabella 5: Composizione della miscela di reazione e protocollo di amplificazione Real-time qPCR per miRNA.

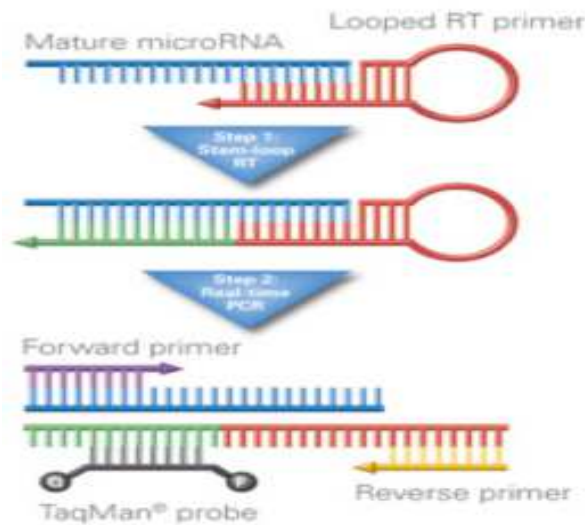


Figura 11: Primers per retro-trascrizione e meccanismo di funzionamento per Real-Time qPCR utilizzati dal kit TaqMan microRNA Assay.

Ciascuna reazione di PCR è stata ripetuta in triplicato. L'amplificazione e la rivelazione del segnale è stata eseguita mediante lo strumento CFX96 Biorad. I dati ottenuti sono stati analizzati con il software Sequence Detection System (SDS vers.2.0).

10.3. Analisi dei dati di espressione

Un controllo endogeno o “reference” è un gene cui si fa riferimento per la quantificazione relativa. Questi “reference” devono essere espressi in maniera costitutiva, non devono risentire dei trattamenti sperimentali e soprattutto devono mantenere la loro espressione costante nei diversi tipi cellulari. Per l'analisi di espressione dei miRNA in campioni FFPE è stato utilizzato come controllo endogeno il miR-191, nelle linee cellulari è stato utilizzato l'RNU19. [54]

La curva di amplificazione, ottenuta in tempo reale dallo strumento, descrive l'aumento di fluorescenza in funzione del numero di cicli di PCR. L'intensità della fluorescenza emessa durante la Real-Time qPCR è correlata con la quantità di prodotto formato. Dopo i primi cicli di amplificazione, la fluorescenza supera un livello di soglia (threshold line) e inizia ad aumentare in modo esponenziale (Figura 12).

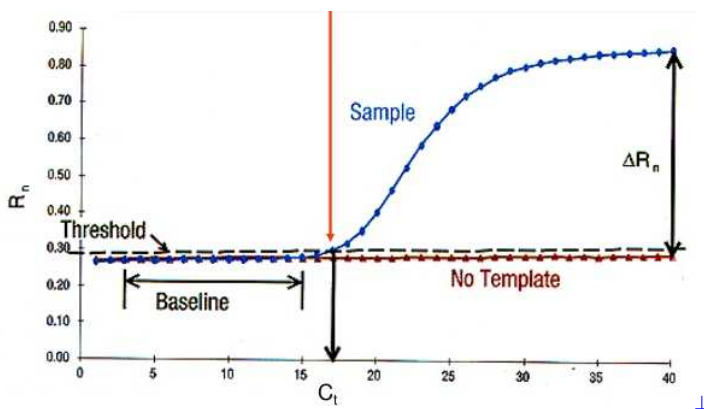


Figura 12: Curva di amplificazione di un campione ottenuta mediante Real-Time qPCR. Baseline = Linea di base; Linea soglia = Threshold; C_t = Ciclo soglia.

Il ciclo soglia C_t rappresenta il numero di cicli necessari in cui il segnale di amplificazione raggiunge la linea di soglia impostata. Graficamente è il punto di intersezione tra la linea di soglia e la curva di amplificazione. Questo metodo si basa sul presupposto che il C_t di ogni campione è inversamente proporzionale alla quantità iniziale: infatti minore è la quantità di materiale di partenza, più cicli saranno necessari per raggiungere il livello di soglia. Il risultato ottenuto quantifica l'incremento (o decremento) del miRNA nel campione che deve essere normalizzato rispetto all'espressione di un controllo endogeno. Questa normalizzazione compensa qualsiasi possibile differenza della quota di materiale caricato nelle varie reazioni di PCR. L'espressione di ciascun microRNA è stata quindi normalizzata su quella di un controllo endogeno nello stesso campione (ΔC_t). Invece, la quantità relativa (RQ) nei campioni trattati, rispetto al campione di controllo, è stata calcolata con il metodo del $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

11. Trasfezione cellulare

I miRNA mimic sono molecole a doppio filamento di RNA di sequenze identiche ad uno specifico miRNA progettate per indurre l'iper-espressione. Una volta che questi frammenti di RNA sono introdotti nelle cellule, possono legarsi specificamente al gene bersaglio. Il risultato è una inibizione post-trascrizionale del gene. Attualmente questo approccio è utilizzato come strumento per studiare la funzione di miRNA in cellule di mammifero (Tabella 6). È stato utilizzato un miRNA mimic per il miR-133b (QIAGEN). Gli effetti del miRNA mimic sono stati confrontati con quelli di una sequenza di controllo scrambled (All Stars Negative Control, QIAGEN) non omologa ad alcuna sequenza umana.

miRNA	Species	Sequence
miR-133b	Human	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUA
miR-133b mimic	Human	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUA

Tabella 6: MiR-133b e miR-133b mimic.

La lipofectamina è un reagente di trasfezione (Invitrogen), utilizzato per aumentare l'efficienza di trasfezione di RNA (compresi mRNA e siRNA) o DNA plasmidico in colture cellulari in vitro. La lipofectamina è composta da subunità lipidiche che possono formare liposomi in ambiente acquoso che intrappolano il materiale di trasfezione consentendo loro di superare la repulsione elettrostatica della membrana cellulare e di entrare nelle cellule (Figura 13).

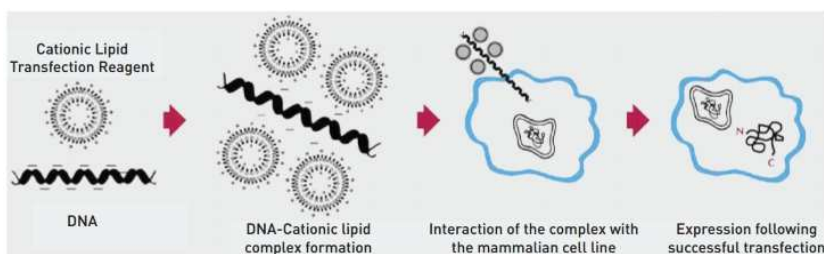


Figura 13 : Meccanismo di trasporto mediato dalla Lipofectamina.

Ventiquattro ore prima della trasfezione le linee cellulari sono state coltivate in piastre da 6 pozzetti in terreno con antibiotici prevedendo una confluenza del 60-80% al momento della trasfezione. Sono stati preparati i vari complessi per la trasfezione: lipofectamina (5 μ L per ogni pozzetto) + miR-133b mimic (20 nM) e lipofectamina (5 μ L per ogni pozzetto) + controllo negativo (20 nM). Sono stati centrifugati brevemente ed aggiunti, goccia a goccia, ai pozzetti corrispondenti. Un pozzetto è stato addizionato con solo terreno per rappresentare il non-trattato, un altro pozzetto è stato addizionato con sola lipofectamina per valutare eventuali effetti dell'agente di trasfezione. Le piastre sono state incubate a 37°C al 5% di CO₂ (Figura 14).

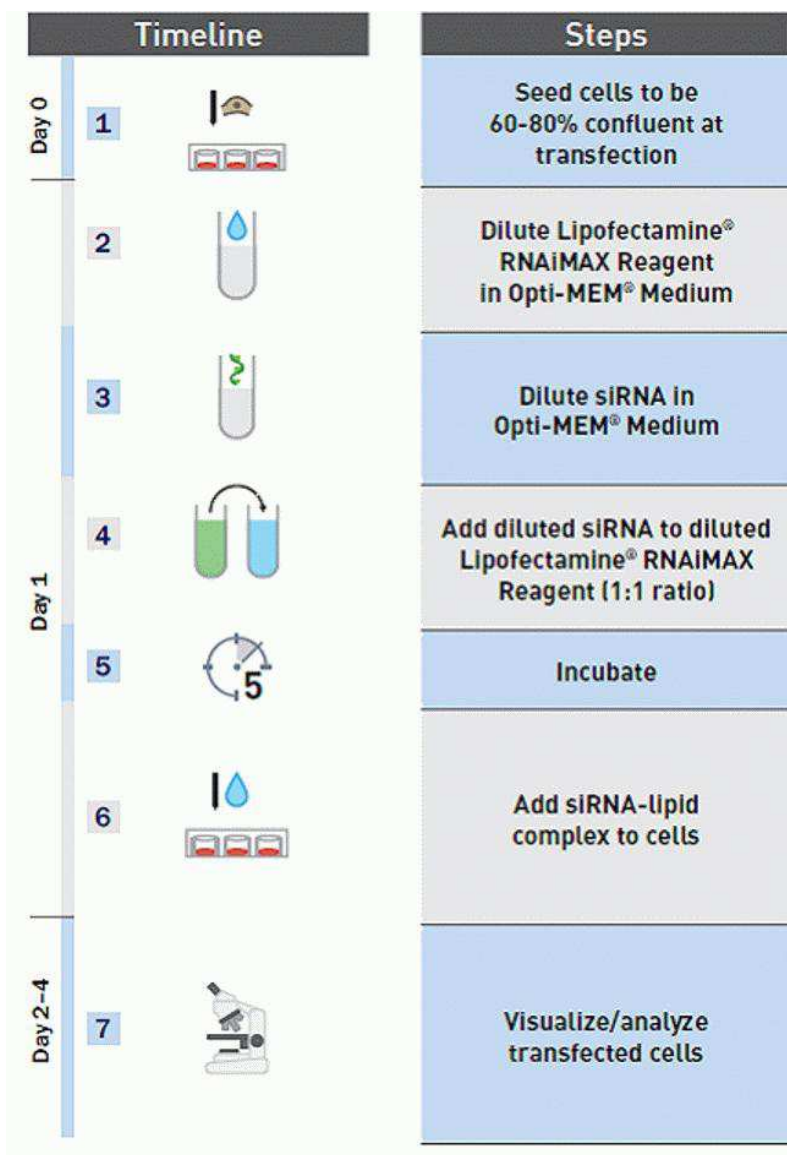


Figura 14: Protocollo di trasfezione.

12. Citofluorimetria a flusso

La citofluorimetria a flusso è una tecnica che si basa sulla contemporanea misurazione e analisi di parametri fisici di particelle, in genere cellule, disperse in un flusso. Rende possibile la misurazione di proprietà multiple di singole cellule ad una velocità molto rapida, permettendo una dettagliata analisi qualitativa e quantitativa. Il principio alla base di questa metodica è legato alla capacità di ogni cellula di rifrangere la luce. I raggi rifratti in diverse direzioni sono legati alle diverse caratteristiche delle cellule per cui è possibile discriminare diverse popolazioni cellulari basandosi solamente sulle loro caratteristiche fisiche.

La coniugazione di specifici fluorocromi a particolari componenti chimici o strutturali delle cellule (proteine, materiale nucleare) consente di differenziare in modo accurato e sensibile le diverse popolazioni cellulari. I dati elaborati da un software sono poi tradotti in istogrammi in tempo reale.

Con la citofluorimetria è stata valutata l'efficienza di trasfezione e successivamente l'espressione di EGFR di superficie nelle linee cellulari A549 ed H1299 dopo trasfezione con miR-133b mimic a diverse time-line (24h, 48h e 72h). Le cellule sono state coltivate in piastre da 6 pozzetti alla densità di $1,5 \times 10^5$ cellule per pozzetto e, a 24 ore dalla trasfezione, processate per citofluorimetria. Le cellule sono state centrifugate a 12000 rpm 30 sec e risospese in 1 mL di PBS, centrifugate di nuovo a 12000 rpm 30 sec e risospese in 50 μ L di PBS con colorante vitale (canale APC-Cy7). Le cellule sono state poi incubate 15 min in ghiaccio al buio, addizionate di 1 mL di PBS + 5% FBS (siero scomplementato) e centrifugate 12000 rpm 30 sec. Sono state quindi risospese in 45 μ L di PBS + 5% FBS (siero scomplementato) + 5 μ L di anticorpo primario α -EGFR (528): sc-120 (Santa Cruz Biotechnology, INC.) coniugato ad Alexa Fluor 488 (Santa Cruz Biotechnology, INC.), e incubate 30 min in ghiaccio al buio. La fluorescenza ottenuta dall'incubazione con l'anticorpo specifico anti-EGFR è stata confrontata con quella derivante

dall'incubazione con l'anticorpo di controllo isotipico marcato con Alexa Fluor 488. Infine sono state addizionate con 1 mL di PBS + 5% FBS (siero scomplementato), centrifugate a 12000 rpm 30 sec e risospese in 50 μ L + 450 μ L di PBS per la lettura al citofluorimetro (Figura 15).

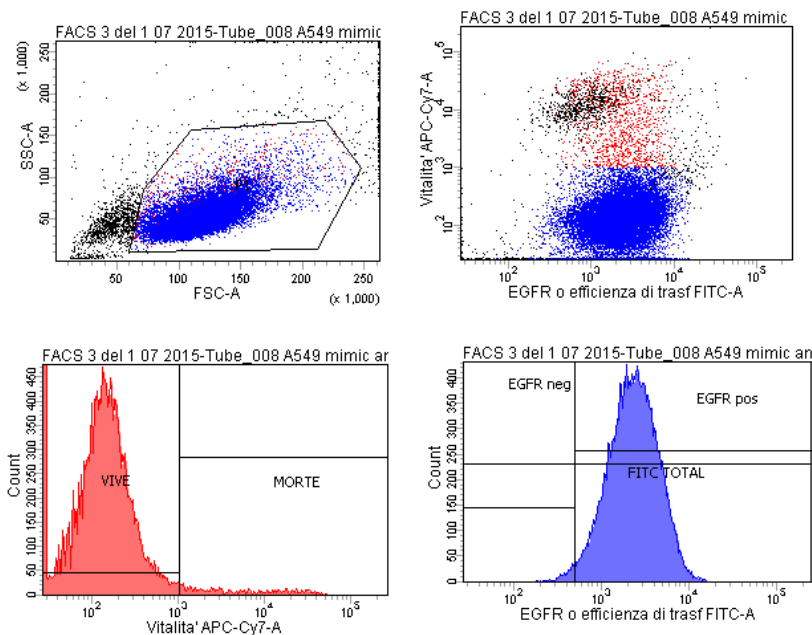


Figura 15: Espressione di membrana di EGFR in cellule trasfettate con miR-133b mimic.

13. Western blot

Il Western Blot è una metodica che permette di identificare una determinata proteina in un dato campione, mediante il riconoscimento da parte di anticorpi specifici. La miscela di proteine presente nel campione viene separata in base alle loro dimensioni (o peso molecolare) utilizzando un gel di poliacrilammide, successivamente le

proteine vengono trasferite su una membrana di nitrocellulosa, e quindi si procede al riconoscimento della proteina mediante l'utilizzo di un anticorpo specifico.

Con il western blot è stata valutata l'espressione di EGFR totale, ERK, pERK e β -tubulina nelle linee cellulari A549 ed H1299 dopo trasfezione con miR-133b mimic a diverse time-line (48h e 72h).

Le cellule sono state seminate in piastre da 6 wells alla densità di $1,5 \times 10^5$ cellule per pozzetto e, a 48h e 72h dalla trasfezione, raccolte, lisate e processate per western blot. Le cellule sono state centrifugate a 12000 rpm 30 sec e risospese in 50 μ L di soluzione di lisi 1x supplementata di inibitori di proteasi (Cell Lysis Buffer, Cell Signaling), quindi incubate in ghiaccio per 40 minuti. Le cellule sono state sottoposte a sonicazione (Bioruptor® Pico, Diagenode) secondo lo schema di tabella 7 ed infine sono state centrifugate a 13.000 giri per 15 minuti a 4°C per ottenere un lisato proteico privo di debris cellulari e materiale insolubile.

Tempo di sonicazione	10 sec ON/20 sec OFF
Cicli totali di sonicazione	3 cicli
Temperatura	4°C

Tabella 7: Schema di sonicazione delle proteine.

Successivamente le proteine sono state quantificate mediante il metodo di Bradford. Sono stati caricati 50 μ g di proteine ed il marcatore di peso molecolare (Precision Plus Protein™ Prestained Standards - Dual Xtra Standards, BioRad) nei pozzetti del gel di poliaccrilammide al 4-20% (Protein Gel, BioRad), separate le proteine nel gel per 5 minuti a 50 V poi 1h a 100 V. Il gel è stato poi trasferito su membrana di nitrocellulosa mediante il sistema Trans-Blot Turbo (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System). Sono state effettuate incubazioni in successione con vari anticorpi: EGFR (R&D System), pERK, ERK totale e β -tubulina (Cell Signaling). Tutti gli anticorpi sono stati diluiti 1:1000.

14. MTT Assay

Sono stati analizzati gli effetti del trattamento combinato miR-133b mimic + Erlotinib (Tarceva®) nelle due linee cellulari.

Erlotinib è stato disciolto in DMSO (dimetilsolfossido) sterile e somministrato alla concentrazione di 2 $\mu\text{mol/L}$.

Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti alla densità di 1500 cellule per pozzetto, dopo 24h sono state trasfettate con miR-133b mimic e con il controllo negativo. Dopo 4 ore sono state trattate con Erlotinib (Tarceva®) alla concentrazione di 2 $\mu\text{mol/L}$, concentrazione che corrisponderebbe all'ipotetica concentrazione equivalente a quella presente allo steady-state nei pazienti. Ogni punto è stato fatto in sestuplicato secondo lo schema riportato in figura 16.

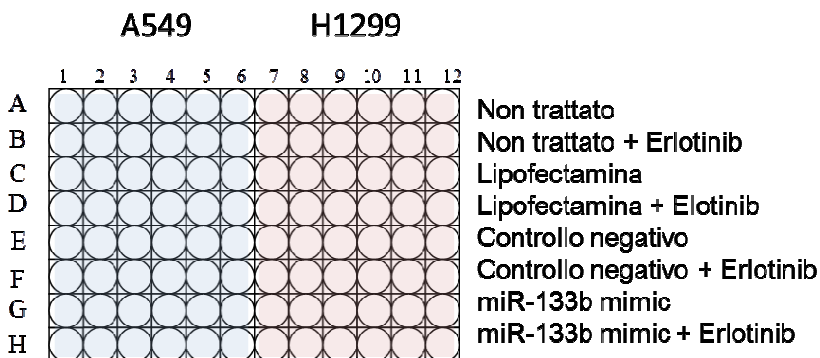


Figura 16: Schema di semina e trattamento combinato delle linee cellulari.

La valutazione della vitalità cellulare in seguito alla somministrazione del farmaco è stata effettuata mediante il saggio MTT, un saggio colorimetrico utilizzato per testare l'azione di farmaci, agenti citotossici ed altri prodotti che alterano la vitalità cellulare. Il principio del test si basa sulla capacità delle cellule metabolicamente attive di convertire il sale di tetrazolio (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium

bromide) o MTT, di colore giallo, in cristalli di formazano di color porpora (Figura 17).

Il formazano è stato quindi solubilizzato con 200 μ L di DMSO e la concentrazione misurata in termini di densità ottica a 560 nm. Il livello di assorbanza è direttamente proporzionale al numero di cellule attive. I valori di assorbanza sono stati determinati mediante il lettore di micropiastre GloMax[®]-Multi Detection System (Promega) ai due differenti time points (48 h e 72 h). [58, 59]

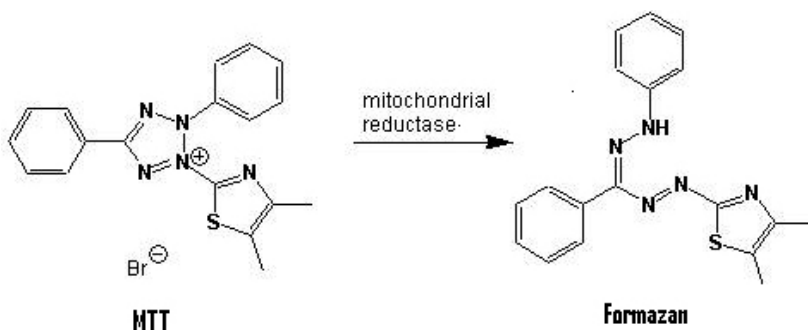


Figura 17: Struttura dell'MTT e del Formazano (prodotto colorato)

15. Analisi statistiche

Le analisi statistiche dei dati ottenuti in questo lavoro sono stati analizzati mediante il test di Mann-Whitney utilizzando GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc.CA, USA). Il test di Mann-Whitney noto pure come test U di Mann-Whitney è uno dei più potenti test non parametrici per verificare, in presenza di valori ordinali provenienti da una distribuzione continua, se due campioni statistici provengono dalla stessa popolazione. È l'equivalente non parametrico del test t di Student per campioni indipendenti.

Il test di Mann-Whitney si applica solitamente quando non sono soddisfatti i presupposti per effettuare il test parametrico, ovvero

quando la distribuzione della variabile oggetto di studio non è normale e quando le dimensioni campionarie sono ridotte ($n < 30$ casi in almeno un campione). Inoltre, non è necessario che la numerosità delle due distribuzioni sia uguale.

RISULTATI

16. Caratteristiche cliniche dei pazienti

Lo studio è stato condotto su un totale di 33 pazienti con diagnosi di adenocarcinoma del polmone e sottoposti a trattamento con Erlotinib in 2^a o 3^a linea.

In questa coorte di pazienti, 19 (57.6%) erano femmine e 14 (42.4%) maschi. L'età media dei pazienti era di 63 anni (range, 41-81 anni). Cinque (15%) pazienti, con malattia ancora in atto, sono in vita e 28 (85%) sono deceduti.

La diagnosi e le relative analisi laboratoristiche sono state eseguite su 13 (39.4%) biopsie e 20 (60.6%) resezioni chirurgiche. Le sedi del prelievo riguardavano in 24 casi (73%) il polmone destro e nei restanti 9 casi (27%) il polmone sinistro. I pazienti in stadio I-II di malattia alla diagnosi erano 6 (18%), quelli in stadio III erano 7 (21%), infine quelli in stadio IV erano 20 (61%).

I pazienti hanno ricevuto 1 o 2 linee di chemioterapia prima di essere sottoposti a trattamento con Erlotinib, che è stato poi somministrato in 2° linea in 22 (66.7%) pazienti ed in 3° linea in 11 (33.3%) pazienti.

Le mutazioni di EGFR sono state analizzate in tutti i campioni tranne uno: 27 (82%) pazienti non presentavano nessuna mutazione mentre 5 (15%) pazienti presentavano una delle mutazioni attivanti di EGFR (delE764-A750, L858R, L861Q), in 1 solo paziente non è stato possibile analizzare lo status di EGFR per la scarsa qualità e quantità di materiale per le indagini molecolari. Le mutazioni di k-RAS sono state analizzate solo in 8 pazienti. K-ras come fattore predittivo negativo è stato introdotto successivamente all'analisi di EGFR e non è stata compiuta nessuna analisi retrospettiva. Il riarrangiamento del gene ALK è risultato negativo in 21 (63.3%) pazienti e positivo in 1 solo paziente (3%), in 11 (33.3%) l'oncologo di comune accordo con il patologo non ha ritenuto necessario procedere all'analisi per la scarsità di materiale idoneo per le indagini molecolari (Tabella 8).

Caratteristiche		Responders (8 pazienti)	Non-responders (25 pazienti)	Totale No (%) N=33
Età (anni)	< 65 anni	2	16	18 (54.5%)
	≥ 65 anni	6	9	15 (45.5%)
Genere	Femmine	7	12	19 (57.6%)
	Maschi	1	13	14 (42.4%)
Status	Vivo	3 (AWD)	2 (AWD)	5 (15%)
	Morto	5	23	28 (85%)
Materiale	Biopsia	4	9	13 (39.4%)
	Pezzo chirurgico	4	16	20 (60.6%)
Sede alla diagnosi	Polmone destro	6	18	24 (73%)
	Polmone sinistro	2	7	9 (27%)
Stadio di malattia alla diagnosi	I-II	0	6	6 (18%)
	III	2	5	7 (21%)
	IV	6	14	20 (61%)
Erlotinib (TKI)	2° linea	4	18	22 (66.7%)
	3° linea	4	7	11 (33.3%)
Status di EGFR	Wild-type	5	22	27 (82%)
	Mutato	2	3	5 (15%)
	NA	1	0	1 (3%)
Status di k-RAS	Wild-type	1	5	6 (18%)
	Mutato	0	2	2 (6%)
	NA	7	18	25 (75.7%)
Status di ALK	Negativo	5	16	21 (63.6%)
	Positivo	1	0	1 (3%)
	NA	2	9	11 (33.3%)

Tabella 8: Caratteristiche dei pazienti. AWD (Alive With Disease).

17. Espressione di miRNA capaci di legarsi ad EGFR mRNA in campioni di pazienti con NSCLC metastatico trattati con Erlotinib in 2^a-3^a linea

17.1 Profiling dei miRNA

Per individuare se il livello di espressione di miRNA fosse associato alla risposta ad Erlotinib, è stata effettuata un'analisi del profilo di espressione di 7 miRNA nella forma matura mediante Real-Time qPCR in campioni ottenuti da pazienti con adenocarcinoma del polmone alla diagnosi. I miRNA analizzati sono in grado di legarsi all'mRNA di EGFR e sono elencati in Tabella 9.

miRNA	Species	Sequence
miR-7	Human	CAACAAAUCCCAGUCUACCUAA
miR-21-5p	Human	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
miR-128-2-5p	Human	GGGGGCCGAUACACUGUACGAGA
mi-133a-3p	Human	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUG
miR-133b	Human	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUA
miR-146a-5p	Human	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU
miR-146b-5p	Human	UGAGAACUGAAUCCAUAGGCU

Tabella 9: Elenco dei miRNA studiati con metodica di Real-Time.

Il livello di espressione di ciascun miRNA è stato normalizzato sul livello di espressione di un miRNA housekeeping: miR-191 (ΔC_t), quindi espresso in relazione ad un campione di riferimento rappresentato dalla mediana di tutti i campioni esaminati ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ = quantificazione relativa)

Dall'analisi statistica effettuata con il test non parametrico di Mann–Whitney 3 miRNA sono risultati avere un'espressione differenziale tra “responders” e “non-responders” significativa ($P < 0.05$) (Tabella 10).

miRNA	2 $-\Delta\Delta C_t$ responders	2 $-\Delta\Delta C_t$ non-responders	Ratio Resp/Non-Resp	p
miR-7	0.887	1.444	0.614	<0.05
miR-21	1.063	0.889	1.218	ns
miR-128	Non espresso	Non espresso	-	ns
miR-133a	2.0	0.891	2.244	=0.055
miR-133b	2.3	1.02	2.255	<0.01
miR-146a	1.71	0.866	1.974	<0.05
miR-146b	0.912	1.084	0.841	ns

Tabella 10: Valori di 2 $-\Delta\Delta C_T$ dei miRNA analizzati, ns = non significativo.

Il livello di espressione di miR-7 nei “responders” è risultato significativamente più basso rispetto al livello nei “non-responders” (Mann-Whitney, $p < 0.05$). Al contrario, il livello di espressione di miR-133b e miR-146a sono risultati significativamente più alti nei “responders” rispetto ai livelli riscontrati nei “non-responders” (Mann-Whitney rispettivamente, $p < 0.01$ e $p < 0.05$). Sebbene i livelli di miR-133a siano risultati più alti nei “responders” non è stata raggiunta la significatività (Mann-Whitney, $p = 0.05$). I livelli di espressione di miR-21 e miR-146b non sono risultati statisticamente differenti nei due gruppi di confronto (Mann-Whitney, $p > 0.05$) (Figura 18). MiR-128 è risultato non essere espresso nei campioni di entrambi i gruppi di pazienti.

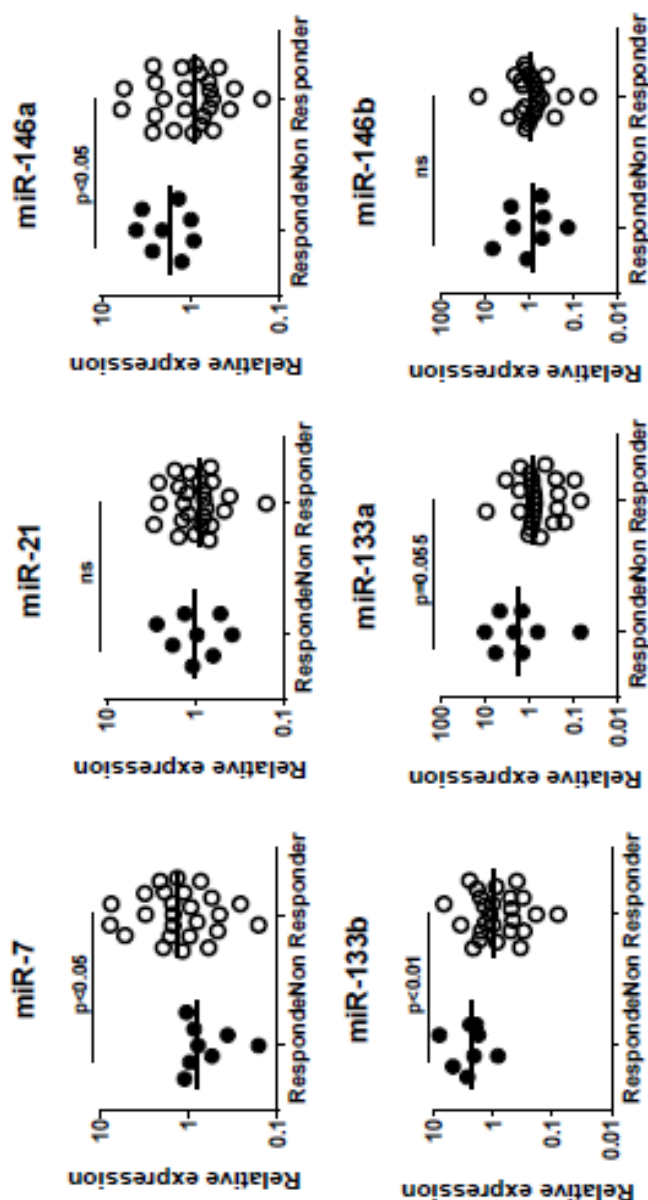


Figura 18: Espressione dei miRNA nei campioni di pazienti con adenocarcinomi del polmone trattati con Erlotinib in 2^a-3^a linea.

17.2 Heat map di espressione dei miRNA

Per identificare l'andamento dell'espressione dei miRNA analizzati in ogni singolo paziente, è stata elaborata una Heat Map in cui i valori di espressione sono stati sostituiti con diversi colori che differiscono di tonalità e/o di intensità a seconda dei valori (Figura 19).

L'espressione di miR-128 non è stata inclusa nell'analisi di Heat Map. Dal diagramma si può notare come all'interno dei due gruppi (responders e non-responders) ci sono pazienti che differiscono dagli altri dello stesso gruppo e sembrerebbero appartenere alla controparte. Ad esempio: il campione R4, che appartiene al gruppo dei "responders", ha mostrato un'espressione dei miRNA molto simile a quella del gruppo dei "non-responders". Il paziente ha ricevuto Erlotinib in terza linea. Al contrario i campioni NR1, NR6 ed NR7, che appartengono al gruppo dei "non-responders", esprimevano i miRNA in maniera molto simile al gruppo dei "responders". Due hanno ricevuto Erlotinib in seconda linea, l'altro in terza linea.

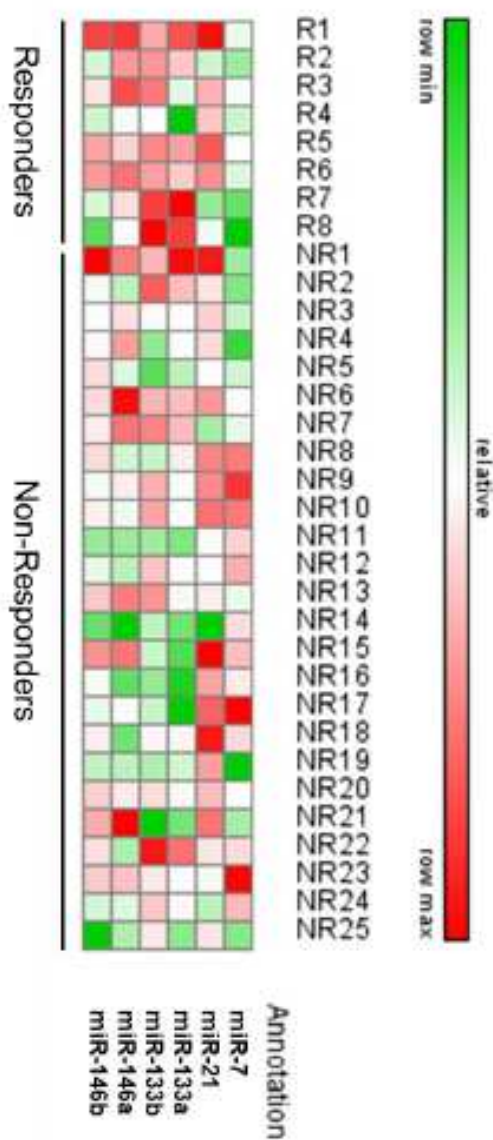


Figura 19: Espressione gerarchica dei miRNA in campioni di pazienti con adenocarcinomi di polmone trattati con Erlotinib.

18. Studio del ruolo biologico di miR-133b in modelli *in vitro*

L'attenzione è stata focalizzata su miR-133b, che risultava essere il più promettente tra i miRNA analizzati perché ha mostrato la più elevata espressione differenziale. È stata quindi condotta un'analisi funzionale per caratterizzare il ruolo biologico del miRNA utilizzando modelli *in vitro*.

Sono state utilizzate due linee cellulari di adenocarcinoma polmonare A549 ed H1299 wild-type per EGFR per simulare le condizioni presenti nella casistica di pazienti inclusi in questo studio. Inoltre, le due linee sono resistenti/poco sensibili al trattamento con Erlotinib. Queste linee cellulari sono state trasfettate con un miR-133b mimic per verificare se un aumento dei livelli di espressione di miR-133b potessero influire o modificare la sensibilità di queste cellule al trattamento con il farmaco.

18.1. Efficienza di trasfezione

Il miR-133b mimic è stato trasfettato all'interno delle cellule mediante l'utilizzo di lipofectamina. Gli effetti del miRNA mimic sono stati confrontati con quelli di una sequenza di controllo scrambled non omologa ad alcuna sequenza umana.

Per prima cosa è stata verificata l'efficienza di trasfezione delle cellule dopo 24 h, 48 h e 72 h di trattamento mediante citofluorimetria a flusso utilizzando un oligonucleotide marcato con un composto fluorescente (Alexa Fluor 488). Sono stati parallelamente analizzati i livelli di espressione del miR-133b mediante Real Time q-PCR dopo 24 h di trattamento.

L'intensità di segnale nel canale FITC (MFI) correla con l'efficienza di trasfezione (numero di cellule trasfettate e livello di trasfezione).

In entrambe le linee cellulari la trasfezione è risultata massima a 24 h. Inoltre, la trasfezione si è mantenuta anche dopo 48 e 72 h sebbene il livello diminuisse probabilmente a causa della crescita cellulare. È da

segnalare che la linea cellulare H1299 è risultata più trasfettabile rispetto alla linea A549 (Figura 20).

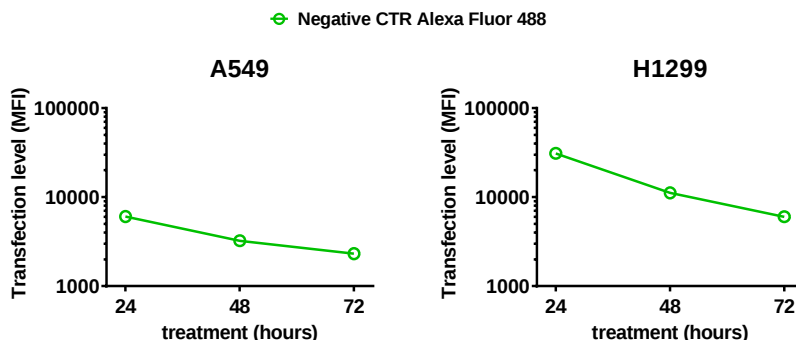


Figure 20: Efficienza di trasfezione del miR-133b mimic nelle A549 ed H1299. MFI = valore mediano dell'intensità di fluorescenza.

Analizzando i livelli di espressione di miR-133b mediante Real Time q-PCR dopo 24 h dalla trasfezione, è stato mostrato un elevato aumento dei livelli di espressione di miR-133b nelle cellule trattate con il mimic rispetto alle cellule trattate con l'oligonucleotide di controllo, trattate con la lipofectamina e non trattate.

A seguito della trasfezione con il mimic, la linea cellulare H1299 ha mostrato livelli di espressione di miR-133b superiori a quelli riscontrati nella linea A549 (10^5 volte per A549 e 10^6 volte per H1299). Anche in base a questi dati la linea cellulare H1299 è risultata più trasfettabile rispetto alla linea A549 (Figura 21).

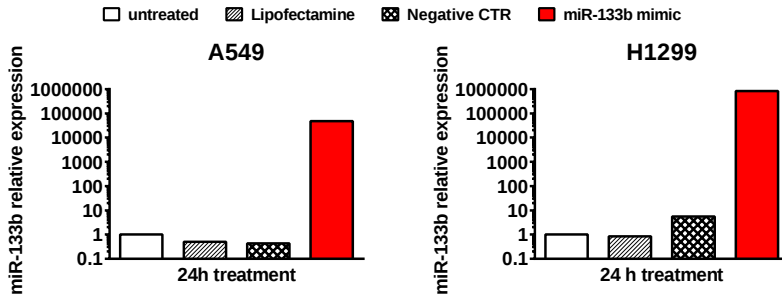


Figura 21: Livelli di espressione di miR-133b nelle linee cellulari A549 ed H1299 dopo trasfezione con il mimic.

18.2. Effetto di miR-133b sull'espressione di EGFR

In base ai dati di letteratura miR-133b dovrebbe legare l'mRNA di EGFR. Sono stati quindi valutati gli effetti della trasfezione del miR-133b mimic sull'espressione di EGFR di membrana mediante citofluorimetria. Successivamente, sono stati valutati gli effetti della trasfezione del miR-133b mimic sull'espressione di EGFR totale, ERK e fosfo-ERK mediante western blot.

Le cellule A549 trattate con il mimic hanno mostrato un livello di EGFR di membrana più alto delle cellule dei gruppi di controllo a 72 h. Inoltre, nelle cellule non trattate è stato evidenziato un calo di EGFR in membrana parallelamente alla crescita/confluenza cellulare. Nelle H1299 non c'è stata nessuna variazione di EGFR di membrana a seguito del trattamento (Figura 22).

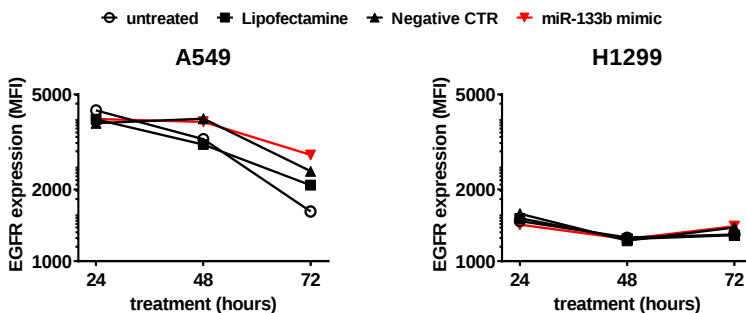


Figura 22: Livelli di espressione di EGFR di membrana nelle linee cellulari A549 ed H1299. MFI = valore mediano dell'intensità di fluorescenza.

I dati ottenuti mediante western blot hanno mostrato che la trasfezione con il miR-133b mimic ha indotto una diminuzione dell'espressione totale di EGFR dopo 48 h di trattamento soprattutto nella linea cellulare A549. Nella linea cellulare A549 la trasfezione con il miR-133b mimic ha inoltre diminuito la fosforilazione di ERK dopo 72 h di trattamento mentre nella linea H1299 è stata documentata un'aumentata fosforilazione di ERK indicando l'attivazione di possibili meccanismi di resistenza e/o di compensazione (Figura 23).

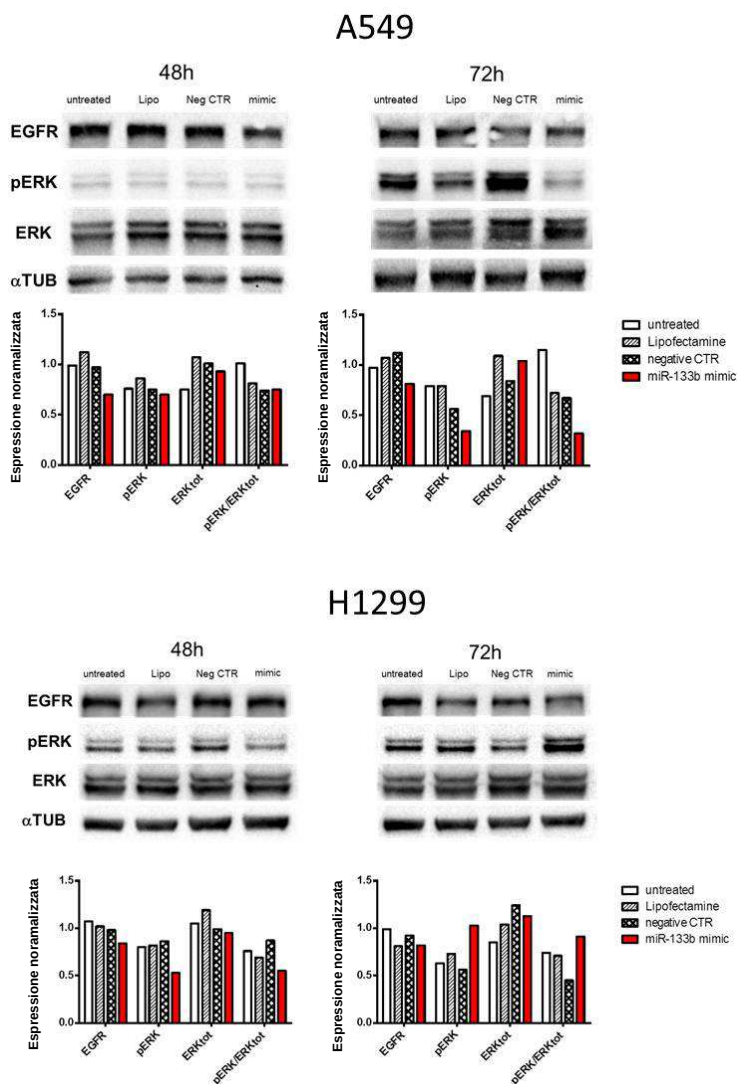


Figura 23: Espressione di EGFRtotale, pERK e ERK totale nelle linee cellulari A549 ed H1299 dopo trasfezione con il mimic. L'espressione di β -tubulina è stata utilizzata per normalizzare i dati.

18.3. Effetto di miR-133b sulla crescita cellulare

Sono stati poi valutati gli effetti della trasfezione del miR-133b mimic sulla crescita cellulare. La conta delle cellule totali vive è stata effettuata mediante l'utilizzo del colorante vitale Trypan Blue in Camera di Burkner. In entrambe le linee la trasfezione con il miR-133b mimic ha diminuito la crescita cellulare ma solo dopo 72 h di trattamento e tale diminuzione è stata maggiore nelle A549 rispetto alle H1299 (Figura 24).

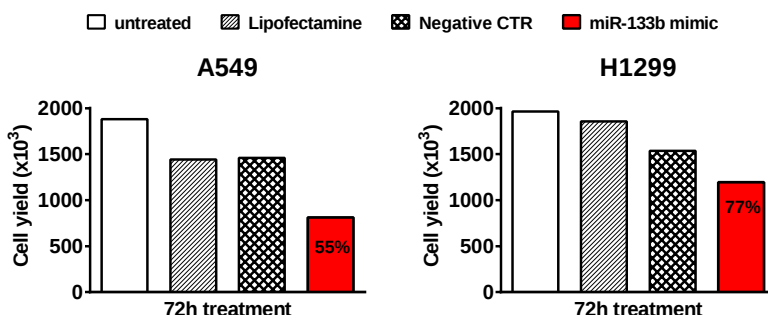


Figura 24: Resa cellulare nelle linee cellulari A549 ed H1299 dopo trasfezione con il mimic.

18.4. Effetto sulla crescita cellulare del trattamento combinato di miR-133b mimic + Erlotinib

Infine, sono stati analizzati gli effetti del trattamento combinato miR-133b mimic + Erlotinib nelle due linee cellulari mediante saggio MTT. La combinazione mimic + Erlotinib ha inibito la crescita delle cellule A549 in modo maggiore rispetto al solo trattamento con il mimic o con il farmaco. Infatti, la crescita delle A549 dopo trattamento combinato è stata del 56% rispetto all'84% del solo trattamento con miR-133b mimic e rispetto al 79% del trattamento con solo Erlotinib.

Nella linea H1299 il trattamento combinato ha avuto effetto pari a quello del mimic da solo; le percentuali di crescita dei tre trattamenti si avvicinano tra loro e sono state del 74% per il trattamento combinato, del 77% per il solo trattamento con miR-133b mimic e dell'84% per il solo trattamento con Erlotinib. Gli effetti sulla crescita sono stati evidenziati solo dopo 72 h di trattamento (Figura 25).

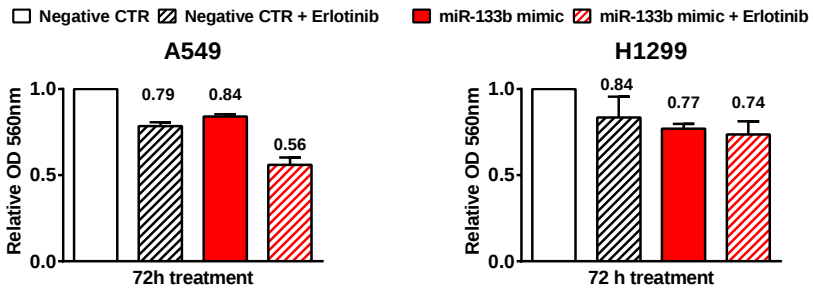


Figura 25: Effetto del trattamento combinato miR-133b mimic + Erlotinib nelle linee cellulari A549 ed H1299. OD relativa alle cellule trattate con Negative CTR.

DISCUSSIONE

La scoperta che variazioni dell'espressione di miRNA sono associate alla genesi e progressione di molti tumori compresi le neoplasie del polmone ha portato in breve tempo alla definizione di profili di espressione di miRNA associati alle diverse patologie. Per alcuni di questi miRNA sono state definite anche funzioni specifiche nella patogenesi suggerendo che molti dei pathways implicati nella tumorigenesi possano avere dei miRNA come target o effettori a valle delle loro vie di segnalazione.

Studi su linee cellulari hanno identificato diversi miRNA coinvolti direttamente o indirettamente nella regolazione del pathway di EGFR nel NSCLC, evidenziando il loro ruolo come potenziali biomarcatori diagnostici e di sopravvivenza.

In questo lavoro è stato studiato l'andamento dell'espressione di miRNA correlati ad EGFR in campioni di pazienti affetti da adenocarcinoma del polmone in relazione alla risposta al trattamento con Erlotinib di 2^a-3^a linea. Lo studio dell'espressione dei miRNA è stato effettuato confrontando due differenti gruppi di pazienti: i pazienti con risposta completa, risposta parziale o con stabilità di malattia superiore/uguale ai sei mesi sono stati considerati "responders", i pazienti con risposta inferiore a sei mesi sono stati considerati "non-responders". L'obiettivo era identificare miRNA predittivi di risposta ad Erlotinib alla diagnosi in pazienti con neoplasia polmonare.

La scelta dei miRNA da studiare è stata un punto di criticità del lavoro ed è stata guidata dalla letteratura. Il criterio di selezione è stato la documentata presenza nel tessuto polmonare neoplastico dei miRNA ed il loro coinvolgimento diretto/indiretto nella via di segnalazione di EGFR.

Sono stati selezionati miR-7, miR-21, miR-128b, miR-133a, miR-133b, miR-146a e miR-146b. Per individuare se il livello di espressione dei miRNA fosse associato alla risposta ad Erlotinib, è stata effettuata un'analisi del loro profilo di espressione mediante Real-Time qPCR in

campioni ottenuti da pazienti con adenocarcinoma del polmone alla diagnosi. I dati ottenuti hanno mostrato una maggior espressione di miR-133b e miR-146a ed una minor espressione di miR-7 nei pazienti “responders”.

MiRNA-7 (o miR-7) si lega in modo specifico alla regione 3'-UTR dell'mRNA di EGFR attivando la sua degradazione, quindi questo miRNA è un potente inibitore dell'espressione del gene EGFR. Inoltre miR-7 regola l'espressione di un numero di geni associati alla via di segnalazione a valle di EGFR, inibendo la progressione del ciclo cellulare e riducendo crescita e vitalità cellulare.

Secondo diversi studi nel NSCLC miR-7 regola negativamente la proliferazione e l'invasione delle cellule e, se associato ai diversi farmaci utilizzati nel trattamento del NSCLC, ne implementa l'azione citotossica. [60, 61, 62, 63]

Inoltre, nei tumori testa-collo è stato dimostrato che l'aumento dei livelli di miR-7 inibisce la crescita delle cellule “responders” a Erlotinib: miR-7 in combinazione con Erlotinib è in grado di diminuire la proliferazione cellulare più dei singoli trattamenti. [64, 65]

In base ai nostri risultati il livello di espressione di miR-7 nei “responders” è risultato significativamente più basso rispetto al livello nei “non-responders”, dato inaspettato in base alla letteratura.

MiRNA-21 (o miR-21) è stato uno dei primi microRNA di mammifero ad essere descritto come oncomiR. Numerosi target sono stati riconosciuti come i bersagli preferenziali di miR-21 e la maggior parte di loro sono oncosoppressori come PTEN. Gli studi di Seike e coll, di Li Liu e coll e di Zhang e coll hanno dimostrato che l'espressione di miR-21 sembra essere correlata con l'attivazione della via di trasduzione del segnale regolata da EGFR e con la progressione tumorale. La sovraespressione di miR-21 agisce come un fattore antiapoptotico e promuove la proliferazione cellulare: miR-21 svolgendo un'azione antiapoptotica può essere correlato alla progressione tumorale. Inoltre risulta associato ad EGFR suggerendo una relazione positiva tra il pathway di segnalazione di EGFR e il livello di espressione di miR-21. [66, 67, 68]

I livelli di espressione di miR-21 non sono risultati statisticamente differenti nei due gruppi da noi confrontati.

MiR-128b è un regolatore diretto di EGFR. Weiss e coll hanno dimostrato che la perdita di eterozigosi (LOH) di miR128b è frequente in pazienti con NSCLC ed è correlata positivamente con la risposta clinica e la sopravvivenza dopo trattamento con gefitinib. [69]

Nel nostro studio miR-128 è risultato non essere espresso nei campioni di entrambi i gruppi di pazienti.

MiRNA-133a (o miR-133a), come dimostrato da Wang e coll, è un oncosoppressore ed è significativamente down-regolato in linee cellulari di NSCLC. [70]

MiRNA-133b (o miR-133b) inibisce l'espressione di EGFR legandosi alla regione 3'-UTR in posizione 50-56. Nel NSCLC esiste una correlazione inversa tra i livelli di espressione di miR-133b e i livelli di mRNA di EGFR. Il gruppo di lavoro di Liu L. ha dimostrato che miR-133b inibisce la crescita, l'invasione e l'apoptosi nelle cellule di NSCLC, quindi miR-133b può essere considerato un oncosoppressore. [71, 72]

Secondo i nostri dati i livelli di espressione di miR-133b sono risultati significativamente più alti nei "responders" rispetto ai livelli riscontrati nei "non-responders", mentre i livelli di espressione di miR-133a, pur essendo risultati più alti nei "responders", non hanno mostrato una differenza significativa rispetto ai livelli riscontrati nei "non-responders".

Elevati livelli di espressione di miR-146a nelle cellule di NSCLC sono correlati alla down regolazione di EGFR, che si associa ad una bassa espressione dell'mRNA e della proteina EGFR. Ugualmente l'inibizione di miR-146a aumenta i livelli di pEGFR, di EGFR e dei segnali a valle. Perciò anche miR-146a sembra essere un oncosoppressore. [73]

I nostri dati hanno mostrato che i livelli di espressione di miR-146a sono risultati significativamente più alti nei "responders" rispetto ai livelli riscontrati nei "non-responders".

In alcuni studi è stata dimostrata l'associazione tra alta espressione di miR-146b e scarsa sopravvivenza globale in pazienti con NSCLC a supporto di attività promoventi la crescita o la progressione tumorale di miR-146b. Patnaik e coll hanno dimostrato che l'iperespressione di miR-146b è associata ad una minima diminuzione/attenuazione del fenotipo maligno nelle linee cellulari di carcinoma del polmone A549. [74, 75]

I dati del nostro studio hanno mostrato che i livelli di espressione di miR-146b non sono risultati statisticamente differenti nei due gruppi di confronto.

È stata condotta un'analisi funzionale per caratterizzare il ruolo biologico del miR-133b utilizzando modelli in vitro (linee cellulari di adenocarcinoma del polmone: A549 ed H1299). Queste linee cellulari sono state trasfettate con miR-133b mimic per verificare se un aumento dei livelli di espressione di miR-133b potessero modificare la sensibilità di queste cellule al trattamento con Erlotinib.

Citofluorimetria a flusso e western blot hanno mostrato risultati contrastanti sulla capacità di un miR-133b mimic di inibire EGFR. La citofluorimetria ha mostrato che le cellule A549 trasfettate con il miR-133b mimic presentavano un EGFR di membrana più alto delle cellule dei gruppi di controllo a 72 h. Nelle cellule H1299 non c'è stata nessuna variazione di EGFR di membrana.

I risultati del western blot hanno mostrato che la trasfezione con il mimic ha indotto una diminuzione dell'espressione totale di EGFR dopo 48 h di trattamento soprattutto nella linea A549. Nella linea cellulare A549 la trasfezione con il miR-133b mimic ha inoltre diminuito la fosforilazione di ERK dopo 72 h di trattamento mentre nella linea H1299 è stata documentata un'aumentata fosforilazione di ERK indicando l'attivazione di possibili meccanismi di resistenza e/o di compensazione (Figura 26).

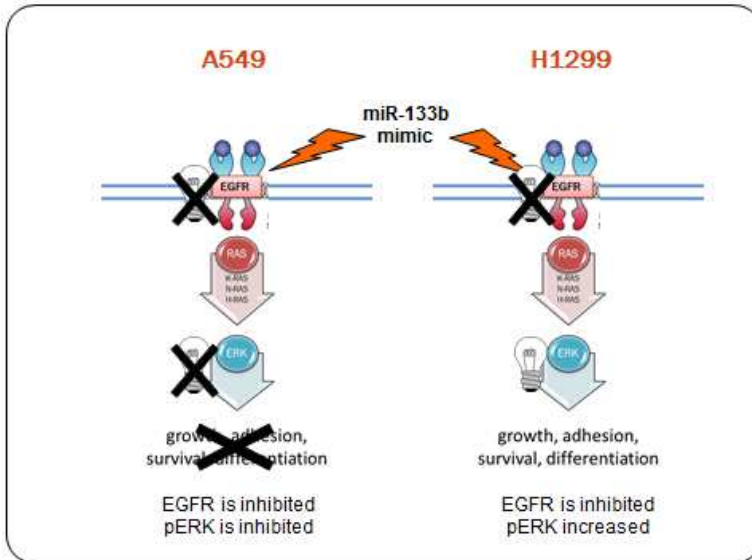


Figura 26: Possibile pathway di resistenza e/o di compensazione nelle due linee cellulari (A549 ed H1299).

I dati ottenuti mediante western blot sono risultati quindi concordi con quanto presente nel lavoro di Liu L. e coll. [67]

L'aumento dei livelli di miR-133b ha prodotto effetti sulla crescita simili nelle due linee cellulari ma di diversa entità: la trasfezione con il miR-133b mimic ha diminuito la crescita cellulare solo dopo 72 h di trattamento e tale diminuzione è stata maggiore nelle A549 rispetto alle H1299 in linea con la diversa attivazione di pERK rilevata a 72 h di trattamento.

Infine sono stati analizzati gli effetti del trattamento combinato miR-133b mimic + Erlotinib nelle due linee cellulari. La scelta della concentrazione di Erlotinib da somministrare alle linee cellulari è stata dettata dalla letteratura, uguale alla concentrazione plasmatica del farmaco allo steady-state: 2 $\mu\text{mol/L}$. [76]

Secondo gli studi di Tianhong e coll la dose giornaliera di Erlotinib somministrata ai pazienti è di 150 mg. La concentrazione plasmatica

di farmaco allo steady-state è circa $2 \mu\text{mol/L}$. Quando si somministra un farmaco, nel tempo la sua concentrazione plasmatica subisce delle variazioni che diventano minime dopo un certo numero di somministrazioni. Lo steady-state è quella situazione di equilibrio in cui la quantità di farmaco eliminata corrisponde a quella introdotta per ogni somministrazione (Figura 27).

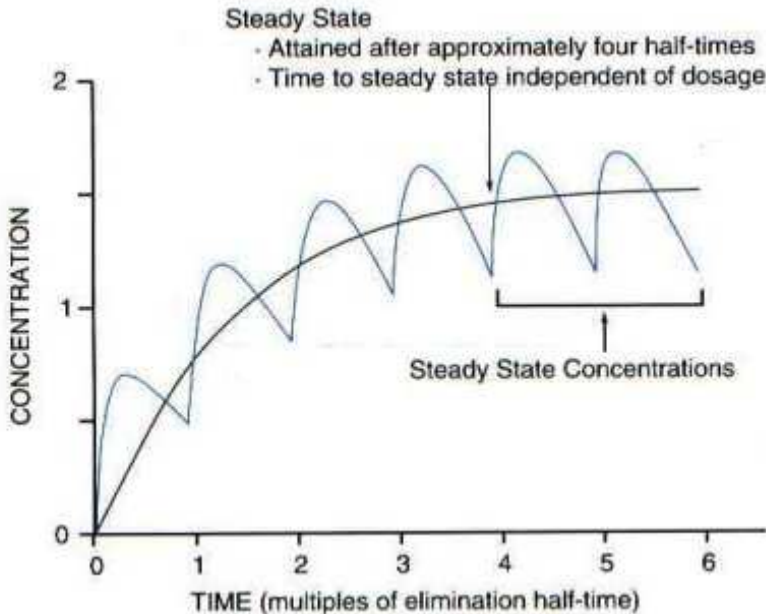


Figura 27: Rappresentazione grafica dello stato di steady-state.

La combinazione mimic + Erlotinib ha inibito in maniera differente la crescita delle due linee cellulari: nelle A549 l'inibizione del trattamento combinato mimic + Erlotinib è stato maggiore rispetto al solo trattamento con il mimic o con il farmaco suggerendo che la combinazione mimic + Erlotinib potrebbe essere vantaggiosa nel trattamento dei pazienti con NSCLC. Nella linea H1299 il trattamento combinato ha avuto effetto pari a quello del mimic da solo indicando

che possono essere attivati meccanismi di resistenza e che solo un subset di pazienti potrebbe beneficiare di un aumento dei livelli di miR-133b. In letteratura l'aumento di miR-133b è risultato vantaggioso anche in associazione a Gefitinib nel NSCLC [71] e Cetuximab nel cancro del colon retto. [77]

Una fase successiva del progetto prevederà l'indagine sperimentale dei diversi meccanismi di regolazione della via di segnalazione di EGFR nelle due linee cellulari e possibili meccanismi di resistenza. Si andrà a valutare l'espressione delle proteine K-RAS ed N-RAS e la presenza di possibili mutazioni attivanti che possono essere responsabili dei meccanismi di resistenza e/o di compensazione riscontrati nelle due linee cellulari studiate. Inoltre sarà valutata l'espressione di recettori come MET ed FGFR che sono bersagli di miR-133b.

Lo studio dei profili di espressione dei miRNA può essere mirato all'individuazione di marcatori dei differenti stati patologici utili, oltre che nella classificazione dei pazienti, nella scelta dei trattamenti terapeutici. Nelle condizioni patologiche in cui sia dimostrata la perdita o iper-espressione di tali molecole, si potrebbe considerare l'ipotesi di poterli utilizzare come farmaci. L'individuazione di biomarcatori predittivi di risposta alla terapia sarebbe di notevole importanza per aumentare l'efficacia dei questi farmaci a target molecolare e trattare con farmaci diversi i pazienti che con elevata probabilità non risponderebbero ad essi.

In conclusione, questo lavoro ha portato all'individuazione di 3 miRNA diversamente espressi nei pazienti con adenocarcinoma del polmone "responders" e in quelli "non-responders" al trattamento con Erlotinib. I risultati ottenuti concordano in parte con la letteratura e suscitano nuovi spunti di riflessione relativi al ruolo svolto dai miRNA nella regolazione del pathway di EGFR; infine pongono le basi per studi futuri sull'utilizzo di miRNA come strumenti fondamentali nella diagnosi, prognosi ed utilizzo terapeutico nei pazienti con adenocarcinoma del polmone.

BIBLIOGRAFIA

Introduzione

1. Jamel A e al. **Cancer statistic, 2009**. CA Cancer J Clin (2009); 59 (4): 225-249.
2. AIRTUM. **Prevalence and cure of cancer in Italy**. Epidemiol Prev (2015); 38 (6 Suppl 1).
3. Travis et al. **The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification**. JTO (2015); 10 (9): 1243-1260.
4. Rossi G et al. **Napsin-A, TTF-1, EGFR, and ALK Status Determination in Lung Primary and Metastatic Mucin-Producing Adenocarcinomas**. Int J Surg Pathol. (2014); 22 (5): 401-7.
5. **Linee guida AIOM. Neoplasie del polmone**. Edizione 2014 (www.aiom.it/area_medica/Linee_Guida/Polmone)
6. Shepherd FA et al. **Prospective Randomized Trial of Docetaxel Versus Best Supportive Care in Patients With Non-Small- Cell Lung Cancer Previously Treated With Platinum- Based Chemotherapy**. J Clin Oncol (2000); 18: 2095-2103
7. Fossella FV et al. **Randomized phase III trial of docetaxel versus vinorelbine or ifosfamide in patients with advanced non-small-cell lung cancer previously treated with platinum-containing chemotherapy regimens**. The TAX 320 Non-Small Cell Lung Cancer Study Group. J Clin Oncol (2000); 18: 2354-2362
8. Hanna N et al. **Randomized Phase III trial of Pemetrexed vs. Docetaxel in patients with NSCLC previously treated with chemotherapy** – JCO (2004); 1: 1589-1597.

9. Delbaldo C et al. **Benefits of Adding a Drug to a Single-Agent or a 2-Agent Chemotherapy Regimen in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. A Meta-analysis.** JAMA (2004); 292 (4): 470-483.
10. Dziadziuszko R et al. **Selecting lung cancer patients for treatment with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization—why, when, and how?** Clin Cancer Res (2006); 12: 4409–4415.
11. Dziadziuszko R et al. **Epidermal growth factor receptor gene copy number and protein level are not associated with outcome of non-small-cell lung cancer patients treated with chemotherapy.** Ann Oncol (2007); 18 (3): 447–452.
12. Mok T.S et al. **Gefitinib or Carboplatin–Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma.** NEJM (2009); 361 (10): 947-957.
13. Maemondo M et al. **Gefitinib or Chemotherapy for Non-Small-Cell Lung Cancer with Mutated EGFR.** NEJM (2010); 362: 2380-2388.
14. Mitsudomi T et al. **Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial.** Lancet Oncol (2010);11: 121–128.
15. Caicun Zhou et al. **Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study.** Lancet Oncol (2011); 12: 735–742.
16. Rosell R et al. **Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial.** Lancet Oncol (2012); 13: 239–2246.
17. Han J-Y et al. **First-SIGNAL: First-Line Single-Agent Iressa Versus Gemcitabine and Cisplatin Trial in Never-Smokers With**

- Adenocarcinoma of the Lung.** J Clin Oncol (2012); 30 (10):1122-1128.
18. Ciuleanu T et al. **Efficacy and safety of erlotinib versus chemotherapy in second-line treatment of patients with advanced non-small-cell lung cancer with poor prognosis (TITAN): a randomised multicentre, open-label, phase 3 study.** Lancet Oncol. (2012); 13: 300-308.
19. M Muhsin et al. **Gefitinib.** Nature reviews Drug Discovery (2003); 2: 515-516.
20. Dowell et al. **Erlotinib hydrochloride.** Nature reviews (2005); 4: 13-14.
21. Sharma SV et al. **Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer.** Nat Rev Cancer (2007); 7: 169-181.
22. Sequist LV et al. **Response to treatment and survival of patients with non-small cell lung cancer undergoing somatic EGFR mutation testing.** Oncologist (2007); 12: 90-98.
23. Rosell R et al. **Screening for Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Lung Cancer.** N Engl J Med (2009); 361: 958-967.
24. Gazdar AF. **Personalized Medicine and Inhibition of EGFR Signaling in Lung Cancer.** N Engl J Med (2009); 361: 1018-1020.
25. Camidge DR et al. **Progression-free survival (PFS) from a phase I study of crizotinib (PF-02341066) in patients with ALK-positive non-small cell lung cancer (NSCLC).** J Clin Oncol (2011); 29: Abstract 2501.
26. Christensen, JG et al. **Cytoreductive antitumor activity of PF-2341066, a novel inhibitor of anaplastic lymphoma kinase and c-Met, in experimental models of anaplastic large-cell lymphoma.** Mol Cancer Ther (2007); 6: 3314-3322.

27. Crinò L. **Initial phase II results with crizotinib in advanced ALK-positive non-small cell lung cancer (NSCLC): PROFILE 1005.** J Clin Oncol (2011); 29: Abstract 7514
28. Kwak, EL et al. **Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer.** N Engl J Med (2010); 363: 1693-1703.
29. Soda M. et al. **Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer.** Nature (2007); 448: 561-566.
30. Shaw AT et al. **Effect of crizotinib on overall survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring ALK gene rearrangement: a retrospective analysis.** Lancet Oncol (2011); 12: 1004-1012.
31. Shaw AT et al. **Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer.** N Engl J Med. (2013); 368 (25): 2385-2394.
32. Oxnard GR et al. **New targetable oncogenes in non-small-cell lung cancer.** J Clin Oncol. (2013); 31: 1097-1104.
33. Pan Y et al. **ALK, ROS1 and RET fusions in 1139 lung adenocarcinomas: A comprehensive study of common and fusion pattern-specific clinicopathologic, histologic and cytologic features.** Lung Cancer (2014); 84 (2): 121-126.
34. Chang-Zheng Chen. **MicroRNAs as Oncogenes and Tumor Suppressors.** New England Journal of Medicine (2005); 353 (17): 1768-1771.
35. Chang-Gong Liu et al. **An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues.** PNAS (2004); 101 (26): 9740–9744.
36. Jun Lu et al. **MicroRNA expression profiles classify human cancers.** Nature (2005); 435: 834-838.
37. Aurora Esquela-Kerscher et al. **Oncomirs — microRNAs with a role in cancer.** Nature (2006); 6: 259-269.

38. Leidinger P et al. **MicroRNAs–important molecules in lung cancer research.** *Frontiers in genetics* (2012); 2 (Article 104): 1-22.
39. Bruno IG et al. **Identification of a microRNA that activates gene expression by repressing nonsense-mediated RNA decay.** *Mol. Cell* (2011); 42: 500–510.
40. Martin D. Jansson et al. **MicroRNA and cancer.** *Molecular Oncology* (2012); 6: 590-610.
41. Tomankova T et al. **Involvement of microRNA sin physiological and pathological processes in the lung.** *Respir.Res.* (2010); 11: 159.
42. Yanaihara N et al. **Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis.** *Cancer Cell* (2006); 9: 189–198.
43. Volinia S et al. **A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* (2006); 103: 2257–2261.
44. Lawrence WC Chan et al. **Genomic Sequence Analysis of EGFR Regulation by MicroRNAs in Lung Cancer.** *Current Topics in Medicinal Chemistry* (2012); 12, 920-926.
45. Fei Han et al. **Emerging Roles of MicroRNAs in EGFR-Targeted Therapies for Lung Cancer.** *BioMed Research International* (2015). Article ID 672759.
46. Chen et al. **Identification of ten serum microRNAs from a genome-wide serum microRNA expression profile as novel non invasive biomarkers for non-small cell lung cancer diagnosis.** *Int.J.Cancer.* (2011); 130: 1620–1628.
47. Rabinowits G et al. **Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer.** *Clin. LungCancer* (2009); 10: 42–46.
48. Raponi M et al. **MicroRNA classifiers for predicting prognosis of squamous cell lung cancer.** *Cancer Res.* (2009); 69: 5776–5783.

49. Landi M.T. et al. **MicroRNA expression differentiates histology and predicts survival of lung cancer.** Clin Cancer Res. (2010); 16: 430–441.

Materiali e metodi

50. Foster KA et al. **Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism.** Exp. Cell Res. (1998); 243 (2): 359-366.
51. Jeffrey A. Engelman et al. **ErbB-3 mediates phosphoinositide 3-kinase activity in gefitinib-sensitive non-small cell lung cancer cell lines.** PNAS (2005); 102 (10): 3788–3793.
52. Michael W. Pfaffl. **A-Z of quantitative PCR. Chapter 3 Quantification strategies in real-time PCR.** Editor: S.A. Bustin pages 87–112.
53. Christian A. Heid,et al. **Real Time Quantitative PCR.** GENOME RESEARCH (1996); 6: 986-994.
54. Mestdagh P. et al. **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.** Genome Biology (2002); 3 (7): research0034.1–0034.11.
55. Heidi J. Peltier et al. **Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: Identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues.** RNA (2008); 14: 844-852.
56. Pieter Mestdagh et al. **A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization.** Genome Biology (2009); 10 (6): R64.
57. Pieter Mestdagh et al. **Evaluation of quantitative miRNRNA expression platforms in the microRNRNA quality control (miRQC) study.** Nature methods (2014); 11: 809-815.
58. Terry L Riss et al. **Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual.**

59. Andrea Cavazzoni et al. **Combined use of anti-ErbB monoclonal antibodies and erlotinib enhances antibody-dependent cellular cytotoxicity of wild-type erlotinib-sensitive NSCLC cell lines.** *Molecular Cancer* (2012); 11: 91.

Discussione

60. Luo J et al. **MicroRNA-7 inhibits the malignant phenotypes of non-small cell lung cancer in vitro by targeting Pax6.** *Mol Med Rep.* (2015); 12 (4): 5443-5448.
61. Liu R et al. **MicroRNA-7 sensitizes non-small cell lung cancer cells to paclitaxel.** *Oncol Lett.* (2014); 8 (5): 2193-2200.
62. He X et al. **Docetaxel inhibits the proliferation of non-small-cell lung cancer cells via upregulation of microRNA-7 expression.** *Int J Clin Exp Pathol.* (2015); 8 (8): 9072-9080.
63. Zhao JG et al. **MicroRNA-7 enhances cytotoxicity induced by gefitinib in non-small cell lung cancer via inhibiting the EGFR and IGF1R signalling pathways.** *Contemp Oncol (Pozn).* (2015); 19 (3): 201-206.
64. Rebecca J. Webster et al. **Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling in Human Cancer Cells by MicroRNA-7.** *The Journal Of Biological Chemistry* (2009); 284 (9): 5731–5741.
65. Felicity C. Kalinowski et al. **Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling and Erlotinib Sensitivity in Head and Neck Cancer Cells by miR-7.** *PLOS ONE* (2012); 7 (10): 1-16.
66. Seike M et al. **MiR-21 is an EGFR-regulated anti-apoptotic factor in lung cancer in never-smokers.** *PNAS* (2009); 106 (29): 12085–12090.
67. Ji-guang Zhang et al. **MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC).** *Clinica Chimica Acta* (2010), 411: 846–852.

68. Zhi-Li Liu et al. **MicroRNA-21 (miR-21) expression promotes growth, metastasis, and chemo- or radio-resistance in non-small cell lung cancer cells by targeting PTEN.** *Mol Cell Biochem* (2013); 372: 35–45.
69. G. J. Weiss et al. **EGFR regulation by microRNA in lung cancer: correlation with clinical response and survival to gefitinib and EGFR expression in cell lines.** *Annals of Oncology* (2008); 19: 1053–1059,.
70. Lu-Kai Wang et al. **MicroRNA-133a Suppresses Multiple Oncogenic Membrane Receptors and Cell Invasion in Non-Small Cell Lung Carcinoma.** *PLOS ONE* (2014); 9 (5): 1-11.
71. Lingxiang Liu et al. **MicroRNA-133b inhibits the growth of non-small-cell lung cancer by targeting the epidermal growth factor receptor.** *FEBS Journal* (2012); 279: 3800–3812.
72. Y Feng et al. **A feedback circuit between miR-133 and the ERK1/2 pathway involving an exquisite mechanism for regulating myoblast proliferation and differentiation.** *Cell Death and Disease* (2013) 4: e934.
73. Gang Chen et al. **MiR-146a Inhibits Cell Growth, Cell Migration and Induces Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer Cells.** *PLOS ONE* (2013); 8 (3).
74. Li J et al. **MicroRNA-146 up-regulation predicts the prognosis of non-small cell lung cancer by miRNA in situ hybridization.** *Exp Mol Pathol.* (2014); 96 (2): 195-9.
75. Santosh Kumar Patnaik et al. **Overexpression of the Lung Cancer-Prognostic miR-146b MicroRNAs Has a Minimal and Negative Effect on the Malignant Phenotype of A549 Lung Cancer Cells.** *PLoS ONE* (2011); 6 (7): e22379.
76. Tianhong Li et al. **Schedule-Dependent Cytotoxic Synergism of Pemetrexed and Erlotinib in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells.** *Clin Cancer Res* (2007); 13: 3413-3422.

77. Jianyu Zhou et al. **Combinational treatment with microRNA-133b and cetuximab has increased inhibitory effects on the growth and invasion of colorectal cancer cells by regulating EGFR.** *Molecular Medicine Reports* (2015); 12: 5407-5414.

PUBBLICAZIONI

- ▣ M. Pagano, F. Zanelli, A. Bisagni, S. Maramotti, E. Tagliavini, S. Croci, R. Gnoni, G. Rossi, M. Paci, G. Sgarbi, A. Mozzarelli, A. Albini, G. Gardini, C. Boni. **EGFR-related miRNAs as potential biomarkers of response to Erlotinib in metastatic NSCLC patients.** 17th National Congress of Medical Oncology, 23-25 October 2015, Rome, Italy. *Ann Oncol* (2015); 26(Suppl 6): 1-166.
- ▣ S. Croci, A. Zerbini, L. Boiardi, F. Muratore, A. Bisagni, D. Nicoli, E. Farnetti, G. Pazzola, L. Cimino, A. Moramarco, A. Cavazza, B. Casali, M. Parmeggiani, C. Salvarani. **MicroRNA markers of inflammation and remodelling in temporal arteries from patients with giant cell arteritis.** *Ann Rheum Dis* (2015); 0: 1–7.
- ▣ M. Ragazzi, I. Tamagnini, A. Bisagni, A. Cavazza, M. Pagano, L. Baldi, C. Boni, F. Cantile, F. Barbieri, D. Nicoli, G. Sartori, D. de Biase, G. Gardini, G. Rossi. **Diamond: immunohistochemistry versus sequencing in EGFR analysis of lung adenocarcinomas.** *J Clin Pathol.* (2015) ; 0: 1–8.
- ▣ F. Lococo, M. Paci, C. Rapicetta, T. Rossi, V. Sancisi, L. Braglia, S. Cavuto, A. Bisagni, I. Bongarzone, D. M. Noonan, A. Albini, S. Maramotti. **Preliminary Evidence on the Diagnostic and Molecular Role of Circulating Soluble EGFR in Non-Small Cell Lung Cancer.** *Int. J. Mol. Sci.* (2015); 16: 19612-19630.
- ▣ G. Rossi, M. Ragazzi, I. Tamagnini, MC. Mengoli, G. Vincenzi, F. Barbieri, S. Piccioli, A. Bisagni, T. Vavalà, L. Righi, S. Novello, F. Gelsomino, M. Tiseo. **Does Immunohistochemistry Represent a Robust Alternative Technique in Determining Drugable Predictive Gene Alterations in Non-Small Cell Lung Cancer?** *Curr Drug Targets.* (2015) Apr 22. [Epub ahead of print]

- ▣ L. Baldi, MC. Mengoli, A. Bisagni, MC. Banzi, C. Boni, G. Rossi. **Case report: Concomitant EGFR mutation and ALK rearrangement in lung adenocarcinoma is more frequent than expected: Report of a case and review of the literature with demonstration of genes alteration into the same tumor cells.** Lung Cancer (2014); 86: 291–295.
- ▣ G. Rossi, A. Bisagni, and A. Cavazza. **High-grade neuroendocrine carcinoma.** Curr Opin Pulm Med (2014); 20 (0): 1-8.
- ▣ G. Rossi, A. Cavazza, L. Righi, G. Sartori, A. Bisagni, L. Longo, G. Pelosi, and M. Papotti. **Napsin-A, TTF-1, EGFR, and ALK Status Determination in Lung Primary and Metastatic Mucin-Producing Adenocarcinomas.** International Journal of Surgical Pathology (2014); 22 (5): 401–407.