



**Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico
"Saverio de Bellis"**
Ente Ospedaliero Specializzato in Gastroenterologia
via Turi n°27 - 70013 Castellana Grotte - Bari
C.F. – P.IVA: 00565330727
Ente di diritto pubblico D.M. del 31-3-1982



Dasa-Räger
EN ISO 9001:2008
IQ-1208-14

Direzione Scientifica



RELAZIONE DELL'ATTIVITA' DI RICERCA CORRENTE DELL'ANNO 2019

Direzione Scientifica

LINEA 1

MEDICINA DI PRECISIONE IN GASTROENTEROLOGIA

Per la linea di ricerca n. 1 - “*Medicina di precisione in Gastroenterologia*”, i principali risultati raggiunti dai singoli Laboratori per ciascun progetto per l’anno 2019 sono i seguenti:

Progetto n. 1: “Biopsia liquida: dosaggio del ctDNA (DNA tumorale circolante) stato mutazionale in pazienti affetti da GIST”

Responsabile: Dott. Ivan Lolli e Dott. Antonio Lippolis

Partecipanti: Marina Liso Marina e Vittoria Disciglio

Background:

I tumori gastrointestinali (GIST) sono neoplasie rare e rappresentano la forma più comune di tumori mesenchimali del tratto gastrointestinale. In Italia l’incidenza è di circa 1 – 1,5 casi per 100.000 abitanti/anno. Per la regione Puglia (4.063.088 abitanti) è possibile stimare 48 nuovi casi attesi per anno, considerando un tasso di densità di incidenza pari a 1,18/100.000/anno e assumendo che la densità di incidenza del tumore sia omogenea in tutto il territorio nazionale. Attualmente lo standard terapeutico per i pazienti affetti da GIST in fase metastatica è rappresentato da imatinib, un inibitore tirosinchinasico[1]. Tale farmaco viene inoltre utilizzato come trattamento neoadiuvante ed adiuvante nei pazienti con diagnosi di GIST in fase localizzata che hanno subito la rimozione completa del tumore. Per i pazienti affetti da GIST, la risposta alla terapia è valutata mediante diagnostica per immagini il cui limite è rappresentato da una limitata sensibilità e specificità. La maggior parte dei GIST (85%) presenta mutazioni nei recettori tirosinchinasici trans membrana: KIT (tyrosine-protein kinase Kit) e PDGFR-alpha (platelet-derived growth factor receptor alpha) [2]. La normale pratica clinica prevede che la diagnosi di questa malattia avviene mediante un esame morfologico dei campioni istologici, completato dalla valutazione dello stato molecolare dei geni KIT e PDGFRA nel DNA tumorale [1]. Caratteristica dei GIST è la variabilità delle mutazioni presenti e la comparsa, nel decorso della malattia, di mutazioni secondarie responsabili dell’insorgenza di resistenza al trattamento. Le mutazioni che insorgono secondariamente nei pazienti GIST sono localizzate in due domini principali della proteina KIT: i) il dominio ATP-binding pocket, codificato dagli esoni 13 e 14 del gene KIT, che interferisce direttamente con il farmaco; ii) il dominio “activation loop”, dove le mutazioni possono stabilizzare la proteina KIT nella conformazione attiva ed impedire quindi l’interazione con il farmaco [3-4]. Al momento, la sola fonte di DNA tumorale utile per valutazioni biomolecolari o genomiche è assicurata dai campioni di tessuto neoplastico ottenuto da procedure chirurgiche o biotiche. L’invasività di tali metodiche rende difficile il campionamento di tessuto tumorale ripetuto nel tempo. Di conseguenza è possibile ottenere solo un’immagine statica dell’assetto molecolare del tumore, quella relativa alla diagnosi, mentre viene preclusa la possibilità di cogliere in tempo, l’insorgenza di mutazioni secondarie caratterizzanti l’eterogeneità molecolare dei GIST. Questo comporta difficoltà e ritardi nella prescrizione di terapie in grado di contrastare la maggiore aggressività della malattia. Le limitazioni proprie delle biopsie tissutali possono essere superate ricorrendo alla “biopsia liquida” che

permette, mediante un prelievo di sangue venoso, di ottenere DNA tumorale circolante (ctDNA) da utilizzare per valutazioni biomolecolari [5-7]. Studi recenti hanno dimostrato che alterazioni somatiche dei geni KIT e PDGFRA identificate nel tessuto tumorale possono essere identificate nel ctDNA di pazienti affetti da GIST [8-10]. Studi recenti hanno dimostrato che alterazioni somatiche dei geni KIT e PDGFRA identificate nel tessuto tumorale possono essere identificate nel ctDNA dei pazienti affetti da GIST [11-14]. Questa strategia diagnostica potrebbe integrare, e/o in futuro sostituire, la biopsia tradizionale, con vantaggi sia per il paziente, che usufruirebbe di una metodica non invasiva, sia per il clinico che potrebbe meglio monitorare la malattia per la possibilità di prelievi ematici seriali nel tempo.

Stato di avanzamento del progetto:

Nel nostro istituto, istituto gastroenterologico nazionale, presso la U.O.S.D. di Oncologia Medica afferiscono pazienti affetti da GIST in fase localizzata o metastatica che vengono avviati a terapia mirata con farmaci a bersaglio molecolare. Da gennaio 2017 sino ad oggi quindici pazienti GIST in fase avanzata sono giunti all'osservazione dell'unità di Oncologia del nostro Istituto. Di tre pazienti è in corso l'analisi molecolare dei geni PDGFRA e KIT su DNA estratto da tessuto tumorale. Le caratteristiche clinico-patologiche dei casi GIST sino ad ora inclusi nello studio per l'analisi molecolare del ctDNA sono riportati nella Tabella 1.. Il consenso informato è stato ottenuto dai pazienti, e campioni di sangue sono stati raccolti prima dell'inizio della terapia farmacologica o prima dell'intervento chirurgico. I campioni di sangue sono stati subito processati per la raccolta del plasma, mediante 2 centrifugazioni successive (2500 g x 10 minuti, a 4°C). Il plasma recuperato è stato suddiviso in aliquote da 1 mL e conservato alla temperatura di -80°C per la successiva estrazione degli acidi nucleici circolanti.

Tabella 1: caratteristiche clinico-patologiche dei casi GIST.

Caso	Età diagnosi / sesso	Tumore Primitivo				Terapia	Sopravvivenza libera da progressione	Tumore Secondario			
		Loc.	Dim. (cm)	Conta mitotica	Mutazione			Loc.	Dim. (cm)	Conta mitotica	Mutazione
1	39/F	Retto	6,5x6	>5/50 HPF	KIT esone 11 Del Q556-K558	Imatinib	10 mesi	Retto	3x3	-	Analisi in corso
2	49/M	Stomaco	14	<5/50 HPF	KIT esone 11 p.V559D	Imatinib Sunitinib	12 mesi	-	-	-	-
3	68/F	Stomaco	ND	ND	KIT esone 11 Del W557-K558	Imatinib Sunitinib	32 mesi 15 mesi	Fegato	12	-	-
4	74/F	Addomino -pelvica	10x8x3,5	ND	Wild-Type	Nessuna	ND	-	-	-	-
5	61/M	GIST extra intestinale	20x18x13	2/50 HPF	KIT esone 11 Del K558-572	Nessuna	-	-	-	-	-
6	62/M	Stomaco/ Colon	10x7x7.8	8/50 HPF	PDGFRA (p.E556_R560; p.Q639R)	Nessuna	36 mesi	-	-	-	-
7	53/M	Duodeno/ Diggiuno	0,63x0,75	ND	KIT esone 11 (p.G559D)	Imatinib	36 mesi	-	-	-	-
8	52/M	Stomaco	8	>5/50 HPF	KIT esone 11 Del550_558	Imatinib Sunitinib	ND ND	-	-	-	-
9	54/M	Stomaco	3	3/50HPF	Analisi in corso	Nessuna	ND	-	-	-	-
10	53/F	Stomaco	2	<5/50HPF	Analisi in corso	Nessuna	ND	-	-	-	-
11	49/M	Stomaco	15x10x7.5		Kit esone 11 Del Q556-V559	Imatinib Sutent Avtrinin Regorafenib	25 mesi 5 mesi ND ND	Fegato	-	-	-
12	62/M	Intestino	ND	ND	NF1 (K1423E)	Sutent	12 mesi	-	-	-	-
13	55/F	Multiplici	ND	ND	NF1 (I679Nfs*21)	Sutent	12 mesi	-	-	-	-
14	65/F	Stomaco	15x11	-	KIT wild-type PDGFRA wild-type	Imatinib	-	Fegato	-	-	-
15	54/M	Pancreas	10x9,5	-	KIT wild-type PDGFRA wild-type	Imatinib	-	-	-	-	-

ND: Non Disponibile

Descrizione Casi Clinici:

Caso 1

Una donna all'età di 39 anni si è sottoposta ad intervento di resezione marginale del retto e del coccige (data intervento 13/04/2010) per una neoformazione (6x5cm) sferoidale dello scavo pelvico con coinvolgimento extramucoso della parete posteriore del retto distale fino al giunto anorettale. L'esame istologico (data 11/05/2010), eseguito sul tessuto tumorale asportato chirurgicamente, ha permesso di diagnosticare una neoplasia a cellule fusate della parete del retto con un indice mitotico $>5/50\text{HPF}$, con caratteri morfologici riferibili a tumore stromale gastrointestinale e ad alto rischio di recidiva. L'analisi molecolare dei geni KIT e PGFRA, eseguita su DNA genomico estratto da tessuto tumorale, identifica la presenza di una delezione di 9 paia di basi nell'esone 11 del gene KIT coinvolgente gli amminoacidi Q556, W557 e K558 della proteina KIT (data 18/06/2010). La paziente viene subito sottoposta a terapia adiuvante con Imatinib al dosaggio di 400mg al giorno (data 30/05/2010) per tre anni che viene sostanzialmente ben tollerato. Segue follow-up negativo fino ai 6 anni, quando esegue risonanza magnetica (data 12/07/2016) che rivela in corrispondenza della parete posteriore del terzo medio del retto una formazione rotondeggiante di 3x3 cm circa a margini regolari. L'endoscopia rettale evidenzia formazione ovalare disomogenea ipoecogena, vascolarizzante, delle dimensioni di 38x30 mm a contatto con la parete rettale. L'esame istologico eseguito su agoaspirato evidenzia materiale prevalentemente ematico inglobante frammenti puntiformi di neoplasia ed elementi fusocellulari ed epitelioide. Tale esame determina ipotesi diagnostica di recidiva di GIST rettale. La paziente viene pertanto subito sottoposta ad intervento chirurgico di proctectomia totale con resezione intersfinterica per via laparoscopica transanale (data 28/12/2016). L'esame istologico rivela: i) segmento di parete retto- anale comprendente GIST ad alto rischio di metastatizzazione recidivo. I margini di resezione chirurgica prossimale, distale e radiale sono esenti da neoplasia; ii) cistoadenoma dell'ovaio; iii) neoformazione cutanea benigna polipoide a struttura fibrovascolare. Dopo 4 mesi dall'intervento chirurgico riprende terapia con Imatinib al dosaggio di 400mg al giorno. Prima dell'inizio della ripresa della terapia con Imatinib è stato eseguito prelievo di sangue per l'analisi del DNA tumorale circolante. La paziente ha una recidiva di malattia, che l'ha portata ad intervento chirurgico di resezione ileale parcellare il 20/10/2017. La paziente riprende terapia con Imatinib il 30/11/2017 che continua sino ad oggi.

Caso 2

Si descrive il caso di un uomo che all'età di 49 anni ha sviluppato GIST. Il primo esame TAC addome rivela una lesione rotondeggiante a pareti regolari con alcune calcificazioni e contenuto disomogeneamente liquido con diametro di circa 14 cm strettamente adesa alla grande curvatura gastrica. Si ipotizza che la lesione possa essere riferibile a GIST. Il paziente si sottopone quindi ad intervento chirurgico (data 18/11/2015) per asportazione di tumore cistico con resezione del tratto di stomaco coinvolto e colecistectomia. L'esame istologico rivela tumore stromale gastrointestinale fusocellulare dello stomaco con fenomeni cistico degenerativi ed estesi focolai di necrosi e calciosi, e con indice mitotico pari a <5 per 50 HPF (rischio intermedio). Per recidiva di malattia a gennaio 2017, è stata eseguita analisi molecolare dei geni KIT e PDGFRA su DNA estratto da tessuto tumorale primitivo mediante sequenziamento diretto, che ha rilevato la presenza della variante p.Val559Asp.

Dal 27 febbraio 2017 il paziente ha iniziato terapia con Imatinib al dosaggio di 400mg al giorno che prosegue fino a marzo 2019. Il paziente tollera bene il farmaco e sino ad oggi la malattia è stazionaria senza progressione. Prima dell'inizio della terapia è stato eseguito prelievo di sangue per l'analisi del DNA tumorale circolante. L'esame di tomografia computerizzata (data 13/03/2019) metteva in evidenza progressione di malattia. La paziente inizia terapia con Sunitinib ad Aprile 2019 ed attualmente presenta malattia stabile.

Caso 3

Si descrive il caso di una donna che all'età di 68 anni ha subito intervento di gastrectomia totale per GIST (Novembre 2000). L'analisi molecolare dei geni KIT e PGFRA, eseguita su DNA genomico estratto da tessuto tumorale, identifica la presenza di una delezione di 6 paia di basi nell'esone 11 del gene KIT coinvolgente gli amminoacidi W557 e K558 della proteina KIT.

Dopo tredici anni dalla diagnosi (Giugno 2013) la paziente ha sviluppato lesioni ripetitive a livello epatico con una grossa lesione del lobo destro di 12cm. L'esame istologico eseguito su biopsia epatica ha permesso di confermare la diagnosi di GIST. La paziente inizia il trattamento con Imatinib al dosaggio di 400mg e a causa di una ritenzione idrica importante il dosaggio farmacologico viene ridotto a 200mg (Ottobre 2013). La paziente prosegue la terapia per due anni. Dopo tre anni (Febbraio 2016) la paziente, a causa di una progressione di malattia a livello epatico, inizia trattamento farmacologico di seconda linea con Sunitinib. Prima dell'inizio del trattamento con Sunitinib, la paziente è stata sottoposta ad un prelievo di sangue venoso per estrazione del ctDNA. Dopo un anno (gennaio 2017) la paziente viene sottoposta a radioterapia a causa di lesioni metastatiche dell'encefalo. La paziente decede dopo qualche mese (maggio 2017) per progressione di malattia.

Caso 4

Si descrive il caso di una donna che all'età di 74 anni è stata sottoposta ad intervento chirurgico per esportazione di una neoformazione addomino-pelvica dalle dimensioni di 10x8x3,5cm che aderiva alle strutture vicine. L'esame istologico della neoformazione ha permesso la diagnosi di GIST a rischio intermedio (indice proliferativo ki67 pari al 5%). Durante l'intervento chirurgico si è verificata rottura capsulare, motivo per cui tale tumore è stato considerato ad alto rischio. Sino ad oggi la paziente non è stata sottoposta ad alcuna terapia. L'analisi mutazionale di 56 geni più frequentemente alterati nei tumori solidi (ALK, RB1, SMARCB1, FLT3, MPL, PTEN, STK11, CDH1, KDR, AKT1, JAK2, HRAS, JAK3, PDGFRA, MAP2K1, FBXW7, DNMT3A, FOXL2, TSC1, HNF1A, MSH6, PIK3CA, SMO, KIT, MET, TP53, DDR2, CSF1R, NOTCH1, SRC, EGFR, NRAS, ERBB4, GNA11, ERBB2, ABL1, VHL, SMAD4, NPM1, CDKN2A, IDH1, IDH2, BRAF, PTPN11, MLH1, APC, GNAQ, GNAS, CTNNB1, ATM, KRAS, FGFR3, FGFR2, EZH2,

FGFR1) eseguita su DNA genomico estratto da tessuto tumorale, mediante la tecnologia di sequenziamento di nuova generazione, non ha permesso di identificare mutazioni patogenetiche.

Caso 5

Si descrive il caso di un uomo che all'età di 61 anni è stato sottoposto ad exeresi chirurgica di una neoformazione localizzata nell'addome superiore che dimensionava 20x18x13cm. L'esame istologico ha permesso di effettuare la diagnosi di GIST extraintestinale ad alto rischio (indice mitotico di 2/50 HPF). L'analisi molecolare dei geni KIT e PDGFRA ha permesso di identificare la mutazione coinvolgente l'esone 11 del gene c-kit (del558-572). Sino ad oggi il paziente non è stato sottoposto ad alcuna terapia farmacologica, in quanto alla diagnosi le condizioni generali erano talmente compromesse da non consentire il trattamento farmacologico della malattia.

Caso 6

Si descrive il caso di un uomo che all'età di 62 anni (data 18/03/2016) viene sottoposto ad intervento chirurgico per esportazione di una voluminosa formazione (10x7x7,8cm) in blocco con la parete posteriore dello stomaco, il colon trasverso distale ed il terzo prossimale del colon discendente. L'esame istologico definisce neoplasia mesenchimale a cellule fusate monomorfe nella tonaca muscolare propria dell'antro gastrico con conta mitotica pari a 8 su 50 HPF, con indice proliferativo (ki-67) pari al 15%, con i caratteri immunomorfologici (CD117+/-focale, DOG1+++ , CD34 neg) del GIST con alto rischio di recidiva. L'analisi molecolare dei geni KIT e PDGFRA ha permesso di identificare la mutazione patogenetica coinvolgente il gene PDGFRA (esone 12, p.E556_R560 ed esone 14, p.Q639R). Il paziente inizia il trattamento con Imatinib (data 03/06/2016) che viene ben tollerato. Segue follow-up che non evidenzia recidiva di malattia.

Caso 7

Si descrive il caso di un uomo che all'età di 53 anni si ricovera al pronto soccorso per importante anemia tale da dover ricorrere ad emotrasfusioni. Il paziente viene quindi sottoposto a colonscopia (data 14/01/2016) che determina presenza di soffiusioni emorragiche a livello dell'ascendente prossimale, cieco e valvola ileo- cecale. L'esame di tomografia computerizzata (data 15/01/2016) identifica al di sotto del pancreas, una formazione espansiva ovalare (63x75 mm) circa che si estrinseca antero-medialmente all'ultimo tratto del Treitz dal quale non presenta piani di clivaggio. Il paziente viene quindi sottoposto ad intervento chirurgico (data 20/01/2016) per resezione duodeno-digiunale con asportazione della massa. L'esame istologico della neoformazione asportata chirurgicamente permette di diagnosticare GIST del digiuno (conta mitotica di 5 mitosi, CD117 e DOG1 positivi, CD34 debolmente positivo). L'analisi mutazionale dei geni KIT e PDGFRA permette di identificare la variante p.G559D del gene KIT. Il paziente termina il trattamento con terapia adiuvante (Imatinib) il 03/06/2019. Il successivo controllo TAC non mette in evidenza segni di malattia.

Caso 8

Si descrive il caso di un uomo che all'età di 52 anni (29/07/2008) è stato sottoposto ad intervento chirurgico di gastrectomia totale per un tumore GIST ad alto rischio (lesione di 8 cm con un indice

mitotico > 5/50 HPF) con metastasi epatiche. Inizia terapia con Glivec che interrompe per progressione di malattia. Il paziente iniziava terapia con Sunitinib al dosaggio di 37.5mg. L'analisi mutazionale dei geni KIT e PDGFRA ha evidenziato la presenza della mutazione coinvolgente l'esone 11 del gene kit (del550_558).

Caso 9

Si descrive il caso di un uomo che all'età di 54 anni è stato sottoposto ad intervento chirurgico per escissione di GIST gastrico (neoformazione di circa 3 cm di diametro della piccola curva del fondo gastrico). L'esame istologico permette di eseguire diagnosi di GIST della parete del fondo gastrico di tipo fusocellulare (Assenza di necrosi. Mitosi 3 per 50 HPF. Margini liberi da neoplasia. Immunofenotipo: positivo CD117- DOG1-CD34. Negativo: AML. Rischio di recidiva basso). Dopo 7 mesi a seguito di comparsa di melena ed

evidenza di TAC lesione digiunale, veniva sottoposto in laparoscopia a resezione digiunale. L'esame istologico di tale resezione rileva GIST del digiuno a cellule fusate, positività immunoistochimica per CD117, DOG1, CD 34 e focale per actina e muscolo liscio. Indice mitotico 3/50 HPF. Rischio di recidiva basso (4,3%). Margini chirurgici esenti da neoplasia. Sono attualmente in corso le analisi molecolari dei geni PDGFRA e KIT.

Caso 10

Si descrive il caso di una donna che all'età di 53 anni in seguito ad epigastralgie eseguiva EGDS con riscontro di mucosa gastrica lievemente atrofica con minute rilevatezze polipoidi di tipo iperplastiche e in sede antrale lesioni esosivo-ulcerative a raggiera sulle quali venivano eseguite biopsie; in sede sottocardiale formazione sottomucosa di 1,5 cm. L'esame TAC evidenziava neoformazione ovoidale sottomucosa del diametro di 19 mm, a sviluppo endofitico con minuta calcificazione intralesionale. Formazioni cistiche al lobo sinistro epatico (diametro massimo 18 mm). Piccolo adenoma surrenalico sinistro di 5 mm ad alto contenuto adiposo. Dopo 8 mesi esegue eco endoscopia che evidenzia a livello dello strato muscolare formazione tondeggianti, ipoecogena, omogenea, ivi completamente contenuta, del diametro di 18 x 18 mm ed a margini netti. Dopo due mesi l'esame TC-torace-addome-pelvi con mdc rileva in corrispondenza di III prossimale dello stomaco, sulla piccola curva, formazione sottomucosa del diametro massimo di 2 cm, che appare verosimilmente riferibile a GIST. Dopo due mesi la paziente viene sottoposta ad intervento di escissione della neoformazione gastrica. L'esame istologico permette di effettuare le diagnosi di GIST della parete fundica dello stomaco, del tipo a cellule fusate (mitosi <5 per 50 HPF. Nessun rischio di recidiva. Margini di resezione chirurgica esenti da neoplasia). Sono attualmente in corso le analisi molecolari dei geni PDGFRA e KIT.

Caso 11

Si descrive il caso di un uomo che all'età di 49 anni (data 20/06/2016) si sottopone a colonscopia con resezione endoscopica di polipo del colon. Dopo sei mesi il paziente viene sottoposto a gastroscopia che evidenzia una vasta area ulcerata a livello del fondo. L'esame istologico eseguito su biopsia tissutale rivela un quadro istologico ed immunofenotipico coerente con il sospetto clinico di GIST gastrico ed elementi fusati. L'esame TAC (data 10/02/2017) evidenzia in corrispondenza del cardias e fondo gastrico una voluminosa formazione solida disomogenea, parzialmente aggettante nel lume ove mostra ampia ulcerazione centrale, ma a maggior estrinsecazione esofitica sottodiaframmatica posteriore, delle dimensioni di 15x10x7,5 cm. L'analisi mutazionale dei geni KIT e PDGFRA, eseguita su biopsia tissutale mediante sequenziamento diretto, rileva la presenza della mutazione del gene KIT (esone 11, p.Q556_V559del). L'esame PET (data 28/02/2017) evidenzia multiple aree di accumulo patologico del radiofarmaco in ambito epatico e in ambito scheletrico, le più evidenti in alcuni somi del tratto dorso-lombare del rachide e nel bacino. Dopo esecuzione di PET/CT il paziente inizia terapia con Imatinib che prosegue per un anno e quattro mesi. L'esame TAC eseguito dopo un anno evidenzia riduzione delle dimensioni della lesione neoplastica di GIST gastrico (10x6x4,5 cm). Il successivo esame TAC eseguito nel paziente in follow-up dopo 1 mese evidenzia in sede gastrica alla periferia della nota neoplasia, si segnala la comparsa di due lesioni solide strettamente contigue del diametro complessivo (6,7x3,5x4 cm) reperti riferibili a recidiva

locale della malattia di base. Il paziente intraprende terapia con Sutent (data 27/07/2018) al dosaggio di 37,5 mg che viene interrotto dopo 5 mesi per progressione di malattia. Il paziente intraprende terapia sperimentale con Avatrinitib (Istituto Nazionale dei Tumori), che dà luogo a sanguinamento della lesione gastrica. Il paziente si ricovera presso l'Unità di Oncologia del nostro Istituto (dal 18/03/2019 al 29/03/2019) ed interrompe il trattamento. Il 16/05/2019 inizia trattamento con Regorafenib.

Caso 12

Nell'ambito dei tumori eredo-familiari si riporta che, è giunto all'osservazione dell'Unità Operativa di Oncologia e dell'Unità Operativa di Genetica Medica un caso familiare in cui è stato riscontrato lo sviluppo di GIST insorto in seguito a trasmissione ereditaria di mutazioni patogenetiche del gene NF1.

Nello specifico, si riporta il caso di un paziente che alla valutazione obiettiva mostrava i segni clinici della neurofibromatosi di tipo 1 (NF1) tra cui numerosi neurofibromi, diffuse macchie caffè-au-lait, lentiginosi ascellare e noduli di Lisch. Il paziente è stato operato per resezioni di GIST multipli digiunali all'età di 69 anni e di emicolectomia destra per adenocarcinoma all'età di 72 anni. Il paziente ha inoltre subito un intervento per resezione di una lesione polipoide duodenale e ha sviluppato meningioma calcifico destro di 2,11 cm senza segni di compressione all'età di 75 anni. L'analisi mutazionale dei geni KIT, PDGFRA e BRAF eseguita su biopsia tissutale mediante sequenziamento diretto, non ha rilevato la presenza di mutazioni causative dello sviluppo della patologia GIST. L'analisi molecolare eseguita su DNA estratto da sangue e finalizzata alla diagnosi molecolare di NF1 ha rilevato la presenza di una mutazione missenso con significato patogenico (NM_000267.3: c.4267 A>G; NP_000258:p.Lys1423Glu). Il paziente inizia terapia con Sutent che interrompe dopo un anno

per tossicità ematologica e ipotiroidismo. Alla data odierna (08/10/2019) il paziente non è in progressione di malattia.

Caso 13

Si riporta un ulteriore caso di una paziente, giunto all'osservazione dell'Unità Operativa di Oncologia e dell'Unità Operativa di Genetica Medica, che all'esame obiettivo presentava numerose macchie café-au-lait di dimensioni disomogenee e variamente distribuite associate a neurofibromi cutanei multipli. La paziente ha inoltre sviluppato carcinoma in situ della mammella (43 e 48 anni), neurinoma toracopleurico (48 anni), GIST (55 anni) e noduli tiroidei. Dalla raccolta dei dati anamnestici, eseguita durante una consulenza genetica all' UO di Genetica Medica, è inoltre emerso che il fratello della paziente mostrava segni clinici della Neurofibromatosi di tipo I (macchie café-au-lait di dimensioni disomogenee e variamente distribuite associate a neurofibromi cutanei multipli), il cui figlio ha manifestato neurofibromi e neurinomi ed è deceduto all'età di 31 anni. Dalla raccolta della storia familiare è inoltre emerso che un altro suo fratello (65 anni) ha mostrato i segni clinici della NF1 (neurofibromi cutanei e neurinomi), che sono stati inoltre riscontrati in sua figlia deceduta all'età di 10 anni. Sulla base di tali valutazioni la paziente è stata sottoposta a prelievo ematico finalizzato alla diagnosi molecolare di NF1. L'analisi molecolare eseguita ha permesso di identificare la mutazione c.2033dupC (p.Ile679Aspfs*21) nel gene NF1. L'analisi molecolare di tale variante patogenetica coinvolgente il gene NF1 è stata confermata in uno dei fratelli della paziente. L'analisi mutazionale dei geni KIT, PDGFRA e BRAF eseguita su biopsia tissutale mediante sequenziamento diretto, non ha rilevato la presenza di mutazioni causative dello sviluppo della patologia GIST.

Il gene NF1 è localizzato sul cromosoma 17 ricopre una regione di 350 kb, è costituito da 60 esoni che codificano per una proteina di 2818 aminoacidi, la neurofibromina, che regola negativamente i livelli cellulari delle proteine RAS attive attraverso la sua attività GTPasica. Il dominio centrale di questa proteina, composto da circa 413 aminoacidi è codificato dalla regione genica compresa tra gli esoni 20 e 27a, e costituisce il maggiore dominio funzionale della proteina NF1 ed è stato nominato GRD (GAP-related domain) [15]. La regolazione negativa delle proteine RAS mediata dal dominio GRD rappresenta uno step cruciale nella regolazione del pathway Ras-MAPK e tale via risulta deregolata in una significativa percentuale di tumori. Mutazioni nel gene NF1, possono determinare una produzione della neurofibromina non funzionale causando un'attivazione della via RAS/RAF/MAPK con conseguente proliferazione e crescita cellulare non controllata. I tumori GIST, in cui non si identificano le mutazioni dei geni KIT e PDGFRA, sono definiti Wild Type GIST (WT GIST) e mostrano un profilo mutazionale differente dai tumori GIST positivi per le mutazioni dei geni KIT e PDGFRA [16].

La NF1 (MIM#162200, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>), chiamata anche Malattia di Von Recklinghausen o Neurofibromatosi periferica o multipla, è la più comune tra le forme di neurofibromatosi. Si tratta di una sindrome autosomica dominante con una prevalenza stimata di 1/3000 nati vivi. L'espressione fenotipica è estremamente variabile anche all'interno dello stesso nucleo familiare.

I pazienti affetti da Neurofibromatosi di tipo 1, presentano una maggiore suscettibilità allo sviluppo di tumori rispetto alla popolazione generale. È stato riportato che il 7% dei pazienti affetti da NF1 possono sviluppare GISTs. Sino ad oggi, circa il 60% di GISTs negativi per le mutazioni dei geni KIT, PDGFRA, RAS, SDH hanno mutazioni nel gene NF1[16]. I GIST associati a mutazioni del gene NF1, hanno basso rischio di ricorrenza, sono tumori a basso grado di malignità e si localizzano più frequentemente nell'ileo, nel duodeno e nello stomaco. Sino ad oggi, in letteratura sono stati descritti pochissimi casi di pazienti affetti da NF1 che hanno sviluppato GIST. La caratterizzazione molecolare dei GIST di questi casi ha mostrato che tali tumori non mostrano alterazioni genetiche nei geni KIT e PDGFRA. Tuttavia di questi casi, non è stata riportata la caratterizzazione molecolare del gene NF1 sia a livello germinale che a livello somatico [17-21].

Nel nostro Istituto abbiamo caratterizzato molecolarmente due casi familiari affetti da NF1 che hanno sviluppato GIST. Considerato che le manifestazioni cliniche e le possibili complicanze della NF1 possono manifestarsi in momenti diversi della vita di un individuo è necessario impostare follow-up e sorveglianza clinico strumentale mirata e personalizzata in base all'età del paziente, alla gravità e alla peculiarità dei sintomi.

Caso 14

Si descrive il caso di una paziente che all'età di 65 anni in seguito ad epigastralgia e calo ponderale eseguiva esame TAC con mezzo di contrasto che evidenziava un grossolano espanso in ipocondrio sinistro. L'espanso sembra essere costituito da diffuso e disomogeneo ispessimento parietale del fondo-corpo gastrico, presenta multipli vettori vascolari artero-venosi al suo interno (dimensioni massime di 9x16x11 cm). Tale neoformazione prende contatto con il lobo sinistro epatico, con la milza, con il pancreas, con anse tenuali e coliche con apparente piano di clivaggio. L'esame strumentale Risonanza Magnetica conferma l'ammasso voluminoso eterologo che occupa pressochè interamente l'ipocondrio sinistro (dimensioni massimi assiali di 16x14 cm) in assenza di infiltrazione delle strutture contigue. Le scansioni endoscopiche a livello del corpo

gastrico evidenziano nello stroto della muscolare propria una voluminosa formazione ipocogena, ivi completamente contenuta, del dm di 15x11 cm a margini irregolari e disomogenea per la presenza di pseudo noduli, calcificazioni e formazioni cistiche del dm max di 1,5 cm. L'esame istologico eseguito su biopsia permette di eseguire la diagnosi di tumore gastrointestinale della parete gastrica. L'analisi mutazionale eseguita su DNA tumorale esclude la presenza di mutazioni coinvolgenti il gene KIT e/o il gene PDGFRA. L'esame di tomografia ad emissione di positroni mostra aree ad elevato metabolismo glicidico a livello della lesione che occupa estesamente l'epigastrio e l'ipocondrio sinistro (SUV max 26,4); a livello epatico e al passaggio VII-VIII segmento (SUV 13,9); a livello del VIIs (SUV 2,8) al Is (SUV 7,3). In relazione al quadro metastatico di malattia e alle caratteristiche molecolari del tumore (geni KIT e PDGFRA wild type) si pone indicazione a trattamento di prima linea secondo con Imatinib. Il paziente esegue PET con 18F-FDG dopo due mesi che evidenzia una riduzione delle dimensioni e

assenza di una significativa attività metabolica della lesione espansiva di pertinenza gastrica. Prosegue attualmente trattamento con Imatinib.

Caso 15

Si descrive il caso di un paziente che all'età di 54 anni (data 09/10/2018) esegue TAC torace, addome e pelvi che evidenzia in corrispondenza del ginocchio duodenale inferiore/regione cefalo pancreatica una voluminosa massa aventi diametri assiali di 10 x 9.5 ed estesa in sede raniocaudale di 14 cm circa. Tale espanso è altamente necrotico nella sua porzione centrale e mostra pareti inspessite, caratterizzata da vivace enhancement dopo mezzo di contrasto. La lesione disloca anteriormente il terzo duodeno e discende fino alla fossa iliaca destra occupando buona parte della metà destra della cavità addominale, aderendo al muscolo ileo psoas. L'esofagogastroduodenoscopia evidenzia esofago e cardias normali, lo stomaco è rivestito da mucosa normale. Il piloro, il bulbo e il duodeno sono normali. A livello del ginocchio duodenale inferiore si rileva una voluminosa formazione, sottomucosa centralmente ulcerata. L'esame istologico eseguito su biopsie evidenzia neoplasia stromale e buona componente epitelioidica compatibile con GIST. L'indice di proliferazione, saggiato con Ki67, è risultato pari al 2%. Il paziente inizia il 5/11/2018 terapia con Imatinib. Il successivo controllo PET (14/12/2018) evidenziava buona risposta alla terapia e ha continuato la terapia con Imatinib fino al 03/07/2019 quando si sottopone ad intervento di resezione del duodeno digiunale. L'esame istologico ha permesso di diagnosticare tumore stromale gastrointestinale della parete del tenue intestino, in preda a fenomeni regressivo-necrotici con residui periferici di neoplasia vitale fusocellulare ed immunoreattiva a DOG1-CD117. (vedi esame istologico). Dopo intervento, riprende terapia con Imatinib (data 16/07/2019).

Analisi genomica di tumori GIST depositati in Database pubblici

La caratterizzazione del profilo molecolare dei tumori GIST è di fondamentale importanza nell'oncologia di precisione in quanto consente l'identificazione di alterazioni di una sequenza genica (o parte di essa), RNA o proteina che possano essere o diventare target di un trattamento individualizzato. L'approccio terapeutico molecolare fonda le basi della sua applicabilità nel modello mutazionale ed in particolare nel concetto che i tumori sono caratterizzati dalla presenza di particolari mutazioni driver acquisite.

Rispetto ai farmaci bersaglio le alterazioni molecolari possono essere distinte in "druggable" se riguardano proteine che possono essere target diretti del farmaco, o "actionable" se le corrispondenti proteine non possono essere direttamente bersagliate ma che portano ad una disregolazione di un pathway nel quale vi possono essere altri possibili target.[22] Studi recenti volti alla caratterizzazione del profilo molecolare dei tumori, come ad esempio quelli condotti dal "The Cancer Genome Atlas (TCGA)" e da "the International Cancer Genome Consortium (ICGC)", hanno permesso di generare una grande quantità di dati genomici provenienti da differenti piattaforme di sequenziamento di nuova generazione. Il portale "cBioPortal for Cancer Genomics" (<http://cbioportal.org>) offre un'interfaccia per la visualizzazione, il download e l'analisi di dati genomici multidimensionali di differenti tipi di tumore generati dai consorzi TCGA, ICGC e provenienti da altri studi pubblicati in letteratura.[23] Nel

portale cBioPortal sono attualmente disponibili i dati genomici (profilo mutazionale e alterazioni cromosomiche) di 137 tumori GIST caratterizzati in uno studio condotto al Memorial Sloan Kettering Cancer Center.[24]

Al fine di definire con più precisione la correlazione tra dati clinici (sede anatomica GIST, risposta alla terapia, sviluppo di metastasi) e genomici (stato mutazionale dei geni KIT, PDGFRA, NF1) dei 15 casi GIST caratterizzati nel nostro progetto, combineremo tali dati con i dati clinici e molecolari dei 137 tumori GIST depositati nel portale dati cBioPortal. È inoltre attualmente in corso l'analisi bioinformatica dei 137 tumori GIST con lo scopo di identificare: i) alterazioni molecolari più frequenti; ii) eventi mutazionali di mutua- esclusione; iii) eventi mutazionali di co-occorrenza; iv) frequenza di alterazioni genomiche “druggable”; v) frequenza di alterazioni genomiche “actionable”.

Tali analisi potranno permettere la definizione delle caratteristiche molecolari dei tumori GIST e conseguentemente la definizione di ulteriori bersagli di terapie molecolari differenti da quelli attualmente in uso nella pratica clinica per tali neoplasie.

Obiettivi specifici dello studio:

Il presente studio si pone l'obiettivo di verificare, nei pazienti afferenti la U.O.S.D. di Oncologia affetti da GIST, l'applicabilità clinico-diagnostica della biopsia liquida. Questo studio si pone l'obiettivo di caratterizzare le alterazioni somatiche nel DNA tumorale circolante (ctDNA) dei geni KIT e PDGFRA noti per essere associati alla patogenesi del GIST nel 50% dei casi. Per il presente studio prevediamo di arruolare 35 casi GIST in 36 mesi. In caso di mancato raggiungimento del numero ci prefiggiamo di coinvolgere altri centri per l'arruolamento di nuovi casi. Per tutti quanti i casi che saranno analizzati, verranno determinate la sensibilità clinica e la specificità clinica del test molecolare su ctDNA[25] e tali dati verranno correlati alle caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti.

Obiettivo specifico 1:

Stimare l'efficienza della biopsia liquida (analisi del ctDNA) nel confronto della biopsia tessutale (analisi del DNA tumorale tissutale), determinare la sensibilità clinica e la specificità clinica della biopsia liquida nei pazienti GIST e definire la percentuale di concordanza fra i due test.

Obiettivo specifico 2:

Correlare i dati di sensibilità clinica e specificità clinica nella biopsia liquida con le caratteristiche clinico – patologiche dei pazienti: malattia localizzata, malattia metastatica, sede anatomica del tumore, carico tumorale, indice mitotico, infiltrazione vascolare.

Obiettivo 1:

Al fine di stimare l'efficienza della biopsia liquida (analisi del ctDNA) nel confronto della biopsia tessutale (analisi del DNA tumorale tissutale), il DNA del tessuto tumorale ottenuto mediante atto chirurgico o biopsia, verrà utilizzato per l'analisi mutazionale dei geni KIT e PDGFRA in modo tale da verificare la concordanza dello stato mutazionale degli stessi con il ctDNA. Aliquote di pool di plasma raccolto da soggetti sani e commercializzato dalla ditta BIORECLAMATION IVT (New York, USA) verranno utilizzate per estrarre DNA libero circolante. Quest'ultimo verrà utilizzato come standard di riferimento al fine di valutare la sensibilità clinica e la specificità clinica del test molecolare su ctDNA. La sensibilità clinica sarà calcolata rapportando il numero di campioni di DNA risultati positivi all'analisi mutazionale dei geni KIT e PDGFRA, sia nel plasma che nel tessuto, al numero totale di campioni di tessuto tumorale risultati positivi all'analisi mutazionale degli stessi geni. La specificità clinica sarà calcolata rapportando il numero di campioni di DNA risultati negativi all'analisi mutazionale dei geni KIT e PDGFRA, sia nel plasma che nel tessuto tumorale, al numero totale di campioni di tessuto tumorale risultati negativi all'analisi mutazionale degli stessi geni. La percentuale di concordanza sarà calcolata rapportando la somma del numero di campioni di DNA positivi all'analisi mutazionale, sia nel plasma che nel tessuto tumorale, e del numero di campioni di DNA negativi all'analisi mutazionale, sia nel plasma che nel tessuto tumorale, al numero totale di pazienti di cui si analizzeranno il campione di plasma e il campione di tessuto tumorale[22].

Obiettivo 2:

I dati di sensibilità clinica e specificità clinica verranno correlati con le caratteristiche clinico – patologiche dei pazienti: malattia localizzata, malattia metastatica, sede anatomica del tumore, carico tumorale, indice mitotico, infiltrazione vascolare.

Dati preliminari:

Il numero di pazienti che hanno ricevuto una diagnosi di GIST nel nostro istituto, che rappresenta l'istituto gastroenterologico nazionale, dal 1988 ad oggi è pari a 87. Nell'ultimo triennio (dal 01-01-2014 al 31-12-2016) sono stati diagnosticati 29 casi e dal 01-01-2017 sino ad oggi sono stati diagnosticati 15 casi.

Metodologie e analisi statistiche:

I GIST sono considerati tumori rari. Il progetto RARECARE (Surveillance of Rare Cancers in Europe) definisce raro un tumore che mostra un'incidenza inferiore o uguale a 6/100.000/anno.

Il GIST ha un tasso di densità di incidenza pari a 1 – 1,5 per 100.000 abitanti l'anno nella popolazione italiana. Possiamo pertanto stimare per la regione Puglia, in cui risiedono 4.063.088 abitanti, 48 nuovi casi attesi per anno. Tale stima è stata calcolata considerando un tasso di densità di incidenza pari a 1,18 per

100.000 abitanti per anno e assumendo che la densità di incidenza del tumore è omogenea in tutto il territorio nazionale.

Il numero di pazienti che hanno ricevuto una diagnosi di GIST nel nostro istituto, che rappresenta l'istituto gastroenterologico nazionale, dal 1988 ad oggi è pari a 87. Nell'ultimo triennio (dal 01-01-2014 al 31-12-2016) sono stati diagnosticati 29 casi e dal 01-01-2017 sino ad oggi sono stati diagnosticati 11 casi. Prevediamo pertanto che in 36 mesi del progetto potremo arruolare 30 nuovi casi. Saranno sottoposti a un prelievo ematico (in provetta con EDTA).

In biobanca saranno conservate, seguendo le SOP specifiche, aliquote di plasma e ctDNA.

La nostra esperienza acquisita negli anni passati ci dice che di 29 casi GIST dell'ultimo triennio, 23 volte è stato possibile ottenere tessuti derivanti dall'asportazione chirurgica. Pertanto consideriamo che dei nuovi casi che saranno reclutati (numero stimato pari a 30) avremo circa 24 casi di cui potremo analizzare il tessuto tumorale. Per i restanti casi di cui non potremo avere il tessuto tumorale, analizzeremo le mutazioni hot-spot dei geni KIT e PDGFRA (mutati nell'85% dei casi GIST) nel ctDNA dei pazienti.

La normale pratica clinica prevede che la diagnosi di GIST avviene per via radiologica. La diagnosi con TAC o RM pur essendo suggestiva di GIST pone frequentemente la necessità di diagnosi differenziale con altre neoplasie. In questi casi la necessità di una caratterizzazione istologica della massa si impone nell'ottica di giungere ad una corretta diagnosi e di conseguenza ad una corretta definizione della strategia terapeutica. Il materiale per l'esame istologico può essere ottenuto, oltre che con un atto chirurgico, anche attraverso tecniche endoscopiche quali, per esempio, l'ecoendoscopia oppure con biopsia transcutanea della massa.

L'analisi mutazionale del ctDNA verrà effettuata utilizzando una tecnologia ad alta sensibilità: droplet digital PCR (ddPCR (acquisito di recente nel nostro Istituto)). Tale strumento permette di identificare alleli mutati rari con una sensibilità analitica pari allo 0.01%[8]. Per tutti quanti i casi in cui sarà possibile ottenere una biopsia tissutale, si procederà all'analisi mutazionale dei geni PDGFRA e KIT in modo da poter verificare la concordanza dello stato mutazionale degli stessi geni con il ctDNA. Aliquote di Pool di plasma raccolto da

soggetti sani e commercializzato dalla ditta BIORECLAMATION IVT (New York, USA), verranno utilizzate per estrarre DNA libero circolante. Quest'ultimo verrà impiegato come standard di riferimento al fine di valutare la sensibilità analitica e la specificità analitica delle tecniche utilizzate. Verranno inoltre determinate la sensibilità clinica e la specificità clinica del test molecolare su ctDNA dei pazienti GIST che analizzeremo [22].

Risultati attesi:

Considerato il lungo decorso dei pazienti GIST e le diverse opzioni terapeutiche dipendenti dallo stato mutazionale del tumore, lo sviluppo di un test non invasivo, quale la biopsia liquida, che permette di determinare la presenza di mutazioni comporta dei vantaggi sia per il paziente che usufruirebbe di una metodica non invasiva, sia per il clinico che potrebbe meglio monitorare la malattia per la possibilità di prelievi ematici seriali nel tempo.

Il presente studio permetterà di sviluppare un test analitico che prevede l'utilizzo della tecnologia droplet digital PCR per la determinazione di mutazioni che ricorrono frequentemente nei geni KIT e PDGFRA nei casi GIST.

Analisi dei rischi, possibili problemi e soluzioni:

Uno dei possibili rischi è rappresentato dal mancato raggiungimento del numero di casi GIST che prevediamo di includere nel presente studio. In caso di mancato raggiungimento del numero ci prefiggiamo di coinvolgere altri centri per l'arruolamento di nuovi casi.

Innovazioni:

L'analisi del ctDNA potrà in futuro integrare/sostituire la biopsia tradizionale ed essere utilizzata per: i) definire la prognosi del paziente; ii) valutare la risposta alla terapia; iii) monitorare il decorso della malattia nel tempo, con la verifica dell'insorgenza di eventuali mutazioni somatiche secondarie, responsabili dei meccanismi di resistenza, che potranno permettere al clinico di selezionare la sequenza ottimale di trattamento utilizzando farmaci target di seconda linea terapeutica.

Descrizione della complementarietà e della sinergia del gruppo di ricerca:

Il nostro team di ricerca, comprende ricercatori medici e ricercatori biologi e possiede delle solide basi per l'esecuzione della presente proposta scientifica ed assicura la risoluzione di possibili problemi attraverso diversi approcci complementari.

Bibliografia:

1. Linee guida SARCOMI DEI TESSUTI MOLLI E GIST, Aiom - Edizione 2014

2. Ravegnini G et al., Personalized Medicine in Gastrointestinal Stromal Tumor (GIST): Clinical implications of the Somatic and Germline DNA Analysis 5 *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 15592-15608;
3. Heinrich MC et al., Molecular correlates of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol.* 2006 Oct 10;24(29):4764-74.
4. Maier J et al., Detection of Mutant Free Circulating Tumor DNA in the Plasma of Patients with Gastrointestinal Stromal Tumor Harboring Activating Mutations of CKIT or PDGFRA. *Clin Cancer Res*; 19(17) September 1, 2013
- 5 Blood-Based Analyses of Cancer: Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA *Cancer Discov.* 2014 June; 4(6): 650–661
6. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA *Nature*, 108, vol. 497, 2 May 2013
8. Wan JC et al., Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA *Nat Rev Cancer.* 2017 Apr;17(4):223-238. Epub 2017 Feb 24.
9. Maier J et al., Detection of mutant free circulating tumor DNA in the plasma of patients with gastrointestinal stromal tumor harboring activating mutations of CKIT or PDGFRA. *Clin Cancer Res.* 2013 Sep 1;19(17):4854-67.
10. Kang G. et al., Detection of KIT and PDGFRA mutations in the plasma of patients with gastrointestinal stromal tumor. *Target Oncol.* 2015 Dec;10(4):597-601.
11. Maier J et al., Detection of mutant free circulating tumor DNA in the plasma of patients with gastrointestinal tumor harboring activating mutations of CKIT or PDGFRA. *Clin Cancer Res.* 2013 Sep 1;19(17):4854-67
12. Kang G. et al., Detection of KIT and PDGFRA mutations in the plasma of patients with gastrointestinal tumor. *Target Oncol.* 2015 Dec; 10(4):597-601.
13. Wada N. et al., Detecting Secondary C-KIT Mutations in the peripheral blood of patients with Imatinib- Resistant Gastrointestinal Stromal Tumor. *Oncology.* 2016; 90(2):112-7
14. Boonstra PA et al., A single digital droplet PCR assay to detect multiple KIT exon 11 mutations in tumor and plasma from patients with gastrointestinal stromal tumors. *Oncotarget.* 2018 Feb 14;9(17):13870-13883.
15. Thomas L, Richards M, Mort M, Dunlop E, Cooper DN, Upadhyaya M. Assessment of the potential pathogenicity of missense mutations identified in the GTPase-activating protein (GAP)-related domain of the neurofibromatosis type-1 (NF1) gene. *Hum Mutat.* 2012 Dec;33(12):1687-96. doi: 10.1002/humu.22162.
16. Maertens O, Prenen H, Debiec-Rychter M, Wozniak A, Sciot R, Pauwels P, De Wever I, Vermeesch JR, de Raedt T, De Paepe A, Speleman F, van Oosterom A, Messiaen L, Legius E. Molecular pathogenesis of multiple gastrointestinal stromal tumors in NF1 patients. *Hum Mol Genet.* 2006 Mar 15;15(6):1015-23. Epub 2006 Feb 6.

17. Andersson J, Sihto H, Meis-Kindblom JM, Joensuu H, Nupponen N, Kindblom LG. NF1-associated gastrointestinal stromal tumors have unique clinical, phenotypic, and genotypic characteristics. *Am J Surg Pathol*. 2005 Sep;29(9):1170-6.
18. Miettinen M, Fetsch JF, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors in patients with neurofibromatosis 1: a clinicopathologic and molecular genetic study of 45 cases. *Am J Surg Pathol*. 2006 Jan;30(1):90-6.
19. Valencia E, Saif MW. Neurofibromatosis type 1 and GIST: is there a correlation? *Anticancer Res*. 2014 Oct;34(10):5609-12.
20. Agaimy A, Vassos N, Croner RS. Gastrointestinal manifestations of neurofibromatosis type 1 (Recklinghausen's disease): clinicopathological spectrum with pathogenetic considerations. *Int J Clin Exp Pathol*. 2012;5(9):852-62.
21. Nishida T, Tsujimoto M, Takahashi T, Hirota S, Blay JY, Wataya-Kaneda M. Gastrointestinal stromal tumors in Japanese patients with neurofibromatosis type I. *J Gastroenterol*. 2016 Jun;51(6):571-8.
22. Takeuchi S, Okuda S. Knowledge base toward understanding actionable alterations and realizing precision oncology. *Int J Clin Oncol*. 2019 Feb;24(2):123-130.
23. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E, Cerami E, Sander C, Schultz N. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal*. 2013 Apr 2;6(269):p11.
24. Zehir A, Benayed R, Shah RH, et al., Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med*. 2017 Jun;23(6):703-713.
25. Lee JY et al., Longitudinal monitoring of EGFR mutations in plasma predicts outcomes of NSCLC patients treated with EGFR TKIs: Korean Lung Cancer Consortium (KLCC-12-02).

Progetto n. 2: “Efficacia del trattamento combinato Paclitaxel e Ramucirumab in modelli di carcinoma gastrico avanzato con resistenza indotta da taxani: studio *in vitro* e *in vivo*”

Responsabile: dott.ssa Caterina Messa

Partecipanti: Dott.ssa Rosalba D’Alessandro, Dott.ssa Maria Grazia Refolo, Sig. Gianpiero De Leonardis

Background

Attualmente la combinazione del Ramucirumab con Paclitaxel rappresenta un’opzione terapeutica di seconda linea per i pazienti con Carcinoma Gastrico (GC) in progressione dopo una precedente terapia a base di platino e fluoropirimidina. I pazienti che hanno, invece, sviluppato resistenza ad un primo trattamento con taxani non sono candidati a tale trattamento combinato. La proposta progettuale ha lo scopo di comprendere, in un modello murino, sia i meccanismi di risposta molecolare di resistenza indotti dal Paclitaxel sia quelli di sinergia indotti dal trattamento combinato con il Ramucirumab. L’associazione Ramucirumab e Paclitaxel risulta di particolare interesse nel trattamento del carcinoma gastrico non solo per l’azione additiva ma anche sinergica in quanto l’effetto combinato risulta essere superiore alla somma degli effetti dei singoli agenti. Il meccanismo d’azione del Paclitaxel è legato alla capacità di interagire con la beta-tubulina III dei microtubuli, alterandone l’equilibrio di polimerizzazione/depolverizzazione. Ciò provoca la formazione di strutture microtubulari altamente stabili con conseguente inibizione della mitosi nella fase di transizione G2/M del ciclo cellulare e successiva induzione di apoptosi per attivazione della caspasi 3 e 9. L’incremento dei livelli di beta-tubulina III, così come una maggiore espressione di ciclina B1 o alterazioni nell’attivazione di vie di segnale intracellulari, quali PI3K/AKT/mTOR o MAPK, importanti nella regolazione del ciclo cellulare, sono stati riportati quali possibili meccanismi di resistenza ai taxani. Tali vie del segnale risultano essere bersaglio anche dell’azione del Ramucirumab.

Obiettivo

La conoscenza dei meccanismi responsabili di resistenza ai taxani, così come dei meccanismi capaci di contrastarli, come quelli dovuti alla combinazione con Ramucirumab, potrebbe condurre ad individuare target molecolari utili non solo a fini predittivi di risposta ma anche a fini prognostici. Sulla base dei risultati ottenuti *in vitro*, lo studio *in vivo* permetterà di definire i pattern molecolari, che sottendono i processi di crescita, diffusione tumorale e resistenza ai taxani. I risultati potranno, inoltre, essere utili nel definire in una seconda linea di trattamento l’efficacia della terapia di associazione nei pazienti con tumore gastrico resistenti ad un precedente trattamento con taxani.

Materiali e Metodi

Nel nostro laboratorio, abbiamo dimostrato in differenti linee cellulari di GC umano (HGC-27, N87, AGS, KATO III), che i due farmaci somministrati in combinazione esercitano un’azione sinergica e non semplicemente additiva rispetto all’azione dei singoli farmaci. Un intervallo di concentrazioni è stato esaminato per ciascuno dei due farmaci mediante test di proliferazione cellulare valutato dopo 48 ore di trattamento. L’aggiunta del Ramucirumab ha esercitato un potente effetto inibitorio sulla proliferazione; inoltre abbiamo evidenziato che concentrazioni di Ramucirumab pari a 50 o 100 μ M (a seconda della linea cellulare in esame) erano in grado di potenziare l’effetto inibitorio di Paclitaxel abbassando la sua IC50. I valori di Combination Index (CI) calcolati per queste combinazioni di farmaci sono risultati ben al di sotto della linea di additività ($CI \leq 1$), dimostrando che un’azione sinergica dei due farmaci è probabilmente alla base degli effetti riscontrati sulle linee cellulari. Il ruolo del Ramucirumab nel potenziare gli effetti esercitati dal Paclitaxel è stato confermato anche nel processo apoptotico e nella migrazione cellulare, valutata su diverse matrici. Sono in corso sperimentazioni volte alla comprensione dei meccanismi alla base dell’azione sinergica esercitata dalla

combinazione Ramucirumab e Paclitaxel. In particolare saranno investigate le principali cascate di segnale bersaglio dei farmaci in esame come MAPK e PI3K/Akt/mTOR.

Risultati

I nostri risultati preliminari suggeriscono che cellule di GC, in cui si è sviluppata resistenza all'azione del Paclitaxel, presentano disordini a livello dei microtubuli del citoscheletro, diminuita espressione di E-caderina associata a un aumento dei livelli della controparte mesenchimale, ridotta risposta all'azione di farmaci anti-mitotici e resistenza all'apoptosi. Inoltre, abbiamo studiato a livello molecolare le vie del segnale quali PI3K /Akt /mTOR e MAPK che sottendono ai processi di crescita e diffusione del tumore, dimostrando che l'azione combinata dei farmaci si esplica attraverso l'inibizione delle principali molecole di entrambe le vie del segnale. Questi risultati sono stati oggetto di una pubblicazione scientifica (MG Refolo et al. Molecular mechanisms of synergistic action of Ramucirumab and Paclitaxel in Gastric Cancers cell lines. **Scientific Reports**, 2020).

Stato di avanzamento

In continuità con le ricerche già avviate, il principale obiettivo di tale progetto sarà quello di analizzare, *in vivo*, i meccanismi molecolari alla base dell'effetto combinato dei due farmaci *versus* gli effetti dei singoli farmaci. Specificatamente, per tale scopo analizzeremo i tumori nel modello murino xenograft, derivati dall'impianto di cellule NCI-N87(ATCC CRL-5822) che derivano da metastasi epatiche di carcinoma gastrico e rese resistenti, nei nostri laboratori, all'azione del Paclitaxel. La resistenza all'azione del Paclitaxel è stata indotta *in vitro* mediante esposizione a concentrazioni crescenti del taxano, partendo da una concentrazione pari a 1/60 dell'IC50. La concentrazione del farmaco è stata incrementata del 25% ogni due settimane. Le cellule vengono definite resistenti quando sono in grado di crescere esponenzialmente in presenza di concentrazioni di Paclitaxel superiori alla IC50.

Lo studio permetterà di definire *in vivo* i pattern molecolari, osservati *in vitro*, che sottendono i processi di crescita, diffusione tumorale e resistenza ai taxani. I risultati potranno inoltre essere utili nel definire in una seconda linea di trattamento l'efficacia della terapia di associazione nei pazienti con tumore resistente ad un precedente trattamento con taxani.

Gli studi condotti sulle interazioni tra i componenti del microambiente, quali fattori di crescita e citochine, e la cellula tumorale e sul loro ruolo nell'influenzare la crescita e progressione della neoplasia, hanno consentito la pubblicazione di due reviews:

1 - Integrated Immune Gene Expression Signature and Molecular Classification in Gastric Cancer: New Insights. Maria Grazia Refolo, Claudio Lotesoriere, Caterina Messa, Maria Gabriella Caruso, Rosalba D'Alessandro. *J Leukoc Biol* 2020. doi: 10.1002/JLB.4MR0120-221R.

2 - Inflammatory Mechanisms of HCC Development. Maria Grazia Refolo, Caterina Messa, Vito Guerra, Brian Irving Carr, Rosalba D'Alessandro. *Cancers (Basel)* 2020; 12(3):641.

Progetto n. 3: “Classificazione molecolare e immunofenotipica dei carcinomi gastrici: correlazione con HER2 e PD-L1”.

Responsabile: dott.ssa AM Valentini

Partecipanti: Dott. G Arborea, Dott. R Armentano, Dott ML Caruso, Dott S Coletta, Dott. F Di Pinto, Dott. R Donghia, Dott V Guerra, Dott. N Schena

Il trattamento terapeutico dei pazienti con carcinoma gastrico (CG) rappresenta ancora una grande sfida. Infatti, nonostante i recenti progressi della diagnostica molecolare, gli unici biomarker predittivi approvati per il CG includono l'overespressione di HER2 per la selezione dei pazienti al trattamento con Trastuzumab e la instabilità dei microsatelliti per la selezione dei pazienti al trattamento con Pembrolizumab (immunoterapia).

Il carcinoma gastrico (CG) è una patologia eterogenea sia a livello intratumorale che intertumorale. Comprendere le basi molecolari di questa eterogeneità è importante a livello diagnostico, prognostico e terapeutico.

La prima classificazione molecolare del CG è stata messa a punto nel 2014 dal “The Cancer Genome Atlas” (TCGA) e prevede la classificazione dei carcinomi gastrici in 4 sottotipi: EBV (con infezione da Epstein Barr Virus), MSI (con instabilità dei microsatelliti), CIN (con instabilità cromosomica), GS (genomicamente stabili). Le metodiche molecolari impiegate per definire la classificazione TCGA però, non sono disponibili presso tutti i laboratori di anatomia patologica per cui successivamente sono state messe a punto delle classificazioni immunofenotipiche che utilizzano metodiche come l'immunoistochimica (IIC) e l'ibridazione in situ cromogenica (CISH), per la rilevazione di marcatori proteici in sostituzione dei molecolari.

L'obiettivo del primo anno del progetto è stato quello di valutare la densità dei TILs nel microambiente tumorale ed effettuare una classificazione dei carcinomi nei 4 Tumor Microenvironment Immune Types (TMITs), correlando questi ultimi con i fattori istopatologici.

Allo scopo si è proceduto alla determinazione immunoistochimica di PD-L1 e del CD8. evidenziando la possibilità di utilizzare l'espressione di questi marcatori per predire la risposta all'immunoterapia, utilizzando un metodo semplice, a basso costo e disponibile presso tutti i laboratori di anatomia patologica, quale l'IIC.

I risultati ottenuti dallo studio sono stati oggetto di un lavoro scientifico pubblicato sulla rivista *Oncology Letters*:

Valentini AM, Di Pinto F, Coletta S, Guerra V, Armentano R, Caruso ML. Tumor microenvironment immune types in gastric cancer are associated with mismatch repair however, not HER2 status. *Oncology Letters*. 2019;18(2):1775-1785. doi: 10.3892/ol.2019.10513.

L'obiettivo del secondo anno di progetto è stato quello di caratterizzare i carcinomi gastrici dal punto di vista immunofenotipico, mediante la determinazione dello status di EBV, MLH1, p53, HER2, E-Caderina, PD-L1, e correlare i marcatori con i fattori istopatologici quali sede, tipo istologico, infiltrazione nella parete (pT) e interessamento linfonodale (pN).

La casistica è stata ampliata fino a comprendere 70 campioni istologici e su di essa si è proceduto alla determinazione dell'espressione di EBV, MLH1, p53, HER2, E-Caderina, PD-L1, al fine di realizzare una classificazione immunofenotipica dei carcinomi gastrici. I dati della letteratura riguardanti le classificazioni immunofenotipiche presentano alcune criticità riguardo la valutazione dei marker utilizzati, soprattutto per quanto riguarda p53 ed E-Caderina. Gli studi finora effettuati sono stati condotti su biopsie o su Tissue MicroArray (TMA) che hanno il limite di non permettere una adeguata valutazione dell'eterogeneità della espressione dei marcatori tissutali.

A nostra conoscenza questo è il primo studio che effettua una classificazione immunofenotipica dei CG esclusivamente su pezzi chirurgici.

Campioni di carcinomi gastrici fissati in formalina e inclusi in paraffina, provenienti da 70 pazienti (46 maschi e 24 femmine) sottoposti a resezione chirurgica presso il nostro istituto tra il 2014 e il 2017 sono stati arruolati in questo studio. Le caratteristiche clinicopatologiche dei pazienti sono riassunte in tabella I.

Si è proceduto alla determinazione dell'infezione da EBV tramite CISH per EBV-encoded RNA (EBER) utilizzando il kit RNAScope (Advanced Cell Diagnostics, CA, USA). I campioni che mostravano una forte positività nei nuclei delle cellule tumorali sono stati considerati come EBV-positivi.

E' stata successivamente determinata l'espressione immunoistochimica degli altri marcatori: PD-L1 (clone E1L3N, Cell Signaling Technology, MA, USA), MLH1 (MAb ES05, Agilent Technologies, CA, USA, diluizione 1:50) p53 (MAb DO7, Menarini diagnostics, Italy, diluizione 1:500), E-Caderina (MAb NCH-38, Agilent Technologies, CA, USA, diluizione 1:100) e HER2 (Polyclonal antibody, Agilent Technologies, CA, USA, diluizione 1:600). L'espressione di membrana di PD-L1 è stata valutata sulle cellule tumorali utilizzando un cut-off >5%.

Tumori con completa perdita di espressione di MLH1 nei nuclei delle cellule tumorali sono stati definiti come tumori con deficit del sistema del mismatch repair (MMR-D).

L'espressione immunoistochimica di p53 è stata valutata nei nuclei delle cellule tumorali e solo i casi con una intensa positività in più del 70% delle cellule tumorali sono stati classificati come casi con overespressione di p53.

Per quanto riguarda la E-Caderina, casi con completa perdita di reattività di membrana delle cellule tumorali o solo debole reattività citoplasmatica sono stati considerati come E-Caderina aberranti, mentre casi con un pattern di colorazione di membrana o misto citoplasma/membrana, sono stati considerati come E-Caderina normali (Figura 1).

Per la valutazione dello status del gene HER2, sono stati utilizzati i criteri di Hofmann. Si è proceduto dapprima alla determinazione di HER2 mediante metodica immunoistochimica e soltanto i casi con score 2+ sono stati sottoposti a CISH con kit Zytovision per valutare l'eventuale amplificazione genica. I carcinomi gastrici con score immunoistochimico 3+ e 2+/con amplificazione genica sono stati considerati come HER2 positivi.

Sulla base dei risultati ottenuti da CISH e IIC, i 70 campioni sono stati raggruppati nelle seguenti 5 categorie: "EBV", 2 casi (2.9%); "MLH1 deficient", 5 casi (7.2%); "p53 overexpressed and/or HER2 +", 43 casi (61.4%); "aberrant E-Cadherin", 8 casi (11.4%); "Normal pattern", 12 casi (17.1%), negativi per tutti i marcatori analizzati.

I casi EBV positivi, che hanno mostrato una intensa colorazione nucleare in più del 90% delle cellule tumorali, sono risultati essere del tipo istologico diffuso ($p < 0.05$) e positivi al PD-L1 ($p < 0.05$). Anche i casi con perdita di MLH1 hanno mostrato positività al PD-L1 ($p < 0.05$) (Tabella II). I campioni appartenenti al gruppo “p53 overexpressed and/or HER2 +” sono risultati per il 46.5% diffusi e per il 53.5% intestinali (Tabella II). Il gruppo con E-Caderina aberrante era costituito da casi esclusivamente di tipo diffuso ($p < 0.05$), T3-T4 ($p < 0.05$) e con pN status positivo ($p < 0.05$) (Tabella II). Il gruppo “Normal pattern” comprendeva 5 carcinomi gastrici diffusi e 7 intestinali, tutti negativi al PD-L1 (Tabella II).

I carcinomi gastrici diffusi hanno mostrato più profili immunofenotipici rispetto agli intestinali, che mancano della categoria EBV ed E-Caderina aberrante.

Lo studio ha messo in evidenza che per quanto riguarda i gruppi “EBV” e “MLH1 Deficient”, la CISH e l’IHC sono in grado di riflettere in maniera affidabile lo status molecolare. Infatti i casi che mostravano perdita di MLH1 sono stati testati con Idylla MSI test (Biocartis) e hanno mostrato tutti instabilità dei microsatelliti.

Nel gruppo “p53 overexpressed and/or HER2 +” è stata riscontrata un’elevata percentuale di carcinomi gastrici diffusi rispetto allo studio TGCA in cui la maggior parte dei CIN è costituita da carcinomi gastrici di tipo intestinale. Il dato ottenuto dallo studio potrebbe riflettere la non completa corrispondenza tra dato molecolare e immunoistochimico. P53, “Guardiano del Genoma” è il gene più frequentemente mutato nei tumori. La valutazione immunoistochimica di p53 è cambiata nel corso degli anni, perché sempre più studi hanno correlato le mutazioni del gene con l’espressione immunoistochimica della proteina. Infatti, in passato un cut-off del 5-10% di positività era considerato espressione indiretta della mutazione del gene. Più recentemente gli studi in letteratura sono concordi nell’affermare che l’espressione immunoistochimica di p53 in più del 70% dei nuclei delle cellule tumorali riflette una mutazione a carico del gene e che percentuali di positività tra il 20-50% riflettono un gene wild-type. Non c’è invece accordo tra gli autori su come debba essere considerata una colorazione immunoistochimica completamente negativa. Infatti, per alcuni corrisponde a un gene wild-type, mentre per altri a mutazioni nonsense o delezioni che sono responsabili della completa perdita di espressione della proteina.

Per quanto riguarda la E-Caderina, lo studio TGCA ha riscontrato un’elevata percentuale di mutazioni del gene CDH1 (codificante per la E-Caderina) nel gruppo dei CG genomicamente stabili. È stato dimostrato che non sempre lo status del gene CDH1 è correlato con l’espressione immunoistochimica della proteina, ma che l’espressione immunoistochimica della proteina è presente nella maggior parte dei CG di tipo diffuso. I risultati dello studio hanno dimostrato che al gruppo “Aberrant E-Cadherin” appartenevano tutti i CG con una istologia di tipo diffuso ($p < 0.05$) (Tabella II). Nella indagine immunoistochimica della E-Caderina l’osservazione di un pattern di colorazione solo di membrana (normale), completamente negativo o completamente citoplasmatico (aberrante), non presenta dubbi di valutazione. Al contrario in presenza di un pattern eterogeneo (membrana e citoplasma) non risulta chiaro se la proteina abbia perso o meno la sua funzione. Infatti, in alcuni studi il pattern di colorazione eterogeneo è valutato come normale mentre in altri aberrante.

Si può affermare che l’utilizzo di campioni chirurgici non ha migliorato la valutazione dei marcatori immunofenotipici anzi ha permesso maggiormente di evidenziarne i limiti.

“EBV” e “MLH1 deficient” sono classi ben definite di carcinomi gastrici, esclusive per alcuni campioni, e facilmente riconoscibili con CISH e IHC. Inoltre, la positività al PD-L1 rende questi pazienti eleggibili all’immunoterapia.

Diversamente, per marcatori come la E-Caderina o p53, l’immunoistochimica non è in grado di definire correttamente delle classi comparabili a quelle degli studi molecolari.

In conclusione, la classificazione immunofenotipica andrebbe quindi rivista allo scopo di individuare dei marcatori che possano meglio identificare le categorie dei CIN e GS e che possano essere bersagli terapeutici al pari di PD-L1 e HER2.

I risultati di questa seconda ed ultima fase del progetto sono stati oggetto di una pubblicazione scientifica pubblicata sulla rivista Oncology:

Di Pinto F, Armentano R, Arborea G, Schena N, Donghia R, Valentini AM. Are Immunohistochemical Markers Useful in Phenotypic Gastric Cancer Classification? *Oncology*. 2020 Apr 21:1-9. doi: 10.1159/000506077

Progetto n. 4: “Valutazione dell’efficacia della somministrazione dell’anticorpo anti-IL1 Anakinra nel modello murino di Colite Ulcerosa TNF α indipendente”.

Responsabile: dott. Mauro Mastronardi

Partecipanti: Grazia Serino, Angela Tafaro, Marcello Chieppa, Antonio Lippolis

Background:

Il fine equilibrio tra tolleranza ed infiammazione presente a livello della mucosa intestinale risulta alterato nelle malattie infiammatorie intestinali (IBD), quali la malattia di Crohn (Crohn’s Disease, CD) e la Colite Ulcerosa (1, 2).

Nonostante il coinvolgimento fondamentale del sistema immunitario, la causa scatenante spesso non risiede in popolazioni cellulari di origine non ematopoietica (3, 4). È stato spesso dimostrato che un difetto primario delle cellule epiteliali (ECs) intestinali possa scatenare una cascata di eventi che termina con l'attivazione in senso infiammatorio del sistema immunitario (5). L'epitelio intestinale rappresenta una barriera chimica, fisica ed elettrica ed è separato dal microbiota luminale da uno strato di muco spesso 50µm (6). Il muco è un elemento di separazione fondamentale tra le cellule epiteliali e il microbiota e rappresenta una barriera impenetrabile ai batteri commensali nella sua parte più vicina all'epitelio "lower mucus". Il maggiore componente dello strato interno del muco è Muc2. Lo studio del Dr. Eri dell'Università della Tasmania in Australia (7) ha dimostrato nel modello murino proposto per il presente studio (WINNIE), come una mutazione missenso nel gene di Muc2 causi l'assenza dello strato di muco e la conseguente infiammazione intestinale mediata dall'attivazione in senso infiammatorio del sistema immunitario.

Nello studio proposto studieremo la mutazione in omozigosi, e per semplicità chiameremo questi topi Winnie^{-/-}, come indice del genotipo mutato su entrambi gli alleli. Inoltre analizzeremo un secondo gruppo di topi KO per il TNF α (linea 5540) (8) ed infine l'incrocio delle due linee (topi Winnie-5540).

Nel modello murino di Colite Ulcerosa (topi Winnie) abbiamo rilevato una elevata presenza dell'IL-1 α a livello del colon che aumenta ulteriormente nei topi Winnie knock-out per il TNF α (linea Winnie5540) [De Santis et al.] Questo dato suggerisce una regolazione, ad oggi sconosciuta, della produzione di IL-1 α da parte del TNF α .

Il recettore per l'IL-1 appartiene a una superfamiglia di recettori caratterizzati dalla presenza del dominio TIR (toll-IL-1 resistance) e del dominio Immunoglobulinico (9, 10). Esistono diverse possibilità di intervento farmacologico anti IL-1.

Negli ultimi 20 anni è stato studiato il ruolo del farmaco anakinra nei processi infiammatori (11). La molecola è un antagonista ricombinante del recettore per l'IL1. Andando a bloccare il sito di legame per l'IL-1 α sul rispettivo recettore, l'anakinra diminuisce l'effetto infiammatorio di questa citochina (11, 12).

Il nostro studio permetterà di valutare se la l'inibizione dell'azione dell'IL-1 α , è in grado di proteggere i topi Winnie-5540 dall'infiammazione cronica osservata in assenza di TNF α . Eventuali risultati positivi saranno alla base di una richiesta di autorizzazione per la sperimentazione clinica del trattamento con farmaci anti-IL1 β per i pazienti affetti da colite ulcerosa non responder ai farmaci biologici anti-TNF α . I nostri dati preliminari, confermano l'aumento di IL-1 α osservato dal gruppo della Dr.ssa Powrie [17] nei pazienti IBD non responder a terapie biologiche anti TNF α . In linea con le priorità del nostro istituto nell'ambito della medicina di precisione, i risultati di questo studio

potrebbero fornire il razionale per il trattamento dei pazienti IBD non responder, per i quali ci sono oggi un limitato numero di scelte terapeutiche.

Stato di avanzamento del progetto (nel caso di seconda o terza annualità):

E' stata ottenuta l'autorizzazione per la sperimentazione animale

Obiettivi specifici dello studio:

Obiettivo specifico 1: Valutazione morfologica e molecolare della progressione della patologia infiammatoria intestinale in topi Winnie-TNF α KO (e controlli) trattati con farmaco o vehicle.

Obiettivo specifico 2: Valutazione del profilo di espressione di miRNA in tessuti e feci di topi Winnie-TNF α KO (e controlli) trattati con farmaco o vehicle al fine di individuare biomarker specifici della patologia e della risposta al farmaco.

Obiettivo specifico 3: Validazione dei dati ottenuti su un campione di pazienti affetti da IBD non responder al trattamento con anti-TNF α .

Obiettivo 1: Valutazione morfologica e molecolare della progressione della patologia infiammatoria intestinale in topi Winnie-TNF α KO (e controlli) trattati con farmaco o vehicle.

Obiettivo specifico 1: Lo studio prevede la somministrazione per via intraperitoneale di 0.4 mg/topo (in 0.1 ml di PBS) di anakinra giornalmente per 10 settimane, a partire dalla quarta settimana di età. Abbiamo utilizzato fonti presenti in letteratura per valutare le dosi e la via di somministrazione meno invasiva (13-16). Il farmaco ha già dimostrato di non comportare effetti avversi o sofferenza negli animali trattati. I topi verranno pesati giornalmente, verrà valutata la presenza di sangue nelle feci insieme alla valutazione di benessere generale. Alla fine del trattamento i topi saranno sacrificati, l'intestino verrà rimosso e ne verrà studiata la morfologia per valutare eventuali miglioramenti indotti dalla somministrazione del farmaco. Verranno isolati tratti intestinali dal colon mediale per permettere analisi molecolari ed i linfonodi mesenterici per le analisi della attivazione del sistema immunitario adattativo.

Il nostro studio permetterà di valutare se la l'inibizione dell'azione dell'IL-1 β , sia in grado di proteggere i topi Winnie-5540 dall'infiammazione cronica osservata in assenza di TNF α .

Obiettivo 2: Valutazione del profilo di espressione di miRNA in tessuti e feci di topi Winnie-TNF α KO (e controlli) trattati con farmaco o vehicle al fine di individuare biomarker specifici della patologia e della risposta al farmaco.

Obiettivo specifico 2: Il profilo di espressione genica del colon mediale ottenuto dai Winnie-TNF α KO e delle linee murine controllo (WT, 5540 e Winnie) verrà analizzato mediante RNAseq. In un secondo momento valuteremo il cambiamento del profilo di espressione indotto dal trattamento con il farmaco anti-IL-1 β . Dagli stessi campioni utilizzati per la valutazione del profilo di espressione genica, valuteremo il profilo di espressione dei miRNA, in modo tale da poter individuare miRNAs coinvolti nella patologia infiammatoria cronica TNF α -indipendente. L'eventuale identificazione di miRNA coinvolti nella modulazione dell'infiammazione intestinale nei topi trattati con farmaco anti-IL-1 β potrà consentire la nascita di nuove linee sperimentali basate su miRNA-Based Therapeutic Strategies.

Obiettivo 3: Validazione dei dati ottenuti su un campione di pazienti affetti da IBD non responder al trattamento con anti-TNF α .

Obiettivo specifico 3: Eventuali risultati positivi ottenuti dalla sperimentazione su modello animale saranno alla base dell'analisi sistematica della banca di siero di pazienti trattati con farmaco anti-TNF α . Abbiamo già ottenuto l'autorizzazione dal comitato etico per la conservazione e la successiva analisi del siero dei pazienti affetti da colite ulcerosa e trattati con farmaco anti-TNF α . Valuteremo in parallelo il profilo citochinico dei pazienti che si sono rivelati dei responder o non responder alla terapia anti-TNF α , con particolare attenzione al livello di TNF α ed IL-1 β circolante. Se i risultati dovessero dimostrare la presenza di alti livelli di IL-1 β nel sangue dei pazienti non responder ai farmaci biologici anti-TNF α , chiederemo l'autorizzazione per la sperimentazione clinica del trattamento con farmaci anti-IL1 β in questa ristretta sottopopolazione di pazienti affetti da colite ulcerosa. I nostri dati preliminari, confermano l'aumento di IL-1 β osservato dal gruppo della Dr.ssa Powrie [17] nei pazienti IBD non responder a terapie biologiche anti TNF α . In linea con le priorità del nostro istituto nell'ambito della medicina di precisione, i risultati di questo studio potrebbero fornire il razionale per il trattamento dei pazienti IBD non responder, per i quali ci sono oggi un limitato numero di scelte terapeutiche.

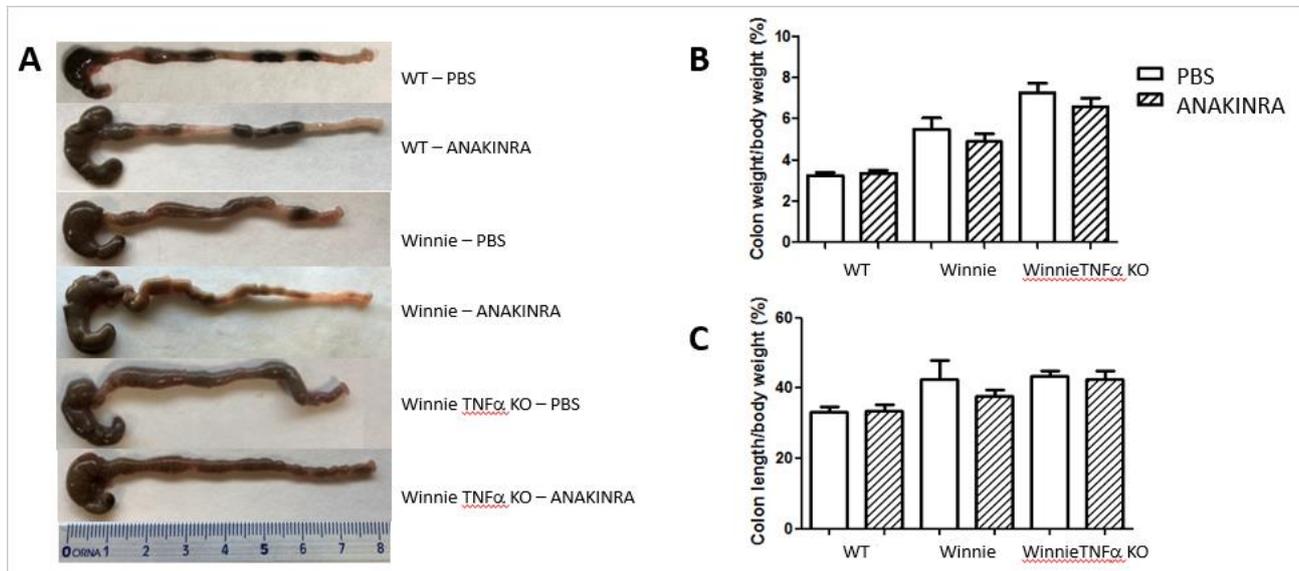
Prima metà del progetto:

0-6 mesi: Breeding delle colonie murine e trattamento farmacologico.
0-12 mesi: Analisi morfologiche e molecolari

AVANZAMENTO:

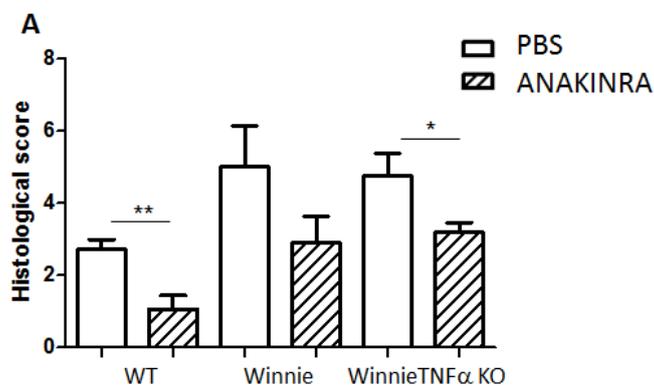
Abbiamo sottomesso al Ministero l'autorizzazione per la sperimentazione animale per il trattamento dei topi Winnie e Winnie 5540 con il Farmaco ANAKINRA.

In seguito al conseguimento dell'autorizzazione (n. 760/2017PR) abbiamo cominciato il breeding degli animali ottenendo le colonie desiderate.

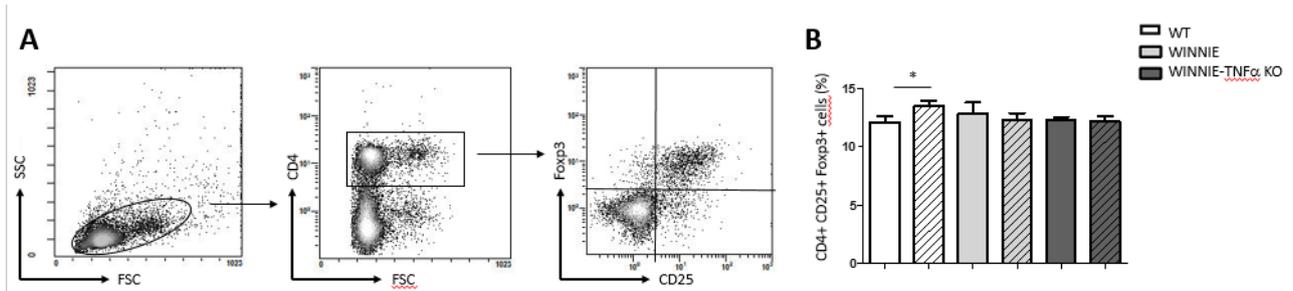


Abbiamo somministrato il farmaco anti IL-1 nel peritoneo di topi WT, Winnie e Winnie-TNF α KO. Al termine del trattamento i topi sono stati sacrificati, gli intestini espantati ed analizzati da punto di vista morfologico. L'analisi della lunghezza e del peso non ha evidenziato sostanziali differenze tra i trattamenti.

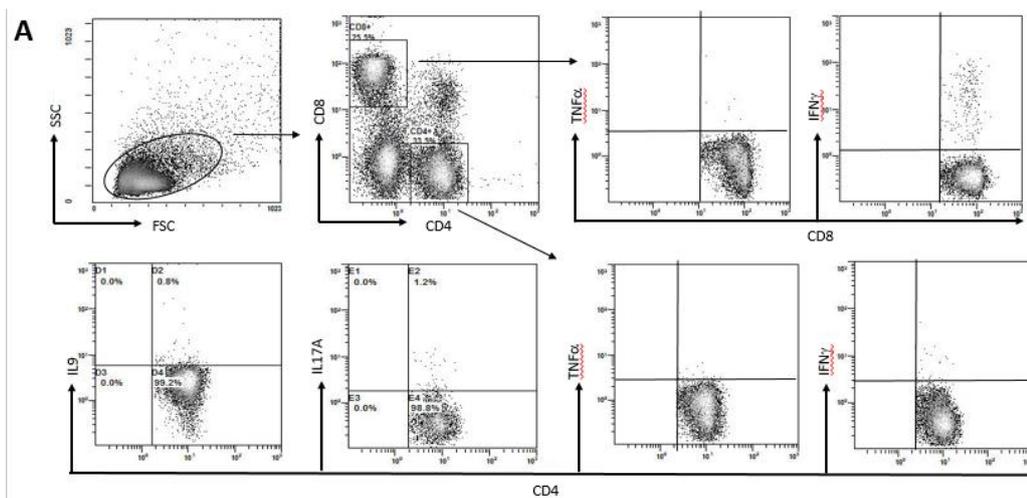
Al contrario, la successiva analisi eseguita in collaborazione con il Dr. Armentano ed il gruppo di Anatomia Patologica ha evidenziato l'efficacia del trattamento con Anakinra nel ridurre lo score infiammatorio in tutti i gruppi sperimentali, incluso il gruppo WT.



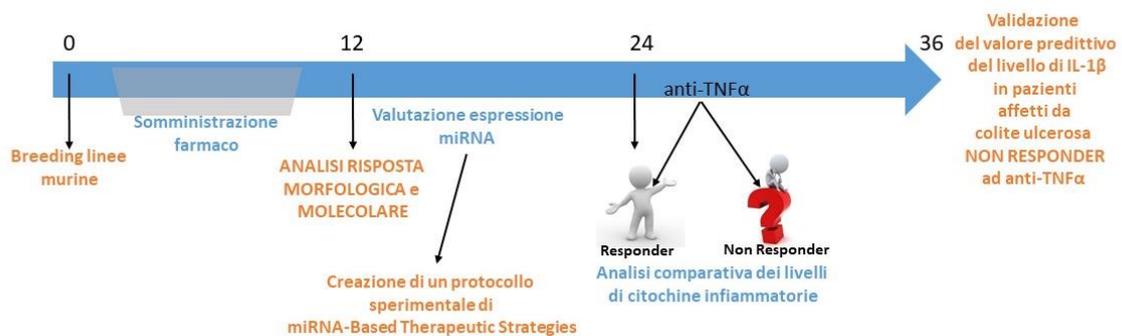
A livello immunologico, l'analisi della polarizzazione delle cellule T nel linfonodo mesenterico non ha evidenziato l'aumento di cellule Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺.



Al contrario, l'analisi del profilo adattativo delle cellule T CD4+ ha evidenziato la riduzione della percentuale di cellule Th1 in seguito alla somministrazione di Anakinra.



Gantt chart



Pubblicazioni del PI 2019-2020

Winnie-APCmin/+ mice: A spontaneous model of colitis-associated colorectal cancer combining genetics and inflammation

De Santis, S., Verna, G., Serino, G., Armentano, R., Cavalcanti, E., Liso, M., Dicarlo, M., Coletta, S., Mastronardi, M., Lippolis, A., Tafaro, A., Santino, A., Pinto, A., Campiglia, P., Huang, A.Y., Cominelli, F., Pizarro, T.T., Chieppa, M.

(2020) 21 (8), art. no. 2972, DOI: 10.3390/ijms21082972

A Specific Mutation in Muc2 Determines Early Dysbiosis in Colitis-Prone Winnie Mice

Liso, M., De Santis, S., Verna, G., Dicarlo, M., Calasso, M., Santino, A., Gigante, I., Eri, R., Raveenthiraraj, S., Sobolewski, A., Palmitessa, V., Lippolis, A., Mastronardi, M., Armentano, R., Serino, G., De Angelis, M., Chieppa, M.

(2020) 26 (4), pp. 546-556. DOI: 10.1093/ibd/izz279

Quercetin exposure suppresses the inflammatory pathway in intestinal organoids from winnie mice

Dicarlo, M., Teti, G., Verna, G., Liso, M., Cavalcanti, E., Sila, A., Raveenthiraraj, S., Mastronardi, M., Santino, A., Serino, G., Lippolis, A., Sobolewski, A., Falconi, M., Chieppa, M. (2019) 20 (22), art. no. 5771, DOI: 10.3390/ijms20225771

Administration Timing Is the Best Clinical Outcome Predictor for Adalimumab Administration in Crohn's Disease

Mastronardi, M., Curlo, M., Cavalcanti, E., Burattini, O., Cuppone, R., Tauro, R., De Santis, S., Serino, G., Pesole, P.L., Stasi, E., Caruso, M.L., Donghia, R., Guerra, V., Giorgio, P., Chieppa, M. (2019) 6, art. no. 234, DOI: 10.3389/fmed.2019.00234

Quercetin-Induced miR-369-3p Suppresses Chronic Inflammatory Response Targeting C/EBP- β

Galleggiante, V., De Santis, S., Liso, M., Verna, G., Sommella, E., Mastronardi, M., Campiglia, P., Chieppa, M., Serino, G. (2019) 63 (19), art. no. 1801390, DOI: 10.1002/mnfr.201801390

Progetto n. 5: “Valutazione espressione tissutale di SMYD3”

Responsabile: *dott. Cristiano Simone*

Partecipanti: Dott.ssa Candida Fasano, Dott.ssa Giovanna Forte

Background

L'ampliamento delle conoscenze sulla biologia molecolare dei tumori e il conseguente incremento delle scelte terapeutiche ha significativamente aumentato le possibilità di trattamento per i pazienti affetti da carcinoma colon rettale e gastrico.

Le neoplasie dell'apparato digerente rappresentano una delle maggiori cause di morbosità e mortalità per cancro. Infatti, il carcinoma colon rettale rappresenta la seconda causa di morbosità per neoplasia. Analogamente il carcinoma gastrico resta la seconda causa al mondo di morte per cancro (1). Infatti, la maggior parte dei CRC sono adenocarcinomi e derivano dalla trasformazione di un polipo adenomatoso attraverso la sequenza adenoma-carcinoma. Il CRC è una malattia eterogenea, caratterizzata da numerose alterazioni genetiche ed epigenetiche (2). Lo sviluppo, la crescita e la eventuale trasformazione maligna dei polipi adenomatosi sono associati all'accumulo di alterazioni di oncogeni e geni oncosoppressori. Talune alterazioni genetiche, quando ereditate e presenti in tutte le cellule dell'organismo, predispongono all'insorgenza dei CRC ereditari. Più frequentemente i fattori ambientali alterano direttamente, nel corso della vita, il DNA delle cellule epiteliali della mucosa intestinale, inducendo o favorendo la progressione tumorale.

La progressione tumorale dallo stato di adenoma a quello di carcinoma è accompagnata da alterazioni genetiche multiple ed è conosciuta come sequenza adenoma-carcinoma. Oggi l'epigenetica è definita come lo studio dei cambiamenti ereditabili dell'espressione genica non causati da variazioni della sequenza primaria di DNA (3). I meccanismi epigenetici, che comprendono la metilazione del DNA, le modificazioni covalenti post-traduzionali delle proteine istoniche, le modificazioni non covalenti, come l'incorporazione di varianti istoniche e il rimodellamento dei nucleosomi, gli RNAs non codificanti, come i microRNAs, influenzano in modo significativo l'espressione genica modulando l'organizzazione spaziale della cromatina, ovvero il chromatin packaging. Recentemente è stato dimostrato che in molte patologie, tra le quali il cancro, questi meccanismi epigenetici di controllo risultano alterati e compromessi (4). Negli ultimi anni la ricerca oncologica ha spostato la sua attenzione sulla identificazione di nuove molecole nodali di pathways cancro specifici, per individuare possibili target molecolari contro cui sviluppare terapie più mirate e meno tossiche. In questo scenario assume sempre più rilievo il ruolo svolto dalla proteina SMYD3 nel meccanismo di cancerogenesi e di progressione tumorale. Questa proteina, infatti, risulta overespressa in numerose forme di cancro, come quello della mammella, dello stomaco, del pancreas, del colon-retto (CRC), del polmone e del carcinoma epatocellulare (HCC) (5-9).

SMYD3 è un'istone di- e tri-metiltransferasi, appartenente alla famiglia delle “SET domain proteins”, cioè proteine caratterizzate dal dominio funzionale SET altamente conservato in tutte le istone metiltransferasi (10). La funzione biologica più nota di questo enzima è la metilazione della lisina 4 dell'istone H3. A differenza di quanto accade nelle cellule neoplastiche, nelle cellule normali SMYD3 non sembra essere indispensabile per lo sviluppo, la proliferazione e la sopravvivenza cellulare.

Tuttavia, anche in cellule normali l'overespressione di SMYD3 è sufficiente ad accelerare la crescita cellulare e ad attivare dei geni di pathways coinvolti nella trasformazione delle cellule tumorali e nella loro migrazione (11-12). Anche nel cancro del colon-retto (CCR) e nell'epatocarcinoma (HCC) appare evidente la centralità di SMYD3 in pathways proliferativi, come dimostrato dagli studi condotti su modelli preclinici, ovvero in topi KO per SMYD3 in cui sono stati indotti tumori gastroenterologici (del colon e del fegato). In questi modelli KO si è osservata regressione tumorale, al contrario di quanto accadeva in topi wt dove SMYD3 potenzia la trascrizione e quindi l'espressione di molti oncogeni, tra cui *cmyc*, *βcat*, *stat3* e tutti i geni della transizione epitelio-mesenchimale (EMT) alla base della trasformazione epatica maligna (Sarris et al. 2016). Nonostante la correlazione esistente tra la deregolazione di SMYD3 e la tumorigenesi, i meccanismi alla base della modulazione di SMYD3, e della sua funzione attivatoria della proliferazione incontrollata delle cellule tumorali, non sono stati ancora completamente chiariti. Una vasta letteratura riporta la stretta correlazione tra un'upregolazione di SMYD3 e la cancerogenesi in diversi organi. Nel CRC mutazioni dell'oncogene KRAS sono correlate con l'overespressione di SMYD3, così come nello sviluppo del cancro polmonare e pancreatico in cui le metilazioni di MAP3K2, mediate da SMYD3 attivano la cascata delle MAP chinasi (13). Pertanto,

In questo scenario, una migliore comprensione del ruolo di SMYD3 nella tumorigenesi del tratto gastroenterico, potrebbe essere un vantaggio per futuri interventi farmacologici.

Obiettivo dello studio

-Identificazione e il co-targeting di percorsi oncogeni sinergici, che potrebbero fornire effetti molto più vantaggiosi per il trattamento del carcinoma colon rettale e gastrico

Materiali e metodi

La valutazione della frequenza di espressione di SMYD3 in linee di CCR con fenotipi CIN (instabilità cromosomica), MIN (instabilità microsatelliti), FAP (poliposi adenomatosa familiare) è stata analizzata mediante real time PCR (RNA) e saggi di immunoblotting per valutare i livelli della proteina SMYD3 nei lisati totali di cellule di CCR con fenotipi CIN, MIN, FAP. La successiva analisi densitometrica dei risultati del western blotting è stata ottenuta attraverso il software ImageJ. I valori sono stati calcolati effettuando il ratio dei livelli di SMYD3 sui livelli di actina (risultati Figure 1,2). L'analisi è stata normalizzata sui valori ottenuti nei colonociti normali NCM460.

La valutazione degli effetti del co-targeting di SMYD3 e di pathway implicati nello sviluppo del CCR (PI3K-AKT e p38-MAPK-MAPK) è stata effettuata mediante saggi di immunoblotting in cui sono stati analizzati i livelli di fosfoattivazione di ERK, AKT, MK2 e delle proteine clivate CASP3 e PARP-1 (marcatori apoptotici) in cellule di CCR sottoposte a trattamenti combinati con BCI-121 e gli inibitori delle vie di segnalazione PI3K-AKT e p38-MAPK-MAPK. Le successive analisi densitometriche dei risultati dei western blotting sono state ottenute attraverso il software ImageJ. I valori sono stati calcolati effettuando il ratio dei livelli delle proteine clivate sui livelli di actina (CASP3 cl/actina, PARP-1 cl/actina), mentre i livelli di proteine fosforilate sono stati calcolati effettuando il ratio delle proteine fosforilate sulla proteine totali (p-ERK/ERK tot, p-AKT/AKT tot e p-MK2/MK2 tot) (risultati Figure 3,6,7,10).

Gli effetti dei trattamenti di inibizione combinata di SMYD3 e di pathway implicati nello sviluppo del CCR (PI3K-AKT e p38-MAPK-MAPK) sono stati valutati attraverso saggi di vitalità e mortalità

cellulare. In particolare, la vitalità cellulare è stata valutata attraverso saggi di WST-1 in cui l'indice di proliferazione è stato calcolato al tempo zero, alle 24 ore, alle 48 ore e infine alle 72 ore (risultati Figure 4,8). Tutti i risultati presentati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti. La mortalità cellulare è stata analizzata mediante conta cellulare con il colorante trypan blue. Il trypan blue viene comunemente usato nella colorazione vitale con un metodo definito come colorazione per esclusione. Infatti, le membrane cellulari sono normalmente impermeabili a tale colorante, mentre le cellule morte, sia apoptotiche che necrotiche, si colorano di blu (senza possibilità di distinzione). La morte cellulare è stata calcolata al tempo zero, alle 24 ore, alle 48 ore e infine alle 72 ore (risultati Figure 5,9). Tutti i risultati presentati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti. Come inibitori per i trattamenti singoli e/o combinati delle cellule di CCR sono stati utilizzati: BCI-121 (100 μ M) inibitore di SMYD3, LY294002 (20 μ M) inibitore del pathway di PI3K-AKT e SB202190 (10 μ M) inibitore di p38-MAPK. Tutti i risultati presentati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti. Infine, gli effetti dei trattamenti combinati con inibitori di SMYD3 e chemioterapici sono stati valutati su cellule HCT116 pre-trattate per 48 ore con BCI-121 (100 μ M) o EPZ031686 (1 μ M), sono state trattate con etoposide (20 μ M) o NCS (1nM) per 24 ore e dopo fissate per l'analisi di immunofluorescenza a 0 e 24 ore. È stata effettuata una colorazione con un anticorpo anti-53BP1 per contare i foci nucleari di danno. Sono stati analizzati i nuclei di almeno 100 cellule per ogni punto (risultati Figura 11a). La vitalità cellulare dopo i trattamenti di inibizione combinata di SMYD3 e chemioterapici è stata valutata attraverso il WST-1 di linee HT29 e HCT116 trattate con i chemioterapici indicati per 24 o 72 ore, paragonate a cellule pre-trattate con BCI-121 per 48 ore e dopo trattate con gli stessi chemioterapici per 24 ore, per un totale di 72 ore (risultati Figura 11b).

Risultati / stato di avanzamento per la terza annualità di progetto

Nel corso degli ultimi decenni la terapia del cancro si è evoluta verso la medicina personalizzata, una medicina che offra il trattamento più indicato per il singolo paziente tenendo conto della sua individualità, della sua storia clinica ma soprattutto delle caratteristiche biologiche del tumore. Infatti il presente, ma soprattutto il futuro delle terapie oncologiche è rappresentato dalle terapie a bersaglio molecolare, il cui meccanismo di azione si basa sulla capacità di legarsi specificatamente ai bersagli molecolari identificati nelle cellule tumorali. Questo particolare meccanismo ne rende altamente selettiva l'azione, lasciando inalterate le cellule normali, contrariamente a quanto avviene con la chemioterapia.

Pertanto, avendo precedentemente dimostrato che l'inibizione farmacologica o l'ablazione genica di SMYD3 porta al blocco del segnale di KRAS a livello della fosforilazione di ERK (chinasi effettrice del pathway) abbiamo indagato l'effetto derivante dall'inibizione combinata di SMYD3 e di due diversi pathway fortemente implicati nello sviluppo del cancro del colon-retto, quello della cascata PI3K-AKT e quello delle MAPK nello specifico p38-MAPK-MAPK. Recenti studi pre-clinici e numerosi clinical trials, hanno sottolineato l'importanza della regolazione di queste cascate di segnale nella lotta contro la progressione tumorale (Goldberg R M, Montagut C, Wainberg R A, Ronga P, Audhuy F, Taieb J, Stintzing S, Siena S, Santini D, 2018; Bence A L, McNeely S C, and Beckmann R P, 2017; Flaherty KT et al, 2012; Patnaik A et al, 2016). Per verificare questa ipotesi abbiamo utilizzato 5 linee cellulari di cancro del colon-retto che esprimessero elevati livelli di SMYD3 e differissero tra loro per background genetico e tipo instabilità. Ad esempio, le HT29, le Caco-2 e le SW480 presentano una instabilità cromosomica (CIN), mentre le HCT116 e le LoVo presentano una instabilità dei microsatelliti (MIN). Allo stesso modo è importante rilevare il differente status mutazionale esistente

tra le diverse linee utilizzate. Per esempio, le HT29 sono wild type per KRAS e mutate in BRAF viceversa le HCT116, le SW480 e le LoVo sono mutate in KRAS e wild type in BRAF. Le mutazioni dei principali pathway coinvolti nell'inizio e nella progressione tumorale sono riassunte nella seguente tabella.

Linea cellulare	Genotipo									
	APC	KRAS	BRAF	P53	CTNNB1	EGFR	PTEN	SMAD4	PIK3CA	MIN
HCT116	wt	mut	wt	wt	wt	wt	wt	wt	mut	MSI
HT29	mut	wt	mut	mut	wt	wt	wt	wt	mut	MSS
LOVO	mut	mut	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	MSI
Caco-2	mut	wt	wt	mut	mut	wt	wt	wt	wt	MSS
SW480	mut	mut	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	MSS

TABELLA 1: Le linee cellulari di CCR (HCT116, HT29, LoVo, Caco-2 e SW480) sono state analizzate per le mutazioni nei seguenti geni: APC, KRAS, BRAF, P53, CTNNB1, EGFR, PTEN, SMAD4, PIK3CA e per l'instabilità dei microsatelliti. MSS = stabili, MSI = instabili.

Le cellule tumorali sono state coltivate in condizioni standard seguendo le indicazioni dell'ATCC (American Type Culture Collection). Abbiamo inibito il pathway di PI3K-AKT attraverso la somministrazione del farmaco LY294002 (20µM) e in aggiunta abbiamo inibito SMYD3 con BCI-121 (100 µM), agendo in tal modo anche sul pathway di RAS-MEK-ERK. Per prima cosa abbiamo proceduto alla valutazione dell'efficienza dei due inibitori utilizzati, infatti tramite western blot è stata verificata la diminuzione del segnale della fosforilazione di AKT e di ERK, come dimostrato dalle densitometrie qui sotto riportate (Figura 3).

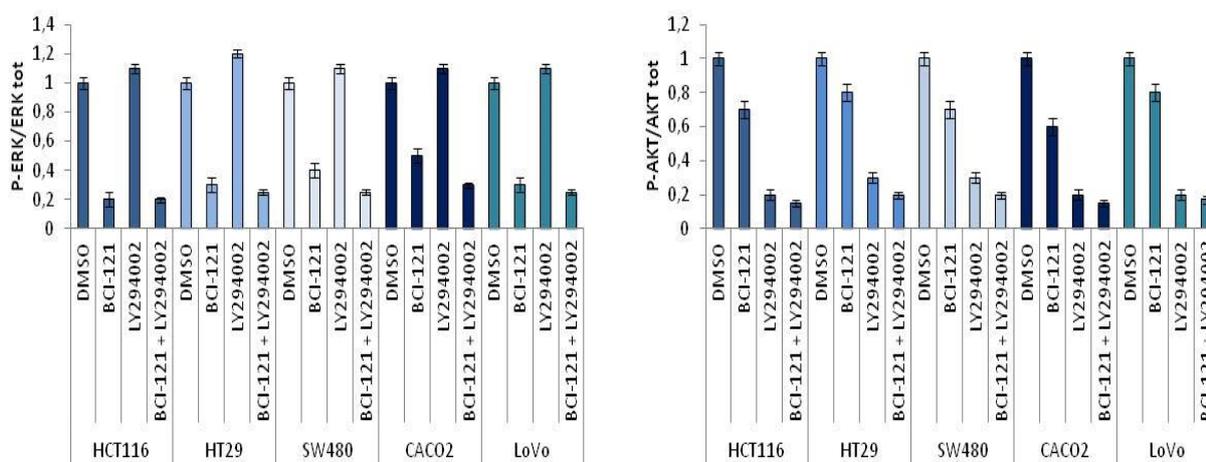


FIGURA 3: Analisi densitometriche dei risultati del western blot ottenute attraverso il software ImageJ. I valori sono stati calcolati effettuando il ratio delle proteine fosforilate sulla proteine

totali (p-ERK/ERK tot e p-AKT/AKT tot). I risultati presentati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti.

In seguito si è proceduto alla valutazione della proliferazione tramite il saggio del WST-1. L'assorbanza rilevata con lo spettrofotometro è infatti proporzionale al numero di cellule metabolicamente attive. Le cellule sono state sottoposte ad inibizione singola o combinata dei due pathway, quindi sono stati utilizzati LY294002 e/o BCI-121 per 24-48-72 ore. È stata dimostrata una riduzione della capacità di crescita in maniera tempo dipendente in tutte le linee cellulari di cancro del colon-retto utilizzate. Inoltre, è possibile affermare come l'inibizione combinata dei due pathway (RAS-MEK-ERK e PI3K-AKT) dia luogo ad una maggiore riduzione della capacità di crescita cellulare rispetto ai singoli trattamenti (Figura 4).

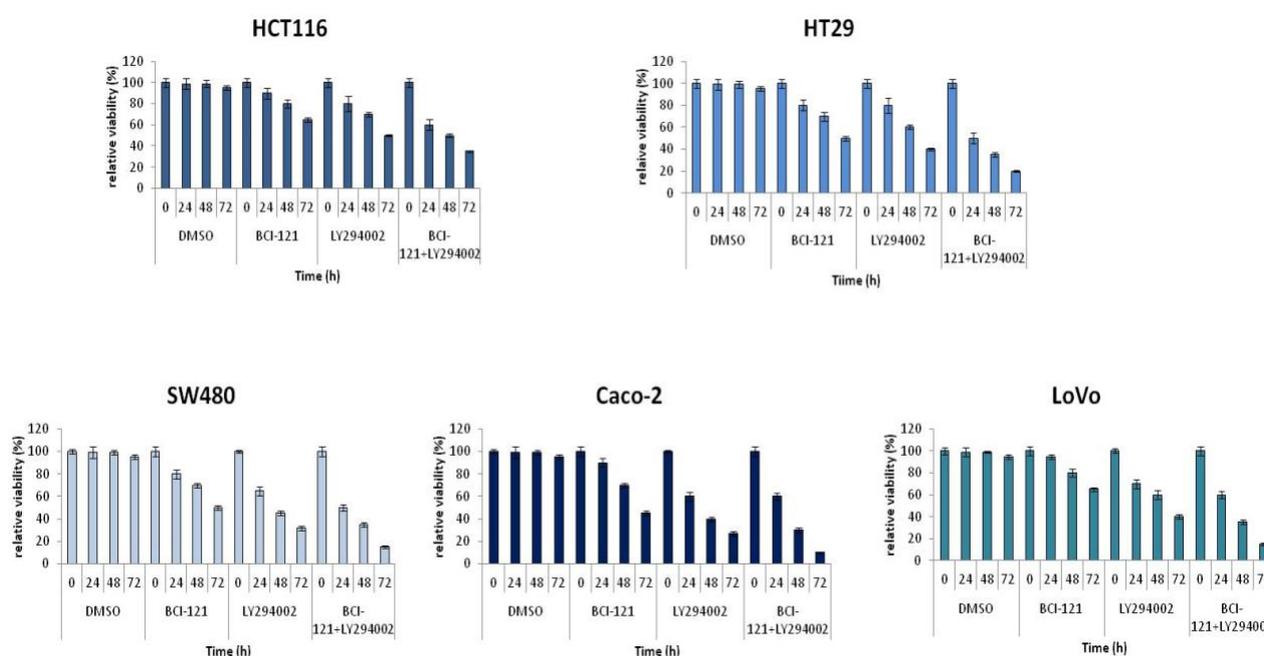


FIGURA 4: le cellule di CCR sono state trattate con BCI-121 (100µM) e/o con LY294002 (20 µM) e analizzate tramite saggio di WST-1. L'indice di proliferazione è stato calcolato al tempo zero, alle 24 ore, alle 48 ore e infine alle 72 ore. L'inibizione combinata del pathway di RAS-MEK-ERK e del pathway di PI3K-AKT induce una riduzione della capacità proliferativa. I risultati presentati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti.

Per avere una visione più completa dell'azione di questi due inibitori (LY294002 e BCI-121) si è proceduto alla valutazione della morte cellulare tramite conta cellulare in trypan blue. Il trypan blue viene comunemente usato nella colorazione vitale con un metodo definito come colorazione per esclusione. Infatti, le membrane cellulari sono normalmente impermeabili a tale colorante, mentre le cellule morte, sia apoptotiche che necrotiche, si colorano di blu (senza possibilità di distinzione). Le cellule sono state sottoposte ad inibizione singola o combinata dei due pathway, quindi sono stati utilizzati LY294002 e/o BCI-121 per 24-48-72 ore. In tutte le linee cellulari di CCR testate è stato dimostrato un aumento del numero di cellule morte in maniera tempo dipendente. Inoltre, è possibile affermare come l'inibizione combinata dei due pathway (RAS-MEK-ERK e PI3K-AKT) dia luogo ad

un incremento della morte cellulare rispetto alla singola inibizione, la quale provoca più un arresto della proliferazione (Figura 5).

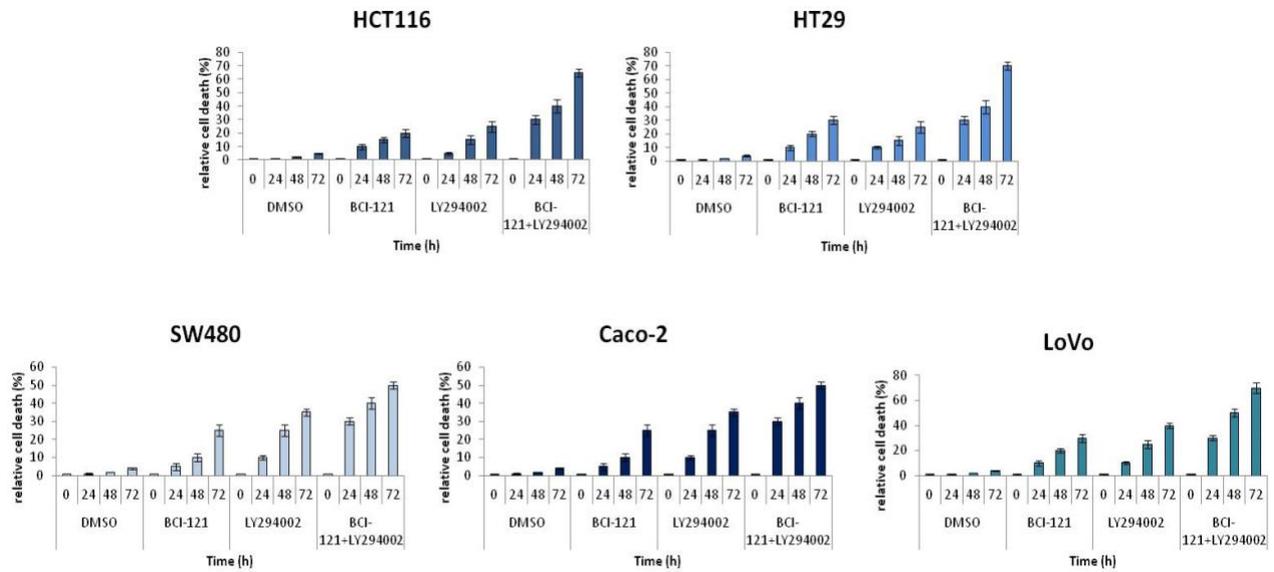


FIGURA 5: le cellule di CCR sono state trattate con BCI-121 (100 μ M) e/o con LY294002 (20 μ M) e analizzate tramite conta cellulare con il colorante trypan blue. La morte cellulare è stata calcolata al tempo zero, alle 24 ore, alle 48 ore e infine alle 72 ore. L'inibizione combinata del pathway di RAS-MEK-ERK e del pathway di PI3K-AKT induce un aumento della morte cellulare in tutte le linee cellulari di CCR analizzate rispetto ai trattamenti singoli. I risultati presentati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti.

Non essendo possibile distinguere il tipo di morte cellulare indotta dall'inibizione dei pathway (RAS-MEK-ERK e PI3K-AKT) attraverso la colorazione per esclusione effettuata con trypan blue, abbiamo verificato il clivaggio della caspasi 3 e di PARP-1. Questi ultimi, infatti, rappresentano i principali indicatori di una morte apoptotica. I risultati dei western blot suggeriscono che l'inibizione combinata ottenuta attraverso la somministrazione di LY294002 e di BCI-121 promuove l'apoptosi (Figura 6).

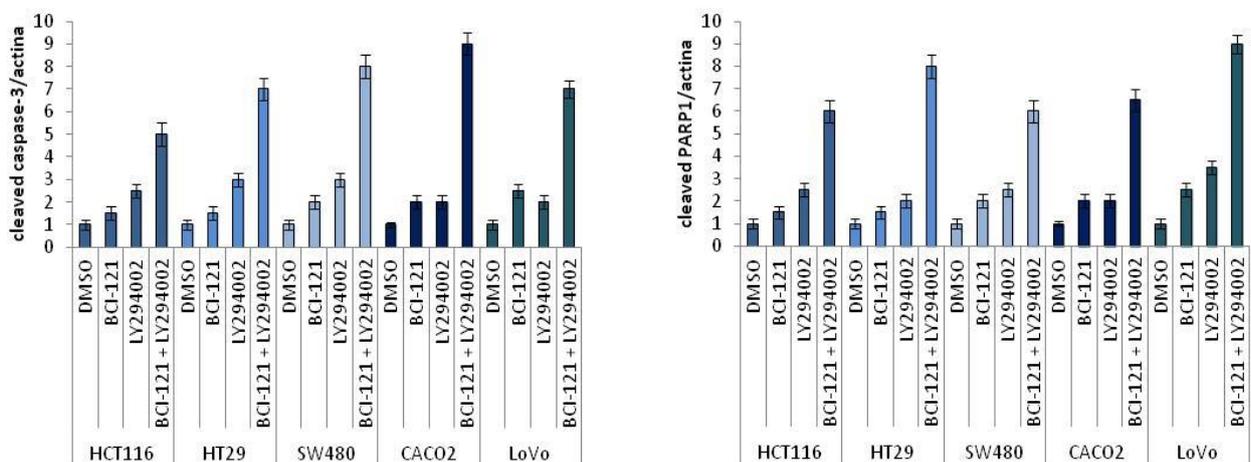


FIGURA 6: Analisi densitometriche dei risultati dei western blot ottenute attraverso il software ImageJ. I valori sono stati calcolati effettuando il ratio delle proteine clivate sulla actina. Le cellule di CCR in cui è stata effettuata l'inibizione combinata dei pathway RAS-MEK-ERK e PI3K-AKT, attraverso la somministrazione di BCI-121 e LY294002, manifestano elevati livelli di apoptosi rilevati dal clivaggio della caspasi 3 e di PARP-1. I risultati presentati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti.

Nel complesso tutti i risultati ottenuti nella prima parte della task 3 dimostrano che il co-targeting del pathway di RAS-MEK-ERK e di quello di PI3K-AKT, ottenuto utilizzando gli inibitori BCI-121 e LY294002, può essere considerata una valida opzione terapeutica per i pazienti affetti da cancro del colon-retto.

Allo stesso modo abbiamo valutato l'effetto del co-targeting del pathway di RAS-MEK-ERK assieme al pathway delle MAPK, procedendo all'inibizione di p38-MAPK. Gli inibitori utilizzati sono stati: BCI-121 (100 μ M) come inibitore di SMYD3, agendo in tal modo sul pathway di RAS-MEK-ERK, e SB202190 (10 μ M) classico inibitore di p38 α -MAPK.

Anche qui per prima cosa abbiamo proceduto alla valutazione dell'efficienza dei due inibitori utilizzati, infatti tramite western blot è stata verificata la diminuzione del segnale della fosforilazione di ERK e la riduzione del segnale di p-MK2 il quale rappresenta il principale target a valle di p38-MAPK, come dimostrato dalle densitometrie qui sotto riportate (Figura 7).

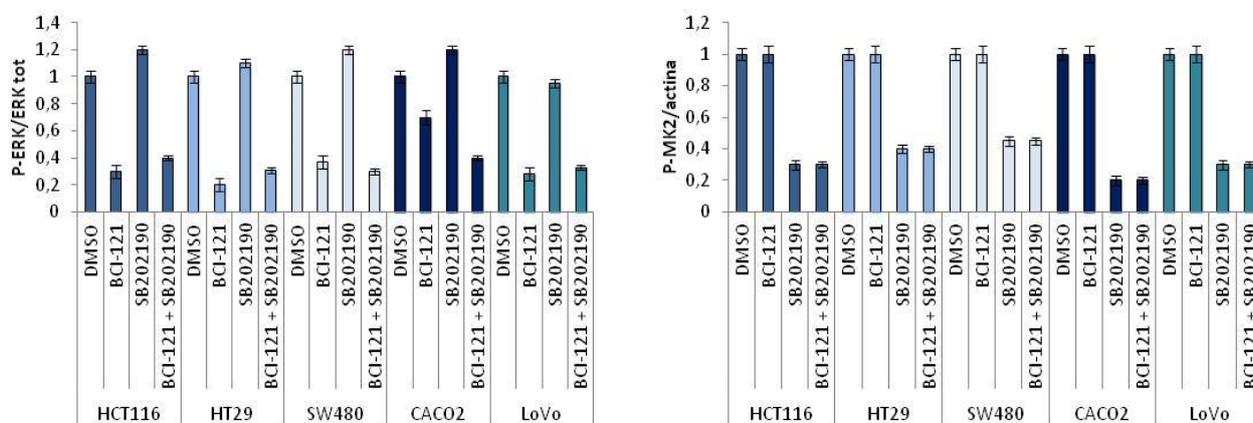


FIGURA7: Analisi densitometriche dei risultati del western blot ottenute attraverso il software ImageJ. I valori sono stati calcolati effettuando il ratio delle proteine fosforilate sulla proteine totali (p-ERK/ERK tot) e delle proteine fosforilate sull'actina (p-MK2/actina). I risultati presentati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti.

In seguito si è proceduto alla valutazione della proliferazione tramite il saggio del WST-1. Le cellule sono state sottoposte ad inibizione singola o combinata dei due pathway, quindi sono stati utilizzati SB202190 e/o BCI-121 per 24-48-72 ore. Tutte le linee cellulari utilizzate hanno mostrato una diminuita proliferazione in maniera tempo dipendente. Inoltre, è possibile affermare come l'inibizione

combinata dei due pathway (RAS-MEK-ERK e p38-MAPK) dia luogo ad una maggiore riduzione della capacità di crescita cellulare rispetto ai trattamenti singoli (Figura 8).

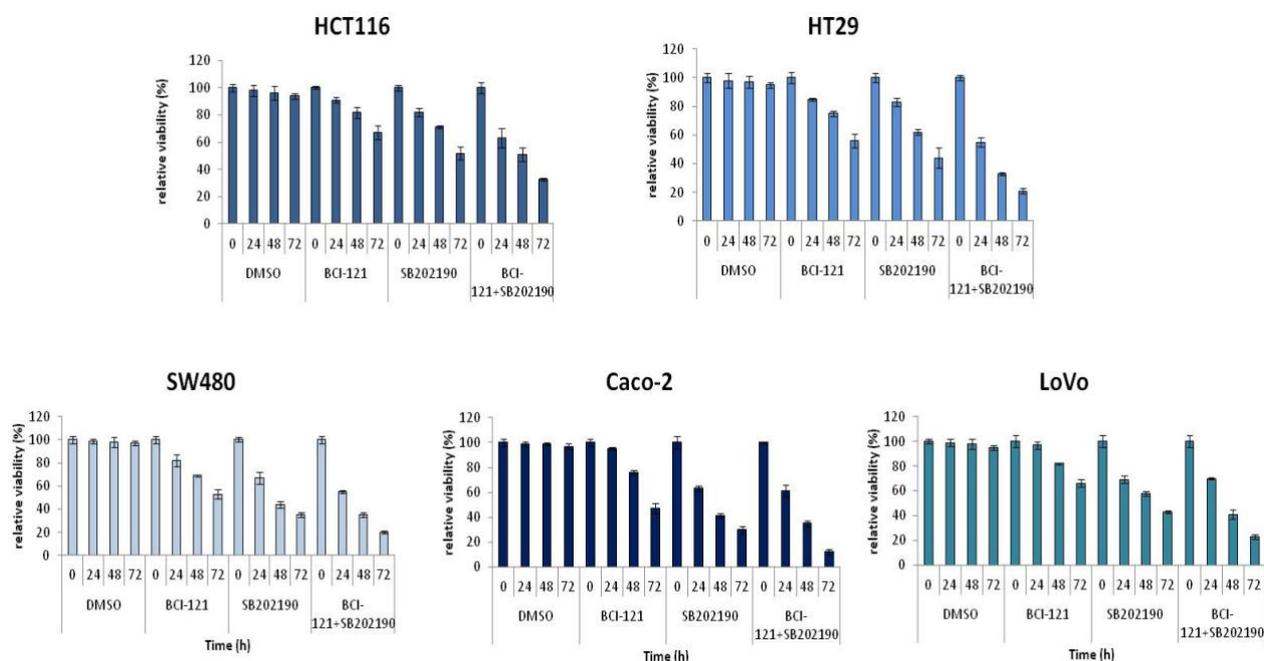


FIGURA 8: le cellule di CCR sono state trattate con BCI-121 (100 μ M) (inibitore di SMYD3) e/o con SB202190 (10 μ M) (inibitore di p38-MAPK) e analizzate tramite saggio di WST-1. L'indice di proliferazione è stato calcolato al tempo zero, alle 24 ore, alle 48 ore e infine alle 72 ore. L'inibizione combinata del pathway di RAS-MEK-ERK e del pathway di p38-MAPK induce una riduzione della capacità di crescita. I risultati presentati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti.

Per avere una visione più completa dell'azione di questi due inibitori (SB202190 e BCI-121) si è proceduto alla valutazione della morte cellulare tramite conta con trypan blue. Le cellule sono state sottoposte ad inibizione singola o combinata dei due pathway, quindi sono stati utilizzati SB202190 e/o BCI-121 per 24-48-72 ore. È stato dimostrato un aumento del numero di cellule morte in maniera tempo dipendente in tutte le linee cellulari di cancro del colon-retto utilizzate. Inoltre, è possibile affermare come l'inibizione combinata dei due pathway (RAS-MEK-ERK e p38-MAPK) dia luogo ad un incremento della morte cellulare rispetto alla singola inibizione, la quale provoca più un arresto della capacità di crescita (Figura 9).

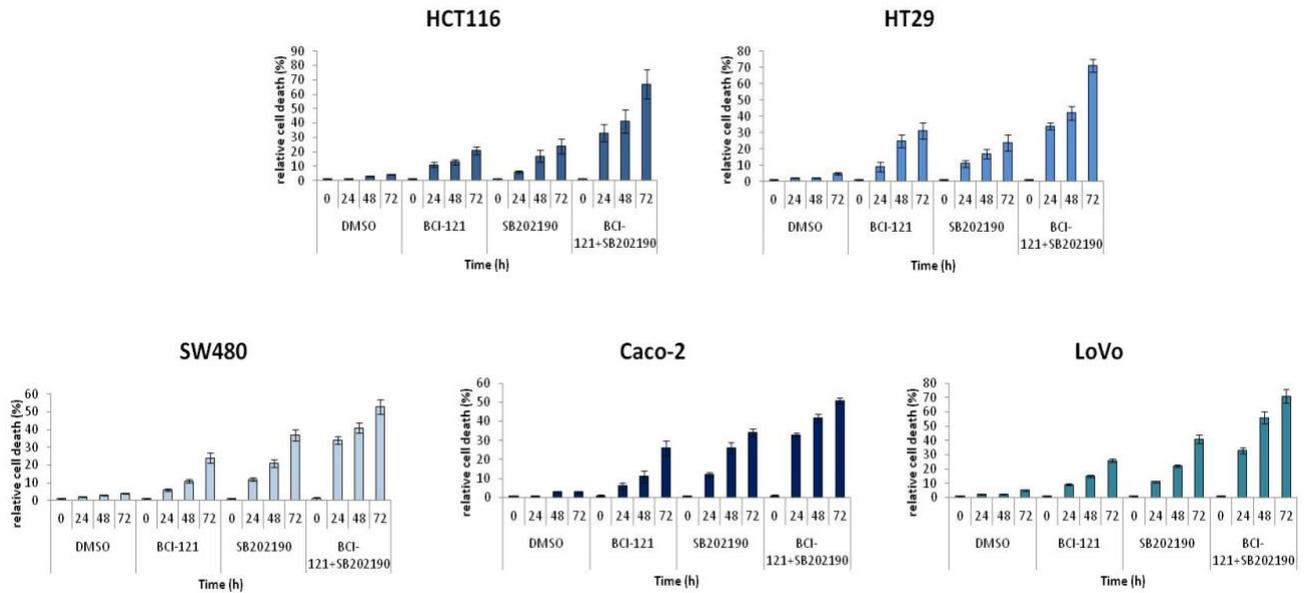


FIGURA 9: le cellule di CCR sono state trattate con BCI-121 (100 μ M) e/o con SB202190 (10 μ M) e analizzate tramite conta cellulare con il colorante trypan blue. La morte cellulare è stata calcolata al tempo zero, alle 24 ore, alle 48 ore e infine alle 72 ore. L'inibizione combinata del pathway di RAS-MEK-ERK e del pathway di p38-MAPK induce un aumento della morte cellulare in tutte le linee cellulari di CCR analizzate rispetto ai trattamenti singoli. I risultati presentati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti.

Non essendo possibile distinguere il tipo di morte cellulare indotta dall'inibizione dei pathway (RAS-MEK-ERK e p38-MAPK) attraverso la colorazione per esclusione, abbiamo proceduto al western blot verificando il clivaggio della caspasi 3 e quello di PARP-1. I risultati suggeriscono che l'inibizione combinata, ottenuta attraverso la somministrazione di SB202190 e di BCI-121, promuove l'apoptosi (Figura 10).

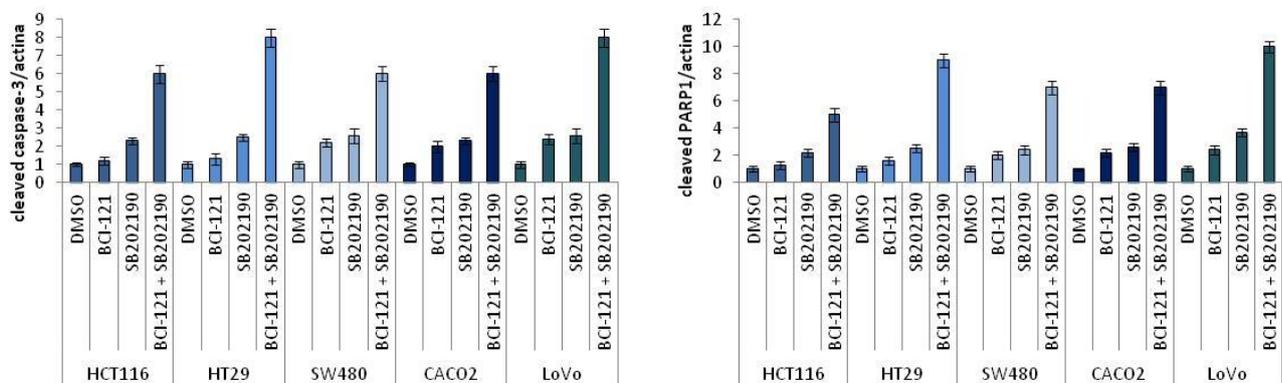


FIGURA 10: Analisi densitometriche dei risultati del western blot ottenute attraverso il software ImageJ. I valori sono stati calcolati effettuando il ratio delle proteine clivate sulla actina. Le cellule di CCR in cui è stata effettuata l'inibizione combinata dei pathway RAS-MEK-ERK e

p38-MAPK, attraverso la somministrazione di BCI-121 e SB202190 per 72 ore, mostrano elevati livelli di apoptosi rilevati dal clivaggio della caspasi 3 e di PARP-1. I risultati presentati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti.

Nel complesso tutti i risultati ottenuti dimostrano che il co-targeting dei pathways di RAS-MEK-ERK e di p38-MAPK, ottenuto utilizzando rispettivamente gli inibitori BCI-121 e SB202190, può essere considerata una valida opzione terapeutica per i pazienti affetti da cancro del colon-retto.

In questi primi mesi della terza annualità di progetto sono proseguiti i nostri studi volti all'identificazione di strategici co-targeting di pathways sinergici del CCR, con una prima valutazione dell'impiego di inibitori di SMYD3 in combinazione con agenti chemioterapici in uso nella clinica per il trattamento del CCR.

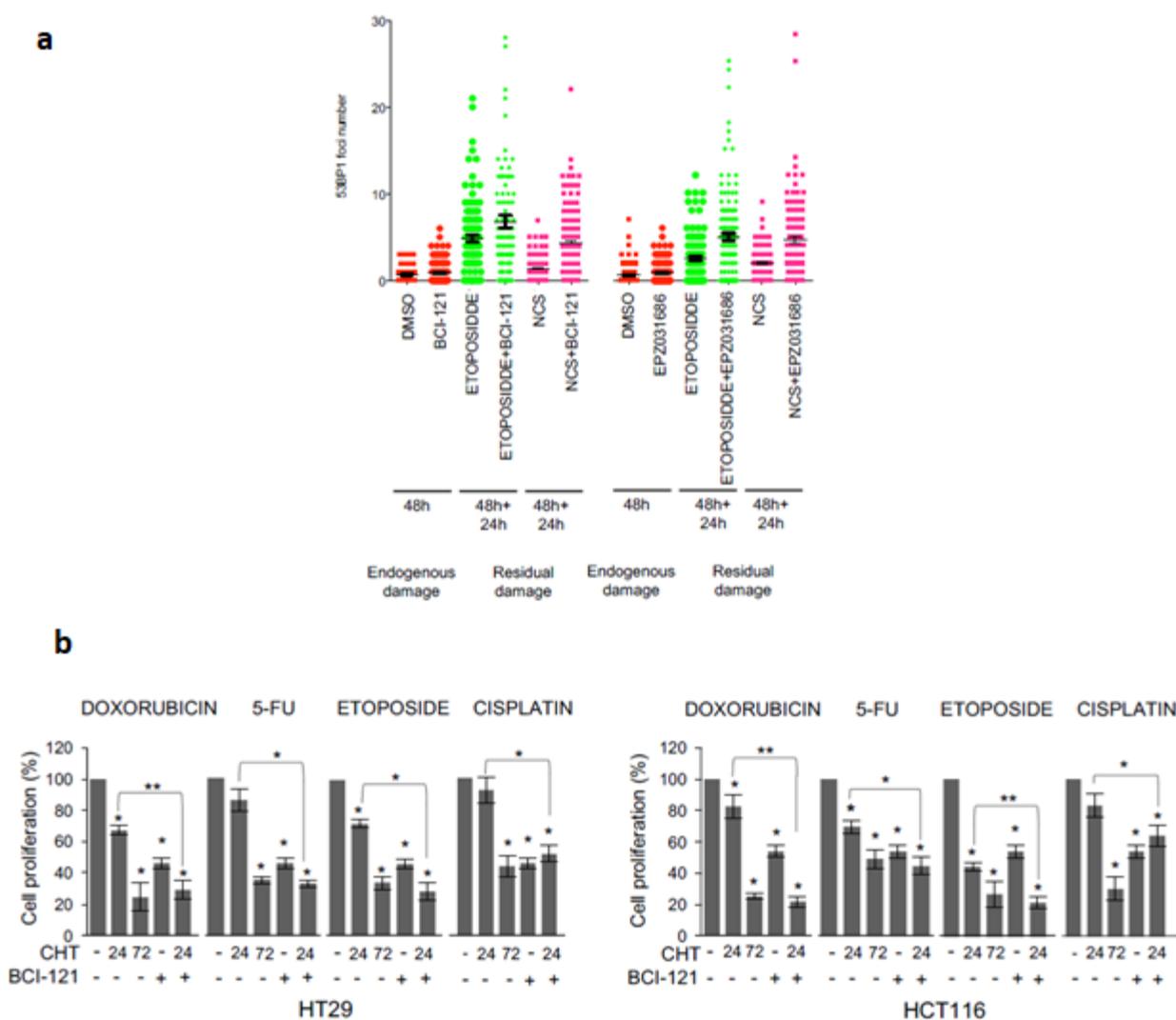
In tale direzione, nuovi spunti di indagine sono stati offerti da un nostro recente studio attualmente in fase di revisione per la pubblicazione sulla rivista *iScience* del gruppo editoriale *Cell Press*. In questo lavoro abbiamo chiarito un nuovo ruolo funzionale di SMYD3 nel meccanismo di ricombinazione omologa (Homologous Recombination, HR) in risposta alla rottura del doppio filamento di DNA (Double Strand Break, DSB). I nostri risultati dimostrano che la fosforilazione di SMYD3 mediata da ATM consente la formazione di un complesso multiproteico formato da ATM, SMYD3, CHK2 e BRCA2, necessario per il reclutamento di RAD51 sui siti di rottura del doppio filamento di DNA e per il completamento del processo di ricombinazione omologa.

Questa scoperta ci ha indotto ad investigare la possibilità che un pre-trattamento con inibitori di SMYD3 su cellule di CCR potesse interferire con i meccanismi di riparazione del DNA nelle cellule tumorali e quindi potenziare l'effetto genotossico di agenti chemioterapici in uso clinico per il trattamento del CCR.

A tal fine abbiamo analizzato per immunofluorescenza l'efficienza di riparazione del DNA in cellule HCT116 pre-trattate con inibitori di SMYD3 (BCI-121 e EPZ031686) per 48 ore e successivamente sottoposte a trattamento con etoposide (VP-16) per 24 ore. La stessa analisi è stata effettuata in cellule trattate con la neocarzinostatina (NCS), un agente in grado di danneggiare il DNA mediante una rottura del doppio filamento. I livelli di danno del DNA sono stati valutati effettuando una conta del numero di foci di danno per cellula, osservabili mediante immunocolorazione della proteina 53BP1 che viene reclutata in corrispondenza dei punti di rottura del DNA (foci). L'analisi è stata effettuata valutando sia lo stato basale delle cellule pre-trattate con gli inibitori di SMYD3, ossia il danno endogeno del DNA, sia il danno residuo dopo i trattamenti con etoposide o NCS in associazione all'inibizione di SMYD3 (Figura 11a). L'analisi per immunofluorescenza dimostra che cellule pre-trattate per 48 ore con inibitori di SMYD3 presentano un maggior numero residuo di foci di danno del DNA non riparati e quindi una minore efficienza di riparazione del DNA. Questi dati, oltre a confermare il ruolo fondamentale di SMYD3 nella riparazione del DNA, suggeriscono che l'inibizione di SMYD3 possa provocare un incremento del danno residuo del DNA in cellule di CCR sottoposte al trattamento con i chemioterapici, come osservato con etoposide (Figura 11a). Questa nuova prova sperimentale supporta la nostra ipotesi che l'inibizione di SMYD3 possa rappresentare una valida strategia per superare la chemioresistenza nelle cellule tumorali che esprimono elevati livelli di SMYD3, esortandoci ad esplorare la combinazione di agenti chemioterapici ed inibitori della riparazione del DNA (in questo caso inibitori di SMYD3) come possibile opzione terapeutica nel trattamento del CCR.

A tal fine, abbiamo valutato gli effetti sulla mortalità cellulare del trattamento combinato di chemioterapici (doxorubicina, 5-fluorouracile, cisplatino ed etoposide) e BCI-121 nelle linee cellulari HT29 e HCT116 che esprimono elevati livelli di SMYD3 (Figura 11b).

Seguendo i tempi indicati nella Figura 11b, le cellule HT29 e HCT116 sono state pretrattate con BCI-121 per 48 ore e successivamente sottoposte a un trattamento combinato con agenti chemioterapici per altre 24 ore, per un totale di 72 ore (Figura 11b). Effetti considerevoli sulla vitalità cellulare sono stati ottenuti non solo con trattamenti lunghi (72 ore) con il solo chemioterapico, come atteso, ma soprattutto grazie all'uso del trattamento combinato (chemioterapico+BCI-121). Questi dati indicano che il pre-trattamento delle cellule HT29 e HCT116 con l'inibitore di SMYD3 può migliorare l'efficacia citotossica di chemioterapici e/o ridurre il tempo necessario affinché questi agenti antitumorali possano esercitare il loro effetto inibitorio sulla proliferazione di cellule di CCR (Figura 11b).



(a) Cellule HCT116 pre-trattate per 48 ore con BCI-121 (100 μ M) o EPZ031686 (1 μ M), sono state trattate con Etoposide (20 μ M) o NCS (1nM) per 24 ore e dopo fissate per l'analisi di immunofluorescenza a 0 e 24 ore. È stata effettuata una colorazione con un anticorpo anti-53BP1 per contare i foci nucleari di danno. Sono stati analizzati i nuclei di almeno 100 cellule per ogni punto. Il grafico mostra il numero di foci 53BP1 prima dell'aggiunta di etoposide/NCS (endogenous damage) ed il numero di foci indotto dal trattamento e rilevabile dopo 24 ore dall'esposizione (residual damage).

(b) Saggio WST-1 delle linee HT29 e HCT116 trattate con i chemioterapici indicati per 24 o 72 ore, paragonate a cellule pretrattate con BCI-121 per 48 ore e dopo trattate con gli stessi chemioterapici per 24 ore, per un totale di 72 ore.

In questo periodo, dopo la ripresa delle attività sperimentali in istituto (a seguito di lockdown per pandemia COVID-19), sono in corso esperimenti volti a valutare la vitalità cellulare a seguito di trattamenti combinati con inibitori di SMYD3 e inibitori farmacologici di altri attori implicati : implicati nei diversi meccanismi di riparo oltre quello di ricombinazione omologa, in modo da agire su tutte le possibili vie di segnalazione che la cellula tumorale adotta per sopravvivere ai danni causati dalle terapie convenzionali.

Bibliografia

1. Kanwal T and Kulsoom G. (2016). *Cancer Biol Med*, 13:120-35.
2. East JE, Saunders BP, Jass JR. (2008). *Gastroenterol Clin North Am*. 37:25.
3. Biggar KK, Li SS. (2015) *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16: 5-17.
4. Luo XG, Zhang CL, Zhao WW, et al. (2014). *Cancer Lett*, 344:129-37.
5. Hamamoto R, Silva FP, Tsuge M, et al. (2006). *Cancer Sci*, 97:113-8.
6. Tsuge M, Hamamoto R, Silva FP, et al. (2005). *Nat Genet*, 37:1104-7.
7. Liu Y, Luo X, Deng J, et al. (2015). *Tumour Biol*, 36:2685-94.
8. Mazur PK, Reynoird N, Khatri P, et al. (2014). *Nature*, 510:283-7.
9. Foreman KW, Brown M, Park F, et al. (2011). *PLoS One*, 6: e22290.
10. Cock-Rada AM, Medjkane S, Janski N, et al. (2012). *Cancer Res*, 72:810-20.
11. Gaedcke J, Grade M, Jung K, et al. (2010). *Genes Chromosomes Cancer*, 49:1024-34.
12. Bence AL, McNeely SC, and Beckmann RP (2017). *Clinical Cancer Research*, 23:3232-40.
13. Goldberg RM, Montagut C, Wainberg RA, et al. (2018). *BMJ Journal*, 3:e000353.
14. Patnaik A, Haluska P, Tolcher AW, et al (2016). *Cancer Therapy*, CCR-15-1718.
15. Peserico A, Germani A, Sanese P, et al. (2015). *J Cell Physiol*, 230:2447-60.

Progetto n. 6: Effetti del Regorafenib in combinazione con la Vitamina K1 e con inibitori della via IGF/IGF1-R, su proliferazione, apoptosi, migrazione ed invasione in linee cellulari di epatocarcinoma umano

Responsabile: Dott.ssa Caterina Messa

Partecipanti: Dott.ssa Rosalba D'Alessandro e Dott.ssa Maria Grazia Refolo

Background e Obiettivo dello studio

Il progetto di durata triennale (2016-2018) con proroga di un anno, sosteneva l'ipotesi che l'impiego di trattamenti combinati, in cui al Regorafenib e alla Vitamina K1, entrambi inibitori della via di trasduzione Ras/MAPK, vengono associati specifici inibitori della via del segnale IGF1/IGF1-R, potesse presentare il doppio vantaggio di impiegare più bassi dosaggi di farmaci, nonché di ovviare a possibili fenomeni di resistenza. In questo modo è possibile ottenere una più efficace azione inibitoria sulla crescita e motilità di cellule di epatocarcinoma umano.

Metodi e Risultati

Le nostre sperimentazioni hanno evidenziato che quando il Sorafenib viene combinato alla Vitamina K1, la concentrazione del farmaco richiesta per l'inibizione della crescita delle cellule tumorali risulta sostanzialmente ridotta. Inoltre, la crescita delle cellule di HCC e gli effetti degli agenti terapeutici possono essere modulati da componenti del microambiente tumorale come ad esempio le piastrine secernenti diversi Fattori di Crescita ad azione mitogena tra cui l'IGF1, strettamente correlato alla crescita dell'HCC, il quale attraverso il suo specifico Recettore attiva il pathway biochimico coinvolto nella crescita cellulare e nella motilità. In uno studio da noi precedentemente pubblicato abbiamo dimostrato che l'impiego dell'inibitore dell'IGF1-R abbassa significativamente il tasso di migrazione di cellule di HCC oltre che causare riduzione e depolarizzazione dell'actina (D'Alessandro R, Refolo MG, Lippolis C, Carella N, Messa C, Cavallini A, Carr BI. Strong enhancement by IGF1-R antagonists of hepatocellular carcinoma cell migration inhibition by Sorafenib and/or vitamin K1. *Cell Oncol* 2018 Jun;41(3):283-296). Nell'anno 2019 abbiamo condotto ulteriori esperimenti aggiungendo al trattamento combinato Sorafenib/Regorafenib anche il GSK1838705A quale inibitore dell'IGF1R, ed il Ramucirumab, un anticorpo monoclonale antagonista specifico del recettore VEGFR2, approvato dall'FDA come farmaco di seconda linea in pazienti che hanno sviluppato resistenza alla terapia di prima linea con Sorafenib e che presentano elevati livelli sierici di AFP.

Conclusioni

Tutti i dati presentati puntano, per la prima volta, l'attenzione sull'effetto modulatorio esercitato da Sorafenib e Regorafenib in combinazione, mostrando che i due inibitori multichinasi usati nella pratica clinica in maniera sequenziale potrebbero potenzialmente sortire una maggiore azione di controllo sulla crescita e diffusione dell'HCC quando somministrati in combinazione. Tale effetto sinergico sembra essere ulteriormente potenziato allorchè altri inibitori specifici come il GSK1838705A o il Ramucirumab vengano usati in combinazione con Sorafenib/Regorafenib.

I nostri risultati sono stati oggetto della seguente pubblicazione scientifica :

-Rosalba D'Alessandro, Maria Grazia Refolo, Palma Aurelia Iacovazzi, Pasqua Letizia Pesole, Caterina Messa and Brian Irving Carr. Ramucirumab and GSK1838705A Enhance the Inhibitory Effects of Low Concentration Sorafenib and Regorafenib Combination on HCC Cell Growth and Motility. *Cancers* 2019 Jun;11(6):787

Progetto n. 7- Studio dei fattori molecolari predittivi di risposta e di resistenza alla terapia anti-angiogenetica con Ramucirumab e Paclitaxel nel tumore gastrico metastatico.

Responsabile: Dott.ssa Caterina Messa

Partecipanti: Dott.ssa Rosalba D'Alessandro, Dott.ssa Maria Grazia Refolo, Sig. Gianpiero De Leonardis

Background

Nonostante i progressi conseguiti nel trattamento del cancro gastrico, il tumore dello stomaco rappresenta ancora la terza causa di morte per cancro in tutto il mondo. I pazienti spesso perdono l'opportunità di una terapia risolutiva chirurgica, in quanto nella maggior parte dei casi il tumore è già in uno stadio avanzato alla diagnosi. Rispetto alla migliore terapia di supporto, la chemioterapia può migliorare la qualità della vita e prolungare il tempo di sopravvivenza. Negli ultimi anni, studi biomolecolari sul cancro gastrico hanno permesso di introdurre nell'uso clinico nuovi farmaci ad azione mirata. Esempio ne è il Trastuzumab, anticorpo anti recettore del fattore di crescita epidermico umano (HER2), che in prima linea, in associazione a fluoropirimidine e derivati del platino può migliorare significativamente la sopravvivenza nei pazienti con carcinoma gastrico avanzato con HER2 amplificato. Accanto all'amplificazione di HER2, l'attivazione dell'angiogenesi è un ulteriore fattore in grado di indurre sviluppo e progressione di malattia nel carcinoma gastrico. In tale contesto, il recettore-2 del fattore di crescita vascolo-endoteliale (VEGFR-2), secreto dalle cellule tumorali gastriche o dalle cellule stromali intra-tumorali appare mediatore chiave dell'angiogenesi. Il Ramucirumab è un anticorpo monoclonale umanizzato che blocca in modo specifico il VEGFR-2 ed è attualmente l'unico farmaco antiangiogenico approvato per il carcinoma gastrico avanzato in progressione di malattia dopo una prima linea con derivati del platino e fluoropirimidine, sia in monoterapia (studio REGARD) che in associazione con il taxano Paclitaxel (studio RAINBOW).

Obiettivo dello studio

Il progetto prevede di:

A. analizzare in modo dinamico, in 40 pazienti con carcinoma gastrico (GC) avanzato in terapia di seconda linea con Ramucirumab e Paclitaxel, a seguito di progressione dopo un trattamento chemioterapico di prima linea, l'espressione dei più importanti Fattori di Crescita e citochine coinvolti nel processo di angiogenesi correlato alla neoplasia

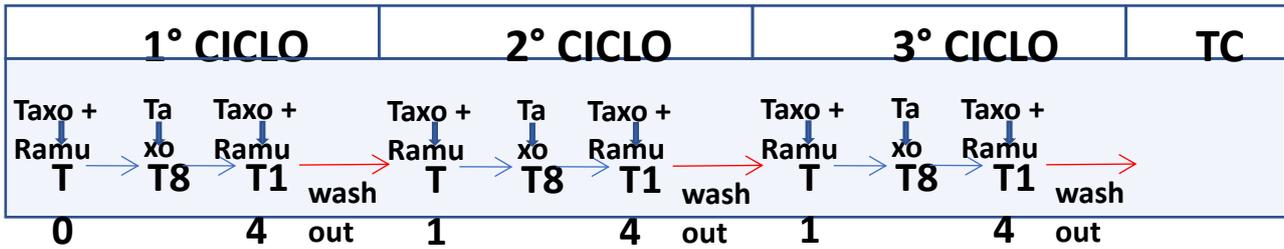
B. analizzare l'espressione *in situ* dei recettori VEGFR1/2/3, del VEGFA, della TUBBIII, di HER2 e di PDGFR nelle cellule tumorali da biopsie gastriche. Inoltre, nei pazienti arruolati nello studio sarà valutata la percentuale di vasi tumorali positivi per VEGFR2 al fine di stabilire il valore prognostico di tale marcatore.

Materiali e Metodi

Allo stato attuale sono stati reclutati 31 pazienti afferenti all' U.O. di Oncologia del nostro Istituto e 6 pazienti dall' Oncologia Medica della Seconda Università degli Studi di Napoli diretta dal prof. Ferdinando De Vita, con il quale è stata avviata una collaborazione scientifica relativamente al progetto in questione.

A seguito della firma del consenso informato, da ogni paziente entrato nello studio ci è pervenuto un prelievo ematico prima dell'inizio della terapia, che rappresenta il T0 (tempo di riferimento), e altri successivi durante la terapia, secondo lo schema di seguito riportato:

STUDIO DINAMICO



Lo studio prevede nei primi tre mesi della terapia 9 prelievi ematici complessivi, che costituiscono per ciascun paziente delle misurazioni ripetute e correlate. Dopo il terzo ciclo di terapia, alla fine del terzo mese, i pazienti sono sottoposti ad esami diagnostici strumentali al fine di valutare lo stato di avanzamento della malattia. Nel caso in cui venga riscontrata una rapida progressione viene modificato il piano terapeutico, mentre nei casi di controllo di malattia si prosegue la terapia in atto e vengono eseguiti ulteriori prelievi ematici. Dai campioni ematici di ciascun paziente si ottengono aliquote di siero, plasma e linfomonociti. Per la determinazione dei livelli dei fattori di crescita e delle citochine presenti nel siero è stata utilizzata la tecnologia Bio-PlexMagPIX Suspension Array System che permette un'analisi simultanea di differenti biomolecole all'interno dello stesso campione.

Risultati

Nelle prime indagini sierologiche effettuate su 40 campioni in doppio derivanti da 13 pazienti, in accordo con quanto riportato in letteratura, sono stati analizzati i seguenti analiti: VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, sVEGFR-1, sVEGFR-2, PDGF-AB/BB, FGF-basic, EGF, sEGFR, PLGF, sTIE-2, SCF and Angiopoietin-2 in quanto strettamente correlati al processo di neoangiogenesi tumorale. Nell'analisi abbiamo distinto due diversi gruppi di pazienti, sulla base della valutazione clinica effettuata dopo i primi tre mesi di trattamento. Un primo gruppo costituito da pazienti che mostravano progressione della malattia (gruppo A) e un secondo gruppo di pazienti che mostravano controllo di malattia (gruppo B) (risposta alla terapia o malattia stabile). I risultati preliminari ottenuti per VEGFA, VEGFR2, VEGFR1 e PDGF, hanno mostrato differenze nella variazione dei livelli di espressione nel tempo tra i pazienti del gruppo A e quelli del gruppo B. Infatti, nei pazienti in controllo di malattia, si assisteva ad un aumento transitorio del VEGFA dopo la prima somministrazione di Ramucirumab seguita da livelli bassi stabili fino alla progressione della malattia, mentre nei pazienti in rapida progressione lo stesso VEGFA si presentava con un aumento rapido e progressivo. VEGFR2 e VEGFR1 hanno mostrato uno schema opposto in quanto in caso di controllo di malattia il VEGFR2 risultava diminuito, mentre il VEGFR1 presentava livelli molto bassi destinati ad aumentare durante il trattamento. Al momento della progressione il pattern dei due recettori era invertito. L'andamento del PDGF si è mostrato sovrapponibile a quello del VEGFR2 diminuendo durante il controllo della malattia e aumentando durante la progressione.

Stato di avanzamento

E' in corso una seconda analisi sui sieri di 18 pazienti afferenti all' U.O. di Oncologia del nostro Istituto nel corso degli anni 2018/2019. La disponibilità di reperti biotipici consente di effettuare un'analisi di espressione *in situ* dei principali fattori bersaglio dell'azione del Ramucirumab, quali i recettori VEGFR1/2/3, HER2 e PDGFR nonché i fattori VEGFA, la TUBBIII nelle cellule e nei vasi tumorali. Tale analisi verterà condotta in collaborazione con l'Unità di Anatomia Patologica del nostro istituto.

Progetto n. 8: “Analisi del profilo degli acidi grassi e dell’espressione dei recettori CB1 e CB2 in campioni ematici di pazienti operati per cancro del colon-retto con e senza metastasi sincrone”

Responsabile Scientifico: *dott.ssa Maria Notarnicola*

Partecipanti: *Dionigi Lorusso, Maria Gabriella Caruso, Valeria Tutino, Valentina De Nunzio*

Background

La “*Lipidomica*” studia le molecole dei *lipidi* in modo “*dinamico*”, ovvero non solo comprendendo la struttura e le funzioni, ma soprattutto seguendo i cambiamenti che si verificano durante il “*metabolismo cellulare*”, in condizioni fisiologiche e patologiche, e definendone i ruoli nell’ambito del complesso equilibrio funzionale di un organismo vivente [1-5]. Diverse evidenze scientifiche hanno dimostrato che alterazioni della composizione lipidica della membrana cellulare sono associate al cancro coloretale (CRC), considerato una patologia metabolica dal momento che le cellule riprogrammano i loro pathways metabolici per sostenere l’elevata attività proliferativa.

Nella carcinogenesi del colon un ruolo importante viene svolto dal sistema endocannabinoide; confermando i dati della letteratura, abbiamo precedentemente dimostrato come il recettore CB1 sia poco espresso nel tumore rispetto al tessuto normale non neoplastico [6]. Inoltre, avendo già dimostrato che pazienti con CRC che presentavano metastasi al momento dell’intervento chirurgico mostravano un profilo lipidico sierico alterato rispetto ai pazienti con CRC senza metastasi sincrone [7], l’obiettivo di questo studio è stato individuare i profili lipidici di membrana caratteristici con elementi comuni di deficit, carenze o trasformazioni metaboliche nell’ambito dei gruppi dei pazienti selezionati. Da questi profili è stato possibile individuare le componenti bioattive/nutrizionali necessarie al recupero delle condizioni di equilibrio fisiologico. Il progetto prevedeva di studiare una eventuale associazione tra analisi lipidomica ed espressione dei recettori CB1 e CB2 che consente di comprendere i meccanismi molecolari che sono alla base di eventuali alterazioni o cambiamenti metabolici associati allo stato di malattia. Sui soggetti coinvolti nel progetto sono state anche valutate le LDL piccole e dense, la cui presenza è considerata un fattore di rischio per malattie dismetaboliche, incluso il cancro [8].

Obiettivi specifici dello studio:

Primario: individuare profili caratteristici con elementi comuni di deficit, carenze o trasformazioni metaboliche nell’ambito dei gruppi dei pazienti selezionati.

Secondario: associare l’analisi lipidomica allo studio dei recettori CB1 e CB2 al fine di comprendere i meccanismi molecolari che sono alla base di eventuali alterazioni o cambiamenti metabolici associati allo stato di malattia e quindi studiare strategie di intervento a livello alimentare e nutraceutico.

Risultati

Il progetto, concluso a dicembre 2019, ha reclutato n° 68 pazienti operati per carcinoma coloretale presso il reparto di Chirurgia del nostro Istituto. Da ciascun paziente è stato prelevato un campione di tessuto colico al momento dell’intervento chirurgico e un campione di siero.

Le caratteristiche dei pazienti reclutati sono mostrate in tabella

	<i>Pazienti con CRC (n.68)</i>	
	Senza metastasi (n = 35)	Con metastasi (n = 33)
Età	69.9 ± 13.8	68.7 ± 9.3
Sesso		
Maschi	19	22
Femmine	16	11
Sede del Tumore		
Colon destro (flessura epatica, ceco e colon ascendente)	17	12
Colon sinistro (colon discendente, sigma e retto)	18	21
Stadio del Tumore		
Stadio I	5	2
Stadio II	24	2
Stadio III	5	19
Stadio IV	1	10
Grado di differenziazione		
Ben differenziato (G1)	4	2
Moderatamente differenziato (G2)	20	16
Scarsamente differenziato (G3)	11	15
Sito delle metastasi		
Fegato	0	13
Linfonodi viscerali	0	18
Osso	0	1
Polmone	0	1

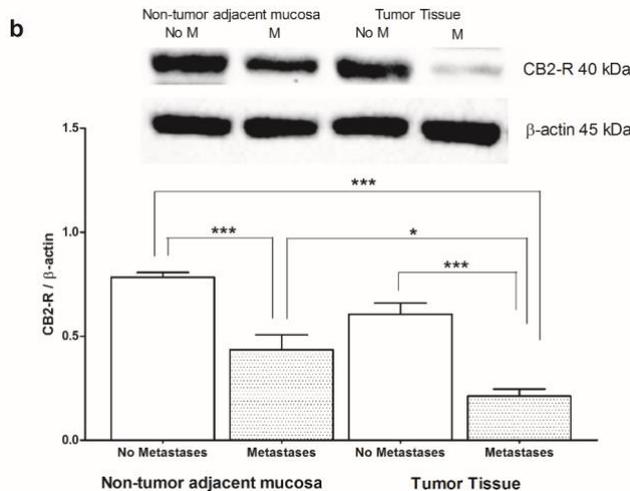
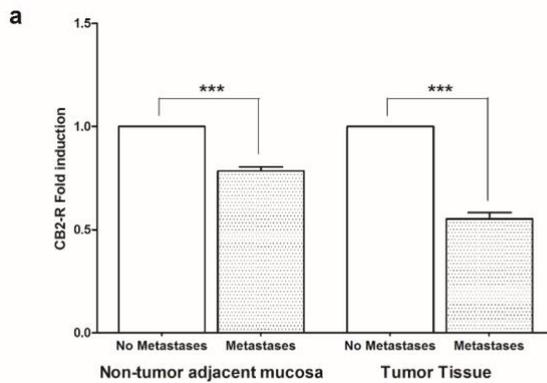
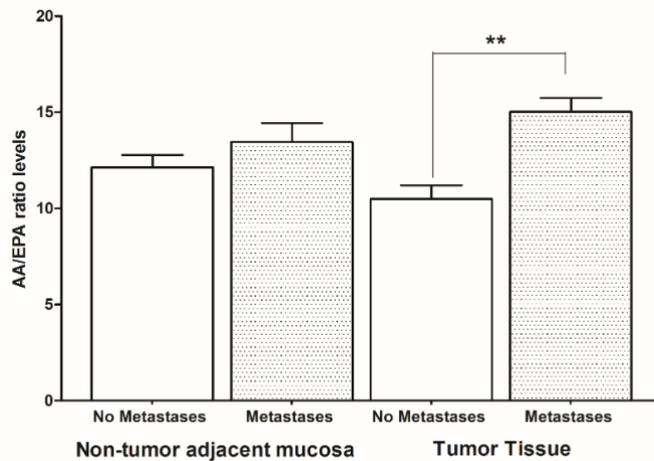
Sui campioni di tessuto dei pazienti con CRC, senza e con metastasi, è stata effettuata l'analisi lipidomica.

	Mucosa normale			Tumore		
	No Metastasi	Metastasi	<i>p</i> -value °	No Metastasi	Metastasi	<i>p</i> -value °
SFAs	42.09±5.1	47.54±7.8	0.62	49.97±4.2	48.53±3.9	0.84
MUFAs	40.54±3.5	38.22±4.0	0.73	32.20±2.7	33.71±4.3	0.90
PUFAs	17.37±2.0	15.99±1.9	0.60	17.83±3.1	16.7±0.8	0.77
n-6/n-3	8.85±5.82	15.10±16.2	0.40	6.2±4.5	15.2±9.2	0.04
Stearic acid	15.2±6.8	18.8±7.8	0.22	18.56±7.5	19.6±6.7	0.71
Oleic acid	28.2±8.4	35.5±6.6	0.30	18.6 ±4.5	21.3±3.9	0.62
SI *	0.95±1.5	0.72±1.42	0.51	0.98±0.49	1.5±0.7	0.86
GLA	0.16±0.6	0.26±0.8	0.83	0.09±0.11	0.34±0.2	0.05
EPA	0.47±0.6	0.36±0.7	0.32	0.99±0.54	0.46±0.54	0.002
DHA	0.4±0.35	0.2±0.18	0.30	0.69±0.48	0.54±0.6	0.24

SFA= acidi grassi saturi; MUFAs= acidi grassi monoinsaturi; PUFAs= acidi grassi polinsaturi; GLA= acido gamma-linolenico; EPA= acido eicosapentanoico; DHA= acido docoesanoico;

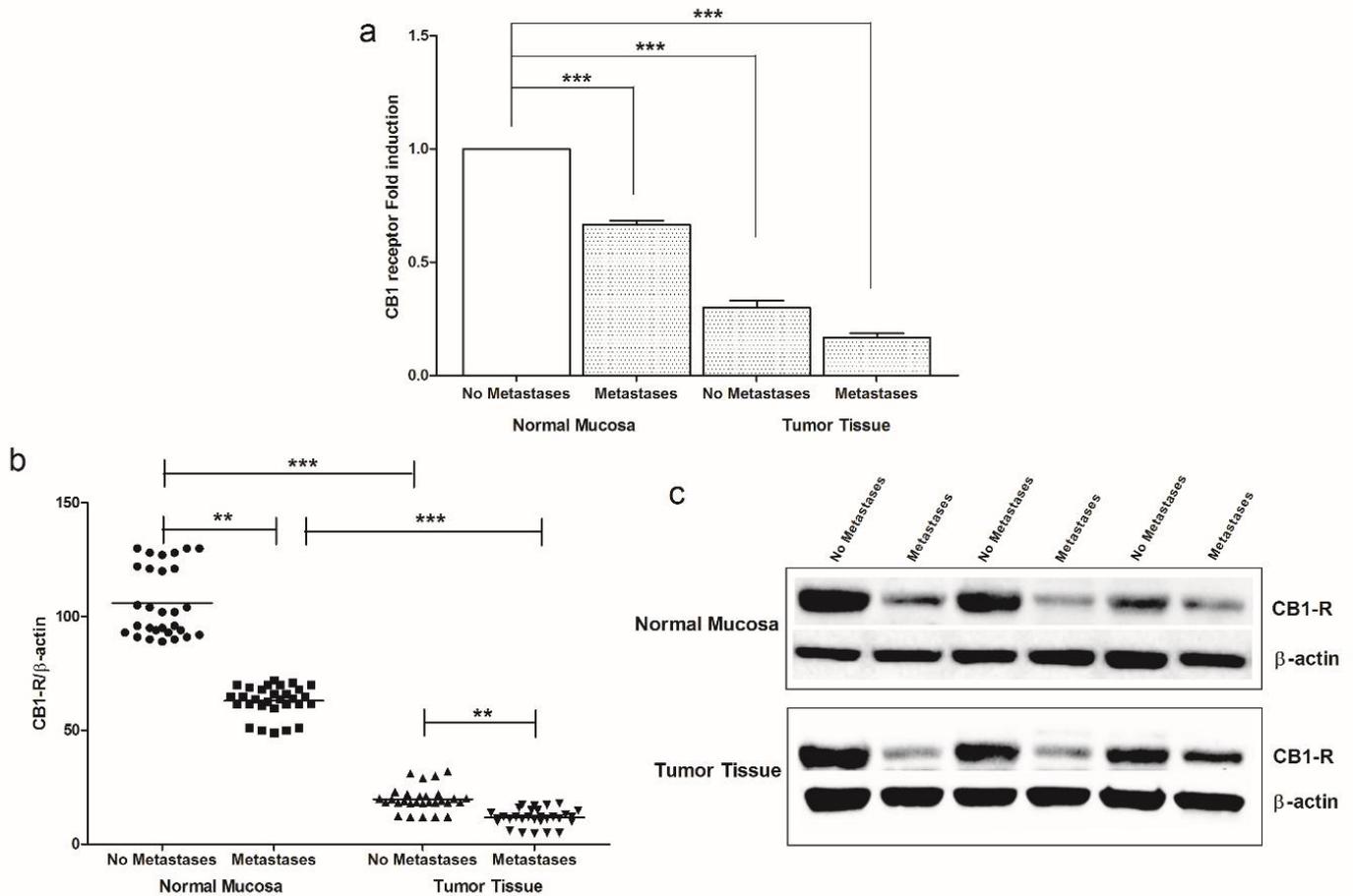
* Saturation Index (stearic acid/oleic acid ratio); °Wilcoxon rank-sum (Mann Whitney) test; I valori sono espressi come Media ± Deviazione Standard

Inoltre, i pazienti con metastasi sincrone mostravano un più alto valore del rapporto AA/EPA (acido arachidonico/acido eicosapentanoico). I più alti livelli di acido arachidonico si associavano ad una down-regolazione del recettore CB2 degli endocannabinoidi. La riduzione dell'espressione genica e proteica di CB2, trovata nel tessuto tumorale dei pazienti con metastasi rispetto a quelli senza metastasi, conferma che si ha la perdita dell'azione antinfiammatoria e antiproliferativa del CB2 nel cancro. I dati suggeriscono che l'approccio lipidomico permette di valutare i cambiamenti nella composizione delle membrane cellulari. Questi cambiamenti sono importanti sia nella trasformazione neoplastica del tessuto colico che nel processo di formazione delle metastasi.

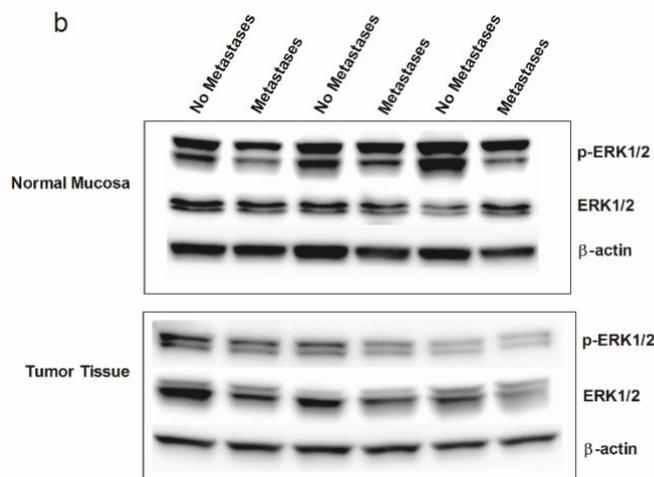
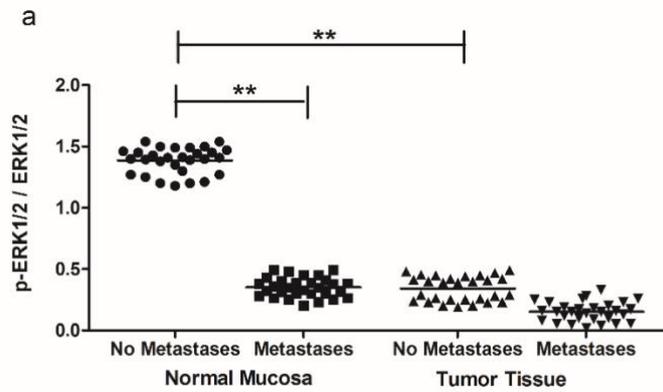
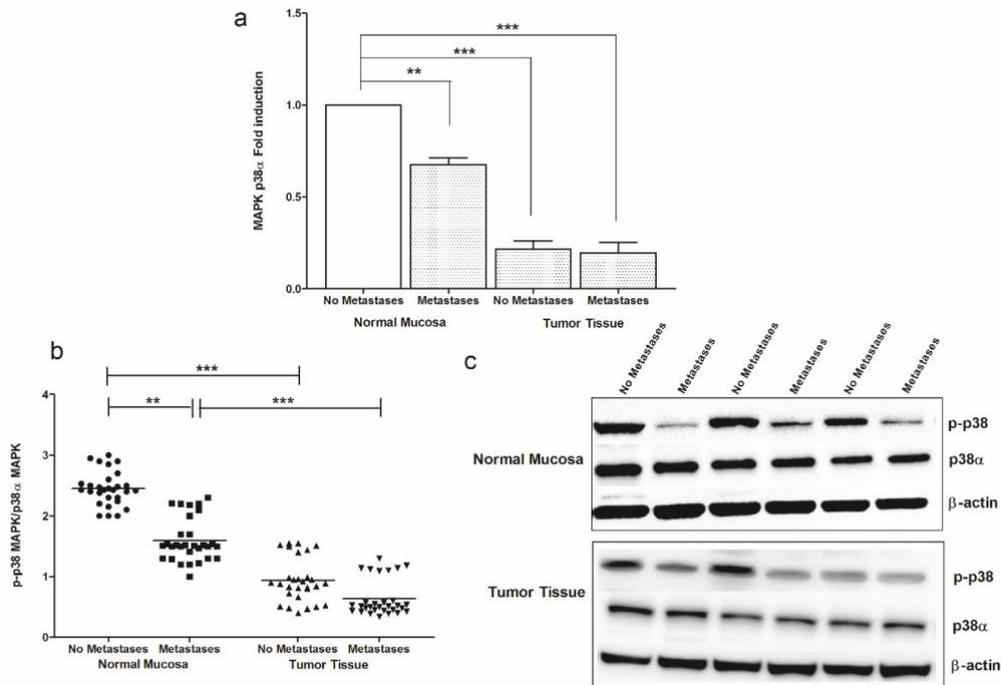


Al fine di comprendere i meccanismi molecolari che sono alla base di eventuali alterazioni o cambiamenti metabolici associati allo stato di malattia, sui campioni di tessuti raccolti in sede di intervento chirurgico è stata valutata anche l'espressione del recettore CB1.

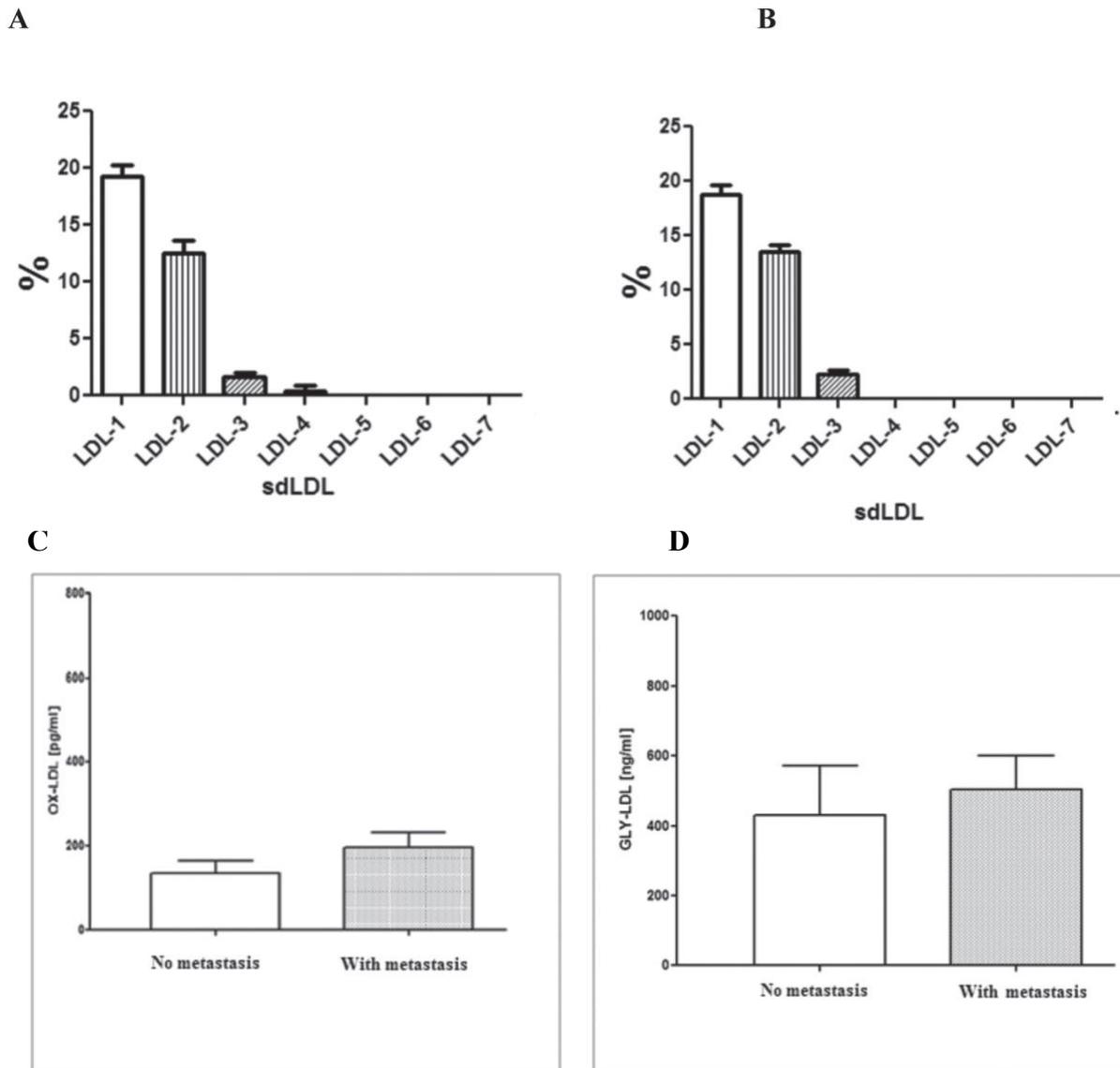
Abbiamo trovato una riduzione dei livelli del recettore CB1 nel tumore rispetto al tessuto sano circostante la neoplasia. Inoltre, la down-regolazione del recettore CB1 era statisticamente più significativa nei pazienti con metastasi sincrone.



Fra i pathways metabolici regolati dal recettore CB1 abbiamo studiato i livelli delle MAP kinasi e di ERK e pERK. Come mostrato nelle figure seguenti, si osservava una riduzione significativa di queste proteine regolatrici della proliferazione cellulare nel tessuto tumorale. Come per il recettore CB1, la down-regolazione di queste molecole si associava alla presenza delle metastasi.



Uno degli obiettivi del progetto era quello di valutare i livelli delle LDL piccole e dense (sdLDL) nel siero dei pazienti reclutati nello studio, nonché i livelli delle LDL ossidate e glicate.



I dati dimostrano che i pazienti con metastasi sincrone hanno un pattern delle sdLDL alterato (panel A), rispetto ai pazienti senza metastasi (panel B). La presenza della metastasi si associava alla presenza della frazione IV, considerata la più aterogena tra le sdLDL e a più alti livelli di LDL ossidate e glicate (panel C e D).

Bibliografia:

1. Mozaffarian D. *Curr. Atheroscler. Rep.* 2005,7:435-45
2. Ailhaud G et al. *Obes. Rev.* 2004,5:21-26
3. Mozaffarian D et al. *Circulation.* 2005,112:1945-52
4. Lankinen M et al. *PLoS ONE* 2009,4:e5258.doi:10.1371/journal.pone.0005258
5. Dandona P et al. *Circulation*, 2005,111:1448-1454
6. Gazzo P et al. *Oncology Rep* 23: 171-175, 2010
7. Notarnicola M et al. *Oncology* 2005; 68: 371-374
8. Gentile M et al. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2017; 61:130-134

Progetto n. 9: “Nuovi bersagli terapeutici nella terapia personalizzata nel cancro del colon retto (CCR): manipolazione farmacologica dell’asse Mapk-Foxo3a e medicina mitocondriale”

Responsabile: dott. Cristiano Simone

Partecipanti: Dott.ssa Martina Lepore Signorile

Background

L'esistenza di vie di segnalazione cancro-specifiche e di deregolazioni molecolari uniche da paziente a paziente sottolinea l'importanza strategica della caratterizzazione genomica per sviluppare terapie personalizzate più efficienti.

I recenti progressi nelle tecnologie di sequenziamento del DNA hanno permesso di identificare in breve tempo ed in maniera completa le alterazioni dei geni e delle vie di segnalazione coinvolte nel processo tumorigenico, aumentando la possibilità che terapie mirate contro i target molecolari del cancro possano essere estese a una più ampia casistica per formulare strategie terapeutiche sempre più personalizzate [1]. Nei prossimi anni, si prevede che la caratterizzazione genomica completa dei pazienti rivoluzionerà la terapia del cancro, diventando uno strumento ordinario nella diagnostica clinica, per garantire diagnosi sempre più precoci, e soprattutto terapie mirate. Il cancro del colon-retto (CCR) rappresenta una sfida formidabile per i ricercatori di tutto il mondo, non solo dal punto di vista dell'incidenza epidemiologica, ma anche per la sua eterogeneità molecolare. Infatti, è noto che le mutazioni molecolari associate al cancro del colon retto possono essere uniche determinando diversi fenotipi della patologia [2]. Per tale ragione un numero sempre crescente di pazienti affetti da CCR viene selezionata nei trials clinici per essere sottoposta a trattamenti anticancro personalizzati. In particolare, il 15% di oltre 25.000 pazienti oncologici testati al centro Sloan Kettering potrebbe avere accesso a uno dei farmaci approvati dalla FDA, e il 10% a farmaci attualmente in uso nei trials clinici. Un'altra parte, il 10-15%, presenta alterazioni del DNA che li rendono potenzialmente candidati per farmaci testati sugli animali. Tuttavia, va sottolineato che la regressione del tumore è stata osservata solo nel 6,6% dei pazienti eleggibili. Infatti, in molti pazienti si verifica recidiva dopo un paio di anni dal trattamento terapeutico [3]. L'insorgere della chemio-resistenza è responsabile del limitato successo di vari farmaci. In effetti, il blocco di una via di segnalazione, come quella di RAS, può indurre solo un effetto citostatico, mentre l'inibizione di più vie di segnalazione coinvolte nella chemio-resistenza induce chemio sensibilità al farmaco e quindi un effetto citotossico finale [4]. Queste considerazioni evidenziano la rilevanza della caratterizzazione genetico-molecolare del tipo di tumore e dell'indagine preclinica, al fine di stabilire nuovi approcci terapeutici basati sull'uso di farmaci più specifici, mirati contro le molecole cruciali delle vie di segnalazione cancro-specifiche. Un recente studio ha mostrato un'interessante caratterizzazione delle alterazioni somatiche in CCR. Oltre alle attese mutazioni in APC, TP53, SMAD4, PIK3CA e KRAS, sono state trovate aberrazioni genomiche significative in IGF2, IGFR, ERBB2, ERBB3, MEK, AKT, MTOR e SRC e queste convergono tutte sul fattore di trascrizione FoxO3A, suggerendo che diverse proteine coinvolte nelle più critiche vie di segnalazione correlate al cancro, come le vie RTK-RAS e PI3K, possano essere oggetto dell'inibizione [5, 6]. La regolazione dell'attività di FoxO3A in risposta a stimoli extracellulari gioca un ruolo fondamentale nell'omeostasi cellulare, essendo un fattore di trascrizione cruciale nel meccanismo molecolare che guida le cellule verso la sopravvivenza o la morte. Infatti, FoxO3A è controllato da una vasta gamma di stimoli esterni, che non solo regolano la sua attività trascrizionale, ma ne influenzano anche la sua localizzazione subcellulare. Questi meccanismi di regolazione sono mediati da vie di segnalazione correlate alla cancerogenesi, che alla fine determinano modifiche post-traduzionali (PTM) di FoxO3A (come ad esempio la fosforilazione). I nostri recenti risultati hanno dimostrato che FoxO3A si localizza nei mitocondri di cellule tumorali e tessuti non tumorali sottoposti a stress metabolico e a chemioterapici (CHT) [7-9]. Abbiamo identificato due residui di serina di FoxO3A, la S12 e la S30 (entrambi fosforilate in cellule tumorali umane) [7]. In risposta allo stress metabolico, queste serine sono fosforilate rispettivamente dalla MAP chinasi ERK nella via di MEK/ERK e dalla chinasi AMPK. Questo doppio segnale fosforilativo su FoxO3A comporta la traslocazione di questa proteina nei

mitocondri, dove si lega al DNA mitocondriale formando un complesso con TFAM, mtRNAPOL e SIRT3. La formazione di tale complesso permette l'espressione del genoma mitocondriale soprattutto di quei geni responsabili del metabolismo ossidativo del mitocondrio. L'effetto finale della traslocazione mitocondriale di FoxO3A è quello di sostenere la funzionalità ossidativa mitocondriale nelle cellule tumorali metabolicamente stressate e/o trattate con CHT. La correlazione tra le vie a cascata di MEK/ERK e di AMPK (che convergono in specifiche fosforilazioni del dominio N-terminale di FoxO3A) rappresenta solo il primo capitolo del "codice mitocondriale" di FoxO3A, suggerendo l'ipotesi che le cellule cancerose siano altamente suscettibili all'inibizione della fosforilazione ossidativa, e che gli inibitori della traduzione mitocondriale possono agire come sensibilizzanti per le (chemio)terapie anticancro [10, 11]. Il piano sperimentale previsto in questo progetto mira a caratterizzare i meccanismi coinvolti nella chemio-resistenza mediata dalla forma mitocondriale di FoxO3A (mtFoxO3A) impiegando cellule di CCR mutate stabilmente per il gene FoxO3A. Tali cellule sono generate attraverso trasfezioni stabili di costrutti mutanti e deleti di FoxO3A in cellule KO per il gene FoxO3A. Ripristinando stabilmente la funzione di FoxO3A in cellule di CCR FoxO3A KO andremo a manipolare la localizzazione di FoxO3A, mediante la modulazione di vie di segnalazione correlate al cancro. Questo meccanismo potrebbe rivelarsi molto promettente per contrastare la resistenza della cellula tumorale alla chemioterapia tradizionale.

Obiettivo dello studio

Caratterizzazione del meccanismo di chemio-resistenza mediato da mtFoxO3A in cellule di CCR mutate stabilmente e trattate con farmaci a bersaglio molecolare e agenti antineoplastici.

Materiali e metodi

Il ruolo di mtFoxO3A in risposta a terapie multi-farmaco è stata analizzata in cellule HCT116 FoxO3A +/- e in cellule trasfettate stabilmente con un pattern di costrutti mutanti e trattate con chemioterapici come irinotecano (CPT-11) ed etoposide (VP-16).

Le linee cellulari trasfettate stabilmente sono state ottenute mediante trasfezione delle linee cellulari di CCR HCT116-FoxO3A +/- con costrutti che esprimono il gene per la resistenza all'antibiotico geneticina (G-418) e i geni di nostro interesse (empty, FoxO3A wt, FoxO3A-S12A, FoxO3A-d242-271). Dopo 48-72h dalla trasfezione, le cellule trasfettate sono state selezionate utilizzando una concentrazione ottimale di G-418 (500 µg/ml) preventivamente ricavata mediante una curva dose/risposta (curva Killer). La tossicità cellulare dell'antibiotico G-418 è stata valutata ogni 24 ore mediante osservazione al microscopio ottico. In seguito, le cellule sono state mantenute in coltura per circa 9 giorni sostituendo il terreno implementato con l'antibiotico due volte a settimana. Dopo nove giorni dalla trasfezione iniziale le cellule sopravvissute sono state piastrate a una densità di 10 cellule /ml al fine di selezionare singoli cloni mutati stabilmente. Al fine di verificare l'avvenuta trasfezione dei costrutti desiderati, abbiamo sequenziato i cloni cellulari selezionati per accertarci che ogni clone esprimesse stabilmente i costrutti trasfettati inizialmente, ovvero il plasmide empty e i costrutti FoxO3Awt, FoxO3A-S12A/S30A e FoxO3A-d242-271.

Successivamente, le cellule sono state valutate per vitalità, morte cellulare. Dopo i trattamenti, la vitalità cellulare è stata valutata indirettamente monitorando l'apoptosi attraverso i seguenti test: MTT/proliferazione, IB (FoxO3A N-terminale, fosfo-ERK, e PARP clivato, BIM) e IF (TMRE-potenziale di membrana mitocondriale e MitotrackerRed), Q-PCR e IB analisi dei geni codificati a livello mitocondriale (ND6, COX1).

Risultati / stato di avanzamento per la seconda annualità di progetto

In questa fase di progetto, come previsto da programmazione iniziale, abbiamo analizzato il ruolo funzionale della forma mitocondriale di FoxO3A (mtFoxO3A) nei meccanismi di chemio-resistenza in cellule di CCR trasfettate stabilmente e sottoposte a stimoli metabolici e a trattamenti con agenti antineoplastici e/o con farmaci biologici a bersaglio molecolare. In particolare, abbiamo caratterizzato dal punto di vista molecolare il ruolo mitocondriale di FoxO3A in risposta a stress metabolico indotto da deprivazione di glucosio (LG) e a stress genotossico indotto da chemioterapici ad azione antineoplastica (CPT-11, VP-16).

Per queste indagini funzionali *in cellulo* abbiamo impiegato come modello di studio le cellule di CCR HCT116 FoxO3A knockout generate mediante il sistema di genome editing CRISPR/CAS9 (HCT116-FoxO3A -/-) trasfettate stabilmente con il plasmide vuoto (plasmide empty) e con i costrutti di FoxO3A wt, di FoxO3A-S12A/S30A (sostituzione concomitante di entrambe le serine per abrogare completamente la localizzazione mitocondriale FoxO3A), e con il costrutto FoxO3A-d242-271 (costrutto delecto privo della sequenza di localizzazione nucleare, NLS).

In seguito, abbiamo valutato la localizzazione subcellulare di FoxO3A in queste cellule trasfettate stabilmente mediante l'analisi per Immunoblot di estratti mitocondriali sottoposti a purificazione con proteinasi K. Confermando i nostri studi preliminari, l'analisi densitometrica dei blot relativi ad estratti mitocondriali di cellule stabili per l'espressione di FoxO3A-S12A/S30A, ha rivelato l'assenza di localizzazione mitocondriale confermando che S12 e S30 sono entrambe responsabili per la traslocazione mitocondriale di FoxO3A in cellule di cancro sottoposte a stress metabolico (Fig.3a). Il trattamento con la proteinasi K ha permesso di stabilire la precisa localizzazione di FoxO3A nella matrice mitocondriale di cellule FoxO3A wt e/o FoxO3A-d242-271 che conservano l'estremità N-terminale, target dei processi di import mitocondriale (MPP, MIP). Le linee che esprimono stabilmente FoxO3A wt e FoxO3A-d242-271 mostrano la proteina ricombinante FoxO3A sulla membrana esterna e localizzano all'interno del mitocondrio nella sua forma clivata (Fig.3a). Quest'analisi conferma che la concomitante sostituzione delle serine 12 e 30 in alanina va ad abrogare i segnali di fosforilazione mediati da ERK (sulla serina 12) e da AMPK (sulla serina 30) che sono risultati fondamentali per la localizzazione mitocondriale di FoxO3A [7] (Fig.3a).

In tutte le nostre linee trasfettate stabilmente, abbiamo quindi valutato la localizzazione subcellulare di FoxO3A e i suoi effetti sulla vitalità/morte cellulare in risposta a stress metabolico indotto da deprivazione di glucosio (LG). Questa vasta caratterizzazione funzionale dei mutanti stabili è stata eseguita mediante immunoblot sulla frazione mitocondriale, analisi dell'espressione di geni mitocondriali per QPCR, immunofluorescenza (Fig.3b-f).

I saggi di vitalità/morte cellulare dei mutanti stabili sottoposti a stress metabolico confermano un incremento della sopravvivenza cellulare in quelle cellule in cui era stata ricostituita stabilmente l'espressione di FoxO3A wt. Da notare che a differenza del mutante stabile S12A/S30A, il mutante FoxO3A-d242-271 era ancora in grado di proteggere le cellule da morte cellulare dopo stress metabolico (Fig.3b,c).

Questi risultati hanno sottolineato l'importanza cruciale dei segnali fosforilativi sulle serine 12 (target di ERK) e 30 (target di AMPK) di FoxO3A (Fig.3d) nella resistenza delle cellule tumorali allo stress metabolico.

Inoltre, mediante analisi dell'espressione genica QPCR dei mutanti abbiamo osservato che solo wt e d242-271 presentavano un incremento dell'attività trascrizionale di geni target mitocondriali come ND6 e COX1; mentre nel mutante S12A/S30A viene attivata la trascrizione nucleare di BIM, gene pro-apoptotico (Fig.3e).

La caratterizzazione per immunofluorescenza delle linee trasfettate stabilmente ha evidenziato che, come mostrato dal grafico riportato in figura 3f la forma clivata di FoxO3A è necessaria per mantenere il potenziale di membrana nei mitocondri funzionalmente attivi delle cellule cancerose (colorazione con TMRE per visualizzare lo status di polarizzazione delle membrane). Infatti, la colorazione con TMRE non avviene nelle cellule mutanti S12A/S30A (Fig. 3f).

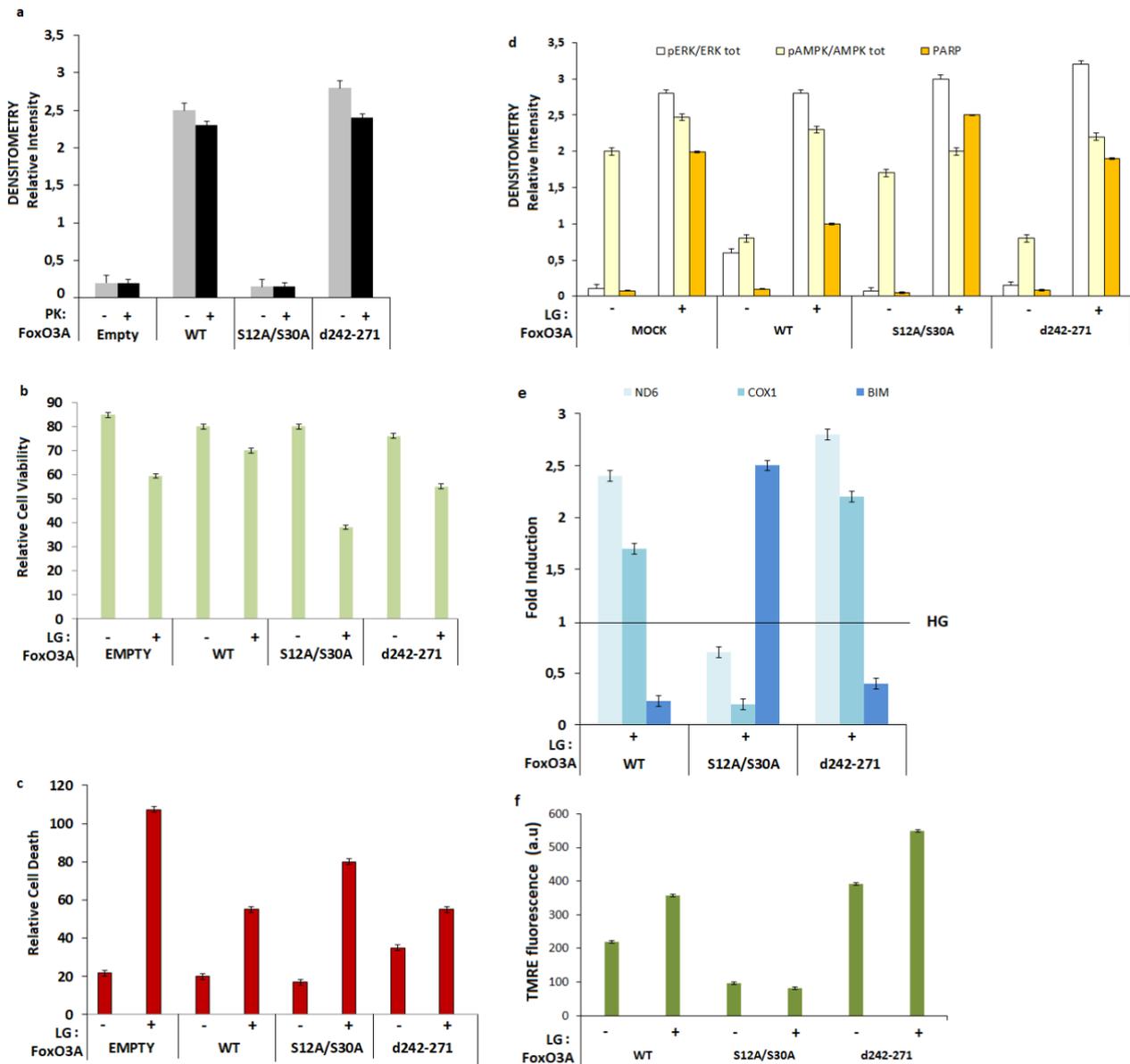


Figura 3: Caratterizzazione funzionale dei mutanti stabili di FoxO3A (empty, wt, S12A/S30A, d242-271) in risposta a stress metabolico (LG). **a.** Analisi densitometriche dell'immunoblot in cellule HCT116 -/- trasfettate stabilmente con i plasmidi indicati e sottoposte al trattamento con proteinasi K. **b,c.** saggi di vitalità e morte cellulare in cellule trasfettate con i plasmidi indicati e sottoposte a stress metabolico (LG); **d.** analisi densitometriche dei risultati del western blot ottenute attraverso il software ImageJ. I valori sono stati calcolati effettuando il ratio delle proteine fosforilate sulla proteine totali (p-ERK/ERK tot e p-AMPK/AMPK tot) e poi calcolati sulle rispettive actine; **e.** analisi dei livelli di espressione genica di BIM e dei geni target mitocondriali mediante QPCR dopo induzione di stress metabolico; **f.** analisi per immunofluorescenza dei livelli di TMRE in in cellule HCT116 -/- trasfettate con i plasmidi indicati e sottoposte a stress metabolico.

Successivamente, al fine di investigare il ruolo di FoxO3A nel mitocondrio nei meccanismi di chemio-resistenza abbiamo valutato nelle cellule trasfettate stabilmente gli effetti della risposta a stress genotossico indotto con irinotecano (CPT-11). I saggi di vitalità e morte cellulare hanno evidenziato un incremento della sopravvivenza cellulare nelle linee cellulari che esprimevano stabilmente FoxO3A wt (Fig.4a), mentre il doppio mutante stabile S12A/S30A non era in grado di proteggere la cellula dall'apoptosi indotta da CHT (Fig. 4a) come dimostrato dall'incremento dell'espressione di BIM e dall'aumento dei livelli di PARP, ovvero due attori cruciali della risposta apoptotica (Fig 4b,c).

Da notare che i mutanti stabili FoxO3A-wt e d242-271 in cui è stata ripristinata la funzionalità di mtFoxO3A mostrano un incremento dell'espressione dei geni target mitocondriali ND6 e COX1 (Fig. 4c) confermando ulteriormente l'ipotesi che mtFoxO3A svolga un ruolo fondamentale nella chemio-resistenza, favorendo l'incremento del metabolismo ossidativo mitocondriale e quindi la sopravvivenza di cellule trattate con chemioterapici.

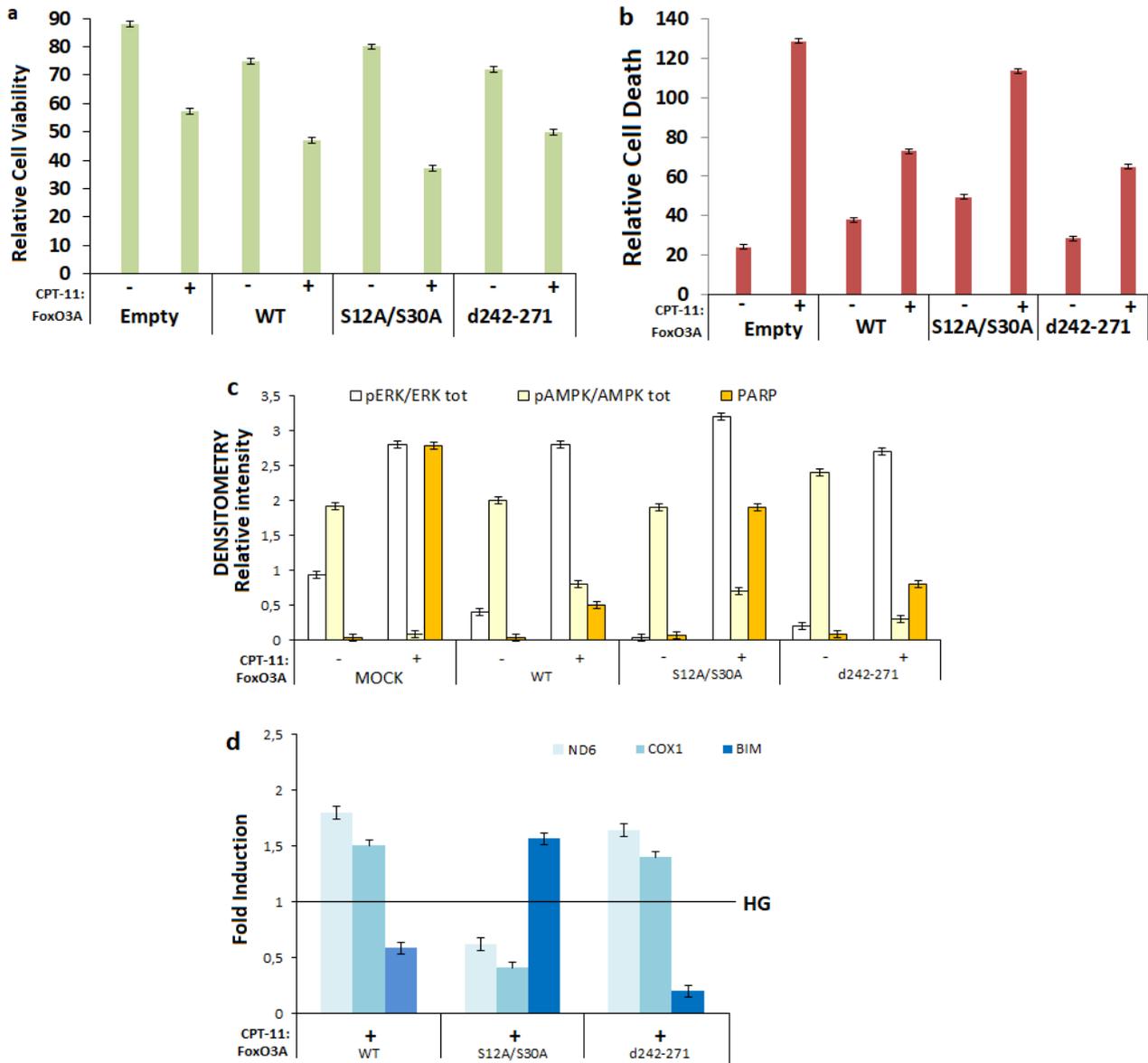


Figura 4: Caratterizzazione funzionale dei mutanti stabili di FoxO3A (empty, wt, S12A/S30A, d242-271) in risposta a stress genotossico indotto da CPT-11 **a,b.** saggi di vitalità e morte cellulare in cellule trasfettate con i plasmidi indicati e sottoposte a stress genotossico indotto da CPT-11; **c.** analisi densitometriche dei risultati del western blot ottenute attraverso il software ImageJ. I valori sono stati calcolati effettuando il ratio delle proteine fosforilate sulla proteine totali (p-ERK/ERK tot e p-AMPK/AMPK tot); **d.** analisi dei livelli di espressione di BIM e dei geni target mitocondriali mediante QPCR.

In questi ultimi mesi sono proseguiti i nostri studi sul ruolo mitocondriale di FoxO3A nei meccanismi di chemio-resistenza. Nelle cellule trasfettate stabilmente abbiamo valutato gli effetti della risposta a

stress genotossico indotto con un altro chemioterapico, l'etoposide (VP-16). Anche in questo caso come per i trattamenti con CPT-11, i saggi di vitalità e morte cellulare hanno evidenziato un incremento della sopravvivenza cellulare nelle cellule che esprimevano stabilmente FoxO3A wt (Fig.5a,b), mentre il doppio mutante stabile S12A/S30A non era in grado di proteggere la cellula dall'apoptosi indotta da CHT (Fig. 5a,b) come dimostrato dall'incremento dell'espressione di BIM e dall'aumento dei livelli di PARP, ovvero due attori cruciali della risposta apoptotica (Fig 5c,d). Da notare che i mutanti stabili FoxO3A-wt e d242-271 in cui è stata ripristinata la funzionalità di mtFoxO3A mostrano un incremento dell'espressione dei geni target mitocondriali ND6 e COX1 (Fig. 5c, d). I dati ottenuti a seguito del trattamento con VP-16 confermano ulteriormente l'ipotesi che mtFoxO3A svolga un ruolo fondamentale nella chemio-resistenza, favorendo l'incremento dell'espressione dei geni mitocondriali coinvolti nel metabolismo fosfo-ossidativo e nella catena respiratoria e quindi promuovendo la sopravvivenza di cellule trattate con chemioterapici.

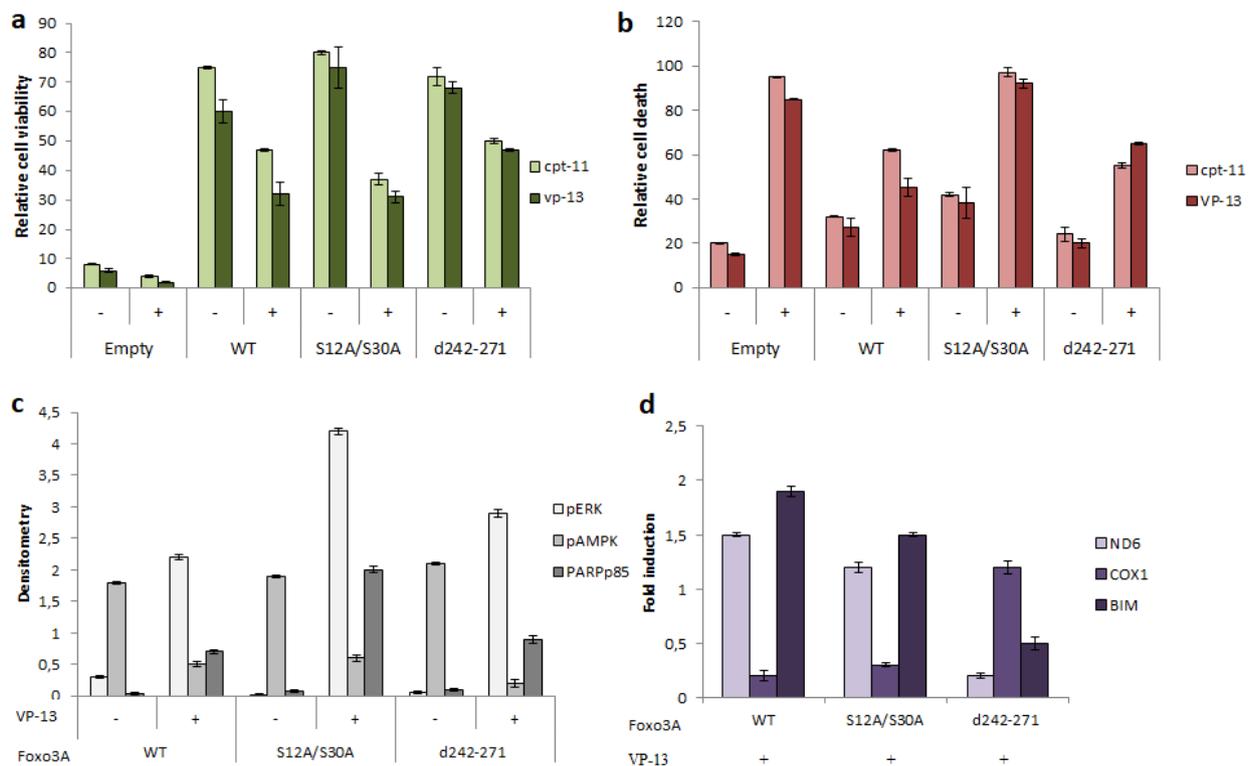


Figura 5: Caratterizzazione funzionale dei mutanti stabili di FoxO3A (empty, wt, S12A/S30A, d242-271) in risposta a stress genotossico indotto da VP-16 **a,b.** saggi di vitalità e morte cellulare in cellule trasfettate con i plasmidi indicati e sottoposte a stress genotossico indotto da CPT-11 e VP-16; **c.** analisi densitometriche dei risultati del western blot ottenute attraverso il software ImageJ. I valori sono stati calcolati effettuando il ratio delle proteine fosforilate sulla proteine totali (p-ERK/ERK tot e p-AMPK/AMPK tot); **d.** analisi dei livelli di espressione di BIM e dei geni target mitocondriali (COX-ND6) in cellule sottoposte a stress genotossico indotto da VP-16 mediante QPCR.

Concludendo, durante questa prima fase della seconda annualità progettuale abbiamo caratterizzato la risposta delle cellule di CCR mutate stabilmente e trattate con agenti chemioterapici. Abbiamo infatti dimostrato come la traslocazione di FoxO3A nel mitocondrio supporta indirettamente il meccanismo

della fosforilazione ossidativa fondamentale per la sopravvivenza delle cellule tumorali sottoposte a stress genotossico indotto dal trattamento con farmaci chemioterapici (CPT-11 e VP-16).

In questo periodo, dopo la ripresa delle attività sperimentali in istituto (a seguito di lockdown per pandemia COVID-19), sono in corso gli esperimenti relativi alle attività progettuali previste da obiettivo 2. Quest'ultime sono incentrate sull'ampliamento delle linee cellulari di CCR con background genetici differenti che saranno sottoposte a trattamenti combinati con chemioterapici ed inibitori farmacologici delle vie di segnalazione implicate nella chemio-resistenza promossa dalla forma mitocondriale di FoxO3A.

Bibliografia

1. Garraway LA, Lander ES. *Cell*. 2013 Mar 28;153(1):17-37.
2. Linnekamp JF, Wang X, Medema JP, Vermeulen L. *Cancer Res*. 2015 Jan 15;75(2):245-9.
3. Marquart J, Chen EY, Prasad V. *JAMA Oncol*. 2018 Apr 17.
4. Chiacchiera F, Grossi V, Cappellari M et al., *Cancer Lett*. 2012 Nov 1;324(1):98-108.
5. Cancer Genome Atlas Network. *Nature*. 2012 Jul 18;487(7407):330-7.
6. Zhang B, Wang J, Wang X et al., NCI CPTAC. *Nature*. 2014 Sep 18;513(7518):382-7.
7. Celestini V, Tezil T, Russo L, et al., *Cell Death Dis*. 2018 Feb 14;9(2):231.
8. Grossi V, Fasano C, Celestini V, et al. *Cancers (Basel)*. 2019;11(3):414.
9. Fasano C, Disciglio V, Bertora S, et al. *Cells*. 2019;8(9):1110.
10. Kuntz EM, et al. *Nat. Med*. 2017;23:1234-1240.
11. Tan J, Song M, Zhou M, Hu Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2017;483:17-23.

Progetto n. 10: Sviluppo di una piattaforma di nanomedicina nelle malattie neoplastiche ed infiammatorie gastrointestinali.

Responsabile: Silke Krol

Nel presente progetto proponiamo di sviluppare nanoparticelle d'oro (AuNP) con un rivestimento di lectine, selettive per le differenze del glicoma nelle aree intestinali infiammate, da utilizzare come agenti di contrasto orali. Queste NPs possono essere visualizzate tramite computed tomography (CT) e dovrebbero permettere, lungo l'intera lunghezza dell'intestino ed in maniera non invasiva, una maggior distinzione tra l'aspetto a "chiazze" tipico dell'intestino affetto da malattia di Crohn (CD) e quello con infiammazione uniforme e continua affetto da colite ulcerosa (UC). Inoltre, queste NPs potrebbero anche permettere allo stesso tempo degli approcci terapeutici: i) come sistema di targeted drug delivery per farmaci classici come il Metotrexato e II) per l'applicazione più innovativa di ipertermia localizzata.

Sviluppo di Lectin-NPs: Le lectine sono ben conosciute per il loro legame specifico alle glicoproteine delle superfici cellulari e per permettere l'identificazione di cellule infiammate o neoplastiche. Ricerche precedenti hanno mostrato che le lectine possono essere d'aiuto nella diagnosi differenziale dell'IBD. Inoltre, è stato visto che la peanut agglutinin (PNA) si lega selettivamente alle aree infiammate sia nell'UC che nel CD. Perciò, programiamo di usare le lectine come molecole targeting sulle AuNP.

La preparazione delle AuNP avverrà tramite un approccio di "green chemistry" in modo da limitare il numero di reagenti, come solventi o riducenti aggressivi, che possono indurre reazioni avverse nell'intestino infiammato.

Sono state sviluppate diverse AuNPs preparate tramite green chemistry con una varietà di molecole differenti, ed usate come antibiotici ed antivirali. AuNPs con lectine sono ancora in via di sviluppo.

I primi studi di legame con differenti lectine sono stati eseguiti su esosomi isolati da diverse linee cellulari tumorali. In modo da ridurre il materiale usato e da sviluppare una potenziale piattaforma di biopsia liquida, abbiamo sviluppato un protocollo per la separazione degli esosomi tramite cromatografia su strato sottile (TLC). Il protocollo necessita ancora di essere ottimizzato, in quanto ancoranon sono state ottenute bande distinguibili, come osservato nell'immagine.

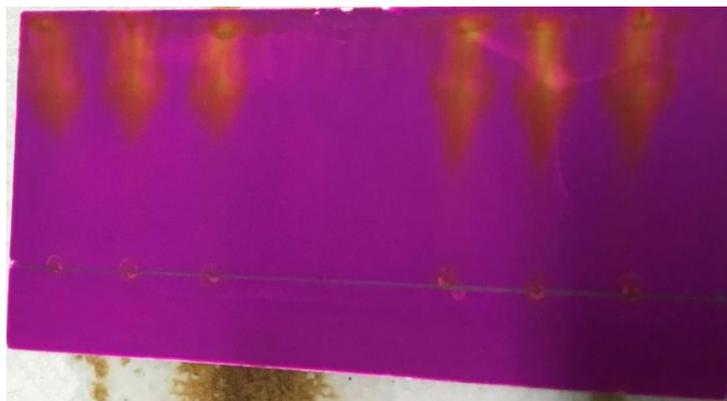


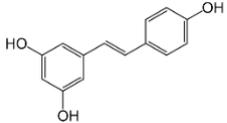
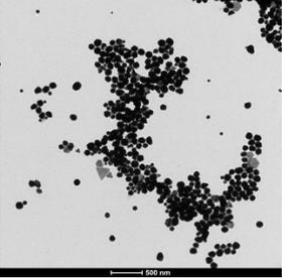
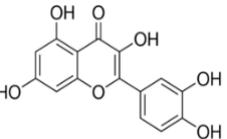
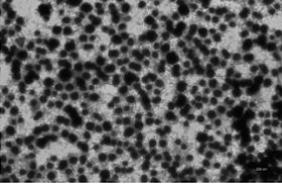
Figure 1. TLC di esosomi da cellule tumorali (3 corsia a destra) ed esosomi legati a lectina (wheat germ agglutinin, WGA,). La fase mobile è costituita da acqua.

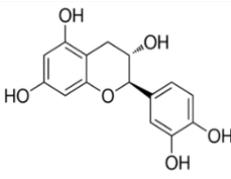
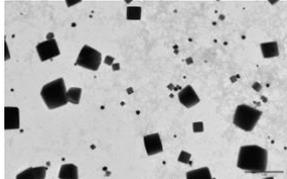
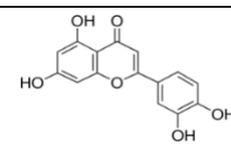
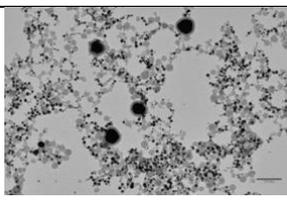
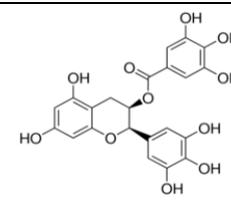
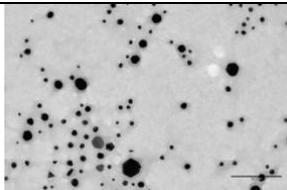
L'accorciamento delle code delle bande sulle corsie di sinistra indica la presenza di alcune frazioni esosomiali più idrofobiche. Questo lavoro è ancora in corso e saranno eseguiti dei test con altre lectine.

Approccio di green chemistry per la preparazione delle AuNPs

Le AuNPs sono state preparate riducendo direttamente $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ con i rispettivi flavonoidi (Luteolina, Catechina, Quercetina, Epigallocatechina gallato (EGCG)). Il riassunto della caratterizzazione chimico-fisica è mostrato nella tabella 1. Altre caratterizzazioni sono in corso.

Table 1. Riassunto di differenti AuNPs preparate tramite green chemistry come antivirali, antibiotici e per il legame selettivo con aree infiammate dell'intestino e per l'utilizzo come mezzo di contrasto

Compound	Structure	shape	Core size ² [nm]	Core shape ²
Resveratrol			70.4± 43.6 (n=318)	Mainly polygonal, flat triangles, hexagons
Quercetin			47.6± 27.2 (n=100)	sphere

Catechin			15.3± 24.2 (n=494)	cubic
Luteolin			81.9± 45.7 (n=293)	polygonal
Epigallocatechin gallate			21.3± 8,2 (n=150)	polygonal

Le AuNPs con Luteolina e Quercetina sono state testate per l'attività antibiotica in collaborazione con l' U.O. di microbiologia e virologia, poiché in letteratura è riportato che i flavonoidi possiedono questa proprietà. Tuttavia, i flavonoidi legati alla superficie delle AuNPs non hanno mostrato attività antimicrobiche.

Tutte le AuNPs preparate sono state anche testate per l'attività antivirale nei confronti degli enterovirus, in collaborazione con il Dipartimento di Scienze Biologiche ed Ambientali ed il centro di Nanoscienze dell'Università finlandese di *Jyväskylä*. Le nanoparticelle con Resveratrolo e con Epigallocatechina gallato hanno mostrato una buona attività antivirale nei confronti di CVB3, inibendo completamente ed irreversibilmente l'apertura del capsid nelle cellule, necessario per il rilascio del contenuto genetico del virus e quindi per la replicazione. Sono in corso esperimenti di modelling e studi di microscopia elettronica, ed una pubblicazione è in preparazione per essere sottomessa a marzo 2020. Le altre nanoparticelle con flavonoidi hanno mostrato solo una inattivazione reversibile o assente del virus.

Sample information

1. 4th batch AuNPs-EPI (Au concentration - 0,33 mg/ml)
2. 4th batch AuNPs-EPI (Au concentration - 12 mg/ml)
3. 4th batch AuNPs-Catechin exp 4 (Au concentration - 0,33 mg/ml)
4. 4th batch AuNPs-Resveratrol exp 2 (Au concentration - 5,3 mg/ml)
5. 4th batch AuNPs-Resveratrol exp 3 (Au concentration - 5,3 mg/ml)

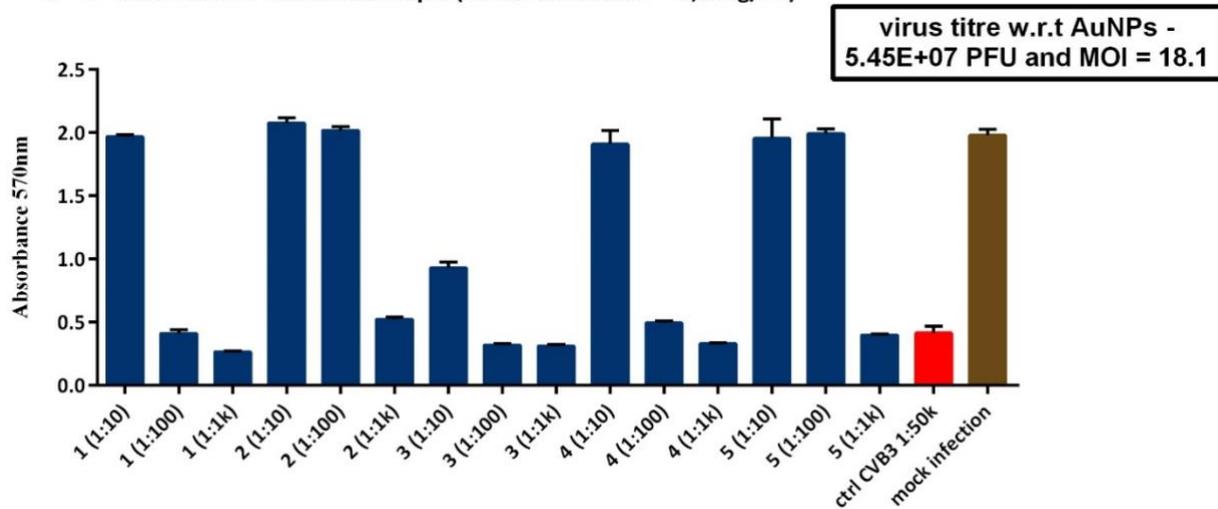


Figure 2. Proprietà antivirali contro l'enterovirus CVB3 di differenti AuNPs preparate con green chemistry

Sviluppo di un nuovo sistema di sferoidi tumorali per migliorare gli studi sul cancro ed i test terapeutici

In collaborazione con l'Università di Twente è stata sviluppata una nuova piattaforma per la crescita cellulare basata sui frattali, ed i test effettuati hanno mostrato che queste superfici favoriscono la crescita delle cellule in 3D, risultante dopo alcuni giorni nella formazione di organoidi. Questi esperimenti sono stati eseguiti con cancer-associated fibroblasts derivanti da tumori epatici. Il lavoro condurrà a diversi brevetti, tre pubblicazioni (1/2020, 4/2020, 5/2020) ed alla nascita di una start-up.

LINEA 2

MEDICINA PREVENTIVA/PREDITTIVA IN GASTROENTEROLOGIA

Per la linea di ricerca n. 2 “Medicina preventiva/predittiva in Gastroenterologia”, i principali risultati raggiunti dai singoli Laboratori per ciascun progetto per l’anno 2019 sono i seguenti:

Progetto n. 11: “L’attività di SMYD3 come bersaglio terapeutico nel trattamento delle neoplasie gastroenterologiche con alterazione dei pathways RAS e TGF- β ”

Responsabile: Prof. Cristiano Simone

Partecipanti: Francesco Dituri, Candida Fasano, Giovanna Forte, Annarita Chieti

Background:

La cancerogenesi è un processo complesso e articolato, che culmina nella trasformazione di una cellula normale in cellula neoplastica a causa dell’alterata regolazione di meccanismi genetici, epigenetici e di trasduzione dei segnali intracellulari.

Negli ultimi anni, i ricercatori oncologici di tutto il mondo sono concentrati nell’identificazione di nuove molecole nodali di pathways cancro specifici, per individuare possibili target molecolari contro cui sviluppare terapie più mirate e meno tossiche. In questo scenario assume sempre più rilievo il ruolo svolto dalla proteina SMYD3 nel meccanismo di cancerogenesi e di progressione tumorale.

Questa proteina, infatti, risulta overespressa in numerose forme di cancro, come quello della mammella, dello stomaco, del pancreas, del colon-retto (CCR), del polmone e del carcinoma epatocellulare (HCC) (Luo XG, et al. 2014, Hamamoto et al., 2004, 2006; Tsuge et al., 2005; Liu et al., 2015; Mazur et al., 2014).

SMYD3 è un’istone di- e tri-metiltransferasi, appartenente alla famiglia delle “SET domain proteins”, cioè proteine caratterizzate dal dominio funzionale SET altamente conservato in tutte le istone metiltransferasi (Foreman et al., 2011). La funzione biologica più nota di questo enzima è la metilazione della lisina 4 dell’istone H3. Tuttavia, recenti saggi di legame e metilazione in vitro hanno identificato come substrato preferenziale di questa metiltransferasi, l’istone H4. Questo dato è stato validato in colture cellulari in cui il mantenimento del fenotipo tumorale dipende dalla metilazione di H4K5 catalizzata da SMYD3 (Van Aller et al., 2012).

Fino a qualche anno fa, l’effetto oncogenico di SMYD3 veniva spiegato esclusivamente sulla base della metilazione di proteine istoniche, evento scatenante l’attivazione trascrizionale di geni bersaglio a valle come WNT10B, NKX2.8, CDK2, cMET e TERT (Hamamoto et al., 2004, 2006; Liu et al., 2007; Zou et al., 2009).

A differenza di quanto accade nelle cellule neoplastiche, nelle cellule normali SMYD3 non sembra essere indispensabile per lo sviluppo, la proliferazione e la sopravvivenza cellulare. Infatti, topi KO condizionali omozigoti per SMYD3, sia maschi che femmine, non mostrano anomalie significative dopo la piena fenotipizzazione (www.sanger.ac.uk/mouseportal/search?query=smyd3). Tuttavia, anche in cellule normali l’overespressione di SMYD3 è sufficiente ad accelerare la crescita cellulare e ad attivare dei geni di pathways coinvolti nella trasformazione delle cellule tumorali e nella loro migrazione (Cock-Rada et al., 2012; Luo et al., 2014).

Dati sperimentali più recenti hanno spostato il focus di studio sulla correlazione tra cancerogenesi e metilazione di proteine non istoniche dimostrando che l'attività oncogenica di SMYD3 è anche collegata ad interazioni funzionali con proteine non istoniche come ad esempio VEGFR1 (Recettore 1 del fattore di crescita vascolare endoteliale) ed ER (recettore degli estrogeni) che regolano la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule tumorali.

Il coinvolgimento di SMYD3 in pathways deregolati di proteine non istoniche è un meccanismo tessuto specifico, infatti, la metilazione di VEGFR1 mediata da SMYD3, potenzia l'attività chinasi di questo recettore in tutte le cellule tumorali, ma specialmente in quelle di cancro del seno, dove VEGFR1 metilato agisce come co-attivatore di ER (Biggar and Li 2014; Kunizaki et al., 2007; Kim et al., 2009). Anche nel cancro del colon retto (CCR) e nell'epatocarcinoma (HCC) appare evidente la centralità di SMYD3 in pathways proliferativi, come dimostrato dagli studi condotti su modelli preclinici, ovvero in topi KO per SMYD3 in cui sono stati indotti tumori gastroenterologici (del colon e del fegato). In questi modelli KO si è osservata regressione tumorale, al contrario di quanto accadeva in topi wt dove SMYD3 potenzia la trascrizione e quindi l'espressione di molti oncogeni, tra cui *c-myc*, *βcat*, *stat3* e tutti i geni della transizione epitelio-mesenchimale (EMT) alla base della trasformazione epatica maligna (Sarris et al. 2016).

Nonostante la correlazione esistente tra la deregolazione di SMYD3 e la tumorigenesi, i meccanismi alla base della modulazione di SMYD3, e della sua funzione attivatoria della proliferazione incontrollata delle cellule tumorali, non sono stati ancora completamente chiariti. In letteratura è stato riportato che il silenziamento di SMYD3 limita considerevolmente la proliferazione cellulare nel CCR, nell' HCC, nel fibrosarcoma e nel carcinoma alla mammella (Hamamoto et al., 2004, 2006; Cock-rada et al., 2012; Guil et al., 2012).

Queste osservazioni preliminari suggeriscono che SMYD3 sia coinvolto nella deregolazione del ciclo cellulare ovvero, in una delle fasi più critiche della carcinogenesi.

Una vasta letteratura riporta la stretta correlazione tra un'upregolazione di SMYD3 e la cancerogenesi in diversi organi. Nel CCR mutazioni dell'oncogene KRAS sono correlate con l'overespressione di SMYD3, così come nello sviluppo del cancro polmonare e pancreatico in cui le metilazioni di MAP3K2, mediate da SMYD3 attivano la cascata delle MAP chinasi (Gaedcke et al., 2010; Mazur et al., 2014). L'espressione di SMYD3 correla positivamente ed in maniera significativa, con l'espressione di TGF-β in tessuti di pazienti con tumori gastrici (Liu et al., 2015).

Recentemente, in uno studio collaborativo, abbiamo dimostrato come SMYD3 sia richiesto anche per la propagazione del signaling PI3K-AKT, favorendo la fosfoattivazione di AKT, mediante la metilazione di un residuo specifico (Yoshioka Y, et al., 2016).

Stato di avanzamento del progetto:

Fase 1a: Caratterizzazione dell'interazione SMYD3-MEK1.

-Clonaggio e mutagenesi di costrutti di SMYD3:

I costrutti per l'espressione in cellule di mammifero *p3xFlagCMV14-SMYD3 wt* e *pFlagCMV2-SMYD3 wt* sono stati ottenuti partendo dal plasmide *pMD18-SMYD3* (Sino Biological #HG11217-M) e dai rispettivi empty backbones, disponibili nel nostro laboratorio, tramite amplificazione della CDS di SMYD3 con primers specifici, restrizione enzimatica e ligazione.

A partire dal plasmide *pFlagCMV2-SMYD3 wt*, tramite esperimenti di mutagenesi sito specifica (Q5 Site Directed Mutagenesis kit - New England Biolabs), attraverso l'utilizzo di specifici primers fosforilati, sono stati ottenuti i plasmidi *pFlagCMV2-SMYD3 (Y239F)*, che rappresenta la forma cataliticamente inattiva di SMYD3 e il plasmide *pFlagCMV2-SMYD3 (219-428)*, delecto nella regione N-terminale e mancante del SET-domain.

Sempre partendo dal plasmide *pMD18-SMYD3* e dall'empty backbone *pGEX4T3* ad espressione batterica, tramite amplificazione dell'inserto con primers specifici, restrizione enzimatica e ligazione, abbiamo ottenuto il plasmide *pGEX4T3-SMYD3 wt*, utile per saggi di metilazione e/o co-

immunoprecipitazione in vitro, previa espressione e purificazione della proteina ricombinante dalle cellule batteriche.

-Clonaggio e mutagenesi di costrutti di MEK1:

A partire dal plasmide *pcDNA3.1-Hygro-Myc-MEK1* (Addgene, #40774) e dall'empty backbone *pGEX4T3*, tramite amplificazione della CDS di MEK1 con primers specifici, restrizione enzimatica e ligazione, è stato ottenuto il costrutto ad espressione batterica *pGEX4T3-MEK1 wt*, utile per i successivi saggi di metilazione e/o co-immunoprecipitazione in vitro.

A partire dal plasmide *pcDNA3.1-Hygro-Myc-MEK1* e su indicazione dell'analisi di predizione di siti metilabili (vd. Paragrafi successivi), tramite esperimenti di mutagenesi sito specifica, sono stati ottenuti due mutanti della proteina MEK1 (K168A e K269A) in cui le lisine citate sono sostituite da residui di alanina non metilabili.

Con lo scopo di caratterizzare meglio le possibili regioni della proteina MEK1 in grado di interagire con SMYD3, sono stati inoltre ottenuti dei costrutti parziali del gene MEK1 (regione N-terminale/localization domain, kinase domain e Prolin-rich domain), sia in vettori ad espressione *mammalian* che in vettori ad espressione batterica.

Tutti i plasmidi ottenuti nel nostro laboratorio tramite cloning per restrizione o mediante esperimenti di mutagenesi sito specifica, sono stati verificati tramite digestione enzimatica e/o sequenziamento con metodo Sanger.

-Verifica dell'interazione di SMYD3-MEK1 tramite esperimenti di overespressione

L'interazione fra le proteine SMYD3 e MEK1, già dimostrata su proteine endogene tramite esperimenti di co-immunoprecipitazione in cellule tumorali di colon HT29, è stata verificata anche mediante esperimenti di overespressione delle due proteine wt, attraverso saggi di co-immunoprecipitazione, per confermare la positività dell'interazione riscontrata nell'analisi su proteine endogene ed escludere possibili aspecificità degli anticorpi.

In breve, le linee cellulari HCT116, HT29 ed HEK293, sono state transfettate con i costrutti *p3xFlagCMV14-SMYD3 wt* e *pcDNA3.1-Hygro-Myc-MEK1 wt* per ottenere una loro espressione ectopica. L'analisi di co-immunoprecipitazione (CoIP) è stata effettuata utilizzando anticorpi Tag-specifici sia per la fase preparativa che per la fase analitica di immunoblotting.

In particolare, sull'immunoprecipitato ottenuto da IP-Flag (SMYD3), sono stati utilizzati gli anticorpi anti-Myc tag per rilevare la forma overespressa di MEK1 e anti-FLAG per evidenziare la quantità immunoprecipitata della forma overespressa di SMYD3. I nostri risultati, ottenuti da esperimenti ripetuti almeno tre volte, dimostrano che le proteine overesprese dai due costrutti cotrasfettati interagiscono in tre linee cellulari diverse, due di cancro del colon-retto (HT29, HCT116) ed una linea di cellule normali embrionali di rene, ovvero un modello cellulare di linea continua normale comunemente utilizzata in questi esperimenti per via della loro capacità di essere altamente trasfettabili (HEK293). (Figura A)

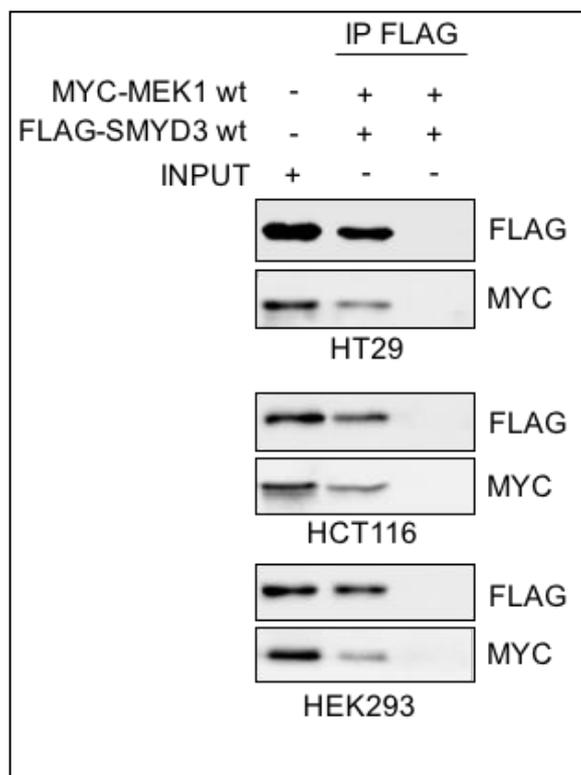


Figura A: Co-immunoprecipitazione di FLAG-SMYD3 wt e MYC-MEK1 wt in cellule HT29, HCT116 ed HEK293.

Fase1B. Analisi della metilazione operata da SMYD3 su MEK1 e il suo effetto sull'attività di MEK1.

-Predizione *in silico* di siti metilabili

Abbiamo effettuato un'analisi di predizione *in silico* volta ad identificare i residui di lisina sulla sequenza di MEK1 potenzialmente metilabili da parte di SMYD3.

La suddetta analisi *in silico* è stata condotta utilizzando tre diversi *software* in modo da aumentare l'accuratezza predittiva dell'analisi e da selezionare i residui lisinici di MEK1 potenzialmente metilabili suggeriti da almeno due differenti tools bioinformatici.

Per questa analisi sono stati impiegati i seguenti tools bioinformatici: PLMLA tool (bioinfo.ncu.edu.cn/inquiries_PLMLA.aspx); PMes (bioinfo.ncu.edu.cn/inquiries_PMeS.aspx) e IMethyl-PseAAC (<https://omictools.com/imethyl-pseaac-tool>). Due tools su tre di quelli impiegati suggeriscono due potenziali siti target di metilazione per MEK1, quali la K168 e la K269 (Tabella 1).

Tabella 1. Predizione *in silico* delle lisine metilabili in MEK1.

Residui AA predetti	PLMLA tool	PMes tool	I Methyl -PseAAC
K3			X
K4			X
K5			X
K48			X
K57	X		
K64			X
K84			X
K88			X
K156			X

K168		X	X
K205	X		
K269	X		X
K289			
K324	X		
K344	X		
K362			X

Valutazione della metilazione di SMYD3 su MEK1.

Al fine di valutare l'abilità di SMYD3 nel metilare MEK1 abbiamo eseguito un saggio di metilazione *in vitro* impiegando come substrati della reazione enzimatica le proteine purificate MEK1 e/o la proteina istonica H4. In breve, la proteina ricombinante His-SMYD3 wt (full-length) enzimaticamente attiva, è stata incubata con la proteina ricombinante GST-MEK1 wt (full-length) in presenza del

reattivo marcato radioattivamente, SAM-³H (fornito dal kit di dosaggio della metilazione *in vitro*; Perkin Elmer) per 45 minuti a 30° C in una soluzione composta da 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 % glicerolo, 20 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.02% Triton e 1 mM PMSF (Peserico et al. 2015).

In parallelo sono state analogamente preparate altre due reazioni enzimatiche *in vitro* come controlli della metilazione in esame. In particolare come controllo positivo della reazione di metilazione abbiamo utilizzato la proteina H4 (noto substrato di SMYD3); mentre come controllo negativo abbiamo utilizzato la proteina Glutathione-S-Transferasi (GST).

Terminato il tempo di incubazione, le miscele di reazione sono state analizzate tramite SDS-PAGE, e i segnali di metilazione sono stati rilevati tramite colorazione con coomassie e autoradiografia. I nostri dati mostrano che la forma purificata His-SMYD3 è in grado di metilare il suo noto substrato histone H4 (controllo positivo), ma non è in grado di metilare la forma purificata GST-MEK1 così come la GST da sola (controllo negativo). Questi esperimenti, eseguiti usando le stesse condizioni riportate da noi e da altri in letteratura (Peserico et al 2015, Mazur et al. 2014), indicano che MEK1 non è un substrato diretto di SMYD3 e quindi escludono che l'attività enzimatica di SMYD3 sia diretta verso MEK1 nella regolazione del pathway RAS/RAF/MEK/ERK.

Sebbene non abbiamo trovato evidenza di metilazione diretta su MEK1 da parte di SMYD3, stiamo approfondendo il meccanismo con cui l'attività di SMYD3 influenza le vie dipendenti da MEK1. A tal fine abbiamo co-trasfettato le cellule HCT116 di CCR con il costrutto FLAG-SMYD3 (intero) o FLAG-SMYD3-ΔSET (deleto, cioè privo del dominio SET) e MEK1-Myc-tag. La via MEK/ERK è stata modulata mediante aggiunta e deprivazione di siero o di EGF (noti stimoli attivatori della cascata MEK/ERK), e regolata negativamente mediante gli inibitori di MEK1.

Quindi per investigare su come SMYD3 influenza l'attività di MEK1, abbiamo analizzato *in vitro* mediante immunoblotting la fosfoattivazione di MEK1, ERK e le proteine a valle della loro via di segnalazione (MEK/ERK). In accordo con quanto si è osservato inibendo MEK1 con trametinib, i nostri risultati mostrano che in presenza di BCI-121 (inibitore di SMYD3) o di FLAG-SMYD3-ΔSET (enzimaticamente inattivo), anche stimolando la crescita cellulare con siero e/o EGF le cellule non sono in grado di fosfo-attivare ERK (Peserico et al., JCP). E' importante sottolineare che, in accordo con i nostri risultati preliminari, la fosfo-attivazione siero e/o EGF-dipendente di MEK1 non è stata influenzata dall'aggiunta di BCI-121 (Peserico JCP) o dall'espressione della forma enzimaticamente inattiva FLAG-SMYD3-ΔSET. Questi ultimi dati nelle cellule di CCR differiscono dai dati succitati ed ottenuti da Mazur e colleghi nelle linee di cellule tumorali polmonari (A549) e pancreatiche (LKR10). Infatti, questi autori hanno dimostrato che SMYD3 potrebbe regolare l'attività MAP3K2 (una chinasi alternativa nella via RAS che può fosforilare MEK1) mediante metilazione diretta la K260, bloccando così l'associazione con il complesso fosfatasi PP2A e prevenendo la defosforilazione di MEK1.

Tuttavia, questi autori hanno anche osservato effetti diversi in una seconda linea cellulare di cancro al pancreas (CFPac1), dove l'ablazione genetica di SMYD3 ha impedito l'attivazione di ERK EGF-

dipendente, ma non la fosfo-attivazione di MEK1 (Mazur et al., Nature). Presi insieme, questi dati suggeriscono che la modulazione mediata da SMYD3 della via di RAS coinvolge diversi meccanismi che operano a monte di ERK e che influenzano la regolazione del complesso di MEK1 con variabilità e specificità inter- e intra-tissutale.

RISULTATI CONSEGUITI NEL TERZO ANNO DI PROGETTO DALL'UNITÀ 1

Fase 1C-D. Effetti di SMYD3 sulla via di segnalazione MEK/ERK in vivo (c) e caratterizzazione della relazione esistente tra SMYD3 e MEK1 in cellule che abbiano mutazioni a carico di Myc/Ras (d).

In questa fase abbiamo iniziato a studiare il ruolo di SMYD3 nella via di segnalazione RAS/RAF/MEK/ERK attraverso l'uso di tipici saggi di tumorigenesi (colony formation assay, MTT e WST) in linee cellulari di cancro del colon-retto con differente background genetico e alta espressione proteica di SMYD3. Infatti, abbiamo caratterizzato le linee di CCR secondo le caratteristiche fenotipiche di instabilità dei microsatelliti (MIN) o instabilità cromosomica (CIN), e genotipiche come lo stato mutazionale dei principali geni coinvolti nella cancerogenesi del colon-retto (KRAS, BRAF, APC, b-catenin, p53, PI3KCA). Tutte le linee cellulari sono state indotte a proliferare *in vitro* e poi trattate con l'inibitore farmacologico di SMYD3, BCI-121, oppure sono state silenziate mediante siRNA specifici per SMYD3. Dopo i trattamenti le cellule sono state analizzate sia per immunoblot, per valutare la propagazione della via di segnalazione RAS/RAF/MEK/ERK, che per saggi di proliferazione (WST-1). La nostra analisi ha rivelato che indipendentemente dal fenotipo (CIN vs MIN) e dal genotipo (wild type o mutazioni di KRAS, BRAF, APC, b-catenin, p53, PI3KCA) tutte le linee di CCR che overesprimono SMYD3 sono sensibili alla sua inibizione farmacologica o ablazione genetica mediante siRNA. La caratterizzazione molecolare mostra come l'inibitore farmacologico BCI-121 sia in grado di bloccare la trasmissione del segnale da MEK verso ERK, stesso effetto ottenuto con l'ablazione genetica di SMYD3 mediante siRNA specifici, infatti in tutte le linee viene impedita la fosforilazione di ERK (FIGURA B). Non solo, anche la valutazione della proliferazione ha mostrato come tutte le linee con alta espressione proteica di SMYD3 siano sensibili sia alla sua inibizione farmacologica che alla sua ablazione genetica (FIGURA B). Infatti, le linee HT29, Caco-2 e SW480 presentano instabilità cromosomica (CIN) mentre le HCT116 presentano instabilità dei microsatelliti (MIN), così come le HT29, le HCT116 e le SW480 hanno mutazioni di BRAF o di KRAS mentre le Caco-2 sono wild type per entrambi i geni. Stesso discorso vale per lo status mutazionale dei restanti geni APC, b-catenin, p53 e PI3KCA (FIGURA B). E' importante sottolineare come altre linee di CCR, sia con fenotipo CIN che MIN e status mutazionale vario, ma con bassa espressione proteica di SMYD3 non sono risultate sensibili né alla sua inibizione farmacologica né alla sua ablazione genetica (es. LS174T, DLD-1, ...).

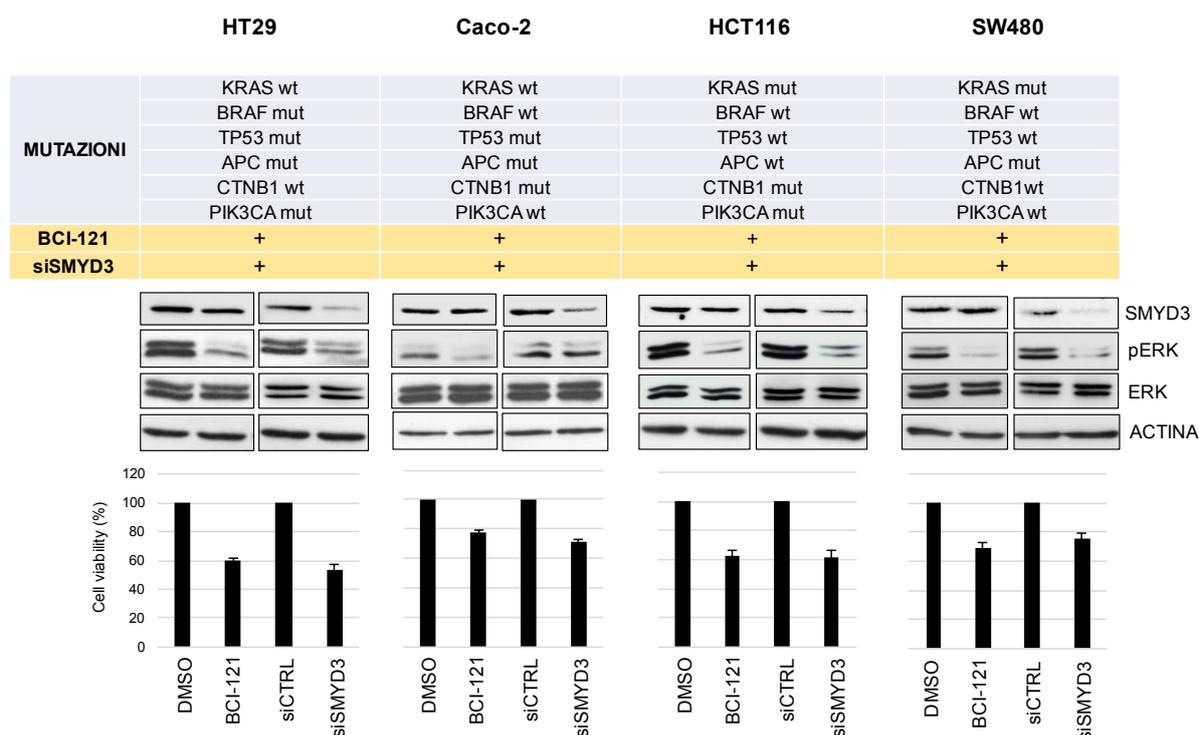


Figura B: Valutazione del ruolo di SMYD3 nella regolazione della via di segnalazione RAS/RAF/MEK/ERK in linee cellulari di cancro del colon-retto con differente background genetico. Analisi per immunoblot di SMYD3, della fosfoattivazione di ERK e saggio di vitalità WST-1 in cellule silenziate per SMYD3 o trattate con l'inibitore BCI-121.

Fase 1d. La caratterizzazione della relazione esistente tra SMYD3 e MEK1 in cellule che abbiano mutazioni a carico di Myc/Ras.

Al fine di valutare il ruolo di SMYD3 nel sostenere il pathway oncogenico RAS-MEK-ERK abbiamo utilizzato 5 linee cellulari di cancro del colon-retto che esprimessero elevati livelli di SMYD3 e differissero tra loro per background genetico e tipo di instabilità. Avendo precedentemente dimostrato, nella Task1c, l'efficacia dell'inibizione farmacologica e dell'ablazione genica in tutte quelle linee cellulari con alta espressione di SMYD3, abbiamo deciso di escludere le LS174T e le DLD-1, le quali non sono risultate sensibili ai trattamenti a causa della bassa espressione di SMYD3 (Peserico A, Germani A, Sanese P, Barbosa A J, Di Virgilio V, Fittipaldi R, Fabini E, Bertucci C, Varchi G, Pat Moyer M, Caretti G, Del Rio A, Simone C, 2014).

Abbiamo sottoposto tutte e 5 le linee cellulari (HCT116, HT29, SW480, Caco-2 e LoVo) a due tipi diversi di stress, la deprivazione da siero o lo stress ossidativo, verificando la dipendenza della proliferazione e della morte cellulare dalla presenza/assenza di SMYD3.

Le cellule tumorali sono state coltivate in condizioni standard seguendo le indicazioni dell'ATCC (American Type Culture Collection), successivamente, al momento dell'esperimento, sono state piastrate in un terreno senza siero fetale bovino, quindi deprivate di tutta quella serie di fattori di crescita contenuti al suo interno. Abbiamo proceduto all'inibizione farmacologica di SMYD3, ottenuta mediante la somministrazione di BCI-121 (100 μ M) oppure abbiamo proceduto alla sua ablazione genica con un siRNA specifico. Quindi, per valutare come l'interazione funzionale di SMYD3 con MEK1 influisca sull'effetto finale della deprivazione da siero, abbiamo eseguito il saggio del WST-1. L'assorbanza rilevata con lo spettrofotometro è infatti proporzionale al numero di cellule metabolicamente attive. Le cellule sono state sottoposte o meno allo stress per 24 ore e inibite/ablate con BCI-121/siRNA di SMYD3 per 48 ore. Coerentemente con quanto affermato in letteratura (Braun

Frederque, Bertin-Ciftci Josephine, Gallouet Anne-Sophie, Millour Julie and Juin Philippe, 2011), è stata dimostrata una leggera riduzione della capacità di crescita in tutte le cellule sottoposte a deprivazione da siero, ma è da sottolineare come la combinazione dello stress e dell'inibizione di SMYD3 conduca ad una riduzione maggiore della capacità di crescita di tutte le linee cellulari testate.

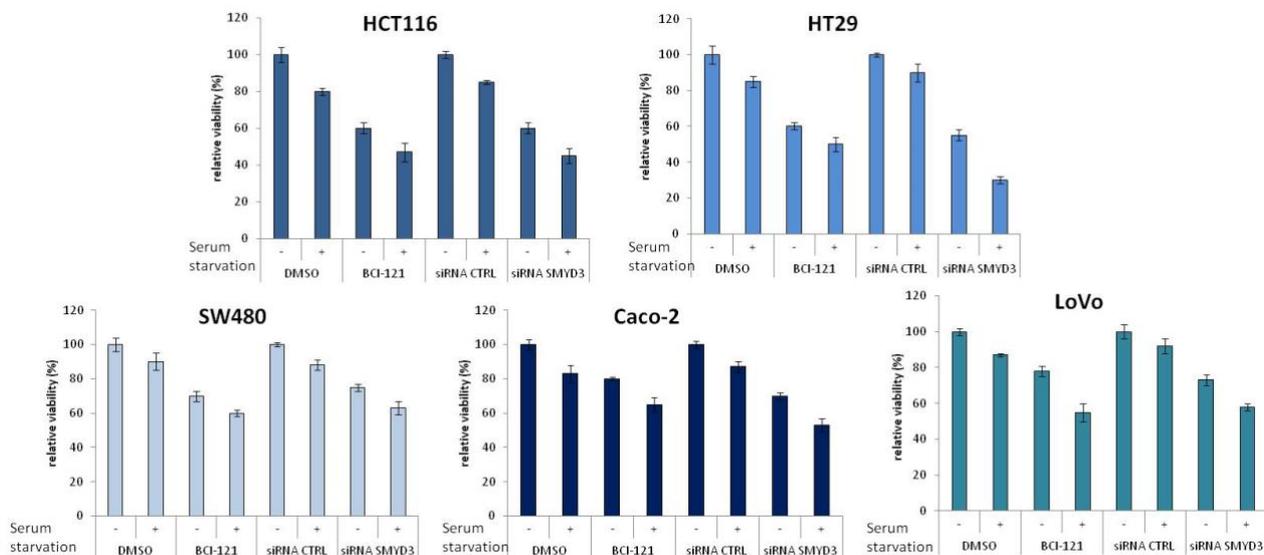


FIGURA C: le cellule di CCR sono state sottoposte a deprivazione da siero e successivamente trattate o meno con BCI-121 (100µM) o con siRNA SMYD3 e analizzate tramite saggio di WST-1. L'azione combinata dello stress dovuto alla deprivazione da siero e l'inibizione del pathway di RAS-MEK-ERK attraverso la somministrazione di BCI-121 o del siRNA specifico induce una riduzione della capacità di crescita in tutte le linee cellulari di CCR. I risultati presentati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti.

Per avere una visione più completa dell'influenza di SMYD3 in condizioni di deprivazione da siero si è proceduto alla valutazione della morte cellulare tramite conta cellulare in trypan blue. Il trypan blue viene comunemente usato nella colorazione vitale con un metodo definito come colorazione per esclusione. Infatti, le membrane cellulari sono normalmente impermeabili a tale colorante, mentre le cellule morte, sia apoptotiche che necrotiche, si colorano di blu (senza possibilità di distinzione). Le cellule sono state sottoposte o meno allo stress di deprivazione da siero per 24 ore e/o inibite per SMYD3 (con BCI-121 o siRNA specifico) per 48 ore. In tutte le linee cellulari di CCR testate e sottoposte a stress è stato dimostrato un leggero aumento del numero di cellule morte rispetto alle cellule non stressate. Ancora una volta, la combinazione dello stress assieme all'inibizione di SMYD3 porta ad un incremento della morte cellulare rispetto al singolo stress, il quale provoca per lo più un arresto della crescita.

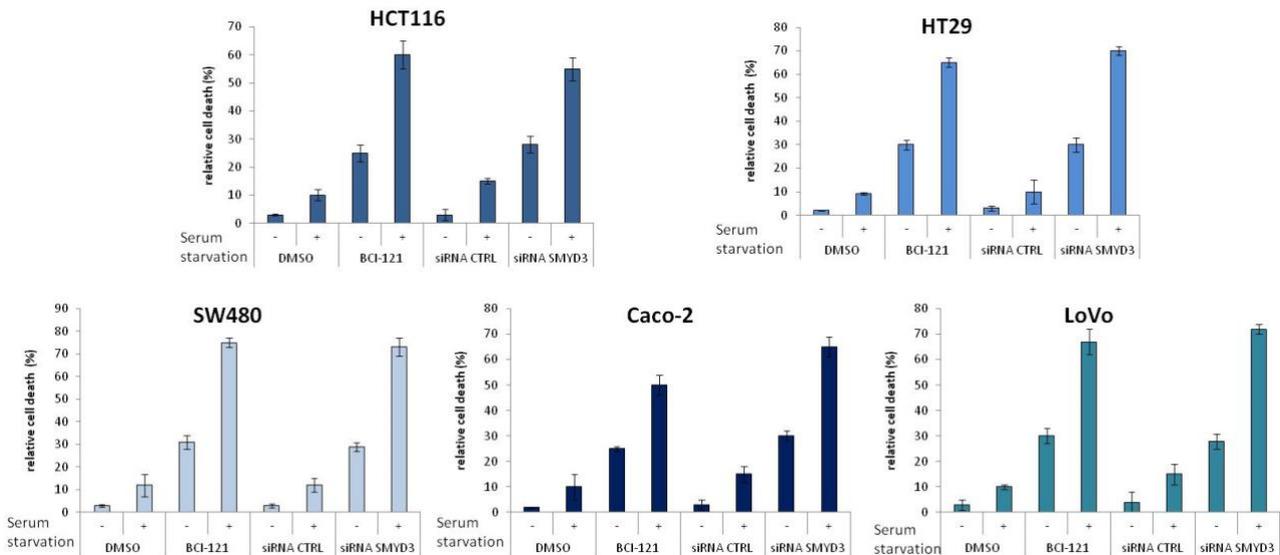


FIGURA D: le cellule di CCR sono state sottoposte a deprivazione da siero (24ore) e successivamente trattate o meno con BCI-121 (100 μ M) o con il siRNA specifico per SMYD3(48ore) e analizzate tramite conta cellulare con il colorante trypan blue. L'azione combinata dello stress dovuto alla deprivazione da siero e all'inibizione del pathway di RAS-MEK-ERK, ottenuta mediante la somministrazione di BCI-121 o del siRNA specifico, induce un aumento della morte cellulare in tutte le linee cellulari di CCR analizzate. I risultati presentati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti.

Non essendo possibile distinguere il tipo di morte cellulare indotta dalla combinazione della deprivazione da siero e dall'inibizione di SMYD3 attraverso la colorazione per esclusione effettuata con trypan blue, abbiamo verificato il clivaggio della caspasi 3 e di PARP-1 mediante western blot. Questi ultimi, infatti, rappresentano i principali indicatori di una morte di tipo apoptotico. I risultati dei western blot hanno suggerito che la combinazione dello stress assieme all'inibizione di SMYD3, ottenuta attraverso la somministrazione di BCI-121 (100 μ M) o attraverso l'ablazione genica (siRNA SMYD3), promuove l'apoptosi.

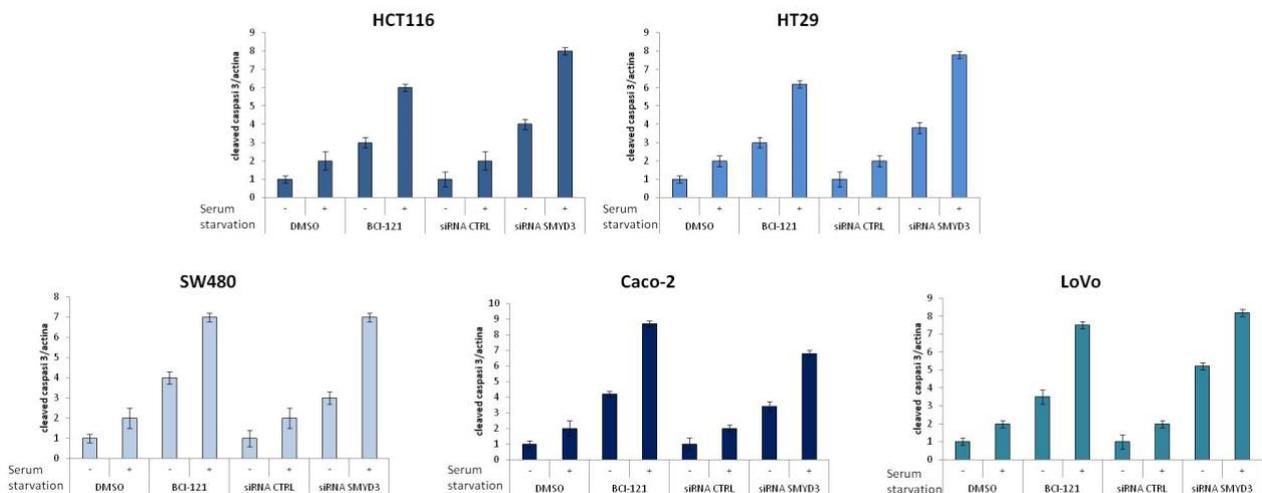


FIGURA E: Analisi densitometriche dei risultati dei western blot, ottenute attraverso il software ImageJ. I valori sono stati calcolati effettuando il ratio delle proteine clivate sulla actina. Le

cellule di CCR sottoposte a deprivazione da siero e ad inibizione del pathway di RAS-MEK-ERK dovuta all'utilizzo di BCI-121 (100 μ M) o al siRNA di SMYD3 manifestano elevati livelli di apoptosi rilevati dal clivaggio della caspasi 3. I risultati presentati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti.

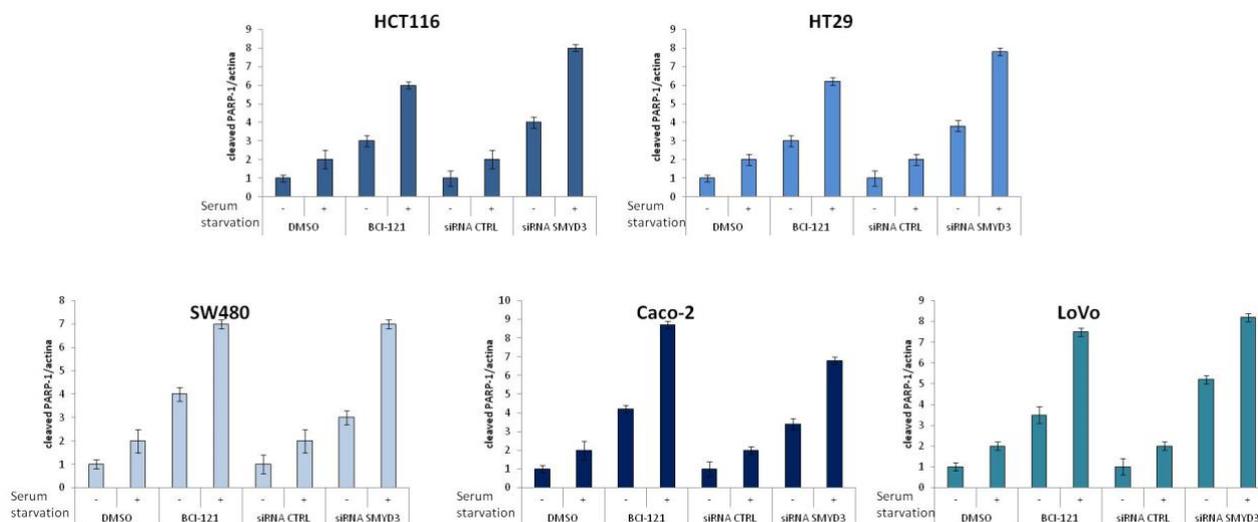


FIGURA F: Analisi densitometriche dei risultati dei western blot ottenute attraverso il software ImageJ. I valori sono stati calcolati effettuando il ratio delle proteine clivate sulla actina. Le cellule di CCR sottoposte a deprivazione da siero e ad inibizione del pathway di RAS-MEK-ERK dovuta all'utilizzo di BCI-121 (100 μ M) o al siRNA di SMYD3 manifestano elevati livelli di apoptosi rilevati dal clivaggio di PARP-1. I risultati presentati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti.

Per studiare e caratterizzare la risposta cellulare ad alterazioni dello stato redox intracellulare sono state utilizzate le seguenti linee cellulari di cancro del colon-retto (HCT116, HT29, SW480, Caco-2 e LoVo) le quali esprimono elevati livelli di SMYD3. Inoltre, come agente pro-ossidante è stato scelto l'H₂O₂, infatti il perossido di idrogeno è in grado di promuovere un incremento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) intracellulari. L'H₂O₂ può attraversare la membrana plasmatica andando ad ossidare, a livello intracellulare, molecole bersaglio sia direttamente, sia in seguito a formazione del radicale idrossilico (Chang DK, Goel A, Ricciardiello L, Lee DH, Chang CL, Carethers JM, Boland CR, 2003).

Le cellule tumorali sono state coltivate in condizioni standard seguendo le indicazioni dell'ATCC (American Type Culture Collection), successivamente, al momento dell'esperimento, sono state trattate per 1 ora con H₂O₂ (100 μ M), quindi si è proceduto all'inibizione farmacologica di SMYD3, attraverso la somministrazione di BCI-121 (100 μ M) oppure abbiamo proceduto alla sua ablazione genica con un siRNA specifico. Quindi per valutare come l'interazione funzionale di SMYD3 con MEK1 influisca sull'effetto finale dello stress ossidativo, provocato dal perossido di idrogeno, abbiamo eseguito il saggio del WST-1. È stata dimostrata una leggera riduzione della capacità di crescita in tutte le cellule sottoposte a stress ossidativo, ma è da sottolineare come la combinazione dello stress e dell'inibizione di SMYD3 conduca ad una riduzione maggiore della capacità di crescita di tutte le linee cellulari testate.

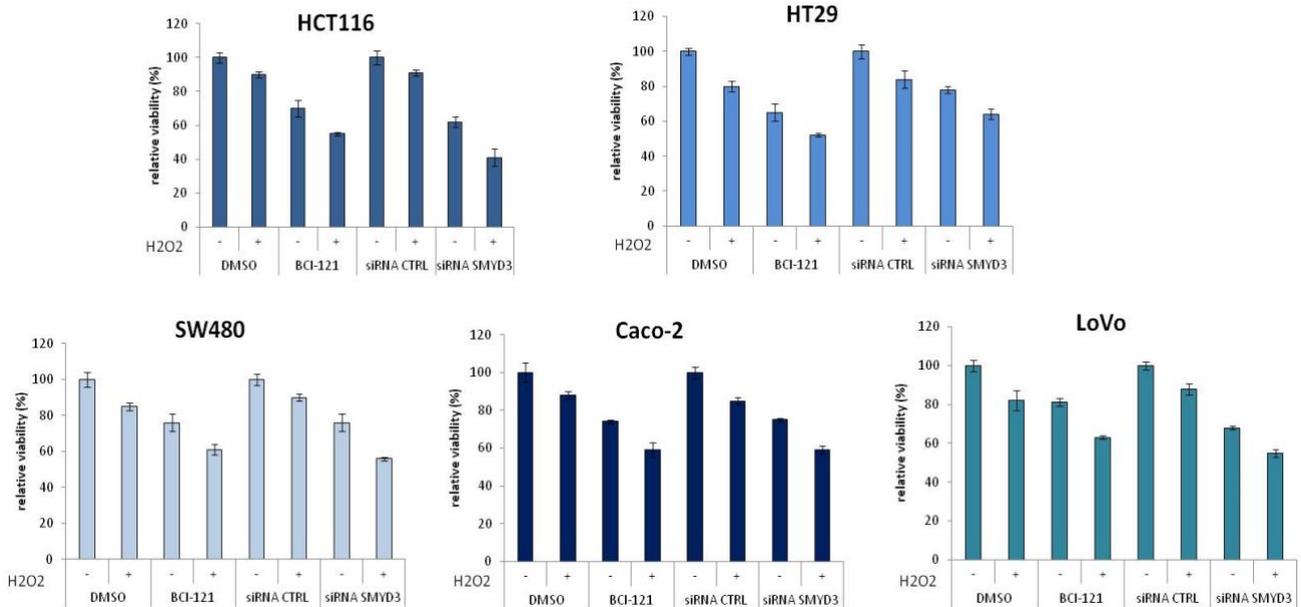


FIGURA G: le cellule di CCR sono state sottoposte a stress ossidativo e successivamente trattate o meno con BCI-121 (100 μ M) o con siRNA SMYD3 e analizzate tramite saggio di WST-1. L'azione combinata dello stress dovuto all'aggiunta di H₂O₂ (100 μ M) per 1 ora e l'inibizione combinata del pathway di RAS-MEK-ERK attraverso la somministrazione di BCI-121 o del siRNA specifico (48 ore) induce una riduzione della capacit  proliferativa in tutte le linee cellulari di CCR. I risultati presentati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti.

Per avere una visione pi  completa dell'influenza di SMYD3 in condizioni di stress ossidativo si   proceduto alla valutazione della morte cellulare tramite conta cellulare con trypan blue. Le cellule sono state trattate o meno con 100 μ M di H₂O₂ e/o inibite per SMYD3 (con BCI-121 o siRNA specifico) per 48 ore. In tutte le linee cellulari di CCR testate e sottoposte a stress   stato dimostrato un leggero aumento del numero di cellule morte. Ancora una volta, la combinazione dello stress assieme all'inibizione di SMYD3 ha comportato un incremento della morte cellulare.

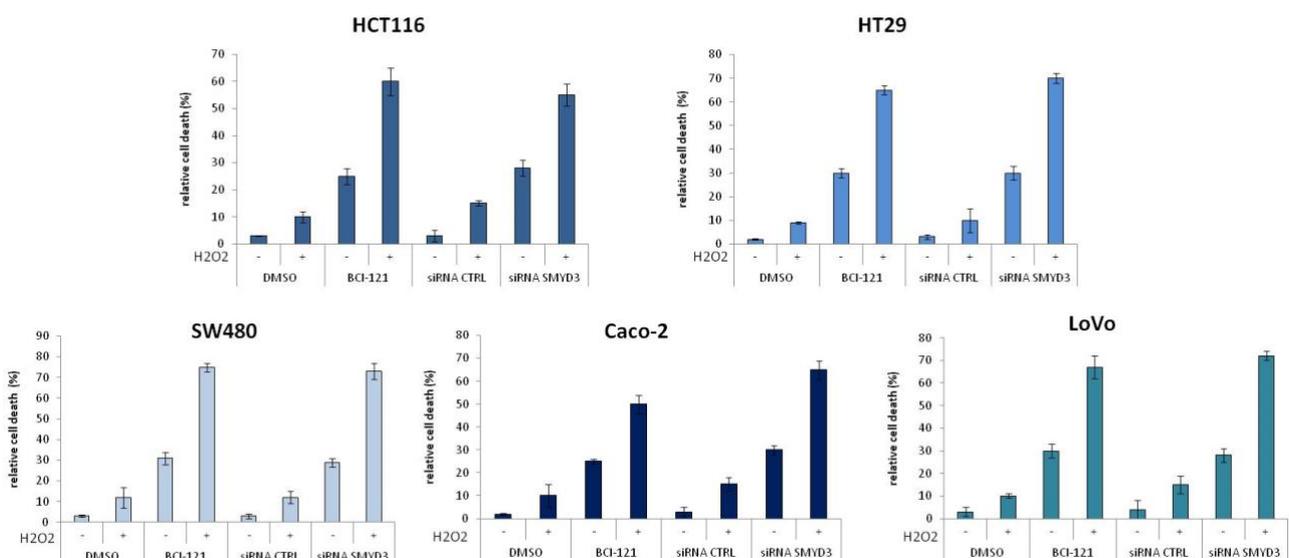


FIGURA H: le cellule di CCR sono state sottoposte a stress ossidativo e successivamente trattate o meno con BCI-121 (100 μ M) o con il siRNA specifico per SMYD3 e analizzate tramite conta cellulare con il colorante trypan blue. L'azione combinata dello stress dovuto alla

somministrazione di H₂O₂ (100μM) e all'inibizione del pathway di RAS-MEK-ERK ottenuta mediante l'uso di BCI-121 o del siRNA specifico induce un aumento della morte cellulare in tutte le linee cellulari di CCR analizzate rispetto al singolo stress. I risultati presentati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti.

Non essendo possibile distinguere il tipo di morte cellulare indotta dallo stress ossidativo e dalla contemporanea inibizione di SMYD3 attraverso la colorazione per esclusione, abbiamo proceduto al western blot verificando il clivaggio della caspasi 3 e quello di PARP-1. I risultati suggeriscono che l'azione combinata di H₂O₂ con BCI-121 o con il siRNA di SMYD3 innesca un meccanismo di tipo apoptotico.

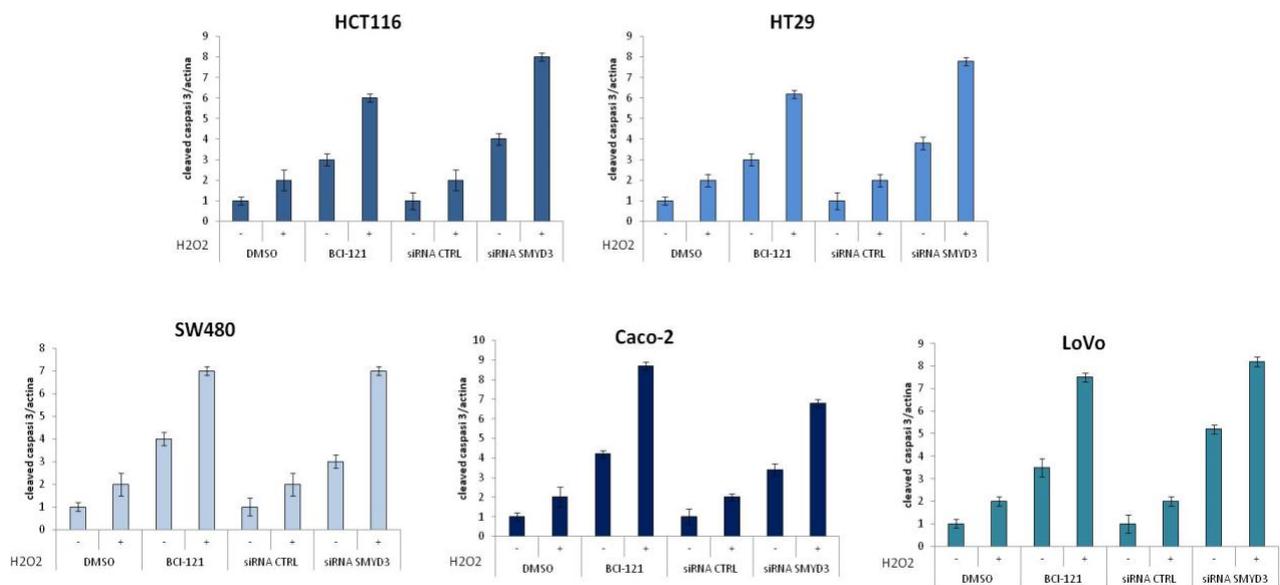


FIGURA I: Analisi densitometriche dei risultati dei western blot ottenute attraverso il software ImageJ. I valori sono stati calcolati effettuando il ratio delle proteine clivate sulla actina. Le cellule di CCR sottoposte a stress ossidativo (H₂O₂ 100 μM) e ad inibizione del pathway di RAS-MEK-ERK dovuta all'utilizzo di BCI-121 (100μM) o al siRNA di SMYD3 manifestano elevati livelli di apoptosi rilevati dal clivaggio della caspasi 3. I risultati presentati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti.

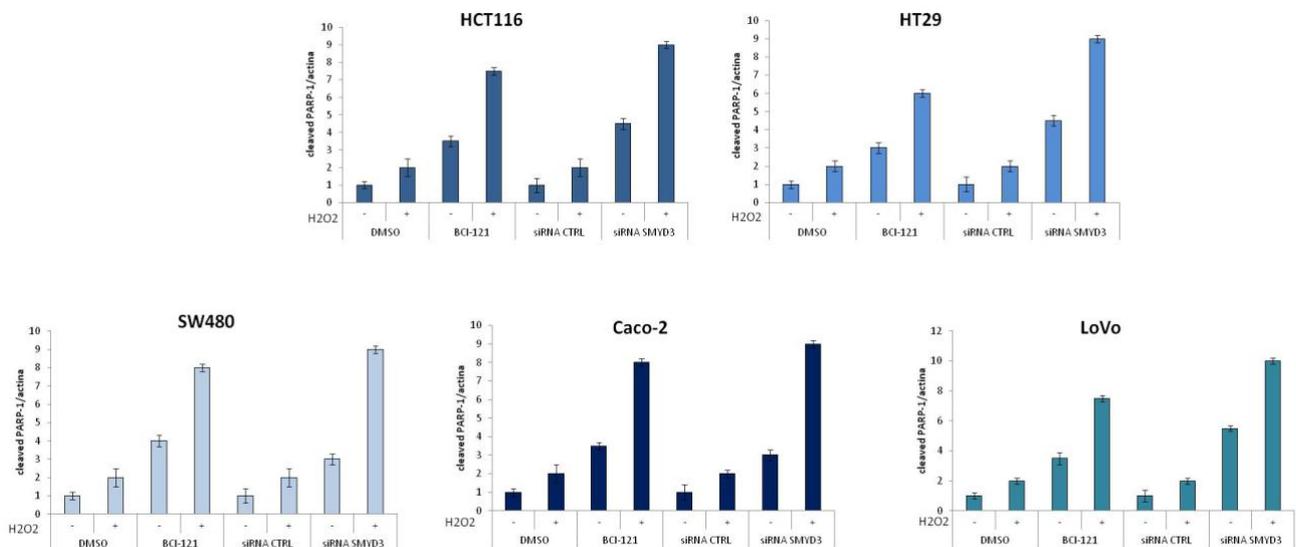


FIGURA L: Analisi densitometriche dei risultati dei western blot ottenute attraverso il software ImageJ. I valori sono stati calcolati effettuando il ratio delle proteine clivate sulla actina. Le cellule di CCR sottoposte a stress ossidativo (H₂O₂ 100 μM) e ad inibizione del pathway di RAS-MEK-ERK dovuta all'utilizzo di BCI-121 (100μM) o al siRNA di SMYD3 manifestano elevati livelli di apoptosi rilevati dal clivaggio di PARP-1. I risultati presentati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti.

I nostri dati dimostrano come nelle linee cellulari con elevati livelli di SMYD3, la sua espressione e allo stesso modo la sua attività metil-transferasica sia richiesta per la sopravvivenza delle cellule tumorali durante il periodo di stress. Infatti, questi risultati indicano che sia l'inibizione farmacologica sia l'ablazione genetica di SMYD3 scatenano una morte di tipo apoptotico, dimostrata dall'aumento del clivaggio della caspasi 3 e del suo substrato diretto PARP-1. Pertanto, questi dati rafforzano quelli già disponibili, indicando SMYD3 come possibile target nella terapia del cancro del colon-retto.

ATTIVITÀ UNITÀ 2 (U2)

Fase 2a. Caratterizzazione del ruolo di SMYD3 nel TGF-β pathway in modelli cellulari.

Precisamente, sono stati definiti 2 sottogruppi di pazienti HCC in accordo alla prognosi più o meno favorevole. A questi 2 sottogruppi sono state associate 2 “signature” molecolari, designate rispettivamente con “early” e “late” TGFbeta signature. La *late signature* si associa a caratteri di maggiore invasività della neoplasia (e prognosi peggiore) rispetto alla *early signature*. In base a questo criterio sono stati identificati due sottogruppi di linee cellulari di HCC umano che riflettono a livello molecolare le caratteristiche riscontrate nei 2 cluster descritti sopra per i pazienti.

Linee HCC late TGF-beta signature presentano caratteri di invasività accresciuta rispetto e quelle del gruppo early.(Figura M)

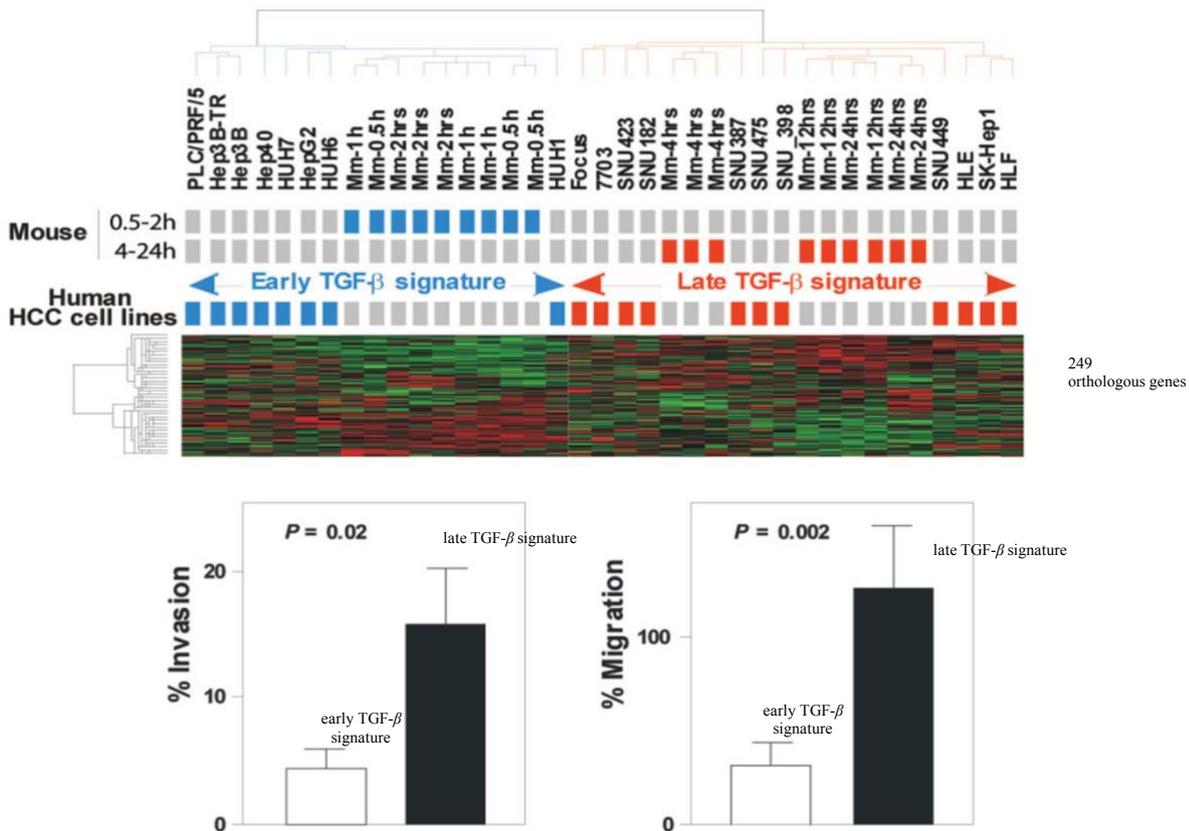


Figura M. HCC PLC/PRF/5, Hep3B ed HepG2 (early signature) e HLE e HLF (late signature) (Coulouarn C et al. Hepatology 2008)

Abbiamo determinato se l'attivazione del pathway del TGFβ altera l'espressione di SMYD3 in cellule HCC early e late TGFβ signature per delineare eventuali differenze nell'effetto della citochina sull'espressione di SMYD3 nei 2 fenotipi cellulari. In Figura C si osserva un'induzione in modo dose-dipendente dell'espressione di SMYD3 (a livello di mRNA e proteina) da parte dello stimolo con TGFβ per 48 ore sia in cellule early (PLC/PRF/5), che late (HLE e HLF). Abbiamo quindi valutato gli effetti del trattamento con TGFβ1 sull'espressione di SMYD3 in linee HCC early (PLC/PRF/5, Hep3B ed HepG2) e late (HLE e HLF) a tempi più lunghi (48, 72 e 96 ore) questa volta in presenza o meno dell'inibitore del recettore I del TGFβ (TGFBR1), LY2157299 (galunisertib). Il galunisertib inibisce l'espressione di SMYD3 e annulla l'effetto del TGFβ1 nelle linee PLC/PRF/5, HLE e HLF. Nelle linee Hep3B e HepG2 l'effetto della citochina e dell'inibitore risulta piuttosto controverso. (Figura N) Successivamente è stata testata la proliferazione delle stesse cellule, silenziate o non per SMYD3, in assenza o presenza di TGFβ1, galunisertib, o entrambi. Il TGFβ1 esercita un effetto complessivamente inibitorio sulla proliferazione di cellule HCC con early o late TGFβ signature (PLC/PRF/5 e HLE rispettivamente). Il silenziamento di SMYD3 accresce l'effetto inibitorio del TGFβ su cellule HLE, ma non PLC/PRF/5 (Figura N).

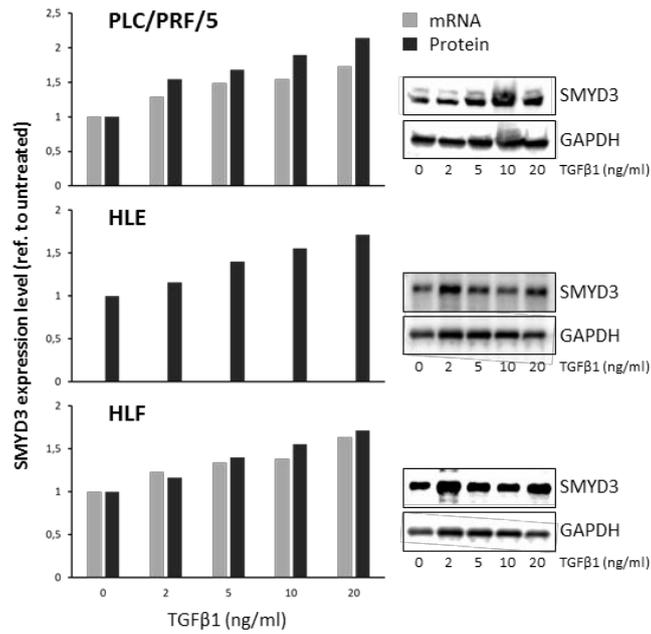


Figura N. Il TGFβ accresce l'espressione di SMYD3 (a livello di mRNA e proteina) in cellule di HCC.

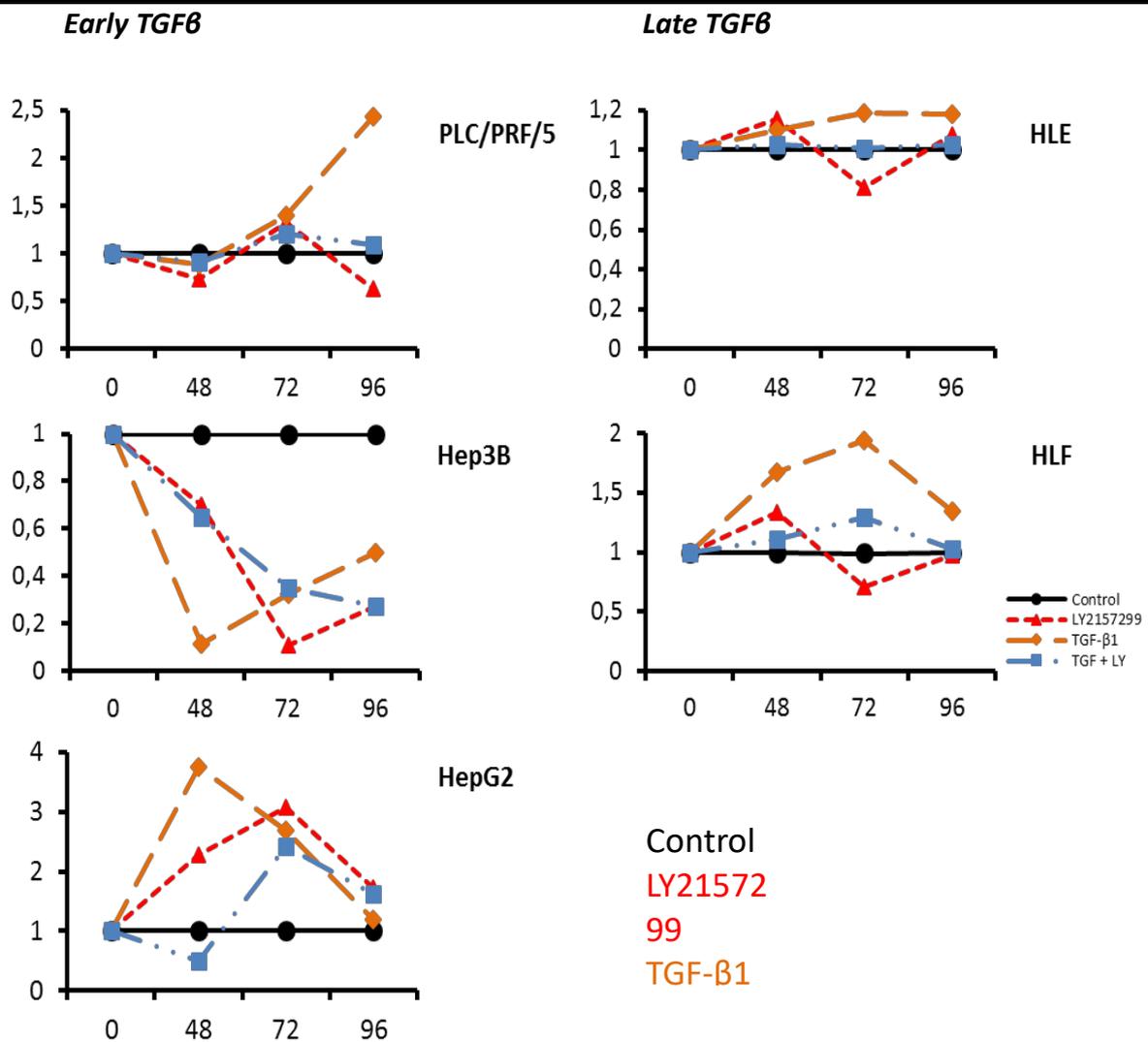


Figura O. Time course dell'espressione di SMYD3 (mRNA) in cellule HCC *early* e *late* TGF β signature.

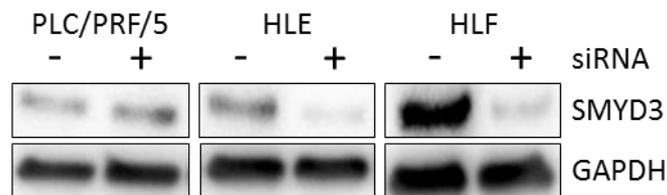
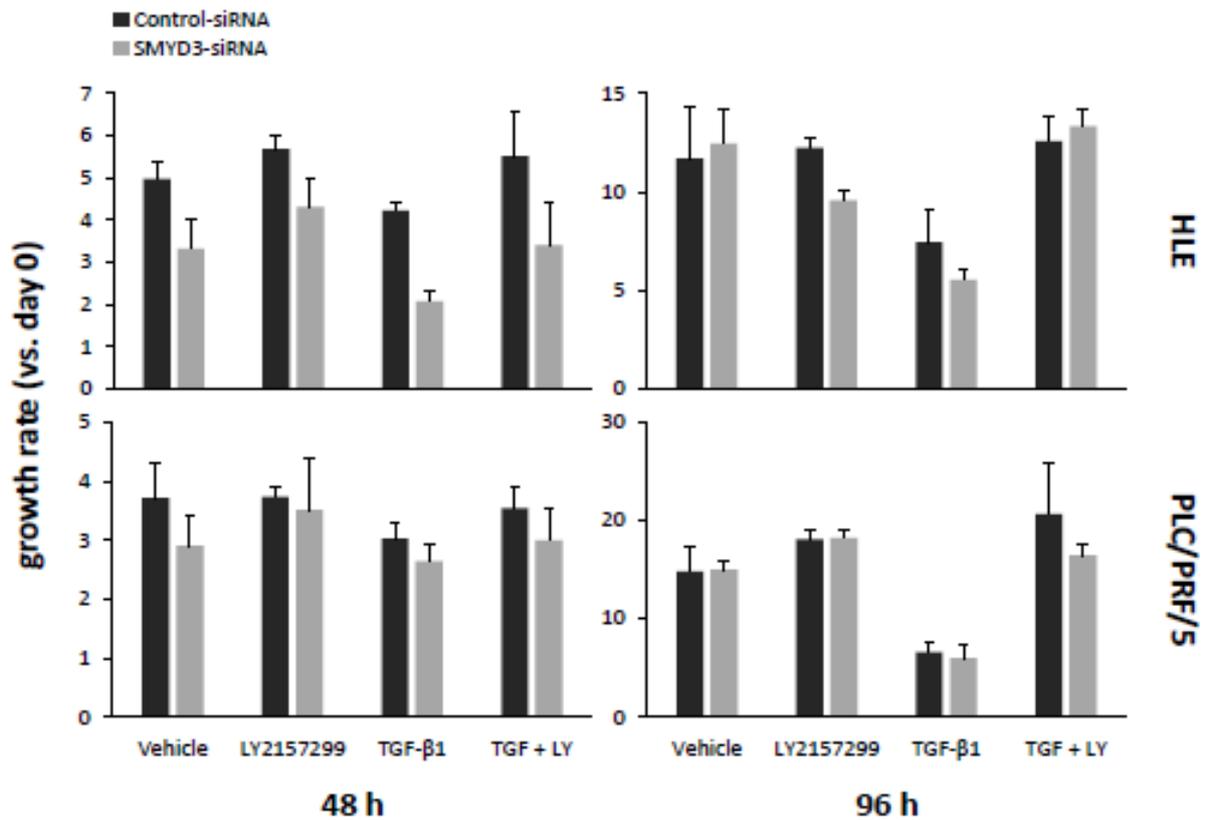


Figura P: (sopra) Saggio di proliferazione di cellule HLE (late TGF β signature), e cellule PLC/PRF/5 (early TGF β signature) silenziate per SMYD3, e trattate con TGF- β 1 e/o LY2157299 (galunisertib); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. (sotto) Efficienza del silenziamento di SMYD3 in cellule PLC/PRF/5, HLE e HLF (western blot).

Abbiamo determinato i livelli di espressione di SMYD3 in tessuti tumorali e peritumorali di HCC umano (Figura Q). L'espressione di SMYD3 è significativamente più alta nel tumore che nel circostante tessuto peritumorale.

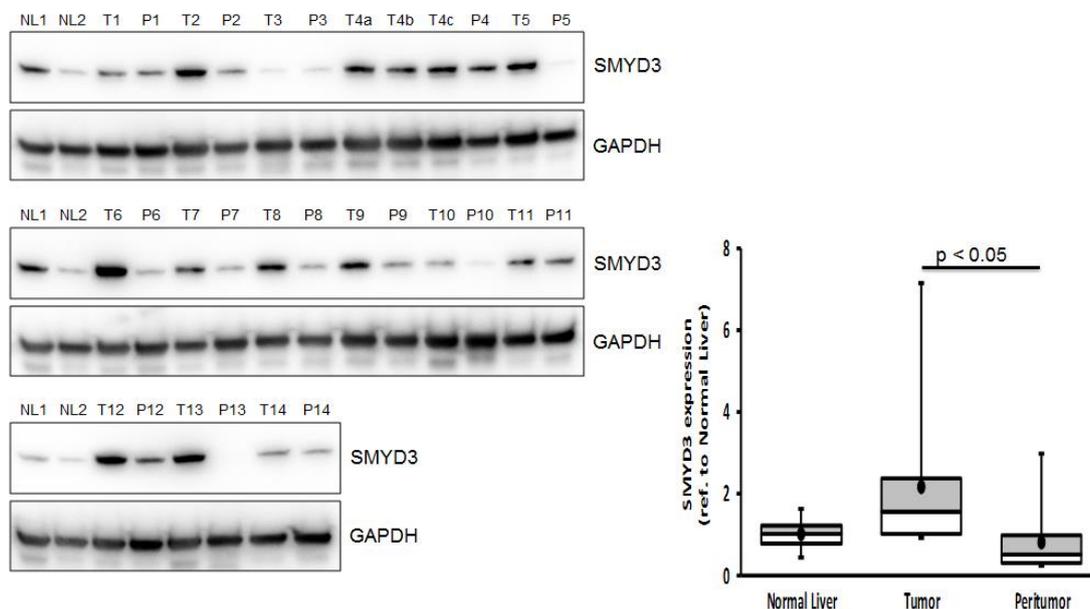


Figura Q. Espressione di SMYD3 in tessuti HCC umani tumorali e peritumorali (western blot).

Poiché è stato determinato che SMYD3 occupa regioni di genoma in cui sono presenti molti promotori di oncogeni (Sarris et al., Cancer Cell 2016), è stata analizzata l'espressione trascrizionale di questi geni in cellule HCC silenziate e non per SMYD3. L'analisi ha rivelato che il silenziamento di SMYD3 in cellule PLC/PRF/5 (early TGF β signature) e HLE e HLF (late TGF β signature) induce una riduzione dell'espressione di un set di geni promotori di carcinogenesi, alcuni dei quali promotori della transizione epitelio-mesenchimale (EMT) (Figura R). Pertanto, la funzione di SMYD3 potrebbe essere importante per la regolazione trascrizionale di numerosi oncogeni coinvolti nella regolazione della EMT durante la carcinogenesi epatica.

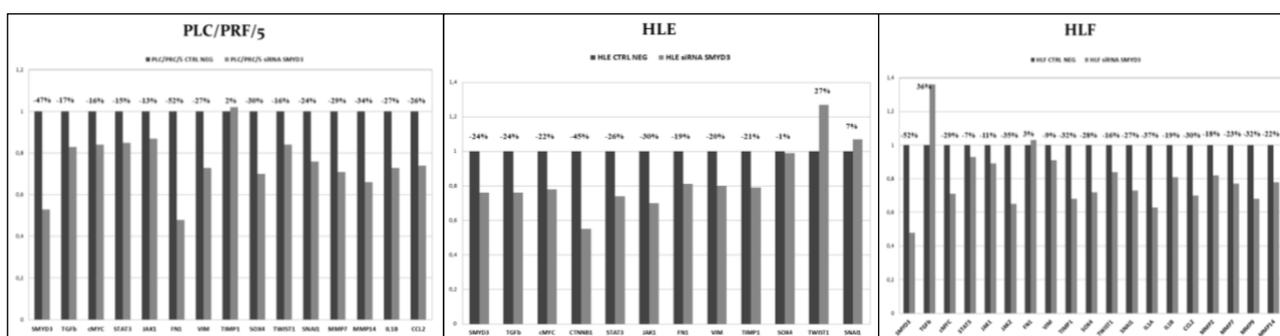


Figura R. Effetto del silenziamento di SMYD3 sull'espressione del mRNA di oncogeni/geni EMT in cellule HCC.

RISULTATI CONSEGUITI NEL TERZO ANNO DI PROGETTO DALL'UNITÀ 2

Per determinare gli effetti biologici dell'interazione tra il pathway del TGF β e l'attività di SMYD3 sono stati testati in combinazione l'inibitore del recettore I del TGF β (LY2157299, o galunisertib, abbrev. LY) e l'inibitore dell'attività metilasi di SMYD3 (BCI121) in saggi di proliferazione e migrazione di cellule HCC. Il galunisertib e BCI121 non sono risultati inibire la proliferazione di

cellule HLE e PLC/PRF/5 sia individualmente che in combinazione (Figura S). Tuttavia sono efficaci nell'inibire la capacità migratoria delle stesse cellule, sia basale, che potenziata dall'effetto pro-migratorio del TGFβ. (Figura T)

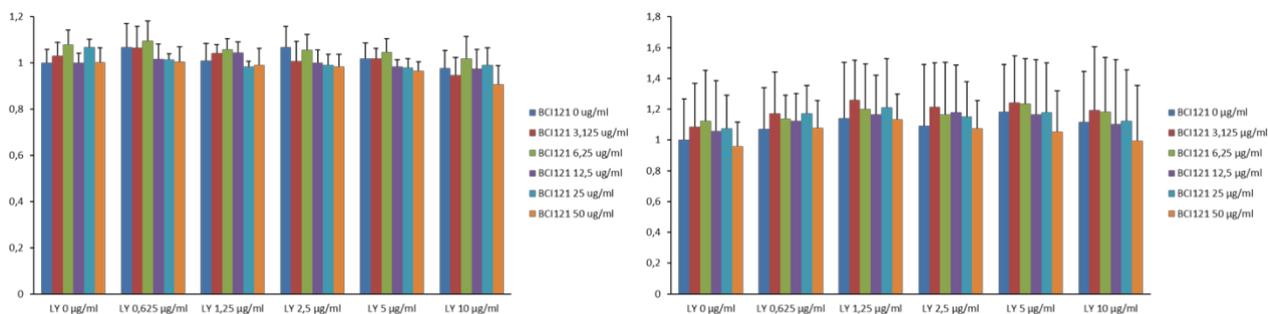


Figura S. L'inibizione combinata del TGFBR1 e di SMYD3 non ha effetti sulla proliferazione di cellule HCC HLE (sinistra) e PLC/PRF/5 (destra).

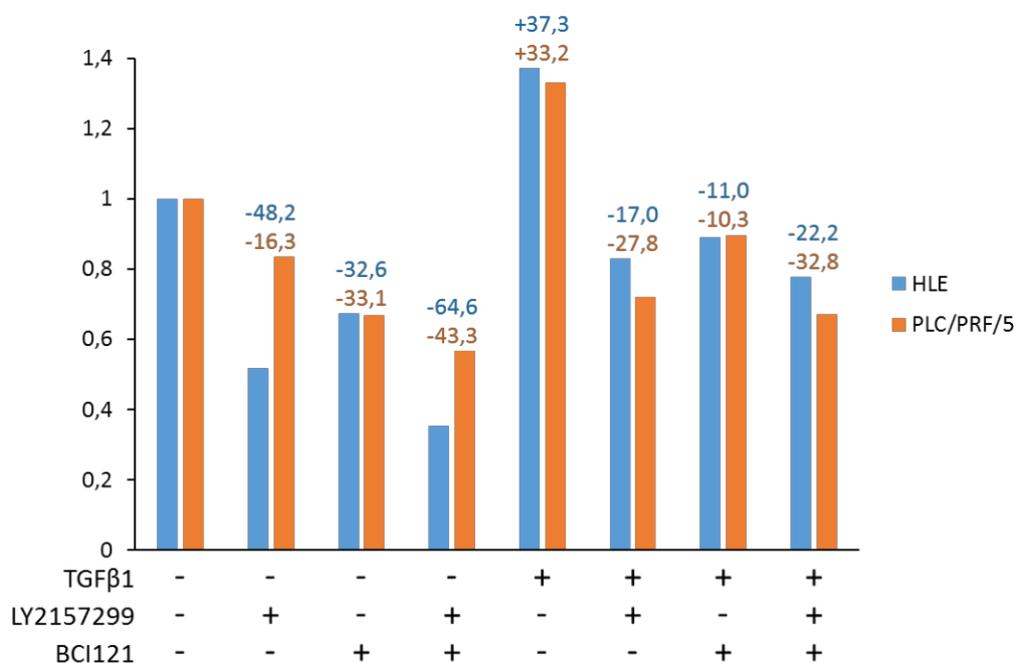


Figura T. Effetto cooperativo dell'inibizione dell'attività metilasi di SMYD3 e del pathway del TGFβ sulla migrazione di cellule HCC. Le percentuali di inibizione della capacità migratoria rispetto alle cellule non trattate sono indicate.

Nel periodo in considerazione si è studiato l'effetto dell'interazione tra il pathway del TGFβ e SMYD3 sulla capacità invasiva di cellule HCC.

Per tale finalità si è proceduto come segue:

- 1) Generazione di cloni cellulari per l'over-espressione di SMYD3 nella linea cellulare PLC/PRF/5 (scarsa espressione basale di SMYD3).

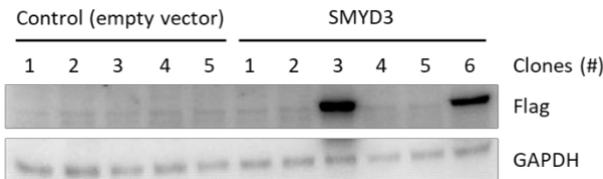
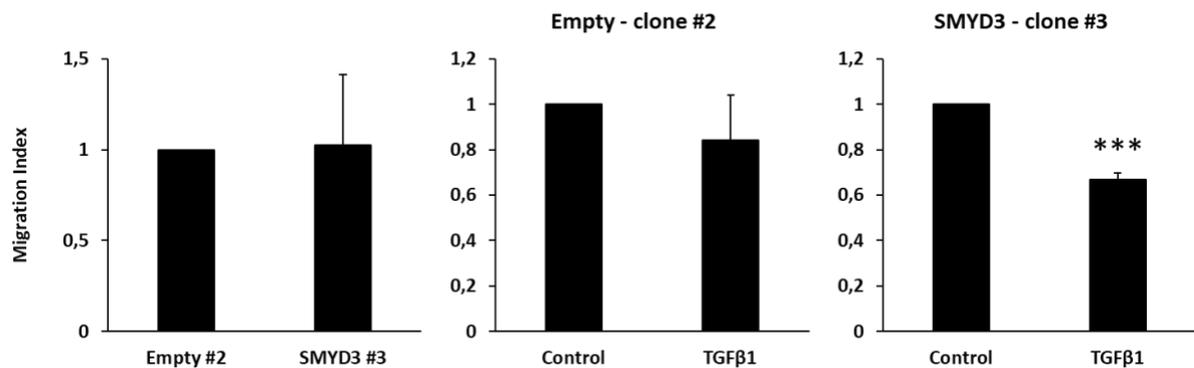


Figura U. Le cellule PLC/PRF5 che esprimono livelli basali relativamente bassi di SMYD3 sono stati transfettati con un vettore di DNA controllo (empty vector), o che contiene un cDNA per l'over-espressione di SMYD3 (in forma "taggata" con una sequenza *Flag*). Sono stati quindi generati cloni, successivamente esaminati tramite western blot per l'espressione di Flag-SMYD3. Due cloni SMYD3 positivi (#3 e #6) e 2 cloni controllo (#1 e #2) sono stati quindi impiegati per i test di migrazione cellulare.

- 2) Saggi di migrazione cellulare (wound healing assay) con cloni PLC/PRF/5 controllo (#1 e #2), e che over-esprimono SMYD3 (#3, #6). Le cellule sono state pre-trattate per 48 ore con TGF β (5 ng/ml) e/o l'inibitore dell'attività metilasica di SMYD3, BCI-121 (10 μ M), e quindi testate per la migrazione per un tempo di 7 ore.

Figura V

(1)



(2)

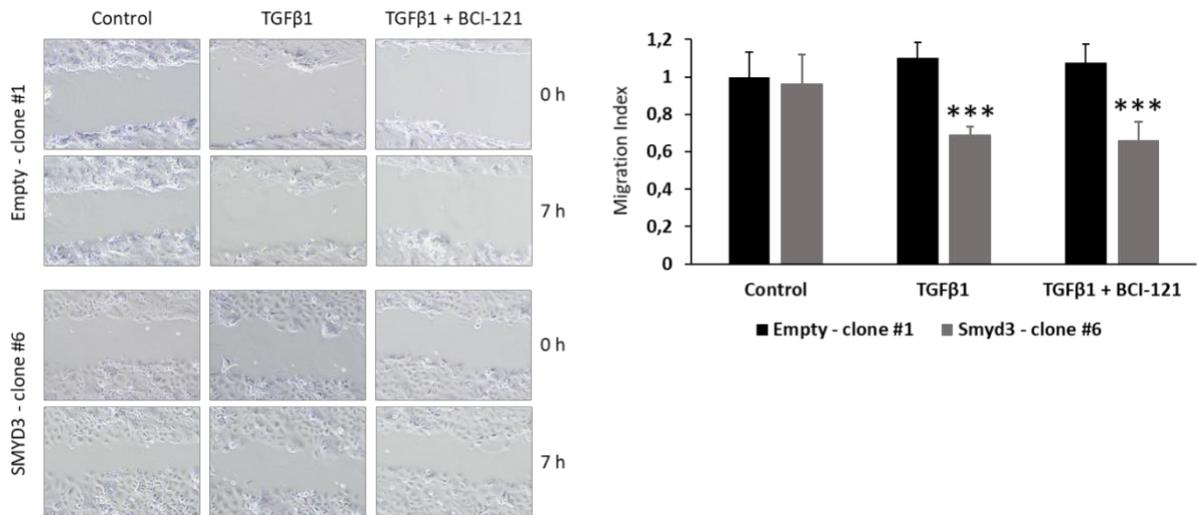


Figura V. La over-espressione di SMYD3 non altera la capacità migratoria delle cellule (Fig. V-1, sinistra). Il trattamento delle cellule controllo con TGFβ1 non ha effetti sulla motilità di queste cellule (Fig. V-1, centro). Tuttavia, in cellule con espressione ectopica di SMYD3 la citochina determina una ridotta attività migratoria (-33%) (Fig. V-1, destra). La figura N-1 è il risultato di n. 4 esperimenti indipendenti, ognuno eseguito catturando e quantificando 6 campi microscopici per condizione. Tale saggio di migrazione è stato condotto in 2 altri cloni controllo e SMYD3+ con risultato consistente (Figura V-2). In questo caso 6 campi microscopici per condizione sono stati catturati e quantificati. Il trattamento con BCI-121 non abolisce l'effetto inibitorio dell'over-espressione di SMYD3 sulla migrazione di cellule esposte al TGFβ1. Campi microscopici rappresentativi sono mostrati. *** $p < 0.001$.

Conclusioni

L'espressione ectopica di SMYD3 in cellule di HCC con livelli di espressione della proteina relativamente bassi determina un'inattesa inibizione della capacità migratoria delle stesse quando sono trattate con TGFβ1, rispetto alle cellule controllo. L'inibizione dell'attività metilasi di SMYD3 con l'uso di BCI-121 non abolisce tale effetto, suggerendo che la funzione metil-transferasica della proteina non sarebbe coinvolta. È possibile ipotizzare che SMYD3 interagisca con il pathway del TGFβ ad un livello ancora non ben chiarito ed eserciti un controllo sull'attività dello stesso pathway in modo da renderla anti-migratoria. Ulteriori saggi di migrazione sono in corso su cloni di una differente linea di HCC (Hep3B), che over-esprimono SMYD3, al fine di confermare i dati fino qui ottenuti. Inoltre, gli stessi saggi verranno eseguiti su cellule HCC silenziate per SMYD3 con siRNAs, per verificare l'effetto del *loss-of-function* di SMYD3 sulla migrazione delle cellule in presenza di TGFβ. Tali esperimenti potranno contribuire a mettere in luce nuovi aspetti del ruolo di SMYD3 nelle cellule cancerose, come la possibilità che funzioni da interruttore molecolare nella regolazione del pathway del TGFβ.

Obiettivi specifici dello studio da programmazione iniziale:

Gli studi sopra riportati aprono la strada per una migliore comprensione dei meccanismi molecolari che correlano le funzioni molecolari di SMYD3 alle proteine non istoniche, sia nel compartimento citoplasmatico che in quello nucleare.

Perseguendo questo scopo nel presente progetto ci proponiamo di analizzare in dettaglio il ruolo di SMYD3 nei pathway di RAS e TGF- β deregolati rispettivamente nel cancro del colon retto, nell'epatocarcinoma e nel colangiocarcinoma.

A tal fine, questa proposta progettuale verrà articolata in due fasi, incentrate sulla caratterizzazione dell'interazione di SMYD3 con MEK1 e con TGF- β , due proteine cruciali dei pathway cancro specifici del cancro del colon retto, nell'epatocarcinoma e nel colangiocarcinoma.

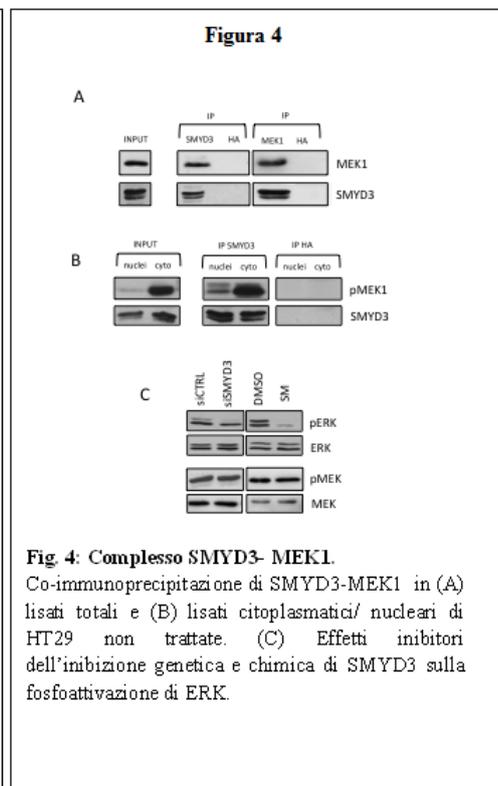
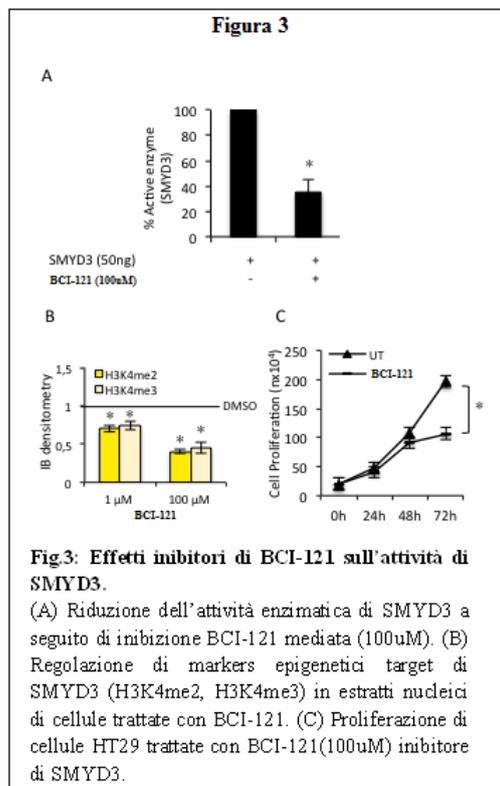
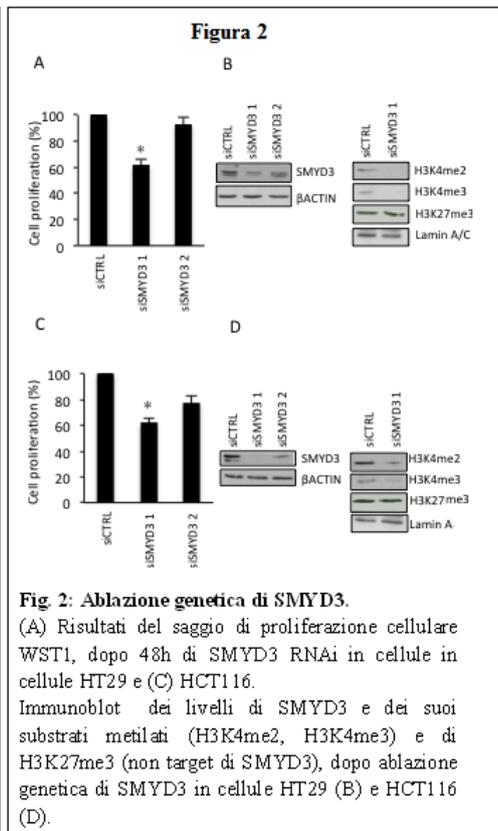
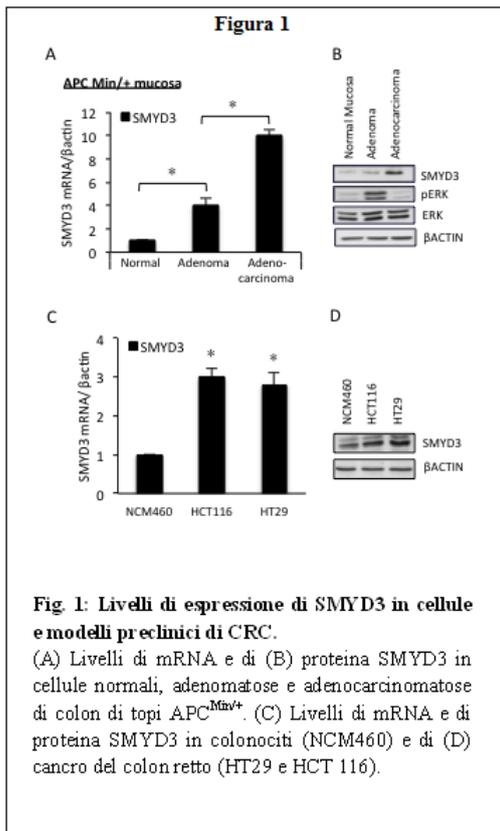
Obiettivo specifico 1: Il primo obiettivo del presente studio sperimentale, sarà caratterizzare in linee cellulari di CCR (HT29, HCT116, CaCO2, LS174T, SW80) l'interazione di SMYD3 con proteine non istoniche, e soprattutto la funzionalità biologica del complesso SMYD3/MEK1.

Obiettivo specifico 2: Caratterizzazione del ruolo di SMYD3 nella modulazione del pathway TGF- β . Il pathway TGF- β gioca un ruolo chiave nella patogenesi dell'Epatocarcinoma. In questi tumori, SMYD3 si accumula nella frazione nucleare durante la fase G2/M del ciclo cellulare, e la sua ablazione genetica causa una riduzione nella progressione verso la mitosi. Inoltre, recenti dati di letteratura indicano che SMYD3 correla con TGF- β in pazienti con cancro gastrico. Infine, come abbiamo precedentemente ricordato, l'ablazione genetica di SMYD3 in modelli animali riduce la formazione di tumori epatici ed intestinali oltre a contrastare l'EMT (epithelial-mesenchymal transition), fenomeno fondamentale della progressione tumorale fortemente dipendente dalla cascata del TGF- β (Giannelli et al., 2016; Fabregat et al. 2016).

Dato che SMYD3 sostiene la tumorigenesi attraverso la metilazione di mediatori chiave dello stimolo proliferativo (i.e. VEGFR, AKT), scopo della Task 2 è quello di investigare l'impatto dell'attività di SMYD3 sulla via di segnalazione del TGF β . Per prima cosa ci proponiamo di identificare i potenziali attori responsabili di tali interazioni, in secondo luogo, investigheremo i membri del TGF- β pathway come substrato candidato alla metilazione da parte di SMYD3. Infine, studieremo l'impatto dell'attività di SMYD3 nel meccanismo di tumorigenesi dipendente da TGF- β .

Obiettivo 1:

Nei pazienti con CCR, il pathway EGF/RAS/RAF/MEK/ERK rappresenta la via fondamentale di progressione tumorale. Inoltre l'attivazione di ERK, può indurre la tumorigenesi nelle cellule epiteliali dell'intestino nei topi APC^{Min/+}. E' stato anche dimostrato che SMYD3 sostiene la proliferazione delle cellule cancerose attraverso la metilazione di mediatori chiave dello stimolo proliferativo (i.e. VEGFR, MAP2K3). I nostri risultati preliminari indicano che SMYD3 interagisce fisicamente con uno dei più importanti mediatori intracellulari della proliferazione delle cellule di CCR, ovvero la forma attiva di MEK1 (P-MEK1). Inoltre, l'inibizione di SMYD3 reprime fortemente l'attivazione di ERK senza però agire sui livelli di P-MEK1 (Dati Preliminari, Figure 1,2,3,4).



Lo scopo di questa prima fase del progetto, sarà investigare l'impatto dell'attività di SMYD3 sulla via di segnalazione MEK/ERK. *In primis* ci proponiamo di identificare i domini responsabili di tali interazioni, *in secundis*, studieremo MEK1 come substrato candidato alla metilazione mediata da SMYD3. Infine, analizzeremo il ruolo di SMYD3 nel meccanismo di cancerogenesi dipendente da MEK1. Operativamente, il lavoro sperimentale inerente a questo primo obiettivo sarà suddiviso in 4 diverse fasi: la fase 1A. che verterà sulla caratterizzazione dell'interazione SMYD3-MEK1; la fase 1b

incentrata sull'analisi della metilazione operata da SMYD3 su MEK1 e il suo effetto sull'attività di MEK1; la fase 1C in cui saranno analizzati gli effetti di SMYD3 sulla via di segnalazione MEK/ERK in vivo e in ultimo, la fase 1D. Caratterizzazione della relazione esistente tra SMYD3 e MEK1 in cellule che abbiano mutazioni a carico di Myc/Ras.

Il principale obiettivo della prima fase sarà l'analisi delle caratteristiche biochimiche-molecolari alla base dell'interazione tra SMYD3 e MEK1. A tal fine, saranno caratterizzati i domini specifici di MEK1 coinvolti nell'interazione con SMYD3. L'obiettivo di questa subtask sarà l'identificazione di regioni e/o residui critici di MEK1 che risultino potenziali target per la metilazione mediata da SMYD3. Poiché molte delle metiltransferasi contenenti il dominio SET, inclusa SMYD3, modificano le lisine, concentreremo le nostre analisi sulle lisine nel dominio regolatorio dell'attività di MEK1. Sebbene non ci siano evidenze sperimentali che suggeriscano la presenza di motivi altamente conservati per le istone metiltransferasi (HMT), recenti studi hanno mostrato come il motivo (K/R)-(S/T/A)-K rappresenti un target preferenziale per le SET7/9, mentre i residui G-S-K sono bersaglio della metilazione SMYD3 mediata.

Il ruolo funzionale dell'interazione SMYD3/MEK1 sarà successivamente investigato in un contesto cellulare, attraverso l'utilizzo di modelli sperimentali overesprimenti mutanti di SMYD3 e di MEK1. In questi modelli, andremo ad analizzare la fosfoattivazione di ERK dipendente da MEK1, attraverso l'ablazione genetica (indotta con siRNA o shRNA) e/o trattamenti farmacologici inibitori di SMYD3 (attraverso BCI-121). Questo step permetterà di comprendere se la metilazione SMYD3 dipendente di MEK1 è un segnale necessario e/o sufficiente per un'upregolazione della via di segnalazione MEK/ERK o se in alternativa in quest'upregolazione sono coinvolti ulteriori segnali intracellulari.

Obiettivo 2:

Caratterizzazione del ruolo di SMYD3 nella modulazione del pathway TGF- β

Il pathway TGF- β gioca un ruolo chiave nella patogenesi dell'Epatocarcinoma. In questi tumori, SMYD3 si accumula nella frazione nucleare durante la fase G2/M del ciclo cellulare, e la sua ablazione genetica causa una riduzione nella progressione verso la mitosi. Inoltre, recenti dati di letteratura indicano che SMYD3 correla con TGF- β in pazienti con cancro gastrico. Infine, come abbiamo precedentemente ricordato, l'ablazione genetica di SMYD3 in modelli animali riduce la formazione di tumori epatici ed intestinali oltre a contrastare l'EMT (epithelial-mesenchymal transition), fenomeno fondamentale della progressione tumorale fortemente dipendente dalla cascata del TGF β (Fabregat et al. 2016).

Dato che SMYD3 sostiene la tumorigenesi attraverso la metilazione di mediatori chiave dello stimolo proliferativo (i.e. VEGFR, AKT), scopo della Task 2 è quello di investigare l'impatto dell'attività di SMYD3 sulla via di segnalazione del TGF β . Per prima cosa ci proponiamo di identificare i potenziali attori responsabili di tali interazioni, in secondo luogo, investigheremo i membri del TGF- β pathway come substrato candidato alla metilazione da parte di SMYD3. Infine, studieremo l'impatto dell'attività di SMYD3 nel meccanismo di tumorigenesi dipendente da TGF β .

2A *Caratterizzazione del ruolo di SMYD3 nel TGF- β pathway in modelli cellulari.* A tal fine verranno utilizzate differenti linee cellulari di HCC variamente responsive al TGF- β (early and Late TGF- β signature) nella proliferazione e sopravvivenza cellulare.

2B *Analisi di interazione fisica e/o funzionale di SMYD3 con i mediatori del TGF- β pathway.* Obiettivo di questa subtask è quello di valutare la possibilità che SMYD3 interagisca fisicamente e/o funzionalmente con i principali mediatori della cascata del TGF β . A tal fine verranno utilizzati approcci diversi e complementari.

2C. *Analisi dell'attività di metilazione di SMYD3 sulle proteine della cascata TGF- β (TGF β R e SMADs) e del suo effetto sulla loro attività/funzione.* L'obiettivo di questa subtask sarà quello di identificare le regioni e i residui critici per la metilazione mediata da SMYD3 (domini G-S-K).

2D Studi cellulari. Una volta identificate le interazioni proteina-proteina e gli effetti di SMYD3 sulla loro funzione, condurremo studi funzionali over-esprimendole e/o inattivandole in linee cellulari precedentemente descritte.

Dati preliminari:

Recentemente abbiamo studiato l'espressione e l'attività di SMYD3 in un modello preclinico di CCR ed abbiamo riscontrato che durante la cancerogenesi questa metil transferasi è fortemente upregolata sia a livello trascrizionale che traduzionale. I nostri risultati mostrano anche che l'ablazione genetica di SMYD3 interferisce con la proliferazione delle cellule di CCR, suggerendo che SMYD3 abbia un ruolo chiave nella regolazione del tasso di proliferazione delle cellule tumorali (Fig.2). Questi dati, oltre a evidenziare un ruolo cruciale delle lisine metiltransferasi come potenziali target per la scoperta di nuovi farmaci, ci hanno spinto ad effettuare uno screening virtuale di piccole molecole, al fine di identificare possibili inibitori farmacologici di SMYD3. In quest'analisi riportiamo come uno di questi composti (BCI-121) induca una riduzione significativa dell'attività di SMYD3 sia in vitro che in cellule di CCR, come suggerito dall'analisi dei livelli di H3K4me e H4K5me (Fig.3). È importante sottolineare come gli effetti della crescita tumorale di BCI-121 siano paragonabili a quelli osservati a seguito dell'ablazione genetica di SMYD3.

L'efficacia inibitoria di BCI-121 su SMYD3 è stata prevalentemente studiata in cellule di CCR, tuttavia, come dimostrano i nostri studi, un effetto simile è stato riscontrato anche su linee cellulari di cancro del polmone, del pancreas, della prostata e dell'ovaio (Peserico et al., 2015). Questi promettenti risultati identificano SMYD3 come potenziale bersaglio per futuri protocolli terapeutici anticancro basati su composti che, come BCI-121 inibiscono chimicamente SMYD3 arrestando, di conseguenza la sua attività oncogenica.

La FDA (Food and Drug Administration) ha recentemente approvato diversi nuovi farmaci epigenetici per il trattamento di specifici tumori umani, e gli inibitori che hanno come target EZH2, componente della famiglia delle KMT, sono attualmente in sperimentazione clinica. In questo scenario, una migliore comprensione del ruolo di SMYD3 nella tumorigenesi del tratto gastroenterico, potrebbe essere un vantaggio per futuri interventi farmacologici.

Metodologie e analisi statistiche:

Obiettivo 1

La realizzazione del primo obiettivo di studio avverrà attraverso le seguenti fasi di indagine sperimentale: 1a. Caratterizzazione dell'interazione SMYD3-MEK1; 1b. Analisi della metilazione operata da SMYD3 su MEK1 e il suo effetto sull'attività di MEK1; 1c. Effetti di SMYD3 sulla via di segnalazione MEK/ERK in vivo; 1d. La caratterizzazione della relazione esistente tra SMYD3 e MEK1 in cellule che abbiano mutazioni a carico di Myc/Ras.

Fase 1a. Caratterizzazione dell'interazione SMYD3-MEK1.

Metodi: l'interazione tra SMYD3 e MEK1 verrà prima esaminata in vitro attraverso l'immunoprecipitazione di proteine purificate taggate con GST e/o con HIS, e derivate da costrutti di SMYD3 completi e da costrutti completi e tronchi di MEK1, già disponibili nel nostro laboratorio (fig). Questi risultati saranno ampliati mediante saggi di coimmunoprecipitazione. A tale scopo, andremo a cotrasferire cellule come le HEK293 e/o NIH3T3 con SMYD3 e con differenti regioni di MEK1 per ottenere una espressione ectopica. Le analisi dei complessi immunoprecipitati saranno completate mediante l'utilizzo di anticorpi tag specifici (anti-HIS e/o anti-MYC e/o FLAG).

Fase 1b. Analisi della metilazione operata da SMYD3 su MEK1 e il suo effetto sull'attività di MEK1.

Metodi: La caratterizzazione sperimentale di potenziali siti (K168 e K268) target della metilazione SMYD3 dipendente su MEK1, avverrà attraverso un saggio di pull down in cui utilizzando costrutti tronchi di MEK1 e costrutti enzimaticamente (in)attivi di SMYD3 (privati del dominio SET) sarà evidenziata l'interazione MEK1-SMYD3 mediante marcatura con GST e/o HIS. Successivamente, in dipendenza dei risultati ottenuti con il saggio di pull down, identificheremo *in vitro* i residui metilati di MEK1, generando dei costrutti mutati di questa proteina. La mutagenesi consisterà in sostituzioni puntiformi delle lisine putative, target di SMYD3 con alanine (e.g. K168A e K268A). La sostituzione delle lisine metilabili di MEK1 con aminoacidi non metilabili ci permetterà di confermare i siti specifici di metilazione. Infine, per caratterizzare l'effetto funzionale della metilazione di MEK1 sulla sua attività catalitica (fosfoattivazione di ERK), realizzeremo un kinase assay per MEK1 utilizzando ERK come substrato. Questi saggi saranno realizzati incubando le proteine purificate, derivanti dai costrutti completi di SMYD3, con i costrutti derivanti da MEK1 (metilabili e non) e /o incubando i plasmidi che esprimono la proteina SMYD3 privata del suo dominio SET con MEK1. Qualsiasi risultato ottenuto da questa subFase ci permetterà di chiarire la regolazione SMYD3-dipendente sull'attività di MEK1. Ovviamente, se il saggio di pull down dovesse rivelare come target di metilazione (SMYD3 mediata), diverse e/o altre lisine di MEK1, seguiremo la medesima procedura di caratterizzazione.

Fase 1c. Effetti di SMYD3 sulla via di segnalazione MEK/ERK in cellulo.

Metodi: Per realizzare gli obiettivi procederemo dapprima a cotrasfettare le HEK293 e le cellule della linea NIH3T3 con i costrutti completi e tronchi sia di SMYD3 che di MEK1. L'attivazione della pathway MEK/ERK verrà ottenuta mediante diversi stimoli (deprivazione del siero, stress ossidativo, inibitori delle chinasi). Successivamente, per assicurare la stretta dipendenza da SMYD3, dell'attività di MEK1, andremo ad analizzare mediante saggi di immunoblotting la fosfoattivazione delle proteine a valle di MEK/ERK, attraverso utilizzo di farmaci e/o mediante l'ablazione genetica di SMYD3.

Fase 1d. La caratterizzazione della relazione esistente tra SMYD3 e MEK1 in cellule che abbiano mutazioni a carico di Myc/Ras.

Metodi: Proceduralmente, per prima cosa trasformeremo le cellule MEF da cellule normali in maligne, attraverso l'impiego di retrovirus esprimenti gli oncogeni c-Myc e h-Ras-V12. Successivamente, procederemo con la cotrasfezione nelle cellule di costrutti completi e tronchi, attivi e inattivi di SMYD3 e MEK1. Nella fase successiva, testeremo nel fenotipo cellulare appena trasformato, l'effetto tumorigenico di SMYD3 sulla via di segnalazione MEK/ERK attraverso l'uso di tipici saggi di tumorigenesi (Matrigel, colony, MTT e WST). In aggiunta, le linee cellulari di CCR (HT29, HCT116, CaCO2, LS174T, SW80) saranno sottoposte a diversi stimoli correlati alla carcinogenesi (starvation da siero, stress ossidativo, etc), per valutare come l'interazione funzionale di SMYD3 con MEK1 influisca sull'effetto finale di ogni stimolo (matrigel, colony, MTT, WST) e sui livelli di fosfoattivazione delle proteine a valle della via di segnalazione di MEK/ERK. Per testare la dipendenza di SMYD3, eseguiremo l'ablazione farmacologica (BCI-121) e genetica (con siRNA o shRNA) negli stessi modelli cellulari.

Fase 2 Caratterizzazione del ruolo di SMYD3 nella modulazione del pathway TGF- β

La realizzazione del secondo obiettivo di studio avverrà attraverso le seguenti fasi di indagine sperimentale: 2a. *caratterizzazione del ruolo di SMYD3 nel TGF- β pathway in modelli cellulari.*

2b. *analisi di interazione fisica e/o funzionale di SMYD3 con i mediatori del TGF- β pathway;* 2c. *Analisi dell'attività di metilazione di SMYD3 sulle proteine della cascata TGF- β (TGF- β R e SMADs) e del suo effetto sulla loro attività/funzione;* 2d. *Studi cellulari.*

Fase 2a. Caratterizzazione del ruolo di SMYD3 nel TGF- β pathway in modelli cellulari.

Metodi: Nelle suddette linee cellulari di HCC (HepG2 e HLE in rappresentanza della early e late TGF- β signature rispettivamente) verrà silenziata l'espressione di SMYD3 a livello di messaggero (RNAi), oppure inibita la sua attività enzimatica con BCI-121, al fine di valutare la risposta alla stimolazione

con il ligando TGF- β . Visto che SMYD3 è in grado di regolare sia l'attivazione che l'attività di chinasi coinvolte nei meccanismi di trasduzione del segnale, che siano recettori di membrana (es. VEGFR) o intermedi citoplasmatici (es. AKT, MAP3K2), valuteremo, mediante analisi di immunoblot e/o di attività chinasi in vitro (sia con proteine purificate che immunoprecipitando le chinasi da estratti cellulari), lo stato di fosforilazione/attivazione di mediatori endogeni della via del TGF- β (TGF- β R, SMAD2-7). Utilizzeremo, inoltre, inibitori per bloccare il segnale a monte della cascata TGF- β (galunisertib), antagonisti del ligando TGF- β (anticorpi monoclonali, DC10) e silenzieremo l'espressione dei principali mediatori del pathway TGF- β (siRNA per i geni SMAD). In tutte le condizioni sperimentali descritte valuteremo anche la formazione e localizzazione subcellulare dei multicomplessi proteici costituiti dalle proteine SMAD mediante frazionamenti cellulari, co-immunoprecipitazioni e analisi di western blot oppure analisi di immunofluorescenza con microscopia confocale su cellule intatte. Infine, valuteremo l'espressione dei principali geni target del TGF- β pathway coinvolti nel processo di progressione tumorale di queste neoplasie.

Fase 2b Analisi di interazione fisica e/o funzionale di SMYD3 con i mediatori del TGF- β pathway.

Metodi: la proteina purificata GST-SMYD3 verrà impiegata in una reazione di legame con i lisati proteici ottenuti da cellule di HCC trattate o meno con il ligando TGF- β con e senza l'aggiunta di galunisertib. I complessi proteici purificati saranno analizzati per immunoblot con anticorpi specifici per le proteine della cascata TGF- β (TGF- β R e SMADs). Un altro approccio prevede l'overespressione del costrutto SMYD3-FLAG nelle HepG2 e HLE seguita da saggi di immunoprecipitazione con anticorpo anti-FLAG e successiva analisi di immunoblot con anticorpi specifici per le proteine della cascata TGF- β (TGF- β R e SMADs). Per confermare l'effettiva formazione dei multicomplessi proteici nel contesto cellulare, procederemo all'esecuzione di co-immunoprecipitazioni di proteine endogene grazie all'utilizzo di anticorpi in grado di riconoscere SMYD3 e le proteine della cascata TGF- β (TGF- β R e SMADs). L'ultimo approccio sarà utile per dimostrare l'eventuale interazione diretta fra proteine purificate con saggi di legame in vitro. In caso di interazione diretta utilizzeremo dei costrutti in grado di codificare porzioni discrete della proteina SMYD3 (N-terminale, centrale, C-terminale) e del partner identificato fra le proteine della cascata TGF- β (TGF- β R e SMADs).

Fase 2c. Analisi dell'attività di metilazione di SMYD3 sulle proteine della cascata TGF- β (TGF- β R e SMADs) e del suo effetto sulla loro attività/funzione.

Metodi: andremo a testare in vitro l'abilità che possiede SMYD3 di metilare questi residui attraverso un saggio di pull down mediante GST e/o HIS, attraverso costrutti tronchi delle proteine della cascata TGF- β (TGF- β R e SMADs) e costrutti enzimaticamente attivi ed inattivi di SMYD3 (privati del dominio SET). Successivamente, per determinare i residui metilati, e in dipendenza dei nostri risultati, abbiamo pianificato di generare dei costrutti con mutazioni puntiformi dei substrati attraverso la sostituzione dei residui delle lisine putative target di SMYD3 con le alanine (K>A). La sostituzione con aminoacidi non metilabili sui substrati ci permetterà di confermare i siti specifici di metilazione. Qualsiasi risultato ottenuto da questa subtask ci aiuterà a chiarificare la regolazione sull'attività di TGF- β SMYD3-dipendente. Sulla base di quale fra le proteine della cascata TGF- β (TGF- β R e SMADs) sarà/saranno identificate come interattori/substrati di SMYD3, procederemo a saggi funzionali in vitro ed in cellulo per valutare l'effetto della metilazione sulle attività biologiche di detta/e proteina/e.

Fase 2d. Studi cellulari.

Metodi:

Le linee cellulari verranno transfettate con costrutti, siRNA specifici e trattate o meno con inibitori chimici e/o attivatori descritti nelle tasks precedenti al fine di poter caratterizzare dal punto di vista funzionale e meccanicistico l'effetto di SMYD3 sulla cascata del TGF- β . A tal fine le linee cellulari dopo i vari trattamenti verranno sottoposte ai classici test di valutazione di proliferazione, migrazione, invasione, apoptosi e EMT.

Risultati attesi:

Nel progetto proposto, ci aspettiamo di approfondire la nostra comprensione del ruolo di SMYD3 nella fisiopatologia e terapia del CCR. I risultati derivanti saranno determinanti per la Formulazione di nuovi protocolli terapeutici basati su BCI-121 inibitore di SMYD3 testato durante i nostri studi preliminari. La necessità di terapie antitumorali in grado di eludere l'acquisizione di farmaco-resistenza e ridurre gli effetti collaterali è stimolante la ricerca di nuovi agenti terapeutici. Negli ultimi anni, i ricercatori si sono concentrati su target molecolari tumore-specifici, con lo scopo di migliorare l'efficacia del trattamento e specificità. In questo scenario, e sulla base delle nostre promettenti risultati preliminari sugli effetti di SMYD3 su MEK1 nelle vie di segnalazione CCR specifiche, e su TGF- β nel HCC e nel CCA. Il nostro progetto è finalizzato ad individuare le cascate di segnalazione suscettibili di essere mirati per promuovere la morte cellulare. Nel dettaglio, i dati raccolti in Obiettivo 1 saranno determinanti per identificare in SMYD3 un nuovo biomarcatore bersaglio di nuove terapie con il suo inibitore BCI-121 e per identificare altri target molecolari per terapia combinate. Gli esperimenti descritti in Obiettivo 2 rappresenteranno il perseguimento dell'Obiettivo 1 e serviranno a definire il ruolo di SMYD3 anche nella deregolazione del pathway di TGF- β specifica dell' HCC e del CCA affinché si possa testare l'efficacia di BCI-121 anche per queste forme di cancro. Infine, la valutazione di p38a umano in campioni tumorali di pazienti CCR proposto Obiettivo 3 aiuterà la definizione di correlazioni con la progressione del cancro, la prognosi e risposta alla terapia nell'uomo. Nel complesso, i risultati del progetto proposto forniranno importanti informazioni sul ruolo di SMYD3 nelle cascate nell'oncogenesi di colon-retto e del fegato e verificare l'efficacia della sua inibizione farmacologica, identificando al tempo stesso, un nuovo potenziale approccio terapeutico per il trattamento di queste neoplasie maligne (CCR, HCC, e CCA)

Analisi dei rischi, possibili problemi e soluzioni:

Basandoci sui nostri risultati preliminari, i dati mostrano l'interazione SMYD3-MEK1, così abbiamo disegnato questa fase per caratterizzare a pieno l'interazione, la potenziale metilazione di MEK1, SMYD3-dipendente e come questa relazione possa influire sulla risposta fisiologica nelle cellule di CCR. In caso contrario, se dovessimo rilevare l'assenza di alcun tipo di attività enzimatica correlante SMYD3 e MEK1, allora ci focalizzeremo sulle possibili ragioni e conseguenze dell'interazione indipendente dall'attività metiltransferasica, cercando partners molecolari che potrebbero agire da proteine trasduttori del segnale e/o domini di lettura epigenetici (e.g. BRD4). Qualunque risultato ottenuto da questa fase permetterà di ampliare e chiarire le attuali conoscenze della comunità scientifica sulla natura e gli aspetti molecolari del cross-talk tra SMYD3 e MEK1 nelle cellule di CCR.

Innovazioni:

Le ultime previsioni epidemiologiche mondiali designano il cancro come la principale causa di morte entro la fine di questo decennio. In particolare, il cancro del colon-retto è una preoccupazione per la salute, con oltre 1.000.000 di nuovi casi e 500.000 decessi attesi in tutto il mondo ogni anno. Le prospettive di ulteriori progressi sostanziali nella gestione del carcinoma del colon-retto risiedono in una dissezione sistematica genetica e funzionale dei percorsi molecolari coinvolti nello sviluppo del cancro e nella progressione al fine di identificare gli agenti che possono avere un impatto diretto sulla terapia

del

cancro.

In questo scenario, il nostro progetto si integra nel percorso delineato dalla più recenti progressi nella ricerca sul cancro, che prevedono che la conoscenza delle basi molecolari della malattia porterà alla cosiddetta medicina personalizzata. Medicina personalizzata si basa sul presupposto che le malattie sono eterogenei, sia nelle loro cause e nei loro risposta ai farmaci. Con limitata comprensione della base molecolare della malattia, ci siamo basati sui segni clinici specifici. In futuro, le malattie cliniche saranno sostituite da classificazioni molecolari, come fenotipi clinici pensato per essere una malattia

sarà sottoclassificate da una tassonomia genomico nuovo. Infatti, i progressi dell'oncologia molecolare indicano chiaramente che ogni tumore è una conseguenza di una serie di particolari eventi mutazionali è verificato in un tessuto specifico di una determinata persona. La visione globale molecolare della malattia di un singolo paziente permetterà interventi terapeutici per essere adattato al profilo molecolare di un individuo sulla base di marcatori molecolari diagnostici e prognostici. Tuttavia, molta strada deve ancora essere fatta prima di tali trattamenti possono essere resi disponibili e il punto di partenza di questo viaggio emozionante è la spiegazione del biologico, i meccanismi genetici e molecolari che caratterizzano una specifica malattia. Per quanto riguarda la trasformazione neoplastica, l'identificazione dei meccanismi molecolari che influenzano il destino delle cellule, la proliferazione cellulare, differenziamento e morte cellulare consentirà di individuare nuovi geni coinvolti nello sviluppo e nella progressione del cancro, e di conseguenza riconoscere sensibili fattori prognostici e nuovi target per il trattamento farmacologico. Valutazione prognostica del carcinoma del colon-retto è attualmente basata su aspetto istologico, e non ci sono marcatori molecolari internazionalmente riconosciuti come fattori predittori standard. Per diversi decenni, la terapia convenzionale per il cancro del colon-retto localmente avanzato coinvolto la chirurgia e la terapia adiuvante, che è una modalità di trattamento combinato, tra cui 5-fluorouracile (5-FU), chemioterapia e radiazioni. Quando metastasi sono associate al tumore primario, 5-FU, con o senza leucovorin definito lo standard di cura. L'aggiunta di altri agenti chemioterapici, quali cisplatino, 5-FU a ha migliorato la sopravvivenza, ma spesso a scapito di un aumento della tossicità. Nel complesso, nonostante i miglioramenti nella sopravvivenza libera da progressione e generale, circa il 50% dei pazienti muore entro 5 anni a causa di metastasi o recidive. La chemioterapia si basa essenzialmente sull' induzione di apoptosi da danno al DNA, ma compromissione di geni apoptotici e / o anti-apoptotica determina l'acquisizione di resistenza ai farmaci. Questa osservazione è stimolare un sempre maggior campo in base alla ricerca di nuovi agenti terapeutici in grado di eludere l'acquisizione di farmaco-resistenza e ridurre gli effetti collaterali. Negli ultimi anni, i ricercatori si sono concentrati su target molecolari tumore-specifici, con lo scopo di migliorare l'efficacia del trattamento e specificità. In questo contesto, e sulla base dei nostri promettenti risultati preliminari sulle correlazioni tra SMYD3 e le vie di regolazione fondamentali della cancerogenesi e della progressione del CCR, ci proponiamo di identificare e caratterizzare meglio l'interazione di SMYD3 con MEK1 nelle cascate di segnalazione del CCR, e con TGF- β nei pathways specifici dell'HCC e del CCA.

Descrizione della complementarietà e della sinergia del gruppo di ricerca:

Il laboratorio di Medicina Personalizzata e quello di Genetica Sperimentale perseguono da sempre l'obiettivo di individuare nuovi target molecolari contro cui rivolgere l'effetto di composti chimico-farmacologici risultati promettenti negli studi preliminari condotti in vitro ed in vivo nei due laboratori. Oltre alla condivisione di scopo, anche la piena complementazione del know-how tra i due laboratori determinerà la perfetta sinergia di competenze e conoscenze differenti. Tale sinergia è presupposto imprescindibile per il raggiungimento di grandi risultati sperimentali come quelli attesi in tale progetto. Il laboratorio di Genetica Sperimentale si occuperà di sviluppare tutte le indagini sperimentali volte alla caratterizzazione dell'interazione SMYD3/MEK1 e relativi effetti sulla progressione del CCR, mentre la caratterizzazione del complesso SMYD3/TGF- β e relativi effetti sui pathway dell'HCC e CCA saranno indagati dal laboratorio di Medicina Personalizzata.

Bibliografia:

Biggar KK, Li SS. Non-histone protein methylation as a regulator of cellular signalling and function. Nat Rev Mol Cell Biol. 2015 Jan; 16(1): 5-17.

Cock-Rada AM, Medjkane S, Janski N, Yousfi N, Perichon M, Chaussepied M, Chluba J, Langsley G, Weitzman JB. SMYD3 promotes cancer invasion by epigenetic upregulation of the metalloproteinase MMP-9. *Cancer Res.* 2012 Feb 1; 72(3): 810-20.

Fabregat I, Moreno-Càceres J, Sánchez A, Dooley S, Dewidar B, Giannelli G, Ten Dijke P; IT-LIVER Consortium.. TGF- β signalling and liver disease. *FEBS J.* 2016 Jun;283(12):2219-32.

Foreman KW, Brown M, Park F, Emtage S, Harriss J, Das C, Zhu L, Crew A, Arnold L, Shaaban S, Tucker P. Structural and functional profiling of the human histone methyltransferase SMYD3. *PLoS One.* 2011; 6(7): e22290.

Gaedcke J, Grade M, Jung K, Camps J, Jo P, Emons G, Gehoff A, Sax U, Schirmer M, Becker H, Beissbarth T, Ried T, Ghadimi BM. Mutated KRAS results in overexpression of DUSP4, a MAP-kinase phosphatase, and SMYD3, a histone methyltransferase, in rectal carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer.* 2010 Nov; 49(11): 1024-34.

Giannelli G, Koudelkova P, Dituri F, Mikulits W. Role of epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2016 Oct;65(4):798-808.

Giannelli G, Mikulits W, Dooley S, Fabregat I, Moustakas A, ten Dijke P, Portincasa P, Winter P, Janssen R, Leporatti S, Herrera B, Sanchez A. The rationale for targeting TGF- β in chronic liver diseases. *Eur J Clin Invest.* 2016 Apr;46(4):349-61. doi: 10.1111/eci.12596.

Guil S, Soler M, Portela A, Carrère J, Fonalleras E, Gómez A, Villanueva A, Esteller M. Intronic RNAs mediate EZH2 regulation of epigenetic targets. *Nat Struct Mol Biol.* 2012 Jun 3; 19(7): 664-70.

Hamamoto R, Furukawa Y, Morita M, Iimura Y, Silva FP, Li M, Yagy R, Nakamura Y. SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. *Nat Cell Biol.* 2004 Aug; 6(8): 731-40.

Hamamoto R, Silva FP, Tsuge M, Nishidate T, Katagiri T, Nakamura Y, Furukawa Y. Enhanced SMYD3 expression is essential for the growth of breast cancer cells. *Cancer Sci.* 2006 Feb; 97(2): 113-8.

Yoshioka Y, Suzuki T, Matsuo Y, Nakakido M, Tsurita G, Simone C, Watanabe T, Dohmae N, Nakamura Y, Hamamoto R. SMYD3-mediated lysine methylation in the PH domain is critical for activation of AKT1. *Oncotarget.* 2016 Sep 8. doi: 10.18632/oncotarget.11898.

Kim H, Heo K, An W. Requirement of histone methyltransferase SMYD3 for estrogen receptor-mediated transcription. *J Biol Chem.* 2009; 284: 19867–19877.

Kunizaki M, Hamamoto R, Silva FP, Yamaguchi K, Nagayasu T, Shibuya M, Nakamura Y, Furukawa Y. The lysine 831 of vascular endothelial growth factor receptor 1 is a novel target of methylation by SMYD3. *Cancer Res.* 2007; 67: 10759–10765.

Liu C, Fang X, Ge Z, Jalink M, Kyo S, Björkholm M, Gruber A, Sjöberg J, Xu D. The telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene is a direct target of the histone methyltransferase SMYD3. *Cancer Res.* 2007; 67: 2626–2631.

Liu Y, Deng J, Luo X, Pan Y, Zhang L, Zhang R, Liang H. Overexpression of SMYD3 was associated with increased STAT3 activation in gastric cancer. *Med Oncol.* 2015 Jan; 32(1): 404.

Liu Y, Luo X, Deng J, Pan Y, Zhang L, Liang H. SMYD3 overexpression was a riskfactor in the biological behavior and prognosis of gastric carcinoma. *Tumour Biol.* 2015 Apr; 36(4): 2685-94

Liu H, Liu Y, Kong F, Xin W, Li X, Liang H, Jia Y. Elevated Levels of SET and MYND Domain-Containing Protein 3 Are Correlated with Overexpression of Transforming Growth Factor- β 1 in Gastric Cancer. *J Am Coll Surg.* 2015 Aug; 221(2):579-90.

Luo XG, Zhang CL, Zhao WW, Liu ZP, Liu L, Mu A, Guo S, Wang N, Zhou H, Zhang TC. Histone methyltransferase SMYD3 promotes MRTF-A-mediated transactivation of MYL9 and migration of MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Lett.* 2014 Mar 1; 344(1): 129-37.

Mazur PK, Reynoird N, Khatri P, Jansen PW, Wilkinson AW, Liu S, Barbash O, Van Aller GS, Huddleston M, Dhanak D, Tummino PJ, Kruger RG, Garcia BA, Butte AJ, Vermeulen M, Sage J, Gozani O. SMYD3 links lysine methylation of MAP3K2 to Ras-driven cancer. *Nature.* 2014 Jun 12; 510(7504): 283-7.

Peserico A, Germani A, Sanese P, Barbosa AJ, di Virgilio V, Fittipaldi R, Fabini E, Bertucci C, Varchi G, Moyer MP, Caretti G, del Rio A, Simone C. A SMYD3 Small-Molecule Inhibitor Impairing Cancer Cell Growth. *J Cell Physiol.* 2015 Oct; 230(10): 2447-60.

Tsuge M, Hamamoto R, Silva FP, Ohnishi Y, Chayama K, Kamatani N, Furukawa Y, Nakamura Y. A variable number of tandem repeats polymorphism in an E2F-1 binding element in the 5' flanking region of SMYD3 is a risk factor for human cancers. *Nat Genet.* 2005 Oct; 37(10): 1104-7.

Zou JN, Wang SZ, Yang JS, Luo XG, Xie JH, Xi T. Knockdown of SMYD3 by RNA interference down-regulates c-Met expression and inhibits cells migration and invasion induced by HGF. *Cancer Lett.* 2009; 280: 78–85.

Sarris ME, Moulos P, Haroniti A, Giakountis A, Talianidis I. Smyd3 Is a Transcriptional Potentiator of Multiple Cancer-Promoting Genes and Required for Liver and Colon Cancer Development. *Cancer Cell.* 2016 Mar 14; 29(3): 354-66.

Braun F, Bertin-Ciftci J, Gallouet A, Millour J and Juin P, 2011. Serum-Nutrient starvation induces cell death mediated by Bax and Puma that is counteracted by p21 and unmasked by Bcl-xl inhibition. *Plos One* 2011; 6(8): e23577.

Chang DK, Goel A, Ricciardiello L, Lee DH, Chang CL, Carethers JM, Boland CR, 2003. Effect of H(2)O(2) on cell cycle and survival in DNA mismatch repair-deficient and -proficient cell lines. *Cancer letters* 2012, Jun 10;195(2):243-51.

Peserico A, Germani A, Sanese P, Barbosa A J, Di Virgilio V, Fittipaldi R, Fabini E, Bertucci C, Varchi G, Pat Moyer M, Caretti G, Del Rio A, Simone C, 2014. A SMYD3 Small-Molecule inhibitor impairing cancer cell growth. *J Cell Physiol.* 2015 Oct; 230(10): 2447–2460.

Timeline / Prodotti finali:

Il progetto sarà svolto in tre annualità.

Prima metà del progetto:

Nei primi 18 mesi saranno effettuate le analisi bionformatiche predittive per identificare i potenziali siti target di metilazione SMYD3 mediata su MEK1 e TGF β . Successivamente si procederà con le mutagenesi sito specifiche per verificare *in vitro* la metilazione predetta *in silico*.

Seconda metà del progetto:

Gli ultimi 18 mesi saranno dedicati agli studi su modelli cellulari di CCR, HCC e CCA e i risultati ottenuti saranno oggetto di pubblicazioni scientifiche su riviste scientifiche internazionali.

Gantt chart

Attività Sperimentali					
Anno	Analisi Bioinformatiche	Mutagenesi Specifiche	Sito	Studi su Modelli Cellulari	Analisi e Pubblicazione dei Dati
1					
2					
3					

Rilevanza traslazionale e impatto per l'SSN

CCR è il terzo tumore maligno più frequente, ma la seconda causa di morte per tumore nella popolazione occidentale, con oltre 1.000.000 di nuovi casi e 500.000 decessi attesi in tutto il mondo ogni anno. In Italia è stato stimato un numero di 20.500 maschi e 17.300 nuovi casi femminili di CCR ogni anno.

L'attuale trattamento del CCR si basa essenzialmente sull'uso di chemioterapici. Tuttavia, recenti ricerche sulle terapie per il cancro stanno rivolgendo la loro attenzione allo studio di target molecolari che possano essere selezionati positivamente e che sono essenziali per la crescita tumorale. Infatti, molti pazienti sono trattati con anticorpi monoclonali contro VEGF o contro EGFR, in combinazione con la chemioterapia. Il successo della chemioterapia si basa sulla capacità di uccidere, o meglio, di indurre selettivamente l'apoptosi nelle cellule tumorali. Non è sorprendente quindi che si evolvano strategie per inibire pathway pro-apoptotici che favoriscono la sopravvivenza e la proliferazione. Pertanto, un approccio promettente consiste nel trovare bersagli molecolari che sono positivamente selezionabili e risultano essenziali per la crescita del tumore.

Questo concetto è alla base delle attuali ricerche di diversi composti diretti su pathway come MEK-ERK1/2 che attualmente sono in fase di sperimentazione clinica.

Nel cancro del colon-retto, la pathway di MEK/ERK1/2 è stata trovata frequentemente over-attivata in seguito a mutazioni delle sue chinasi a monte RAS e RAF. Questa via di segnalazione è essenziale per la formazione e progressione tumorale ed è stata ampiamente studiata come un promettente bersaglio farmacologico. Anche se i risultati iniziali hanno dimostrato che l'inibizione di RAF o MEK1 esercita un effetto citostatico e citotossico in vitro e in modelli murini xenotrapianti, l'inibitore di MEK1 CI-1040 ha mostrato un'insufficiente attività antitumorale nella seconda fase della sperimentazione clinica. Inoltre, l'inibizione di RAF è in grado di bloccare la via di segnalazione di ERK in cellule tumorali portatrici di mutazioni in BRAF, ma sorprendentemente non nelle wt BRAF o nelle KRAS mutate.

In questo contesto la caratterizzazione delle relazioni tra la via di segnalazione di SMYD3 e la più importante cascata di segnalazione del CCR (RAS/MEK/ERK1/2) potrebbe fornire dati importanti per definire nuovi bersagli ed una terapia combinata.

Abbiamo recentemente dimostrato che l'attività di SMYD3 è necessaria per la crescita delle cellule di cancro del colon retto *in vitro* e in modelli murini di familial adenomatous polyposis. Infatti, la sua inibizione con BCI-121 induce morte cellulare e riduce la crescita tumorale in cellule di cancro del colon retto e in topi APC^{Min/+} trattati con AOM (azossimetano). L'efficacia inibitoria di BCI-121 su SMYD3 è stata riscontrata oltre che su cellule di CCR, come dimostrano i nostri studi, anche su linee cellulari di cancro del polmone, del pancreas, della prostata e dell'ovaio (Peserico et al., 2015). Questi risultati ci suggeriscono che SMYD3 sia un potenziale candidato come bersaglio molecolare da inibire con BCI-121 per formulare futuri protocolli terapeutici antiCCR e antiHCC.

Progetto n. 12: Grading e outcome clinico di GEP/NET in relazione al PDL-1 status

Responsabile: Dr. Raffaele Armentano

Partecipanti: Dott. E. Cavalcanti

Dott. G. Serino

Dott. S. Coletta

Dott. E. Stasi

Background:

I tumori neuroendocrini (NETs) sono un gruppo eterogeneo di tumori rari, con incidenza annuale di 4-5 nuovi casi ogni 100.000 abitanti (1). I tumori neuroendocrini pancreatici (pNETs) rappresentano circa il 25% dei NETs e 1-3% dei tumori pancreatici (2). I NETs prendono origine dalle cellule del sistema neuroendocrino diffuso ma sono generalmente accomunati da alcune somiglianze fenotipiche, tra cui potenziali caratteristiche di secrezione ormonale ed istologiche (synaptophysin e cromogranina A). Tuttavia, i NET non si associano a sintomi evidenti e risultano perciò di difficile diagnosi; crescendo lentamente, possono infatti rimanere silenti per anni ed essere riscontrati quando già metastatici. Sul piano istopatologico, i NET si suddividono in NET ben differenziati e scarsamente differenziati. I NET ben differenziati: hanno una bassa o bassissima attività proliferativa, per cui si associano generalmente a buone prospettive di sopravvivenza a lungo termine. La loro natura meno aggressiva, ma comunque maligna, fa sì che questi tumori possano dare metastasi, anche molto tempo dopo l'identificazione del tumore primitivo. I NET scarsamente differenziati hanno un'alta attività proliferativa ed un più elevato grado di malignità, per cui si associano generalmente ad una maggiore probabilità di evolvere precocemente verso la fase metastatica.

Da un punto di vista clinico, i NET vengono distinti in NET funzionanti, i quali si manifestano con una sindrome da iperproduzione di un determinato peptide (insulinoma, gastrinoma ecc) e NET non-funzionanti (circa il 70% del totale), così definiti in quanto non secernenti peptidi biologicamente attivi. Sul piano anatomico-patologico i GEP NET sono classificati in base all'indice di proliferazione (cioè alla quantità di cellule tumorali in fase di riproduzione) in tre gruppi: $Ki67 \leq 2\%$ e/o indice mitotico < 2 HPF (high power fields) = **G1**, $Ki67 3-20\%$ e/o indice mitotico 2-20 HPF = **G2** e $Ki67 > 20\%$ e/o indice mitotico > 20 HPF = **G3**. I primi due gruppi, G1 e G2, vengono anche chiamati TUMORI NEUROENDOCRINI (NET), mentre il terzo gruppo, G3, costituisce i CARCINOMI NEUROENDOCRINI (NEC). È attesa per il 2017 la pubblicazione di una nuova classificazione che restituisce rango alla differenziazione istologica a fronte del solo indice proliferativo.

Le strategie terapeutiche attualmente disponibili per i NET, considerate sempre all'interno di un approccio integrato e multidisciplinare, possono assicurare al paziente una buona sopravvivenza e qualità di vita. Oltre alla lenta evoluzione spontanea di molti NET, infatti, la prognosi dipende anche dalla risposta ai trattamenti. L'obiettivo del trattamento è quello di migliorare i sintomi ad essi associati, nonché di controllare la crescita tumorale, al fine di migliorare la sopravvivenza e la qualità di vita dei pazienti. I tumori neuroendocrini sono rari, ma la natura indolente della malattia porta ad una prevalenza molto più alta. Oltre alla lenta evoluzione spontanea di molti NET, infatti, la prognosi dipende anche dalla risposta ai trattamenti, pertanto l'individuazione di markers molecolari utili al monitoraggio delle terapie è fondamentale.

Attualmente l'indirizzo terapeutico è volto sempre di più verso una *targeted therapy mirata e personalizzata*. L'immunoterapia con gli inibitori delle molecole del check-point immune (gli anticorpi anti-PD-1 ed antiPD-L1) sta emergendo come un importante strumento nel trattamento di diversi

tumori, con l'ottenimento di un beneficio clinico potenzialmente duraturo nel tempo in una buona parte dei pazienti trattati. In particolare recenti studi hanno evidenziato come il blocco anticorpo-mediato della proteina PD-1 (proteina della morte programmata 1) e del suo ligando (PD-L1) induce la regressione durevole del tumore e la stabilizzazione prolungata della malattia nei pazienti con tumori solidi avanzati (6-7). Il blocco di questa via con anticorpi anti PD-1 o suoi ligandi ha portato a risposte cliniche notevoli nei pazienti affetti da diversi tipi di cancro, tra cui i melanomi, carcinoma polmonare non a piccole cellule, carcinoma a cellule renali, cancro alla vescica, e il linfoma di Hodgkin (8-9). In letteratura è evidenziato che 9 su 25 pazienti (36%) con tumore e positivi al PDL-1 hanno una risposta obiettiva alla terapia (10).

L'ipotesi più validata è che i pazienti responder hanno una alterazione delle proteine del mismatch-repair (MMR) (11-12). Il Sistema Mis Match Repair è responsabile del mantenimento della stabilità genomica; in seguito alla perdita di funzione del MMR, può accadere che si verifichi una variazione del numero di ripetizioni di un particolare locus nel DNA tumorale rispetto a quello germinale di un individuo. Questo fenomeno prende il nome di instabilità microsatellitare (MSI). L'instabilità dei microsatelliti riveste un ruolo importante nei processi di carcinogenesi, con particolare riferimento agli errori di replicazione, in tumori maligni del colon e benigni con evoluzione verso la malignità (adenomatosi polipoide del colon o FAP), del sigma e del retto, nei tumori maligni della cute e della mammella (13). Pertanto i tumori instabili sono caratterizzati da un maggior carico mutazionale che si traduce in una sintesi di proteine alterate (mismatch) e di neo-epitopi che possono essere riconosciuti dal sistema immunitario rendendo quindi queste malattie potenzialmente più sensibili agli inibitori di PD-1 che riattivano e amplificano la risposta immunitaria. I tumori del colon-retto e i tumori gastrici con instabilità dei microsatelliti (MSI) appaiono più responsivi alla immunoterapia rispetto ai tumori con stabilità del microsatellite (14-15).

Nei GEP-NET l'instabilità dei microsatelliti (MSI) è stata poco studiata e il ruolo di altri meccanismi epigenetici è ancora poco conosciuto. Anche se i GEP-NET sono tumori in genere aggressivi e con prognosi infausta, recenti studi (17) evidenziano che c'è un frazione di pazienti con GEP-NET che mostra una migliore tasso di sopravvivenza atteso. La Rosa et al. hanno evidenziato un alta instabilità dei microsatelliti (MSI-H) con una perdita di espressione immunoistochimica delle proteine del MLH1 and PMS2 nel 15% dei carcinomi neuroendocrini colon-rettali scarsamente differenziati per i quali è atteso un vantaggio prognostico (18).

Inoltre, le alterazioni molecolari nei NET rimangono non completamente caratterizzate in particolare per quanto riguarda mutazioni in BRAF e KRAS che hanno un ruolo sia nei processi di cancerogenesi che nella comparsa di recidiva nei carcinomi colon rettali (18-19). La maggior parte degli studi suggeriscono che carcinomi neuroendocrini colon rettali scarsamente differenziati sono biologicamente aggressivi ed associati ad una scarsa sopravvivenza. Pertanto nel nostro studio si vuole differenziare i NET in base alla rilevazione di mutazioni in BRAF e KRAS associate ad una mancata espressione delle proteine del MMR e MSI.

Nei tumori, la combinazione dello studio del profilo di espressione dei miRNA, unitamente al profilo di espressione genica, può aiutare a comprendere la complessità degli eventi molecolari che si verificano nelle cellule neoplastiche (20). A livello di diagnostica molecolare, invece, l'uso del profilo di espressione dei miRNA può aiutare a distinguere tra neoplasie simili e fornire indicazioni riguardo alla tipologia di tumore, alle mutazioni eventualmente ad esso associate e anche alla possibile risposta alla terapia. In particolare l'importanza dei cambiamenti epigenetici in pNET è sottolineata anche da recenti risultati di uno studio che ha sovrapposto dati di espressione di miRNA e profili di RNA messaggero (mRNA) in pNETs. In letteratura è presente un unico lavoro che utilizza miRNA (miR-204-5p, miR-375) per differenziare tumori neuroendocrini dell'intestino tenue (SBNETs) e la localizzazione secondaria degli stessi (21).

Pertanto, non essendoci ancora in letteratura molte evidenze sulla correlazione nei NET tra MSI, espressione PDL-1 e prognosi, in questo studio, sarà analizzata l'incidenza del MSI, espressione delle proteine del MMR, delle mutazioni KRAS e BRAF e dei miRNA in una ben caratterizzata coorte di GEP-NET al fine di delineare e differenziare le caratteristiche clinico patologiche e molecolari.

Obiettivi specifici dello studio:

Il razionale dello studio si basa sull'ipotesi che tumori instabili sono caratterizzati da un maggior carico mutazionale che si traduce in una sintesi di proteine alterate e di neo-epitopi che possono essere riconosciuti dal sistema immunitario rendendo quindi queste malattie potenzialmente più sensibili agli inibitori di PD-1 che riattivano e amplificano la risposta immunitaria. I tumori del colon-retto e i tumori gastrici con instabilità dei microsatelliti appaiono più responsivi alla immunoterapia rispetto ai tumori con stabilità del microsatellite.

L'**obiettivo** dello studio è di indagare il valore prognostico dell'espressione di PD-L1 in pazienti con NET. Successivamente si andrà a valutare le alterazioni molecolari nei NET in particolare l'instabilità dei microsatelliti (MSI), il tipo di difetto di mismatch repair (MMR) e la sua correlazione con le mutazioni KRAS e BRAF per meglio comprendere il valore di suddetti marcatori molecolari. In ultima analisi tramite un approccio di miRNA profiling, andremo a ricercare la presenza di miRNA differenzialmente espressi tra i NET ben differenziati e scarsamente differenziati. Il miRNA profiling ci può aiutare ad identificare sottogruppi tumorali con diverso comportamento biologico e/o diversa risposta terapeutica.

Obiettivo specifico 1:

Valutazione della correlazione tra grado istologico (secondo differenziazione casistica WHO2010 alla luce della nuova WHO2017) ed espressione di PD-L1 nei pazienti con NET ben differenziati e scarsamente differenziati.

Obiettivo specifico 2:

Caratterizzazione dei NET dal punto di vista molecolare: MSI, MMR, BRAF, PDL-1 e miRNA.

Obiettivo specifico 3: Analisi dei profili di espressione *miRNA* nei NET ben differenziati e scarsamente differenziati.

Stato di avanzamento del progetto:

Nel primo anno di progetto è stata raggiunto il primo obiettivo conclusosi con la pubblicazione: [Role of PD-L1 expression as a biomarker for GEP neuroendocrine neoplasm grading](#). **Cavalcanti E, Armentano R, Valentini AM, Chieppa M, Caruso ML. Cell Death Dis. 2017 Aug 24;8(8):e3004.**

Nello specifico inizialmente è stata allestita la casistica dei casi NET pervenuti all'IRCCS de Bellis dal gennaio 2006 a dicembre 2016, sono stati arruolati 57 pazienti: 34 M e 23 F e comprendono NET dell'apparato GEP: 17.5% stomaco, 17.5 % fegato, 2 % colecisti, 12 % colon, 17.5 pancreas, 28% piccolo intestino e 2 % ampolla di Vater. Tutti i casi sono stati rivisti e classificati secondo la WHO 2010 e su tutti è stato rivalutato il Ki 67. Di questi pazienti è stato anche valutato l'infiltrato perineurale, la permeazione vascolare, la necrosi e i linfonodi metastatici.

Successivamente è stata messa a punto la metodica immunohistochimica per la valutazione tissutale del PD-L1. Attualmente il test del PD-L1 è controverso principalmente a causa dell'eterogeneità del tumore, della presenza in commercio di diversi tipi di anticorpi anti PD-L1 e dalla mancanza della definizione di un cut-off discriminante. Pertanto, siamo andati a saggiare due diversi anticorpi anti PD-L1: clone E1L3N, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA, a una diluizione di 1:600 ed il clone SP142, Roche/ Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA a con diluizione 1:100). Il pattern di colorazione di entrambi gli anticorpi è stato come previsto: membrane cellulari e citoplasmatico con punti occasionali, corrispondenti al PD-1 / Siti di interazione PD-L1. L'anticorpo E1L3N è stato preferito soprattutto poiché evidenziava un più definito e preciso segnale di membrana.

Abbiamo adottato uno score di tipo qualitativo (intensità dello staining comparata alla placenta usata come controllo) e quantitativo (numero di cellule positive). Abbiamo considerato positivi i campioni con un cut off $\geq 10\%$ e con score pari a 2 o 3.

Abbiamo valutato l'espressione di membrana PD-L1 sulle cellule tumorali e/o sulle cellule immunitarie infiltrate. L'espressione del PD-L1 è assente in tutti i casi WD-NENs (G1), mentre è fortemente espresso in tutti i casi G3. L'espressione di PD-L1 è significativamente associata con il grado istopatologico. Attualmente il Ki67 è un marker prognostico e fa parte dei criteri di classificazione WHO 2010, ma nella diagnosi ed indirizzo della terapia non è un ottimo predittore. Nei NEN G3, il Ki67 abbraccia un range molto ampio (20-100%) che può includere una varietà di neoplasie differenti, con risposte potenzialmente diverse alla terapia. Pertanto, noi abbiamo evidenziato che il PD-L1 può essere un discriminante nei NEN G3 ai fini terapeutici. Espressione del PD-L1 è significativamente correlata con il Ki67 index e c'è un significativo trend positivo con il Ki67 proliferation index. Successivamente abbiamo valutati espressione di PDL-1 su cellule immunitarie infiltranti il tumore. Abbiamo evidenziato una differente espressione del PDL-1 su cellule immunitarie infiltranti il tumore in base al grado, questo a dimostrazione del fatto che i NEN potrebbero acquisire resistenza alla

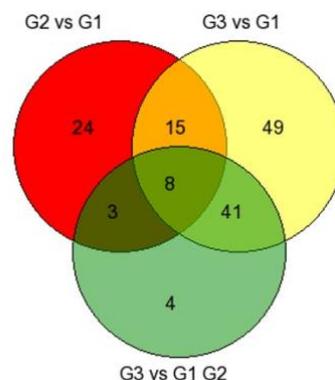
sorveglianza immunitaria, attraverso l'aumento del PD-L1 e inibendo i linfociti infiltranti peritumorali e intratumorali.

La sovraespressione di PDL-1 in NEN (G2-G3) indica che il tumore-correlato PD-L1 può essere legato a un maggior potenziale maligno e contribuire alla progressione tumorale fornendo un meccanismo protettivo contro la sorveglianza immunitaria.

Nel secondo anno di svolgimento del progetto, in collaborazione con il gruppo di ricerca della Dott.ssa Serino, è stata effettuata l'analisi del profilo di espressione dei *miRNA* nei NET ben e scarsamente differenziati. Nello specifico, sono stati utilizzati 7 casi di NEN G1, 6 casi di NEN G2 e 7 casi di NEN G3. Il profilo di espressione totale dei miRNAs è stato effettuato mediante la metodica del microarray su piattaforma Agilent. I risultati di espressione ottenuti da ciascun campione sono stati inizialmente normalizzati utilizzando il livello mediano di espressione genica. A partire dai 2549 miRNA umani rappresentati sul microarray, sono stati identificati 560 miRNA che risultano espressi nei campioni analizzati. Questi dati sono stati sottoposti a diverse analisi statistiche allo scopo di determinare quali sono i miRNA differenzialmente espressi per ciascun gruppo di pazienti. Applicando il metodo del Q-value e selezionando i miRNA modulati che hanno un fold-change di 2, sono stati identificati una lista di miRNAs deregolati specifica per ciascun grade. Nello specifico, sono state effettuate le seguenti comparazioni:

- G2 vs G1 = 50 miRNA deregolati
- G3 vs G1 = 113 miRNA deregolati
- G3 vs G1+G2 = 56 miRNA deregolati

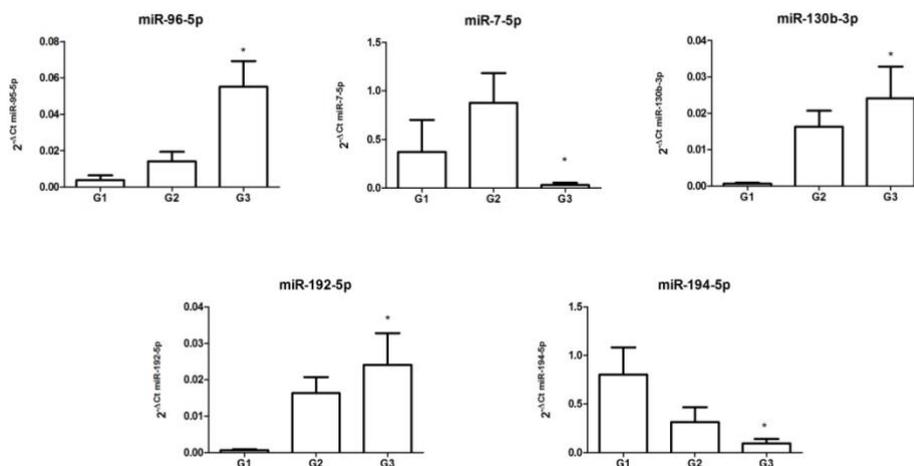
In seguito, utilizzando un diagramma di Venn (mostrato di seguito) abbiamo selezionato tra le diverse liste di miRNA identificate, i miRNA espressi nei 3 gruppi ma con un diverso grado di espressione.



Quindi abbiamo valutato i geni target degli 8 miRNA selezionati e i processi biologici che andavano a regolare. L'analisi bioinformatica ha messo in evidenza che gli 8 miRNA regolavano le seguenti

pathways: FOXO pathway, Pathways in Cancer, TGF β Signalling Pathways, P53 signalling pathway, WNT signalling, P13K-AKT signalling pathway.

Successivamente abbiamo validato con Real-time PCR 5 degli 8 miRNA analizzati. I dati ottenuti riportati nell'istogramma sono relativi ai seguenti miRNA: miR-96-5p: miR-7-5p: miR-130b-3p miR-192-5p miR-194-5p. I dati di Real-time PCR hanno validato i dati ottenuti da microarray. Le differenze osservate sono tutte statisticamente significative (*p<0.05).



Nel contempo in quest'anno studiando i target molecolari dei miRNA siamo stati indirizzati a valutare il significato biologico della densa rete vascolare associate a NEN di basso grado. Abbiamo valutato l'impatto dell'espressione del tessuto PDGFR α in 77 pazienti GEP / NEN, associando l'espressione di PDGFR α alla caratterizzazione morfologica nei tumori di basso grado. Dallo studio è emerso che il PDGFR α rappresenta un bersaglio efficace per un nuovo trattamento anti-angiogenico nei WD-GEP-NEN (fig.1), in particolare nei casi G2 e in G3 casi solo in presenza di un pattern misto-acetico misto. In questo contesto, è importante delineare attentamente quei tumori che potrebbero rispondere meglio a questo tipo di trattamento da solo o in combinazione. Un'ulteriore indagine sulla relazione tra PD-L1 e PDGFR α è giustificata e può contribuire a ottimizzare l'approccio terapeutico nei pazienti con NEN GEP. **Questo studio è stato pubblicato: Cavalcanti E, Ignazzi A, De Michele F, Caruso ML. PDGFR α expression as a novel therapeutic marker in well-differentiated neuroendocrine tumors. Cancer Biol Ther. 2019;20(4):423-430.**

Figure 1

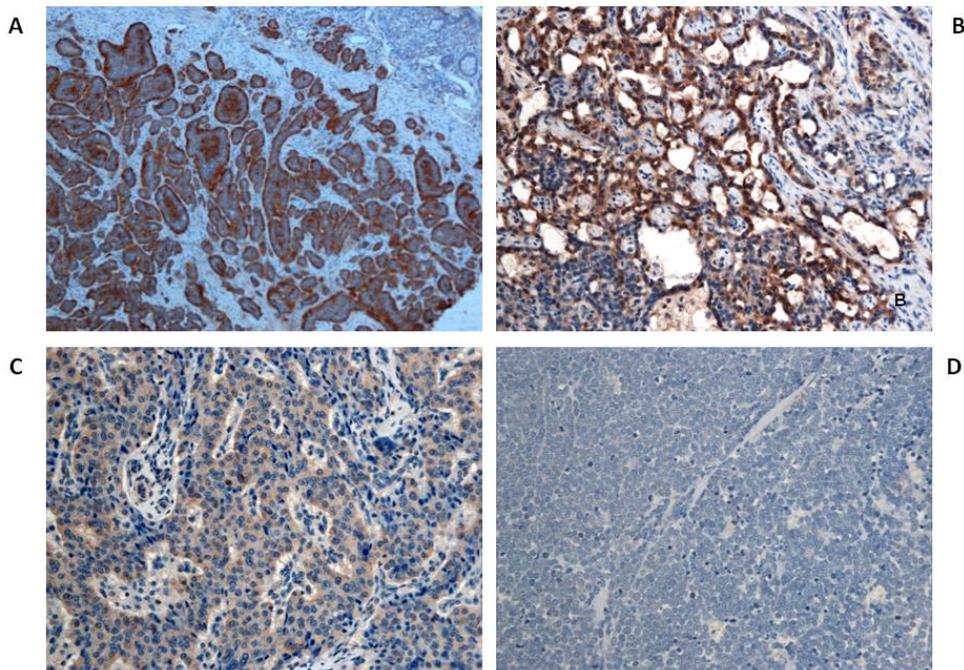


Figure 1. Representative patterns of PDGFR α in different architectural types: A) insular solid type B) acinar type C) trabecular type D) poorly-differentiated type. (magnification 20 \times).

Infine nell'ultimo anno abbiamo focalizzato i nostri studi sugli 8 miRNA identificati che sono espressi in tutti i gradi GEP-NET ma a livello diverso. In particolare abbiamo focalizzato la nostra attenzione sull'espressione di miR-96-5p che era progressivamente espresso dai NET G1 a i NET G3. miR-96-5p regola la pathway FOXO. FOXO1a è regolato da miRNA96 FOXO1a è un fattore di trascrizione coinvolto nella pathway IGF-1R / PI3K / Akt. Nei tumori maligni, FOXO1 è down-regolato ed il suo ruolo nella tumorigenesi non è del tutto chiaro. È stato ipotizzato che la downregulation di questo gene sia un passo importante nella formazione del tumore. 'attività e la funzione di FOXO1 sono regolate attraverso lo shuttling tra il nucleo e il citoplasma. In particolare noi abbiamo evidenziato una differente espressione di FOXO tra NET G1, G2 e G3. Nello specifico l'espressione di FOXO1 è maggiormente localizzato nel nucleo dei NET G1 e G2 e nel citoplasma nei NET G3. I casi di NET ben differenziati (G1-G2) hanno un'espressione nucleare / citoplasmatica FOXO1 costantemente positiva che diminuisce con la progressione del tumore, confermando gli esiti più favorevoli nei pazienti G1 / G2 GEP-NET. Inoltre, l'effetto dell'attività di FOXO1 sulla chemiosensibilizzazione è stato dimostrato in diversi tumori (Hoekstra et al. 2008). I nostri dati sull'assenza di FOXO1 in pazienti GEP-NET scarsamente differenziati potrebbero, almeno in parte, spiegare la chemioresistenza osservata in questo gruppo di pazienti (Fazio & Milione 2016). La combinazione di strategie convenzionali implementate con l'espressione di miRNA e la valutazione istologica FOX1 può rappresentare un nuovo gold standard per la valutazione di GEP-NET. Inoltre, i miRNA rappresentano un obiettivo innovativo per il trattamento personalizzato di diverse malattie. I nostri dati dimostrano un ruolo importante e non segnalato dei miRNA come biomarcatore nella classificazione NET GEPs e suggeriscono ulteriori

indagini per indirizzare i loro potenziali terapeutici. Il progetto si è concluso con la pubblicazione : Cavalcanti Elisabetta, Vanessa Galleggiante, Sergio Coletta, Elisa Stasi, Marcello Chieppa, Raffaele Armentano and Grazia Serino. **Altered miRNAs expression correlates with Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors Grades.** *Front. Oncol.* 2020; | doi: 10.3389/fonc.2020.01187

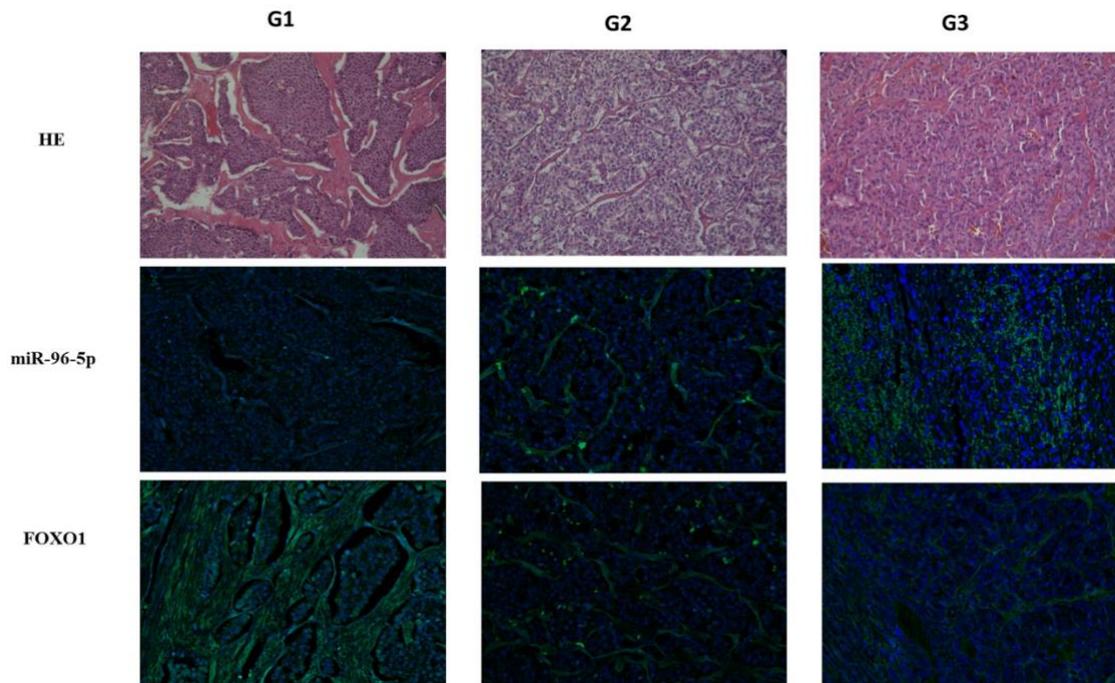


Figure 4. Detection of miR-96-5p and FOXO1 mRNA by in situ hybridization. LNA-modified probes (double or single FAM-labeled) complementary to miR-96-5p and FOXO1 mRNA were hybridized on consecutive 6 μ m paraffin sections from G1, G2 and G3 GEP-NENs patients. An additional section was stained with H&E to reveal the overall morphology. miR-96-5p was predominantly localized in the cytoplasm in all grades and its expression increased from G1 to G3. Inversely, FOXO1 expression was localized in the nucleus in G1 and G2 sections and in the cytoplasm in G3. Original magnification, $\times 20$. HE, hematoxylin and eosin stain.

Bibliografia:

1. Fesinmeyer MD, Austin MA, Li CI, De Roos AJ, Bowen DJ. Differences in survival by histologic type of pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(7):1766–73.
2. Oberg K, Castellano D. Current knowledge on diagnosis and staging of neuroendocrine tumors. *Cancer Metastasis Rev* 2011;30(Suppl. 1):3–7.

3. Warner RRP. Enteroendocrine Tumors Other Than Carcinoid: A review of clinically significant advances. *Gastroenterology* 2005;128:1668-84
4. Massironi S, Sciola V, Peracchi M, Ciafardini C, SpampattiMP, Conte D. Neuroendocrine tumors of the gastro-enteropancreatic system. *World J Gastroenterol* 2008;14:5377-84.
5. Ramage J K, Davies A H G, Ardill J, Bax N, Caplin M, Grossman A et al; UKNETwork for Neuroendocrine Tumours. Guidelines for the management of gastroenteropancreatic neuroendocrine(including carcinoid) tumours. *Gut* 2005;54:1-16
6. Guilleminault L, Carmier D, Heuzé-Vourc'h N, Diot P, Pichon E. Immunotherapy in non-small cell lung cancer: inhibition of PD1/PDL1 pathway. *Rev Pneumol Clin*. 2015 Feb; 71(1):44-56. Epub 2015 Feb 14.
7. Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, et al. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol*. 2010; 28:3167–75.
8. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 2014; 515:563–7
9. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, et al. Safety and activity of anti–PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med*. 2012; 366:2455–65.
10. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti–PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*. 2012; 366:2443–54.
11. Koopman M, Kortman GA, Mekenkamp L, et al. Deficient mismatch repair system in patients with sporadic advanced colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009; 100:266–73.
12. Goldstein J, Tran B, Ensor J, et al. Multicenter retrospective analysis of metastatic colorectal cancer (CRC) with high-level microsatellite instability (MSI-H). *Ann Oncol*. 2014; 25:1032–8.
13. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010; 138:2073–87.
14. [Microsatellite instability and allelic losses in neuroendocrine tumors of the gastro-enteropancreatic system](#). Ghimenti C, Lonobile A, Campani D, Bevilacqua G, Caligo MA. *Int J Oncol*. 1999 Aug;15(2):361-6.
15. [The mismatch repair protein status of colorectal small cell neuroendocrine carcinomas](#). Stelow EB, Moskaluk CA, Mills SE. *Am J Surg Pathol*. 2006 Nov;30(11):1401-4.
16. [Kim ST, Ha SY, Lee S, Ahn S, Lee J, Park SH, Park JO, Lim HY, Kang WK, Kim KM, Park YS](#). The Impact of PD-L1 Expression in Patients with Metastatic GEP-NETs. *J Cancer*. 2016 Feb 5;7(5):484-9.
17. La Rosa S, Marando A, Furlan D, Sahnane N, Capella C. Colorectal poorly differentiated neuroendocrine carcinomas and mixed adenoneuroendocrine carcinomas: insights into the diagnostic immunophenotype, assessment of methylation profile, and search for prognostic markers. *Am J Surg Pathol* 2012;36:601-11.
18. Sinicrope FA, Shi Q, Smyrk TC, et al. Molecular markers identify subtypes of stage III colon cancer associated with patient outcomes. *Gastroenterology* 2015;148:88-99.
19. Phipps AI, Limburg PJ, Baron JA, et al. Association between molecular subtypes of colorectal cancer and patient survival. *Gastroenterology* 2015;148:77-87
20. [New Genetics and Genomic Data on Pancreatic Neuroendocrine Tumors: Implications for Diagnosis, Treatment, and Targeted Therapies](#). Schmitt AM, Marinoni I, Blank A, Perren A. *Endocr Pathol*. 2016 Sep;27(3):200-4. Review

21. Schmitt AM, Marinoni I, Blank A, Perren A. [New Genetics and Genomic Data on Pancreatic Neuroendocrine Tumors: Implications for Diagnosis, Treatment, and Targeted Therapies.](#) *Endocr Pathol.* 2016 Sep;27(3):200-4. Review.
22. Miller HC, Frampton AE, Malczewska A, Ottaviani S, Stronach EA, Flora R, Kaemmerer D, Schwach G, Pfragner R, Faiz O, Kos-Kudła B, Hanna GB, Stebbing J, Castellano L, Frilling A. [MicroRNAs associated with small bowel neuroendocrine tumours and their metastases.](#) *Endocr Relat Cancer.* 2016 Sep;23(9):711-26.

Progetto n. 13: PIVKA II e AFP: marcatori sierologici della popolazione ad alto rischio per l'HCC

Responsabile: Palma Aurelia Iacovazzi

partecipanti: Raffaele Cozzolongo, Mara Di Masi, Pasqua Letizia Pesole

Stato di avanzamento del progetto:

Nel corso del primo anno, come previsto dal piano organizzativo del progetto, si è provveduto al reclutamento di nuovi pazienti con diagnosi di HCC afferenti al reparto di Gastroenterologia 1 del nostro Istituto. Tutti provenivano da altre strutture ospedaliere della zona ed hanno effettuato il ricovero da noi per eseguire la diagnosi di HCC. Come conseguenza non rappresentano una popolazione da utilizzare per la valutazione del follow-up dei soggetti a rischio ma sono utili per la valutazione del valore diagnostico dei marcatori oggetto di questo studio. I campioni di siero sono stati aliquotati e conservati nella Biobanca dell'Istituto, previo consenso informato.

Il personale coinvolto si è coordinato abbastanza efficacemente. Solo nel periodo estivo abbiamo registrato un lieve calo nell'arruolamento anche conseguenza della diminuzione dei ricoveri. Poiché, inoltre, la popolazione affetta da questa neoplasia non è così numerosa contiamo di proseguire l'arruolamento dei pazienti con HCC ancora almeno nei primi sei mesi del 2020.

Progetto n. 14: Ricerca di nuovi biomarkers in grado di discriminare i pazienti IBD non-responder alla terapia biologica.

Responsabile: dott. Mauro Mastronardi

Partecipanti: Maria Lucia Caruso, Antonio Lippolis, Elisa Stasi, Margherita Curlo, Grazia Serino, Vito Guerra, Marcello Chieppa

Background:

Le malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD) includono la colite ulcerosa (UC) ed il Crohn's disease (CD). Queste patologie debilitanti hanno una eziologia sconosciuta e genesi multifattoriale con diversi fattori tra cui componenti genetici, immunologici ed ambientali. Prima del 2001, la comparsa di CD era prevalentemente ritenuta un effetto di una mancata regolazione del sistema immunitario adattativo, ma la scoperta della mutazione NOD2/CARD15 ha cambiato questa percezione portando alla luce il ruolo fondamentale dell'immunità innata [1]. La proteina NOD2 è un pattern recognition receptor (PPR) che attiva il fattore nucleare NFkB in seguito al riconoscimento di una sequenza dei peptidoglicani batterici. La traslocazione di NFkB nel nucleo attiva la trascrizione di citochine pro-infiammatorie (TNF α , IL-1, IL-6 etc.) le quali a cascata possono influenzare numerose altre risposte. I pazienti con mutazioni del gene NOD2 sono caratterizzati da una aumentata permeabilità intestinale, questo sottolinea il legame tra IBD ed integrità della barriera epiteliale intestinale [2]. Inoltre, dal 2001 ad oggi sono state scoperte numerose altre mutazioni legate all'aumento del rischio di IBD, tra cui IL-23R/IL-12B, TL1A, ATG16L1, IRGM, e diversi TLRs [3]. E' importante sottolineare che eventuali mutazioni possono rendere inefficaci le terapie convenzionali, come nel caso della mutazione a carico di IL-10R per la quale è richiesta come unica alternativa terapeutica il trapianto di cellule staminali [4]. Ad eccezione del IL-10R, allo stato attuale delle conoscenze, non esiste un pannello di geni in grado di indirizzare le terapie farmacologiche più adatte al paziente. Un recente studio ha utilizzato parametri genetici e fenotipici di circa 30.000 pazienti affetti da IBD ed è riuscito a segregare CD a carico del colon e dell'ileo [5]. I recenti progressi nello studio del metagenoma intestinale hanno consentito di discriminare pazienti responder dai non responder alla terapia con anti-TNF α . Nei responder, il microbiota intestinale tornava a mostrare la biodiversità tipica di un controllo sano [6]. Sono anche stati descritti effetti benefici mediati dalla somministrazione di probiotici a pazienti affetti da CD [7,8], mentre la presenza di *Faecalibacterium prausnitzii* è stata associata al rischio di recidiva in pazienti chirurgici [9]. Probabilmente, proprio la stocasticità dei fattori scatenanti l'IBD, determina un percorso/decorso terapeutico estremamente differente per ogni singolo paziente. Questi possono passare da periodi lunghi di remissione alla mancanza di risposta clinica alle terapie.

I dati storici del reparto di endoscopia digestiva del nostro IRCCS indicano come il 30% dei pazienti trattati con farmaci biologici anti TNF α non rispondono alla terapia, mentre, tra i responder, il 50% ha un calo/perdita di risposta con il prolungarsi dei trattamenti. Sappiamo che a queste percentuali contribuiscono in maniera fondamentale fattori ambientali. Tra questi fattori noti come il fumo che abbassa da 73 a 22 la percentuale dei responder e al 6 la percentuale dei pazienti con risposta prolungata [10,11]. L'insieme dei fattori ambientali che possono influenzare l'andamento della patologia viene definito *esposoma* ed include anche l'utilizzo di immunosoppressivi, aspetto importante per l'efficacia della risposta terapeutica.

L'insieme di variabili genetiche, immunologiche, microbiologiche ed ambientali porta alla sensazione che all'interno del grande contenitore IBD ci siano un ventaglio di patologie dalle cause diverse, ma con manifestazioni patologiche simili. Alcune tra queste patologie sono trattabili con le strategie attuali, mentre per le altre bisognerebbe intraprendere percorsi terapeutici alternativi.

L'introduzione delle terapie biologiche ha portato enormi vantaggi per i pazienti, ma allo stato attuale delle conoscenze non siamo in grado di distinguere preventivamente i pazienti responder dai non responder, anche se, grazie al dosaggio del farmaco in circolo e degli anticorpi anti-farmaco biologico siamo in grado di "personalizzare" i trattamenti per renderli più efficaci. La vera separazione tra responder e non responder è possibile solo con l'osservazione del decorso clinico del paziente dopo un minimo di 3 mesi di infusioni, con un notevole dispendio economico (stimabile in circa 10.000 euro/paziente) e disagi per i pazienti.

La nostra proposta si inserisce nelle nuove linee per il miglioramento degli approcci terapeutici e lo sviluppo della "medicina di precisione".

La prima parte del progetto sarà la definizione di un percorso diagnostico nuovo e condiviso tra reparti differenti del nostro istituto. La comunicazione e lo scambio di informazioni sarà fondamentale ed indispensabile per il successo del progetto; riunioni bisettimanali serviranno a discutere i risultati e coordinare il lavoro di tutti i gruppi coinvolti. I risultati degli esami diagnostici (standard) verranno ordinati in una cartella clinica sperimentale in grado di accogliere i dati sperimentali ottenuti durante la seconda fase del progetto. La cartella subirà un continuo processo di miglioramento per rispondere alle esigenze o criticità evidenziate nel corso del progetto.

La seconda fase, che comincerà solo dopo aver individuato e caratterizzato con estrema precisione un numero minimo di 20 non responder e 20 responder. Utilizzeremo un ventaglio di analisi multi-omiche e diagnostiche non-convenzionali. Tra queste alcune già standardizzate, quali ad esempio la misurazione del anti-TNF circolante e di eventuali anticorpi anti-farmaco, in parallelo misureremo i livelli tissutali di TNF [12] ed anti-TNF mediante immunoistochimica. Valuteremo il microbiota intestinale. Dai campioni di feci, raccolte il giorno prima della visita endoscopica, estrarremo il DNA batterico che verrà sequenziato per evidenziare eventuali differenze tra responder e non-responder prima dell'inizio del trattamento con anti-TNF. Paragoneremo i due gruppi utilizzando il multiplex per valutare un ampio spettro di citochine infiammatorie presenti nel siero e valuteremo i micro-RNA circolanti. Mediante analisi laboratoristiche monitoreremo anche markers legati al metabolismo del ferro (quali ferritina ed epcidina) che dai nostri dati preliminari risultano fondamentali per la risposta immunitaria infiammatoria [13], proteine dal ruolo anti-infiammatorio (ad es. SLPI [14] e la calprotectina sierica [15]). Utilizzeremo anche le analisi sulla saliva dei pazienti, in quanto, eventuali riscontri positivi, ci permetterebbero di monitorare la risposta dei pazienti in maniera assolutamente non invasiva. Le analisi proteomiche effettuate sulle urine permetteranno di ottenere un profilo metabolomico dei pazienti, questo aspetto è un altro importante pezzo del puzzle che potrebbe fornire dei metaboliti da utilizzare come candidati per lo screening e la separazione tra responder e non responder.

Durante la terza fase, i dati ottenuti verranno analizzati e paragonati. La validazione statistica delle analisi verrà coordinata dal Dr. Guerra al fine di individuare candidati da validare in un secondo ciclo di sperimentazione. I biomarkers individuati verranno validati mediante immunoistochimica in maniera prospettica sui tessuti biopsici dei pazienti facenti parte dello studio e mediante l'archivio storico del reparto di anatomia patologica. Utilizzando campioni provenienti da pazienti affetti da patologie diverse da quelle studiate, potremo validare anche la specificità dei biomarker selezionati. Inoltre, mediante l'utilizzo di modelli murini, geneticamente predisposti allo sviluppo di UC,

utilizzeremo i dati ottenuti durante le prime due fasi dello studio, per sviluppare approcci terapeutici alternativi e mirati al trattamento dei non responder.

Stato di avanzamento del progetto (nel caso di seconda o terza annualità):

Il progetto terminerà a Dicembre.

Abbiamo ottenuto l'autorizzazione allo studio dal comitato etico il 04/08/2017.

Attualmente non abbiamo attuato un protocollo per la raccolta delle biopsie secondo gli standard descritti del progetto, questo ha influito negativamente sulla catena di analisi laboratoristiche.

Utilizzando modelli animali caratterizzati da infiammazione intestinale spontanea TNF α -indipendente abbiamo individuato due target infiammatori innovativi (IL-1 β e IL-9). [16]

Approfittando dei campioni biologici raccolti dal laboratorio di patologia clinica per l'analisi dell'anticorpo anti-farmaco sviluppato dai pazienti trattati con infliximab, abbiamo cominciato la valutazione dei livelli di TNF α , IL-1 β ed IL-9. Attualmente abbiamo esaminato il siero di 41 pazienti dei quali 25 è risultato positivo a TNF α , 11 ad IL-1 β ed 7 ad IL-9.

In 7 casi la positività al TNF α coincideva con quella ad IL-1 β , in 8 casi la positività al TNF α coincideva con quella ad IL-9 ed in 3 casi la positività ad IL-9 coincideva con quella ad IL-1 β .

Per l'analisi dei sieri dei pazienti afferiti presso l'Ambulatorio delle IBD, nei giorni programmati per l'infusione della terapia biologica, sono stati determinati i seguenti parametri metabolici: glucosio, colesterolo HDL, colesterolo LDL, trigliceridi, insulina, ferro, ferritina, vitamina D. Mediante i valori di glicemia ed insulinemia è stato effettuato l'HOMA test.

Inoltre, si è proceduto a verificare lo stato infiammatorio dei pazienti mediante determinazione della proteina C reattiva.

Sono stati arruolati 18 pazienti, ritornati in media per quattro volte. Nonostante l'esiguo numero di campioni raccolti, abbiamo analizzato le variazioni dei parametri nel corso delle infusioni. I risultati indicano che glicemia, colesterolemia e vitamina D non variano durante la terapia. Insulinemia, colesterolo LDL e HOMA diminuiscono, mentre aumenta il colesterolo HDL, facendo pensare ad un miglioramento dell'insulino-resistenza. Aumentano i trigliceridi probabilmente in relazione alla ripresa clinica del paziente. In netto aumento è il ferro (mentre la ferritina diminuisce), che da sotto soglia diventa normale e la Proteina C reattiva, che rientra nel range di riferimento.

Il numero di pazienti ed ad oggi troppo ristretto per poter associare la positività ad IL-1 β con i pazienti non responder ad infliximab, ma abbiamo avviato uno studio pre-clinico su modelli murini di infiammazione intestinale TNF α -indipendente. Tale studio prevede la somministrazione di Anakinra (IL-1Ra) al fine di neutralizzare l'IL-1 β e valutare gli effetti sull'infiammazione (intestinale e sistemica).

Abbiamo inoltre avviato una collaborazione con il gruppo di gastroenterologia del Policlinico Gemelli di Roma e la Case Western University di Cleveland. Abbiamo avuto la possibilità di ottenere i sieri dei pazienti responder e non-responder ai quali è associata una rigorosa valutazione morfologica.

I sieri sono stati analizzati confermando le indicazioni ottenute dalla nostra unità sul ruolo predittivo dell'IL1b nel contesto dei pazienti non-responder.

Obiettivi specifici dello studio:

Obiettivo specifico 1: Miglioramento degli standard di valutazione dei pazienti con presunto IBD

Obiettivo specifico 2: Stratificazione del campione in base alla risposta al trattamento con farmaco biologico

Obiettivo specifico 3: Individuazione e validazione di biomarkers predittivi

Obiettivo 1: Miglioramento degli standard di valutazione dei pazienti con presunto IBD

Il percorso clinico dei pazienti arruolati per lo studio dovrà seguire rigidi standard di eccellenza. Verranno arruolati per lo studio solo i pazienti che non hanno ancora iniziato alcun percorso terapeutico, stimiamo di arruolare 100 nuovi casi all'anno. I nuovi pazienti con presunto IBD verranno seguiti in un percorso coordinato tra Endoscopia digestiva, Anatomia patologica e Patologia Clinica. Il giorno dell'endoscopia i pazienti si presenteranno in ospedale per il prelievo (analisi di routine) e consegneranno un campione di feci (valutazione del sangue occulto e calprotectina fecale) ed urine (analisi standard e dosaggio della neopterin) raccolte prima di cominciare la preparazione per la colon e conservate nel freezer di casa.

Il materiale biologico non utilizzato per le analisi verrà conservato nella biobanca seguendo gli standard di riservatezza in uso nel nostro istituto.

I prelievi biotici verranno prelevati secondo rigidi standard numerici e qualitativi. Le biopsie, in numero uguale o superiore a due per ogni tratto compreso tra ileo e retto, dovranno avere dimensioni tali da permettere l'analisi di almeno 8 cripte parallele e della muscularis mucosae. In caso di mancato raggiungimento degli standard qualitativi richiesti, i pazienti verranno esclusi dallo studio.

I dati di ogni paziente verranno uniti in una nuova cartella clinica sperimentale coordinata con i reparti coinvolti. Tutte le informazioni ottenute saranno presenti nella cartella.

Il gruppo di ricerca si riunirà 2 volte al mese per discutere i dati raccolti e risolvere eventuali problematiche evidenziate. Tutti i pazienti seguiranno la terapia convenzionale secondo gli standard terapeutici in uso.

Obiettivo 2: Stratificazione del campione in base alla risposta al trattamento con farmaco biologico

La valutazione dell'efficacia del trattamento con farmaco biologico richiede circa 3 mesi di trattamento. Ogni nuovo *non-responder* (20% circa) verrà segnalato, mentre per i responder potrebbero formarsi due sottogruppi *responder* (55% circa) e *lose responder* (25% circa).

Obiettivo 3: Individuazione e validazione di biomarkers predittivi

Raggiunta una numerosità di 40 *non-responder* e 40 *responder* cominceremo analisi retrospettive sul materiale biologico conservato in biobanca per l'individuazione e la validazione dei nuovi markers.

Timeline / Prodotti finali:

Il fine ultimo del progetto proposto è la selezione di un pannello di biomarkers in grado di discriminare i pazienti in grado di rispondere alla terapia biologica, da quelli non responder.

Intendiamo inoltre:

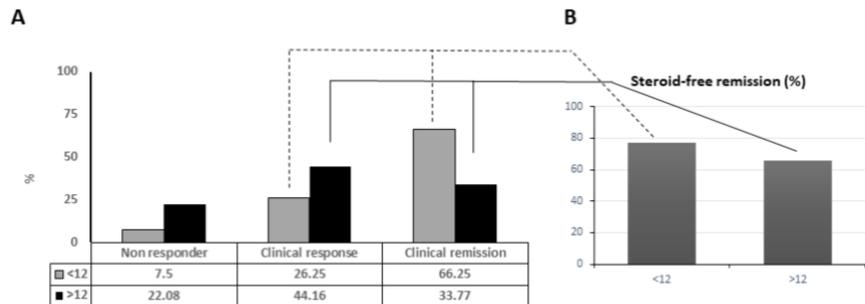
- individuare un pannello di parametri biologici in grado di aiutare i clinici alla scelta della terapia più efficace

Lo studio proposto ha portato ad individuare parametri innovativi per la valutazione dei pazienti IBD ed il trattamento.

Abbiamo dimostrato come uno dei parametri maggiormente correlati con l'efficacia dell'intervento farmacologico sia il tempo trascorso dalla diagnosi all'intervento farmacologico.

Infatti, i pazienti ai quali viene somministrato Adalimumab a meno di 12 mesi dalla

diagnosi hanno una probabilità doppia rispetto agli altri di avere una remissione clinica nella patologia di Crohn. [Administration Timing is the Best Clinical Outcome Predictor for Adalimumab Administration in Crohn's disease, Mastronardi et al. Accepted 2019]

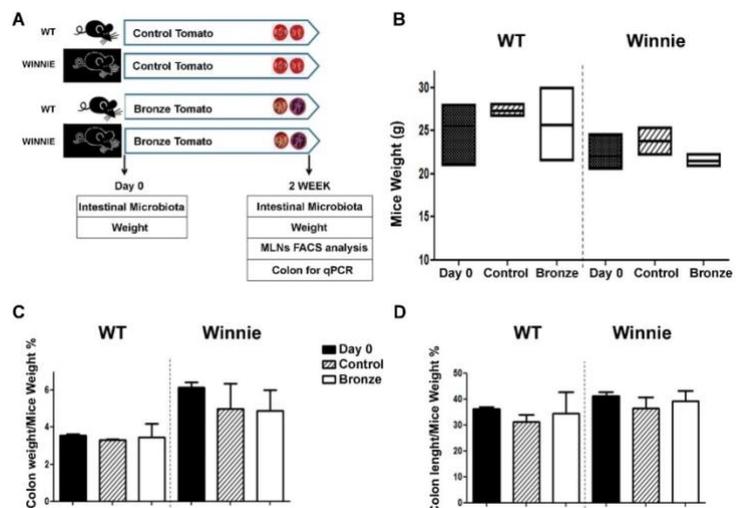


Abbiamo inoltre individuate una serie di biomarkatori che sono oggi in fase di validazione anche grazie al progetto SI-CURA "Soluzioni Innovative per la gestione del paziente e il follow up terapeutico della Colite UlceRosA" attualmente in corso nel nostro istituto.

- individuare terapie nutrizionali in grado di prolungare le fasi di mantenimento della risposta terapeutica

Essendo la disbiosi intestinale un problema molto rilevante per i pazienti affetti da IBD, abbiamo studiato la possibilità di intervenire con terapie nutrizionali in grado di correggere l'abbondanza relative di specie batteriche associate allo stato infiammatorio intestinale. Per raggiungere questo fine abbiamo utilizzato il modello murino Winnie che è caratterizzato dalla progressiva comparsa di infiammazione del colon. Abbiamo caratterizzato il microbiota intestinale dei topi Winnie e lo abbiamo paragonato ai topi Wild Type.

Successivamente abbiamo provato a somministrare delle diete arricchite di un mix di polifenoli ottenuti dal frutto liofilizzato dei pomodori transgenici BRONZE. La dieta arricchita è riuscita a correggere la



disbiosi e ridurre la differenza tra topo normale e topo con colite. [A Bronze-Tomato Enriched Diet Affects the Intestinal Microbiome under Homeostatic and Inflammatory Conditions. Liso M. et al. *Nutrients*. 2018 Dec 2;10(12). pii: E1862. doi: 10.3390/nu10121862.]

Sulla base di questi risultati abbiamo scritto un protocollo per uno studio clinico legato al progetto SICURA e dopo aver ricevuto l'autorizzazione del comitato etico abbiamo cominciato il trattamento adiuvante nutrizionale per i pazienti affetti da Colite Ulcerosa e Crohn. Lo studio è attualmente in corso e stiamo arruolando la seconda decina di pazienti. Non abbiamo ancora dati che ci possano indicare l'efficacia del trattamento nutrizionale, ma i pazienti hanno accolto in maniera estremamente positiva l'introduzione di uno specialista in nutrizione (Dr.ssa Annamaria Sila).

- individuare parametri biologici in grado di aiutare il clinico a riconoscere immediatamente la perdita della risposta terapeutica e conseguentemente cambiare strategia tempestivamente

La raccolta del siero dei pazienti è attualmente in corso, abbiamo programmato l'analisi metabolomica completa del siero dei pazienti in modo da poter confrontare il profilo dei responder vs non-responder. Attendiamo di avere completato la raccolta di tutti i soggetti a tutti i time points programmati in modo da poter eseguire in parallelo tutte le analisi richieste.

Progetto n. 15: Ruolo dei miRNA nella patogenesi delle malattie infiammatorie croniche intestinali: dal modello murino all'uomo

Responsabile: dott. Antonio Lippolis

Partecipanti: Dott.ssa Grazia Serino, Dott.ssa Viviana Scalavino

Background

La malattia di Crohn (CD) e la colite ulcerosa (UC), comunemente note come malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI o secondo la nomenclatura anglosassone IBD, inflammatory bowel diseases), sono patologie idiopatiche caratterizzate da uno stato flogistico del tratto gastroenterico ad andamento cronico recidivante.

L'eziologia delle malattie infiammatorie croniche intestinali non è ancora nota ma è attualmente ipotizzata un'origine multifattoriale. La predisposizione genetica è uno degli elementi preponderanti come dimostra l'aumentata percentuale di IBD nei parenti di persone affette (*Tysk C et al. Gut. 29:990-6,1988*). Nella patogenesi delle IBD l'elemento più importante è l'alterazione dell'equilibrio immunitario a livello della mucosa intestinale che determina una risposta inappropriata ad antigeni normalmente presenti nel lume intestinale, tra cui la flora batterica.

Il preciso meccanismo ancora non è conosciuto ma il difetto primario delle cellule epiteliali (ECs) intestinali può scatenare una cascata di eventi che termina con l'attivazione in senso infiammatorio del sistema immunitario (*Pizarro TT et al. Inflamm Bowel Dis. 17:2566-84,2011*). L'epitelio intestinale rappresenta una barriera chimica, fisica ed elettrica ed è separato dal microbiota luminale da uno strato di muco spesso 50µm (*Dharmani P et al. J Innate Immun. 1:123-35, 2009*) dove il maggiore componente dello strato interno è Muc2. Lo studio del Dr. Eri dell'Università della Tasmania in Australia (*Eri RD et al. Mucosal Immunol. 4:354-64, 2011; McGuckin MA et al. Biochem Soc Trans. 39:1081-5, 2011*) ha dimostrato che una mutazione missenso nel gene di Muc2 in modelli murini chiamati Winnie determina la riduzione dello strato di muco e la conseguente infiammazione intestinale. È stato dimostrato che, a livello della mucosa intestinale, la comunicazione tra le cellule dell'immunità innata e l'epitelio gioca un ruolo critico nella regolazione dell'omeostasi e dell'infiammazione.

Negli ultimi anni, nella ricerca medica particolare interesse hanno destato delle piccole molecole di RNA chiamate microRNA (miRNA) che regolano l'espressione di geni inibendo la trascrizione di RNA messaggero in proteine o favorendo la degradazione dell'RNA messaggero di specifici geni. Diversi studi dimostrano anche che i miRNA giocano un ruolo importante in molte patologie umane come le neoplasie. Inoltre, è stato dimostrato che esiste un profilo unico di espressione dei miRNA per ogni malattia e che l'espressione alterata di uno o più miRNA è specifico di ogni patologia. Per questi motivi, i miRNA potrebbero essere utilizzati sia come potenziali target terapeutici sia come nuovi biomarcatori predittivi e/o diagnostici di malattia.

Diversi lavori hanno studiato il ruolo dei miRNA nelle IBD dimostrandone il loro coinvolgimento nella patogenesi (*Kalla R et al. Gut. 64:504-17, 2015; Van der Gooten J et al. PLoS One. 9:e116117, 2014*). Tuttavia, il limite della maggior parte degli studi esistenti è rappresentato dal materiale di partenza su cui è stato effettuato il profiling dei miRNA, infatti il tessuto in toto è costituito da una eterogeneità cellulare che rende difficile la comprensione dei risultati ottenuti. In primo luogo, il tessuto intestinale comprende distretti distinti dal punto di vista anatomico e funzionale. Inoltre, a sua volta, la mucosa stessa è composta da diversi tipi cellulari tra cui linfociti, monociti e residue, microflora e loro prodotti. Considerando l'importanza della plasticità fenotipica dei diversi tipi cellulari nel tratto gastrointestinale, esaminare il profilo di espressione dei miRNA nelle cellule epiteliali dell'intestino è il primo passo per identificare i miRNA direttamente coinvolti nella patogenesi della IBD.

Scopo di questo progetto è analizzare l'espressione dei miRNA nelle cellule epiteliali isolate dal grande intestino di topi Winnie al fine di identificare nuovi target terapeutici e/o biomarcatori che potrebbero migliorare la comprensione della patogenesi delle IBD e quindi rendere più specifica la terapia e la diagnosi.

Obiettivo dello studio

- 1) Identificazione del pattern specifico di miRNA nelle cellule epiteliali isolate da diverse porzioni di colon di topi Winnie.
- 2) Identificazione dei target molecolari dei miRNA individuati e successiva caratterizzazione funzionale.

Materiali e metodi

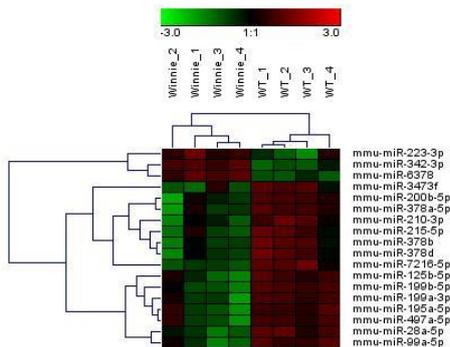
Il modello animale Winnie caratterizzato nel nostro Istituto rappresenta un ottimo modello per lo studio della colite ulcerosa. Questo modello animale, infatti, è geneticamente predisposto a sviluppare la colite ulcerosa e mostra a livello fenotipico e a livello istologico i segni dell'infiammazione intestinale (perdita di peso, feci molli caratterizzate da presenza di sangue e sopravvivenza ridotta). Al raggiungimento delle 16 settimane i topi sono stati sacrificati, i tessuti di colon di topi Winnie e wild-type sono stati prelevati e utilizzati per l'isolamento delle cellule epiteliali da tessuto. I pezzi di colon sono stati prelevati da 4 topi Winnie e 4 topi wild-type e sottoposti a digestione meccanica con il gentleMACS™ Dissociator ed enzimatica utilizzando il kit Lamina Propria Dissociation kit per topo (Miltenyi Biotec). La sospensione cellulare è stata in seguito utilizzata per selezionare le cellule epiteliali (EpCAM+) mediante separazione immunomagnetica positiva con biglie magnetiche coniugate con anticorpi per il marcatore EpCAM (CD326). Allo scopo di determinare la purezza delle cellule isolate, al termine della separazione è stata effettuata l'analisi citofluorimetrica con l'anticorpo EpCAM-PE (Miltenyi Biotec). Sono stati utilizzati solo campioni con una purezza di cellule EpCAM+ superiore al 90%. Inoltre, visto che il marcatore EpCAM è espresso anche sulla popolazione leucocitaria, abbiamo anche valutato la presenza delle cellule CD45 positive nei nostri campioni mediante anticorpo CD45-APC (Miltenyi Biotec). Le cellule selezionate, dopo separazione immunomagnetica, risultavano tutte EpCAM+ e CD45-. Le cellule selezionate sono state lisate per RNA e si è proceduto all'estrazione dei miRNAs mediante kit miRNeasy mini (Qiagen), un metodo che combina la lisi del campione con fenolo/guanidina tiocianato e la purificazione dell'RNA totale che comprende anche i piccoli RNA con una membrana di silice. La concentrazione del campione ottenuto è stata determinata mediante lo spettrofotometro NanoDrop. L'integrità dell'RNA è stata valutata mediante lo strumento Bioanalyzer (Agilent). I campioni di RNA totale, inclusi i miRNAs, sono stati defosforilati, denaturati e marcati con molecole di Cyanine 3-pCp al 3' mediante il kit miRNA Complete Labeling and Hyb (Agilent Technologies). Successivamente si è proceduto all'ibridazione su chip Mouse miRNA Microarray Kit, Release 21 (Agilent Technologies). Dopo l'ibridazione i campioni sono stati scansionati con lo scanner Agilent G2565BA e i dati sono stati estratti con il software Feature Extraction (Agilent Technologies). I risultati di espressione ottenuti da ciascun campione sono stati inizialmente normalizzati utilizzando il livello mediano di espressione genica e successivamente sottoposti alle analisi statistiche mediante software Genespring (Agilent Technologies). Il software Genesis è stato utilizzato per il 2-D hierarchical clustering e la Principal Component Analysis. L'identificazione dei target dei miRNA è stata effettuata mediante l'utilizzo di diversi algoritmi bioinformatici tra cui miRBase 21.1 (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml>), TargetScan 7.1 (http://www.targetscan.org/vert_71/), miRWalk 2.0 (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/>), miRDB (<http://www.mirdb.org/>) e TarBase v.8 (http://carolina.imis.athena-innovation.gr/diana_tools/web/index.php?r=tarbasev8/index). Dato che si tratta di risultati predittivi, per ridurre i falsi positivi, i risultati ottenuti da ciascun database sono stati sovrapposti e sono stati considerati solo quei target predetti da almeno 3 algoritmi. Lo studio delle

pathway molecolari regolate dai miRNA trovati deregolati nei topi Winnie rispetto ai topi wild-type è stato effettuato mediante l'utilizzo di software come mirPath, miRSystem e Ingenuity Pathway analysis (IPA).

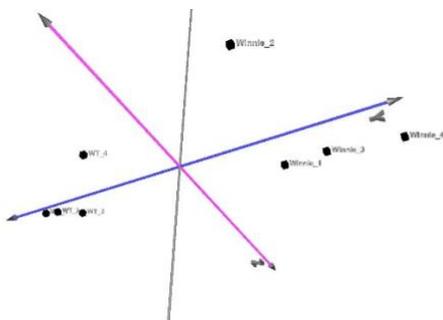
Risultati / stato di avanzamento per la 3 annualità del progetto

Abbiamo messo a punto la metodica di isolamento delle cellule epiteliali da tessuti di colon di topi *Winnie* e wild-type. Al raggiungimento delle 16 settimane, dopo il sacrificio, l'analisi necroscopica ha confermato la presenza di segni di infiammazione nei topi Winnie rispetto ai topi wild-type. Infatti, il colon dei topi Winnie risultava più corto di quello del wild-type, segno di una infiammazione intestinale. Nei colon con mutazione Winnie era, inoltre, frequente la presenza di feci poco consistenti ed a volte la presenza di sangue. La parte prossimale e distale è stata fissata e colorata con ematossilina/eosina ed è stato valutato lo score infiammatorio. Lo score infiammatorio dei topi Winnie è più elevato rispetto anche ai wild-type sia nella porzione prossimale che distale.

I pezzi di colon sono stati prelevati e utilizzati per l'isolamento delle cellule epiteliali da tessuto. Al fine di identificare i miRNA espressi nelle cellule epiteliali intestinali isolate da topi Winnie rispetto ai topi wild-type, è stato analizzato il loro totale profilo di espressione mediante la tecnica del microarray. A partire dai 1881 miRNA murini rappresentati sul microarray, sono stati identificati 460 miRNA che risultano espressi nelle cellule epiteliali isolate. Applicando il metodo del Q-value e selezionando i miRNA modulati che hanno un fold-change di 2, sono stati identificati 18 miRNA che discriminano le cellule epiteliali intestinali dei topi Winnie dalle cellule epiteliali intestinali dei topi wild-type. Il 2-D hierarchical clustering e la Principal Component Analysis dimostrano chiaramente che il profilo di espressione dei miRNA delle cellule epiteliali intestinali dei 2 modelli è nettamente distinto.



Hierarchical clustering

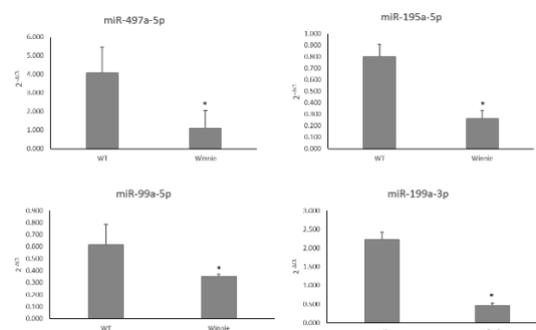


Principal Component Analysis

Al fine di studiare i meccanismi molecolari in cui sono coinvolti i miRNA deregolati che sono stati individuati nell'analisi del microarray, è stata effettuata un'analisi bioinformatica utilizzando diversi software di predizione accessibili pubblicamente on line. Sono stati utilizzati 6 differenti algoritmi e in seguito, per ridurre il numero di falsi positivi, sono stati sovrapposti i risultati ottenuti dai differenti database e considerati solo i geni target putativi predetti da almeno 3 dei 6 database. Basandosi sui

risultati ottenuti dalle analisi bioinformatiche sono stati individuati diversi geni, particolarmente coinvolti nella fisiopatologia delle epiteliali intestinali, che erano potenzialmente regolati da alcuni dei miRNA individuati. Per approfondire le interazioni biologiche tra i miRNA trovati modulati nelle cellule epiteliali isolate da topi Winnie rispetto ai controlli e i geni target regolati dai miRNA, è stata effettuata un'ulteriore analisi bioinformatica per valutare le pathway e i processi biologici in cui sono coinvolti i geni target dei miRNA. In particolare, risultano significativamente modulate le seguenti pathways canoniche: Wnt, MAPK, TGF β , tight junction, Intestinal immune network for IgA production. Inoltre, tra i processi biologici più significativi sono stati identificati la proliferazione e la crescita cellulare, lo sviluppo delle cellule e degli organi, la morfologia cellulare e le interazioni cellula-cellula.

I dati ottenuti da microarray sono stati validati mediante l'utilizzo della Real-Time PCR su RNA estratto da cellule epiteliali intestinali di un gruppo indipendente di 4 topi Winnie e 4 topi wild-type. Tutti i miRNA analizzati hanno mostrato un cambiamento significativo nell'espressione nelle cellule epiteliali isolate da topi Winnie rispetto a quelle isolate da topi wild-type, confermando i risultati del microarray (* $p < 0.01$).



Sono in corso gli studi funzionali per validare biologicamente l'interazione tra miRNA e i geni target individuati. Questi esperimenti sono rallentati dalle difficoltà nella messa in coltura delle cellule epiteliali intestinali da utilizzare per esperimenti di transfezione. Infatti, stiamo procedendo con la messa a punto degli esperimenti di transfezione in cellule epiteliali del colon a linea continua quali Caco-2 e HT-29.

Parallelamente a questo progetto, ci siamo occupati di studiare il ruolo dei miRNA nella immunomodulazione mediata dalla quercetina. Le cellule dendritiche sono le più potenti cellule presentanti l'antigene e svolgono un ruolo importante nella comunicazione tra la risposta immunitaria innata e la risposta immunitaria adattativa. È ormai noto il ruolo svolto dai miRNA nella regolazione dell'immunità innata.

Negli ultimi anni, diversi studi hanno dimostrato che alcune sostanze naturali come la quercetina possono ridurre l'attivazione delle cellule dendritiche in risposta al lipopolisaccaride (LPS). La quercetina, un flavonoide comunemente presente nei vegetali e nella frutta, possiede una vasta gamma di proprietà farmacologiche tra cui una forte azione anti-infiammatoria.

Studi recenti hanno dimostrato gli effetti immunosoppressivi della quercetina sulla funzione delle cellule dendritiche. Tuttavia non è ancora stato chiarito il ruolo dei miRNA nella cascata di eventi che conduce all'effetto immunosoppressivo della quercetina nelle cellule dendritiche.

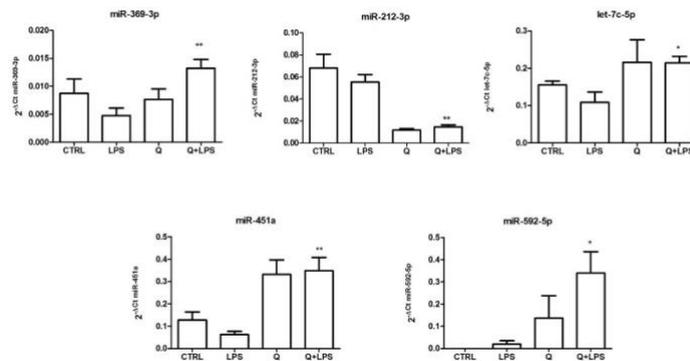
Pertanto, abbiamo studiato l'espressione dei miRNA in cellule dendritiche isolate da midollo osseo (BMDCs) stimulate con LPS dopo esposizione a quercetina. Per identificare i miRNA differenzialmente espressi nelle BMDC trattate con LPS ed esposte o meno alla quercetina, abbiamo analizzato il loro profilo di espressione globale mediante next generation sequencing.

L'analisi dell'espressione differenziale tra le BMDC trattate con LPS esposte o meno alla quercetina ha rivelato che ci sono 113 miRNA differenzialmente espressi con $FDR \leq 0.05$ e fold change threshold > 2).

Allo scopo di studiare i meccanismi molecolari in cui sono coinvolti i miRNA differenzialmente espressi, abbiamo eseguito un'analisi bioinformatica per predire i geni bersaglio dei 113 miRNA trovati

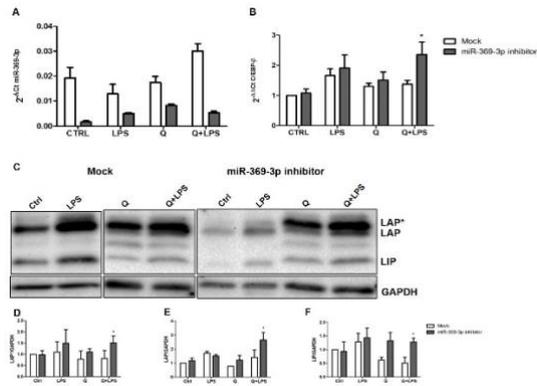
modulati. Per ridurre il numero di risultati falsi positivi, abbiamo utilizzato cinque diversi algoritmi e abbiamo elencato solo i geni putativi previsti da almeno due di essi.

Sulla base dei risultati dell'analisi bioinformatica, abbiamo identificato il miR-369-3p che potenzialmente regolava la proteina CCAAT / Enhancer β (C/EBP- β). I risultati del sequenziamento sono stati validati con q-RT-PCR per miR-369-3p, miR-212-3p, let-7c-5p, miR-451a e miR-592-5p su miRNA isolati da BMDCs da un gruppo indipendente di 4 topi wild-type, esposti o meno alla quercetina e trattati con 1 μ g/mL di LPS. Tutti i miRNA analizzati hanno mostrato un cambiamento significativo dell'espressione nelle BMDCs stimolate con LPS dopo il trattamento con quercetina, confermando i risultati del sequenziamento.

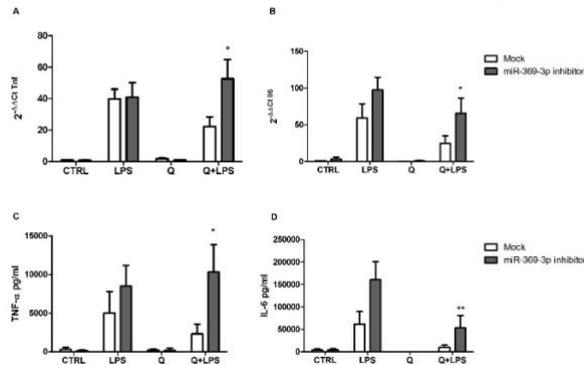


Molti studi hanno dimostrato che la trascrizione del gene C/EBP- β è attivata da stimoli infiammatori, quali citochine e LPS batterico. L'analisi in silico ha mostrato che l'aumento del miR-369-3p, in seguito all'esposizione con quercetina, potrebbe causare una diminuzione di C/EBP- β e una conseguente riduzione del rilascio di citochine infiammatorie. Successivamente abbiamo valutato i livelli di espressione di mRNA di C/EBP- β mediante qRT-PCR nello stesso set di campioni di RNA usati negli esperimenti di validazione. Abbiamo trovato che i livelli di C/EBP- β erano significativamente inferiori nelle BMDCs stimolate con LPS dopo il trattamento con quercetina ($p < 0.03$). Allo stesso modo, abbiamo studiato due geni bersaglio regolati da C/EBP- β , il TNF α e Il6. Anche questi geni, come C/EBP- β , erano significativamente più bassi dopo trattamento con quercetina. Il legame tra funzione della quercetina e miR-369-3p non è mai stato caratterizzato dal punto di vista funzionale; per valutare se il miR-369-3p fosse in grado di modulare realmente l'espressione del gene C/EBP- β abbiamo eseguito esperimenti di transfezione transiente usando BMDCs isolate da un gruppo indipendente di quattro topi wild-type, trattate per 4 giorni con quercetina e successivamente stimolate con LPS.

Abbiamo inibito l'attività di miR-369-3p in BMDCs stimolate con LPS esposte o meno alla quercetina, come mostrato nella Figura A. La trasfezione delle BMDCs con 75 nM di inibitore miR-369-3p ha determinato un aumento statisticamente significativo dei livelli di mRNA di C/EBP- β endogeno rispetto ai controlli (mock) ($p = 0.03$, Figura B). Inoltre, abbiamo valutato se anche l'espressione della proteina C/EBP- β fosse controllata dal miR-369-3p. Le BMDC stimolate con LPS, esposte o meno alla quercetina, sono state transfettate in maniera transiente con 75 nM di inibitore miR-369-3p, le proteine sono state estratte e analizzate mediante analisi Western blot. La transfezione con l'inibitore miR-369-3p ha determinato un aumento statisticamente significativo della proteina C/EBP- β (Figura C) e di tutte e tre le isoforme (Figura D-E-F).

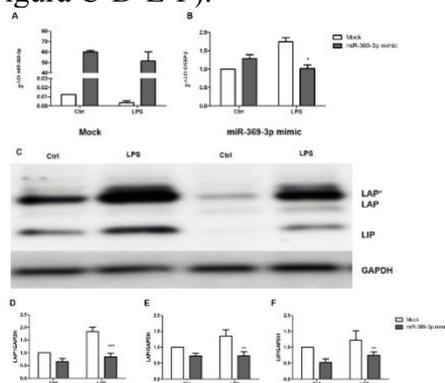


Per confermare ulteriormente il legame tra l'espressione mediata dalla quercetina del miR-369-3p e le proprietà anti-infiammatorie della quercetina stessa, abbiamo testato se l'inibizione di miR-369-3p influenzasse il rilascio di citochine infiammatorie anche dopo trattamento con quercetina. La trasfezione delle BMDC con 75 nM di inibitore miR-369-3p ha determinato un aumento dell'espressione di mRNA di TNF α e IL6 ($p < 0.05$, Figura A-B). Di conseguenza, dopo il trattamento con la quercetina, le BMDC transfettate con l'inibitore di miR-369-3p hanno maggiormente prodotto le citochine infiammatorie, TNF α e IL6 nel surnatante ($p < 0.05$, Figura C-D).



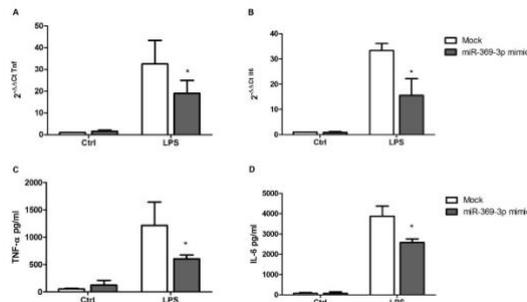
Per confermare ulteriormente il ruolo del miR-369-3p come mediatore dell'attività anti-infiammatoria della quercetina, abbiamo eseguito un ulteriore esperimento di trasfezione transiente in cui è stata utilizzata una sequenza di RNA breve in grado di mimare l'azione di miR-369-3p. Le BMDCs isolate da un gruppo indipendente di quattro topi wild-type e stimulate con LPS sono state transfettate con 50 nM del mimic miR-369-3p. Come mostrato nella Figura A, dopo la trasfezione, i livelli di miR-369-3p erano aumentati in tutte le condizioni.

In particolare l'espressione del gene target del miR-369-3p di C/EBP- β era significativamente ridotta nelle BMDCs stimulate con LPS dopo trasfezione con miR-369-3p mimic rispetto al controllo (mock) ($p < 0.01$, Figura B). Inoltre, abbiamo confermato l'espressione della proteina C/EBP- β nelle BMDCs transfettate con miR-369-3p mimic. L'aumento transitorio dei livelli di miR-369-3p nelle BMDC ha determinato una notevole riduzione dell'espressione della proteina C/EBP- β in tutte e tre le isoforme come rivelato da Western blot (Figura C-D-E-F).

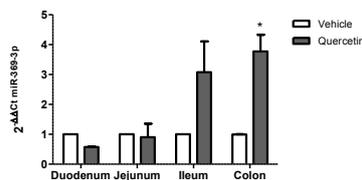


Per verificare l'ipotesi che l'aumento del miR-369-3p inibisca la produzione di citochine di fase acuta come TNF α e IL6, abbiamo transfettato in maniera transiente le BMDCs stimulate con LPS con 50 nM di miR-369-3p mimic. L'espressione di mRNA di TNF α e di IL6 risultava essere significativamente ridotta dopo la trasfezione rispetto al controllo (mock) ($p < 0.05$, Figura A-B). Questi risultati sono stati ulteriormente confermati dai dati ELISA sul surnatante ottenuto dalle BMDCs stimulate con LPS dopo trasfezione con mimic. Infatti, a livelli di miR-369-3p più elevati, il rilascio di TNF α e IL6 era ridotto ($p < 0.05$, Figura C-D).

Complessivamente, i nostri risultati dimostrano che la up-regolazione del miR-369-3p dopo l'esposizione alla quercetina è responsabile della riduzione di C/EBP- β e quindi del rilascio delle citochine TNF α e IL6.

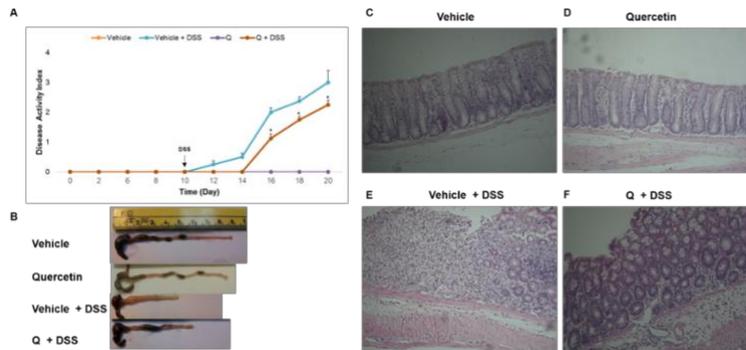


Successivamente, abbiamo verificato se l'esposizione di quercetina potesse indurre l'espressione del miR-369-3p anche nel tratto gastro-intestinale. Per questo, abbiamo valutato l'espressione del miR-369-3p nelle diverse porzioni di intestino di topi in cui è stata somministrata per via orale la quercetina. La quercetina è stata somministrata mediante gavage alla concentrazione di 0.5 μ M/g ogni 48h per una settimana. Il giorno 7, i topi sono stati sacrificati, l'intestino è stato espantato e suddiviso nelle varie porzioni: duodeno, digiuno, ileo e colon. Dopo la somministrazione di quercetina, è stata rilevato un aumento dell'espressione di miR-369-3p nell'ileo e nel colon, invece nel duodeno e nel digiuno i livelli del miRNA risultavano essere simili ai campioni non trattati. Da notare che solo nella porzione del colon abbiamo rilevato un aumento di espressione del miR-369-3p statisticamente significativo ($p < 0.05$).



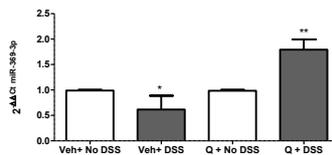
Al fine di confermare il coinvolgimento delle cellule dendritiche intestinali dopo la somministrazione di quercetina, dopo somministrazione orale di quercetina nei topi, abbiamo isolato le cellule CD11c+ dal colon intero e misurato i livelli di espressione di miR-369-3p. Dopo la somministrazione di quercetina, i livelli di espressione del miR-369-3p sono significativamente aumentati anche nelle cellule dendritiche intestinali ($p = 0.0003$).

In seguito, abbiamo studiato l'effetto della somministrazione orale di quercetina in modelli sperimentali di topi con colite indotta da destran sodio solfato (DSS). La colite veniva indotta aggiungendo il 2% di DSS nell'acqua da bere al giorno 12 con e senza somministrazione orale di quercetina. La somministrazione orale di DSS provocava un aumento significativo del DAI score in comparazione al gruppo controllo. Il trattamento con quercetina riduceva fortemente il DAI score dal giorno 12 in poi ($p < 0.05$, Figura A). Inoltre, il colon dei topi trattati con quercetina nel gruppo DSS rispetto ai controlli risultava più lungo rispetto al controllo con solo DSS (Figura B). L'analisi istologica dei tessuti di colon dopo trattamento con DSS rivelava una distruzione della struttura delle cripte con perdita delle cellule caliciforme mucipare (globet cells), uno strato epiteliale disomogeneo e un'infiltrazione massiccia di cellule infiammatorie (Figura E). Il trattamento di quercetina in questi topi attenuava il danno istologico tipico del DSS (Figure F).

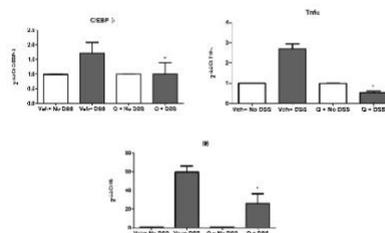


Abbiamo anche valutato la quantità di quercetina nei tessuti di colon e plasma nei topi in cui è stata indotta la colite con DSS dopo somministrazione orale di quercetina. La concentrazione di quercetina non era rilevabile nei tessuti espuntati da topi controllo trattati con 1% di saccarosio (vehicle), invece nei topi trattati con quercetina, la concentrazione media di quercetina era 12.06 ± 0.48 nM. Nel plasma, la concentrazione media di quercetina nei topi in cui era stata somministrata solo la quercetina e nei topi in cui era stata somministrata la quercetina e il DSS era, rispettivamente, 1896.60 ± 25.63 nM and 1825.68 ± 24.59 nM.

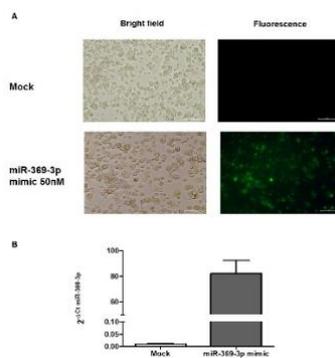
I livelli di espressione del miR-369-3p nei tessuti di colon prelevati da topi pretrattati con quercetina per 8 giorni e trattati con DSS per 10 giorni erano significativamente più elevati rispetto ai topi controllo trattati solo con (1.8 fold-increase, $p < 0.01$).



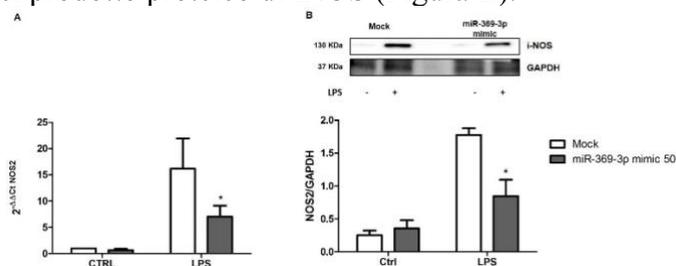
Al contrario negli stessi animali, i livelli di espressione dei geni *C/EBP-β*, *Tnfa* e *Il6* risultavano significativamente ridotti nei topi trattati con quercetina e DSS rispetto ai topi trattati con solo DSS ($p < 0.05$).



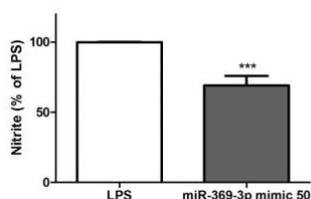
Allo scopo di trovare altri geni target del miR-369-3p, abbiamo effettuato una ulteriore analisi bioinformatica focalizzando la nostra attenzione non solo sulla regione 3'UTR, ma anche sulle regioni 5'UTR e CDS. L'analisi bioinformatica ha messo in evidenza che il miR-369-3p presentava un sito di legame putativo nella regione CDS del gene *NOS2*. Allo scopo di validare l'analisi bioinformatica, abbiamo eseguito degli esperimenti di trasfezione transiente su BMDCs isolate da quattro topi wild-type e stimulate con LPS utilizzando il miR-369-3p mimic. Utilizzando il mimic miR-369-3p marcato in modo fluorescente abbiamo valutato l'efficienza della trasfezione (FiguraA). Successivamente, abbiamo quantificato i livelli di espressione di miR-369-3p nelle DCs trasfettate con il solo liposoma (mock) e con il mimic miR-369-3p (FiguraB). Abbiamo riscontrato che tale trasfezione aumenta l'espressione di miR-369-3p nelle DCs.



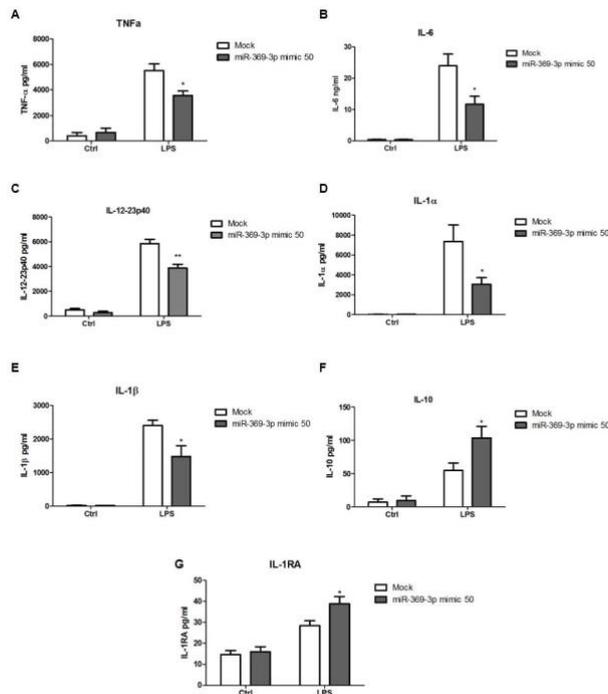
Successivamente, abbiamo analizzato l'effetto di miR-369-3p sull'espressione di NOS2. L'aumento di miR-369-3p endogeno portava ad una significativa riduzione dell'espressione del mRNA di iNOS nelle BMDCs trattate con LPS rispetto al mock (Figura A). In aggiunta, abbiamo esaminato se il miR-369-3p fosse anche il grado di influire sull'espressione proteica di iNOS. Per tale ragione, le BMDCs sono state trasfettate con il miR-369-3p mimic ad una concentrazione di 50nM e successivamente stimulate con LPS. L'analisi di Western blot ha comprovato che la trasfezione con il miR-369-3p porta ad una significativa riduzione del prodotto proteico di iNOS (Figura B).



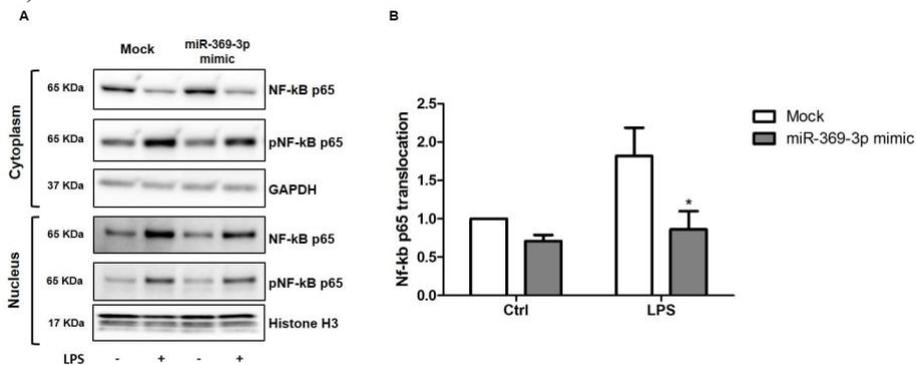
Per valutare l'effetto dell'induzione di miR-369-3p sull'influenza nella produzione di NO, abbiamo misurato i nitriti rilasciati dalle BMDCs stimulate con LPS dopo la trasfezione transiente con il miR-369-3p mimic. Abbiamo riscontrato che l'aumento intracellulare di miR-369-3p causava una significativa riduzione di NO rilasciato dalle BMDCs stimulate con LPS comparate con il mock (Figura).



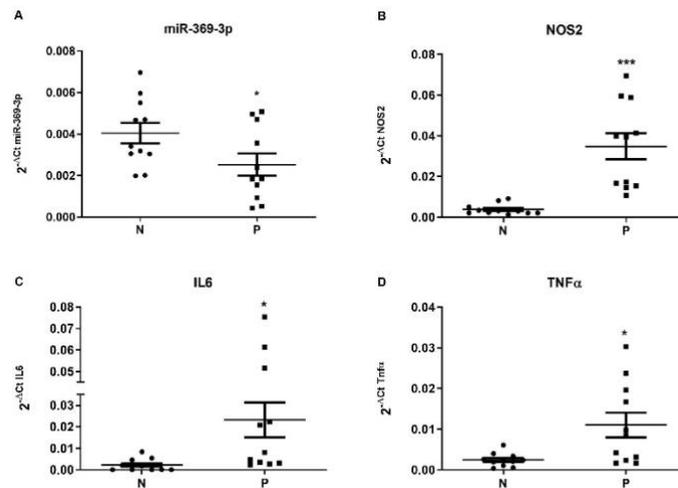
Per analizzare se l'espressione di miR-369-3p fosse funzionalmente coinvolta nella produzione di citochine infiammatorie, abbiamo indotto nelle BMDCs l'espressione di miR-369-3p attraverso la trasfezione transiente con il mimic miR-369-3p. Le BMDCs trasfettate sono state quindi stimulate con LPS per 24h e nel surnatante sono stati analizzati i livelli delle differenti citochine prodotte. L'induzione di miR-369-3p riduceva significativamente la produzione di TNF α , IL6, IL-12, IL-1 α , IL-1 β in risposta a LPS (Figura A-E). Contrariamente, la produzione di citochine anti-infiammatorie come IL-10 e IL-1RA sono risultate aumentate nelle BMDCs trasfettate con il miR-369-3p mimic e successivamente stimulate con LPS rispetto alla condizione di mock (Figura F-G). Questi risultati confermano il ruolo di miR-369-3p come agente anti-infiammatorio.



NF- κ B è il principale fattore di trascrizione attivato durante la risposta infiammatoria a LPS, regolando l'espressione di geni target coinvolti nell'attivazione della risposta immunitaria delle BMDCs. NF- κ B è presente nel citoplasma, mentre le subunità NF- κ B attivate formano dei dimeri e traslocano nel nucleo per iniziare la trascrizione dei geni target. Per analizzare il coinvolgimento di miR-369-3p nell'attivazione e traslocazione di NF- κ B p65, abbiamo isolato gli estratti nucleari e citosolici dalle BMDCs stimulate con LPS dopo la trasfezione transiente con il miR-369-3p mimic. Come mostrato nella figura A, l'attivazione di NF- κ B indotta da LPS, verificata sulla base dell'aumento dei livelli di fosforilazione di NF- κ B p65 citosolico, risultava significativamente invertita dall'over-espressione di miR-369-3p. In aggiunta, abbiamo rilevato un'inibizione della traslocazione di NF- κ B dal citosol nel nucleo (Figure B).



Infine, abbiamo determinato i livelli di espressione del miR-369-3p nei tessuti prelevati da 11 pazienti con IBD e nello specifico abbiamo analizzato l'espressione del miRNA nelle regioni infiammate comparandolo con quelle non infiammate. I livelli di miR-369-3p nelle aree infiammate sono risultati significativamente bassi rispetto ai livelli delle aree non infiammate (Figura A). Contrariamente, NOS2, IL6 e TNF α sono risultati significativamente aumentati nelle aree infiammate rispetto quelli delle aree non infiammate (Figura B-C-D). Questo risultato conferma il coinvolgimento di miR-369-3p nella cascata infiammatoria risultante, specialmente nelle malattie infiammatorie intestinali.



I risultati di questa parte del progetto sono oggetto di un paper pubblicato a luglio 2019 su *Molecular Nutrition & Food Research* (Mol Nutr Food Res. 2019 Oct;63(19):e1801390. doi: 10.1002/mnfr.201801390) e di un paper sottomesso alla rivista *Scientific Reports* a gennaio 2020. È stato depositato un brevetto italiano dal titolo “Composizione farmaceutica comprendente come ingrediente attivo il miR-369-3p per il trattamento delle patologie infiammatorie croniche” e stiamo preparando la replica ai commenti dei revisori per il rilascio del brevetto in Italia. Inoltre, ad agosto 2019, il brevetto è stato depositato anche in Europa.

Progetto n. 16: “Endoscopic performance and patterns of narrow-band imaging in detecting dysplasia during follow-up of precancerous gastric conditions”

Responsabile: dott.ssa Alba PANARESE

Partecipanti: dr. Endrit Shahini –specialista gastroenterologo ed endoscopista digestivo-, dr. Raffaele Armentano-dirigente medico specialista in anatomia patologica-

Background

La diagnosi endoscopica delle lesioni precancerose e cancerose iniziali del tratto digestivo è un argomento molto attuale e oggetto di dibattito nella comunità scientifica internazionale. Soprattutto, per il tratto gastrico, negli ultimi anni, si è accesa una forte discussione scientifica, che nel 2019 ha visto aumentare le pubblicazioni e moltiplicare gli interrogativi, per i quali si attendono risposte condivise.

L’outcome comune è ridurre l’incidenza di mortalità per cancro gastrico e aumentare la percentuale relativa di neoplasia gastrica precoce vs neoplasia gastrica avanzata. La prima suscettibile di trattamento curativo, peraltro, meno invasivo perché endoscopico. La seconda suscettibile di trattamento chirurgico, quando possibile, e con sopravvivenza a 5 anni inferiore al 50%.

L’applicazione delle classificazioni che rendono possibile la descrizione delle lesioni neoplastiche precoci gastriche si scontra con il background conoscitivo e la difficoltà di definizione dovuta anche alla disponibilità di dispositivi aggiornati e di materiale diagnostico adeguato. Inoltre, è tutt’altro che raggiunta l’intesa diagnostica multidisciplinare in fase di screening e sorveglianza.

Il nostro studio sulla ricerca di pattern morfologici che consentano la diagnosi di lesioni neoplastiche precoci gastriche si inserisce in questo contesto scientifico.

Obiettivo dello studio

L’obiettivo principale del primo studio del filone di ricerca sulla displasia nel segmento gastrico è stato la valutazione della diagnosi di displasia nei soggetti con gastrite cronica atrofica prima e dopo eradicazione dell’*Helicobacter pylori* (HP), utilizzando la cromoendoscopia virtuale (NBI) e la magnificazione. Considerando la difficoltà all’applicazione delle classificazioni endoscopiche

proposte per la descrizione della gastrite cronica atrofica, della metaplasia intestinale e displasia, questo outcome è stato considerato come primo step.

L'outcome individuato nel 2017, anno in cui il protocollo è stato realizzato, è risultato interessante anche alla luce delle pubblicazioni che, successivamente al 2017, sono state effettuate nel settore internazionale di riferimento.

Il nostro studio ha avuto, inoltre, l'obiettivo di individuare e valutare altre variabili significative nella descrizione della gastrite cronica atrofica, come, in primis, l'autoimmunità.

Materiali e metodi

Il nostro studio è osservazionale, prospettico, condotto presso l'Istituto "De Bellis" da giugno 2017 ad aprile 2019. Abbiamo arruolato 85 soggetti consecutivi, da una coorte di 156 pazienti esterni, che sono stati sottoposti a gastroscopia di alta qualità con/senza cromoendoscopia virtuale (narrow band imaging –NBI-) usando gli strumenti Olympus GIF-HQ190® - Evis Exera III processor® (Olympus Tokyo, Japan). Gli steps di arruolamento sono descritti nella Figure 1.

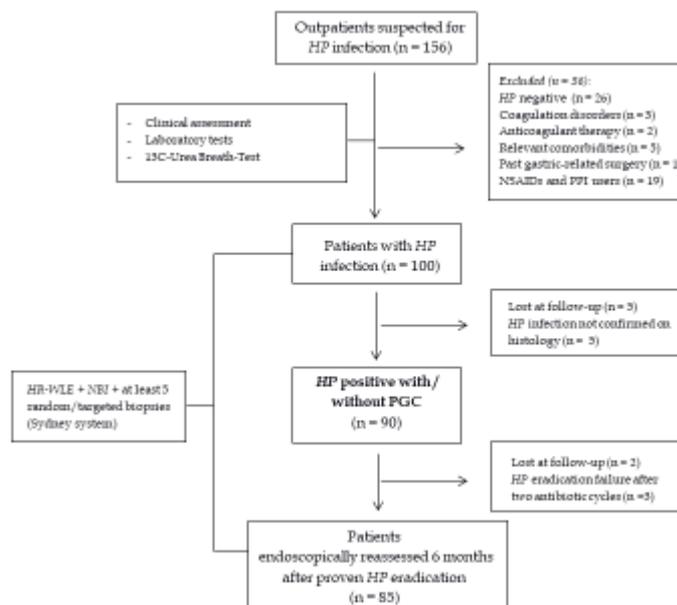


Figure 1. Diagramma di flusso della selezione dei pazienti. HP, Helicobacter Pylori; NSAIDs, Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs; PPI, Proton Pump Inhibitor; HR-WLE, High Resolution-White Light Endoscopy; NBI, Narrow Band Imaging.

Nei soggetti con sospetta componente autoimmune è stato effettuato il dosaggio degli anticorpi anti cellule parietali gastriche e anti fattore intrinseco, usando tecniche di immunofluorescenza.

Le procedure endoscopiche sono state effettuate da un'endoscopista esperto. La revisione statistica dei dati è stata portata a termine da un'esperto di statistica biomedica. Partendo dai dati precedentemente pubblicati, abbiamo calcolato che, per l'analisi dell'outcome primario usando la funzione $ss2 \times 2$ contenuta nel programma *exact2x2*, la grandezza campionaria di 48 soggetti (24 controlli e 24 trattati) avrebbe assicurato un potere di 0.82 e un livello di significatività di 0.05. Quindi, il nostro obiettivo è stato di arruolare almeno 48 soggetti. Abbiamo completato lo studio dopo aver arruolato 85 soggetti, che sono stati valutati endoscopicamente con luce bianca ad alta definizione (HR-WLE) e NBI, e con campionamento bioptico gastrico secondo il Sydney System, prima dell'eradicazione dell'HP e sei mesi dopo l'eradicazione, confermata dall'urea breath test (UBT). Lo scopo è stato di determinare il potere diagnostico dell'HR-WLE con NBI nell'individuare le lesioni neoplastiche precoci dello stomaco, durante un tempo di sorveglianza breve e, soprattutto, dopo eradicazione dell'HP.

I criteri di inclusione sono stati: l'età ≥ 18 anni, l'indicazione alla gastroscopia per sintomi cronici HP-correlati (i.e. dolore addominale, dispepsia, o anemia), con positività dell'UBT e diagnosi istologica di gastrite HP-correlata con/senza lesioni neoplastiche precoci.

I criteri di esclusione sono stati: precedenti resezioni gastriche o diagnosi di cancro gastrico, impossibilità a effettuare almeno cinque biopsie, comorbidità rilevanti (cardiache, respiratorie, insufficienza renale cronica, epatopatie croniche e condizioni psichiatriche), terapie anticoagulanti/disordini coagulativi, uso di antifiammatori e uso cronico di inibitori di pompa protonica, abitudine tabagica. Le comorbidità autoimmuni non sono state considerate criterio di esclusione.

Tutte le lesioni gastriche sono state studiate in HR-WLE e NBI. Abbiamo effettuato in tutti i casi 5 prelievi bioptici e, sulle lesioni visibili, suggestive di metaplasia intestinale/displasia, biopsie target.

Inoltre, in corso di gastroscopia, sono state acquisite almeno cinque immagini diverse da un operatore esperto, a cui non era nota la diagnosi istologica e che formulava diagnosi di normalità/atrofia/metaplasia intestinale/displasia utilizzando la classificazione "Endoscopic Grading of Gastric Intestinal Metaplasia (EGGIM)" formulata da Pimentel-Nunes et al. nel 2016.

L'esame istologico è stato considerato il gold standard per la diagnosi di displasia e metaplasia intestinale. L'OLGA e l'OLGIM system sono stati considerati per la stadiazione della atrofia e metaplasia intestinale della mucosa gastrica. Invece, per la valutazione della displasia sono state considerate le categorie descritte dalla WHO classification: negativo per neoplasia intraepiteliale/displasia, indefinito per neoplasia intraepiteliale/displasia, basso grado per neoplasia intraepiteliale/displasia, alto grado per neoplasia intraepiteliale/displasia, e neoplasia invasiva

intraepiteliale/carcinoma intramucoso. In tutti i pazienti l'eradicazione dell'HP è stata determinata con UBT e confermata dall'istologia.

Per quanto concerne l'analisi statistica, la distribuzione normale delle variabili continue è stata effettuata con Shapiro-Wilk test e i dati sono stati espressi come media \pm standard deviation. Le variabili sono state espresse come percentuali e confrontate usando il Chi-squared test o il Fisher's exact test, quando necessario. La probabilità di diagnosticare la displasia gastrica dopo eradicazione dell'HP è stata valutata usando l'analisi logistica univariata e multivariata. L'associazione tra ogni variabile e l'outcome (diagnosi di displasia) è stata testata usando il test del rapporto di verosimiglianza. Per ogni variabile inclusa nel modello multivariato, abbiamo calcolato gli odds ratio, con intervallo di confidenza del 95% e livello di significatività, fissato a $P < 0.05$. Tutte le analisi statistiche sono state effettuate usando il software SPSS 23.0 (SPSS, Chicago, IL, United States).

Risultati / stato di avanzamento del progetto

Le caratteristiche cliniche degli 85 soggetti arruolati sono descritte nella tabella 1.

Table 1. Caratteristiche demografiche e cliniche dei soggetti sottoposti a eradicazione dell'*Helicobacter pylori* (HP).

Parameters	Patients (n = 85)
Age, mean (SD), years	56.1 (12.3)
Gender, n (%)	
Female	53 (62.4)
BMI, mean (SD), Kg/m ²	25.1 (2.2)
Alcohol users (12-24 g/dL /die), n (%)	27 (31.8)
Previous smokers, n (%)	12 (14.1)
Drug users, n (%)	23 (27.1)
Family history of gastric cancer, n (%)	4 (4.7)
Family history of other cancer, n (%)	9 (10.6)
Autoimmune comorbidity	
Autoimmune atrophic gastritis	12 (14.1)

Autoimmune thyroiditis	6 (7.1)
Type-1/2 diabetes mellitus	3 (3.5)
Skin psoriasis	1 (1.2)
Rheumatoid arthritis	1 (1.2)
Sjögren syndrome	1 (1.2)
A. thyroiditis + vitiligo	1 (1.2)
A. thyroiditis + Crohn's disease	1 (1.2)
A. thyroiditis + Sjögren syndrome	1 (1.2)
APCA and/or AIF antibody positivity	12 (14.1)
Endoscopy indication, n (%)	
Gastroesophageal reflux	17 (20)
Recurrent abdominal pain	12 (14.1)
Dyspepsia	41 (48.2)
Unexplained anemia	15 (17.7)
HP eradication scheme, n (%)	
Quadruple†	53 (62.4)
Modified triple††	28 (32.9)
Triple†††	3 (3.6)
Sequential††††	1 (1.2)
HP eradication cycles, n (%)	
One-cycle	71 (83.5)
Two-cycles	14 (16.5)

I dati sono espressi come numero di pazienti e percentuali (in parentesi); BMI, Body Mass Index; SD, Standard deviation; APCA, anti-Parietal Cell Antibody; AIF, anti-Intrinsic Factor; *HP*, Helicobacter pylori; PPI, Proton Pump Inhibitor; †Bismuth + Metronidazole + Tetracycline + PPI; ††Amoxicillin + Levofloxacin + PPI; †††Amoxicillin + Clarithromycin + PPI; ††††Amoxicillin + Clarithromycin + PPI Amoxicillin (5 days), then Clarithromycin + Metronidazole (5 days) + PPI.

Alla prima gastroscopia la maggior parte dei soggetti (71.8%) presentava gastrite cronica atrofica (panatrofia, atrofia “corpus predominant” e atrofia “antrum predominant”), e la minoranza (22.4%) aveva atrofia focale antrale. L’80% dei pazienti aveva un grado di atrofia meno avanzato (0-2 e 3-4) nella scala dell’EGGIM; l’istologia era moderato/grave e lieve nel 77.6% e nel 22.4% dei pazienti rispettivamente; il 45.8% dei pazienti aveva anche iperplasia del MALT. Abbiamo osservato che 15 soggetti (17.6%) avevano displasia di basso grado su biopsie random. Dei 49 soggetti con panatrofia o atrofia “corpus predominant”, 11 (22.4%) erano positivi agli anticorpi anticellule parietali gastriche o agli anticorpi anti fattore intrinseco. Nel 100% dei casi l’infiltrazione istologica mononucleare o polimorfonucleare è scomparsa o si è drasticamente ridotta dopo eradicazione.

Inoltre, la proporzione degli stadi OLGA e OLGIM, e quella dei soggetti con diagnosi istologica di displasia di basso grado su biopsie random non è cambiata significativamente dopo l’eradicazione dell’HP (17.6% vs. 10.6%, $p=0.19$). La detection della displasia di basso grado sulle lesioni visibili è aumentata significativamente dopo l’eradicazione dell’HP (0% vs. 22.3%, $p<0.001$).

I risultati dell’attività relativa al suddetto progetto di ricerca (prog. N.16/2019-21 LN 2) sono stati sottoposti all’attenzione di una rivista scientifica internazionale con IF e hanno ottenuto un’ottimo giudizio da parte dei revisori, pertanto, sono alla valutazione dell’editore.

Progetto n. 17: Effetto dei composti naturali sull' infiammazione e carcinogenesi sperimentale in modelli animali di CAC e CRC

Responsabile: dott. mauro Mastronardi

Partecipanti: dott. Marcello Chieppa

RELAZIONE

Nel secondo anno di attività sperimentale per tale progetto di ricerca abbiamo avuto necessità di estendere l'obbiettivo specifico 1 per approfondire le indagini in vitro dell'effetto dei composti naturali. Avendo avuto buoni risultati nell'anno precedente con le cellule Caco-2, era necessario valutare la risposta della esposizione alla Curcuma longa in altre linee cellulari. In quanto la decisione comune del gruppo di lavoro è stata di dedicare una pubblicazione con i dati ottenuti in vitro, con successiva pubblicazione dei dati in vivo. A tale scopo, come modello sperimentale sono state utilizzate le cellule tumorali umane di adenocarcinoma colon-rettale quali: le DLD-1, le HT-29 e le SW480. Anche per queste cellule, come per le Caco-2, è stato necessario valutare la dose di curcuma con la maggiore risposta antiproliferativa ed apoptotica in vitro. La prima indagine è stata effettuata con il test dell'MTT, abbiamo sperimentato diversi tempi di incubazione a 24h e 48h. Nello specifico, le cellule DLD-1, HT-29, sono state incubate con quattro diverse concentrazioni di curcumina (10 μ M, 20 μ M, 50 μ M, 100 μ M) come mostrato nei grafici di figura n.1.

Poiché il gap di risposta tra la concentrazione 20 μ M e 50 μ M era notevole, abbiamo preferito ripetere la sperimentazione con una concentrazione intermedia di curcuma, ovvero a 30 μ M, come mostrato nei grafici di figura n.2.

FIG- 1

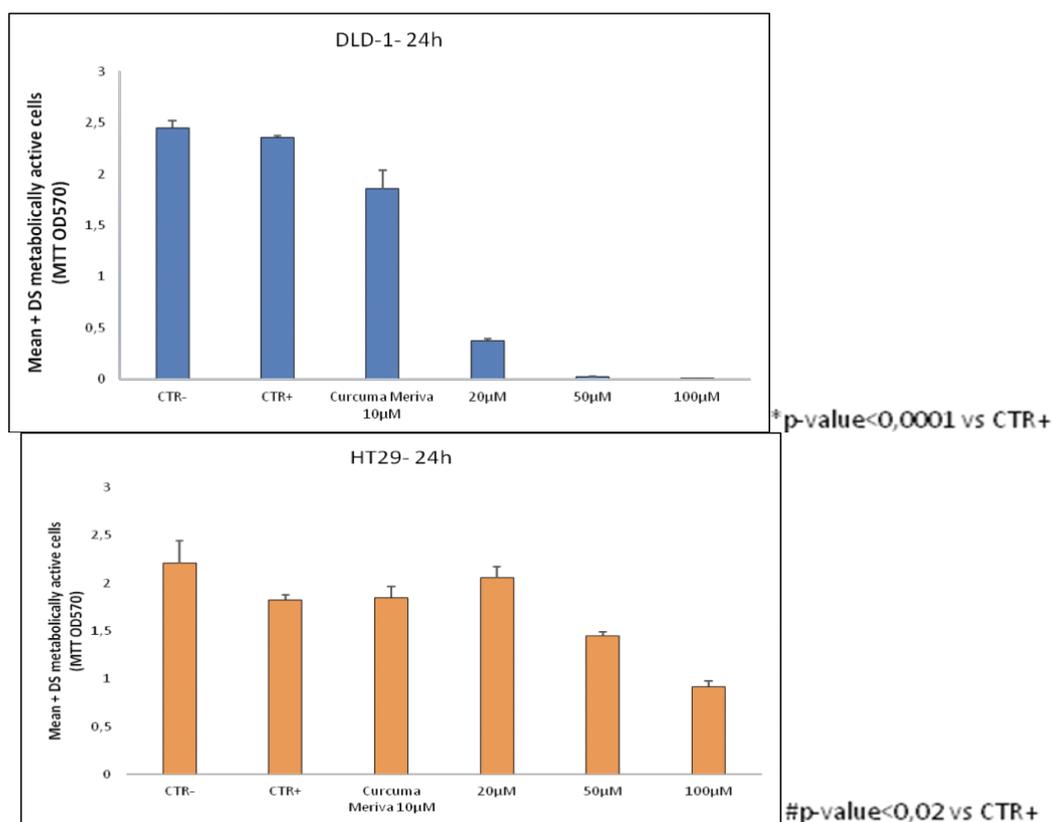
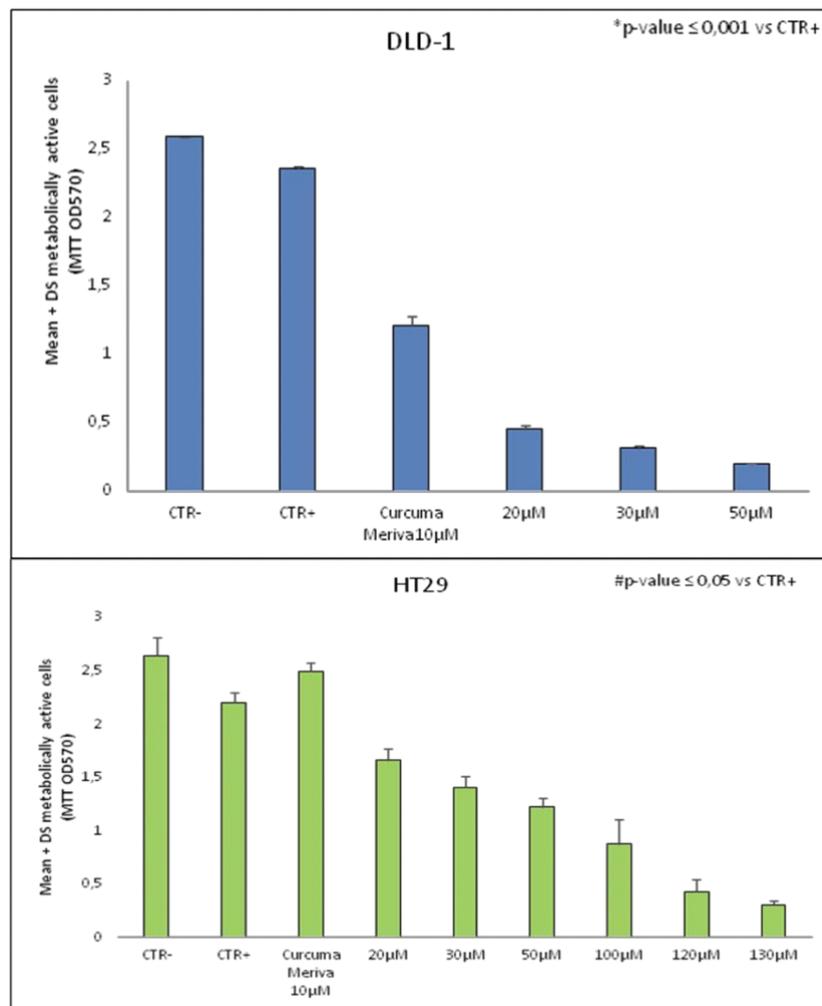
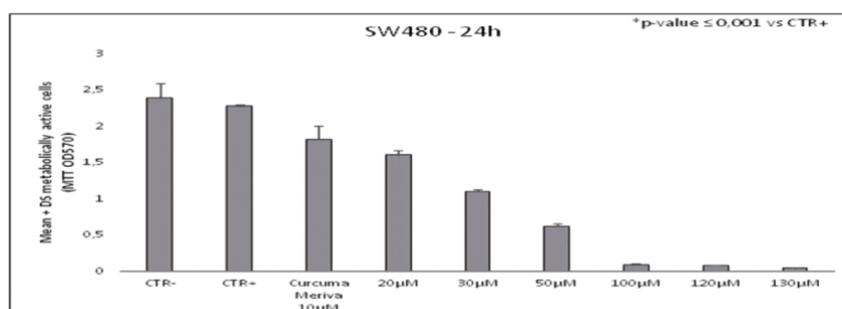


FIG- 2



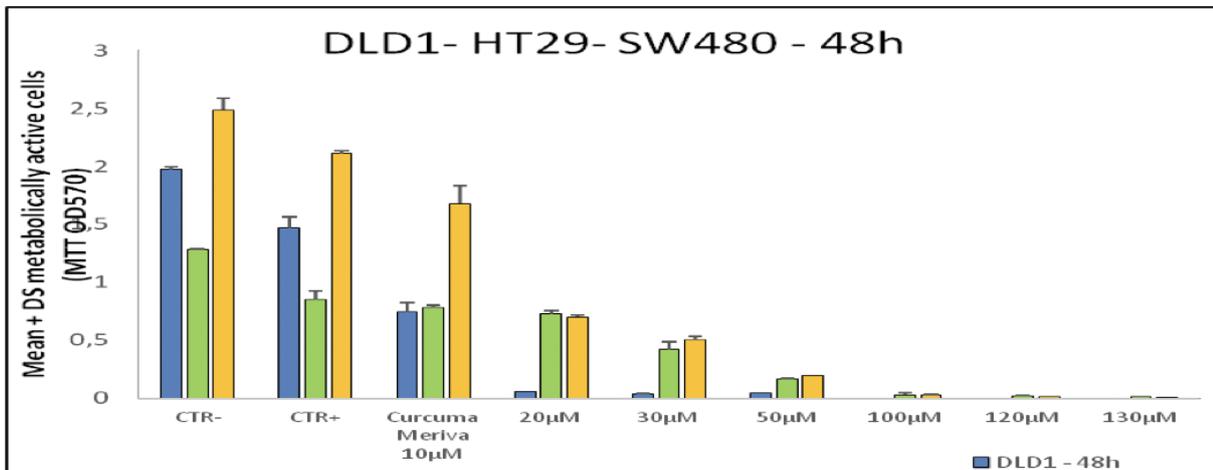
Dai risultati si evince che la concentrazione opportuna di curcuma da utilizzare per i prossimi studi in vitro, che effettueremo in combinazione con l'estratto ottenuto dalle foglie dell'ulivo della cultivar Coratina, è proprio quella di 30µM. Anche per le cellule SW480 i risultati mostrati in figura 3 confermano i dati ottenuti con le precedenti linee cellulari.

FIG- 3



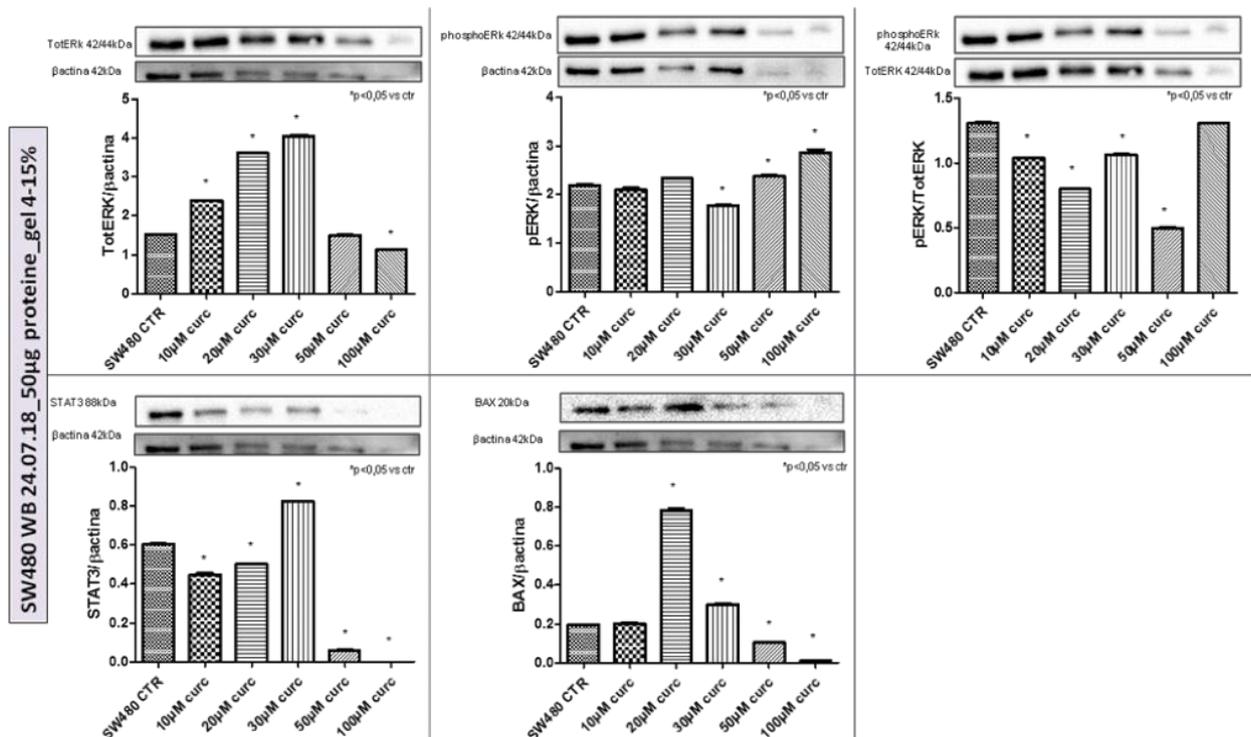
Dalle indagini fatte con una incubazione di 48h (fig.4: DLD1(in blu), HT29(in verde), SW480 (in arancione)) si evince che il tempo ottimale per valutare l'effetto in vitro della curcuma è di 24h.

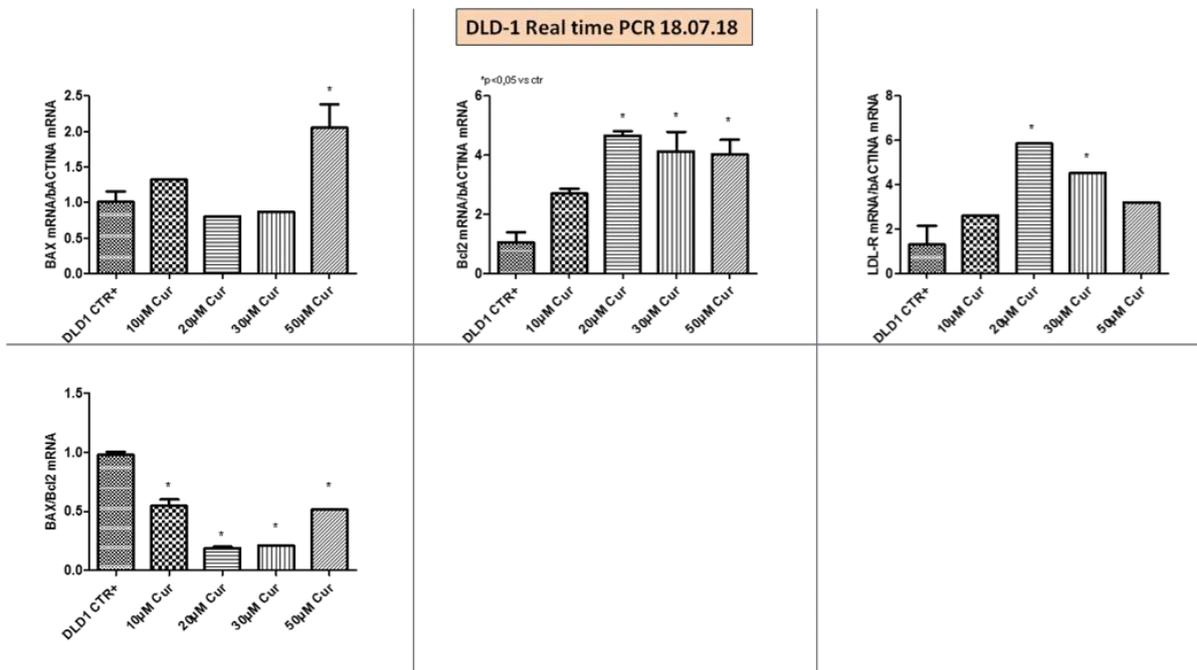
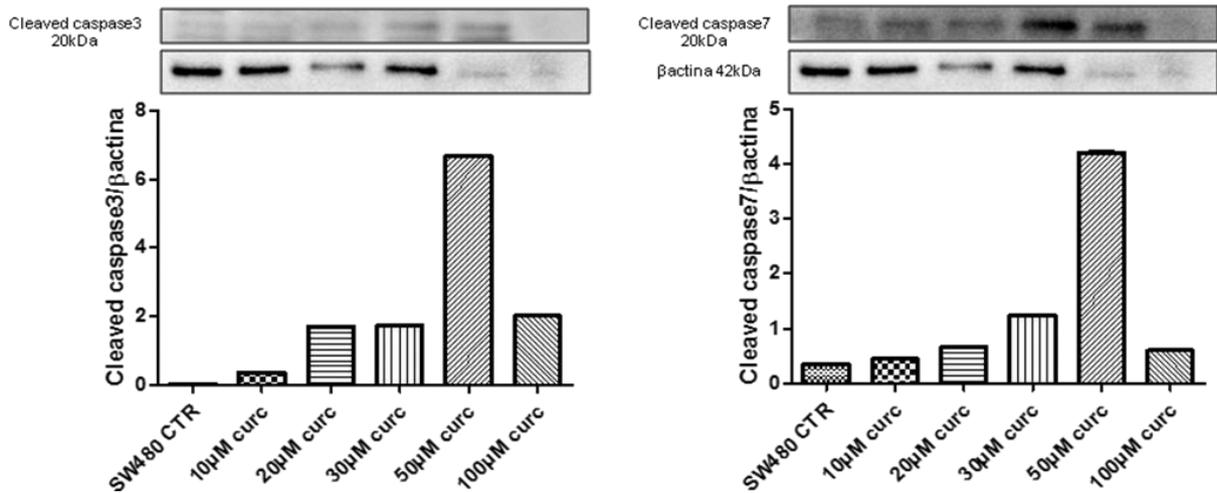
FIG- 4



Successivamente sono stati allestiti dei test di biologia molecolare dei markers β -actina, pERK, STAT3, BAX; Caspasi 7 e Caspasi 3 .

FIG- 5





Per quanto riguarda invece le cellule HT29 i dati di wester blot non sono risultati significativi, questo ci porterà ad escluderle nelle sperimentazioni successive.

In conclusione dall'analisi integrata di tutte le condizioni si evince che la curcuma longa dell'Indena ha un effetto apoptotico sulle cellule DLD1 e SW480, che funziona meglio a basse concentrazioni.

Sono in atto studi per determinare in quale stadio del ciclo riproduttivo cellulare agisce la curcuma; abbiamo inoltre raccolto e campionato tutti i sovranatanti delle colture cellulari delle tre linee cellulari per il dosaggio del pattern di citochine infiammatorie (GM-CSF, IFN- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-17A, and TNF- α), tramite citofluorimetro.

Il prossimo anno sarà fondamentale per effettuare studi "in vivo" traslazionali (Obiettivo specifico 2 e 3) su modelli animali, per testare l'effetto anti-infiammatorio e antiossidante di una dieta arricchita in curcuma, ed estratti fenolici isolati dalle foglie dell'ulivo e del loro effetto combinato, in modelli murini che mimano le CAC (colits-associated carcinogenesis).

Progetto n. 18: “Malattia infiammatoria intestinale, cancro del colon retto e microbiota intestinale: quali correlazioni”

Responsabile: dott. Antonio Lippolis

Partecipanti:

- Grazia Serino (analisi molecolari)
- Angela Tafaro (sperimentazione animale)
- Marcello Chieppa (analisi campioni umani)
- Pesole Pasqua Letizia (analisi campioni umani)
- Mauro Mastronardi (dati clinici endoscopici)

Background

I tumori del colon-retto rappresentano, nel mondo, la seconda causa di morte. In Italia ogni anno circa 34 000 persone si ammalano (1). E' stato ormai definito che i fattori di rischio includono la dieta, l'obesità, il fumo, l'alcool e una scarsa attività fisica (2). Un altro fattore di rischio è rappresentato dalle malattie infiammatorie croniche intestinali che comprendono la malattia di Crohn e la colite ulcerosa (3, 4). E' riportato infatti che circa l'1% dei pazienti con CRC ha una storia clinica di rettocolite ulcerosa ed il rischio di sviluppare CRC è direttamente connesso con la gravità del danno della mucosa intestinale e con l'estensione del processo infiammatorio tuttavia il rischio di sviluppare CRC nei soggetti con la malattia di Crohn risulta minore rispetto ai soggetti con rettocolite ulcerosa (5, 6). Il microbiota intestinale svolge un ruolo importante nel mantenimento dell'omeostasi intestinale. Dati metagenomici recenti hanno dimostrato che la maggior parte delle specie componenti non è presente nello stesso tempo e nella stessa persona, ma, alcune specie sono abbondanti in individui sani, mentre altre sono meno rappresentate (7, 8). Il microbiota intestinale inoltre influenza la proliferazione delle cellule epiteliali e l'apoptosi delle cellule ospiti. Sebbene le interazioni intime tra microbiota e cellule ospiti non siano del tutto chiare, un meccanismo importante sembra implicare acidi grassi a catena corta (SCFA), derivanti dalla fermentazione di polisaccaridi indigeribili (fibre), come butirrato, acetato e propionato con un importante ruolo antinfiammatorio. Gli SCFA supportano anche l'omeostasi intestinale nel colon normale, aiutando la riparazione intestinale attraverso la promozione della proliferazione e differenziazione cellulare. Tuttavia, gli SCFA sembrano inibire la proliferazione delle cellule cancerogene (9). Inoltre, il microbiota intestinale stimola lo sviluppo di componenti del sistema immunitario aspecifico e specifico, subito dopo la nascita e durante l'intera vita e agisce da barriera anti-infettiva inibendo l'adesione dei patogeni e successiva colonizzazione del substrato cellulare e dalla produzione di batteriocine e di altri metaboliti tossici.

Negli ultimi anni, però, si è fatta avanti l'idea che la flora batterica intestinale possa svolgere un ruolo importante nello sviluppo di diverse malattie e nella cancerogenesi. La disbiosi è stato dimostrato essere associata alla tumorigenesi intestinale (10, 11). L'alterazione della complessità e dello stato eubiotico del microbiota potrebbe promuovere disordini autoimmuni e infiammatori intestinali ed extraintestinali (diabete di tipo I, artrite reumatoide, spondilosi anchilosante, IBD, malattia polmonare, atopia, steatosi epatica non alcolica, obesità, aterosclerosi, carcinogenesi, ecc.) sebbene i meccanismi coinvolti non siano ben compresi. Tuttavia, la correlazione tra microbiota intestinale, malattie intestinali autoimmuni / infiammatorie deve essere ancora approfonditamente indagata (12).

Bibliografia

- 1) Maida M, Macaluso FS, Ianiro G, Mangiola F, Sinagra E, Hold G, Maida C, Cammarota G, Gasbarrini A, Scarpulla G. Screening of colorectal cancer: present and future. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2017 Dec;17(12):1131-1146.
- 2) Mendonça LABM, Dos Santos Ferreira R, de Cássia Avellaneda Guimarães R, de Castro AP, Franco OL, Matias R, Carvalho CME. The Complex Puzzle of Interactions Among Functional Food, Gut Microbiota, and Colorectal Cancer. *Front Oncol.* 2018 Sep 5;8:325.
- 3) Rescigno M, Chieppa M. Gut-level decisions in peace and war. *Nat Med.* 2005 Mar;11(3):254-5. Colorectal cancer prevention in patients with ulcerative colitis.
- 4) Olson TS et al. The primary defect in experimental ileitis originates from a nonhematopoietic source. *J Exp Med.* 2006 Mar 20;203(3):541-52.
- 5) Lopez A, Pouillon L, Beaugerie L, Danese S, Peyrin-Biroulet L. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2018 Feb - Apr;32-33:103-109.
- 6) Kameyama H, Nagahashi M, Shimada Y, Tajima Y, Ichikawa H, Nakano M, Sakata J, Kobayashi T, Narayanan S, Takabe K, Wakai T. Genomic characterization of colitis-associated colorectal cancer. *World J Surg Oncol.* 2018 Jul 2;16(1):121.
- 7) Stidham RW, Higgins PDR. *Clin Colon Rectal Surg.* 2018 May;31(3):168-178. Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease.
- 8) Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, MetaHIT Consortium., Bork P, Ehrlich SD, Wang J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 2010 Mar 4; 464(7285):59-65
- 9) Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Human Microbiome Project Consortium. Nature.* 2012 Jun 13; 486(7402):207-14.
- 10) Scheppach W Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut.* 1994 Jan; 35(1 Suppl):S35-8
- 11) Akin H, Tözün N. Diet, microbiota, and colorectal cancer. *J Clin Gastroenterol.* 2014 Nov-Dec;
- 12) Mandal P.. Molecular mechanistic pathway of colorectal carcinogenesis associated with intestinal microbiota. *Anaerobe.* 2018 Feb;49:63-70.

Obiettivo dello studio

L'obiettivo di questo progetto di ricerca è quello di valutare tramite l'utilizzo di modelli murini di trapianto fecale (FMT) le correlazioni tra microbiota intestinale, cancerogenesi del tumore del colon retto e patologia infiammatoria intestinale. In particolare, lo studio si propone di:

- valutare dal punto di vista morfologico e molecolare la progressione della patologia infiammatoria intestinale in topi Winnie (e controlli) sottoposti a trapianto fecale di feci provenienti da topi Winnie-APCmin .
- valutare il profilo di espressione di miRNA in tessuti e feci di topi Winnie (e controlli) sottoposti a trapianto fecale al fine di individuare biomarkers specifici della patologia e della risposta immunitaria
- validare i dati ottenuti su un campione di pazienti affetti da IBD che hanno sviluppato un tumore del colon-retto.

Materiali e metodi

Nello studio proposto utilizzeremo diversi modelli murini: topo APC^{min/+} che contiene una mutazione puntiforme nel gene della poliposi adenomatosa coli (Apc) e sviluppa solo lesioni precancerose intestinali (adenomi benigni) che fornisce un eccellente sistema in vivo per indagare gli eventi molecolari coinvolti nel processo infiammatorio che possono contribuire alla tumorigenesi multistep e alla carcinogenesi; topo Winnie ^{-/-} topo con la mutazione omozigosi, modelli murini di Colite Ulcerosa, topo Winnie-APC^{min} che combina entrambe le mutazioni e presenta lesioni pre-cancerose a partire dalle 5 settimane di età (manoscritto in sottomissione), e topi wild-type (WT) che rappresenteranno il controllo. In particolare, effettueremo trapianti fecali da topo donatore Winnie-APC^{min} in topi Winnie e topi normali. Valuteremo quindi una serie di markers della cancerogenesi e dell'infiammazione intestinale al fine di chiarire quali sono i pathways attivati e disattivati in seguito al transfer fecale sia nel modello di controllo che nel modello indicato come Winnie. In linea con le priorità del nostro istituto nell'ambito della medicina di precisione, i risultati di questo studio potrebbero fornire il razionale per lo studio dell'associazione tra tumori intestinali ed il microbiota. Gli esperimenti vedranno impiegati modelli murini di trapianto fecale di microbiota come fase pre-clinica per futuri approcci clinici sperimentali.

Risultati / stato di avanzamento per la 1^a annualità del progetto

In questo primo anno, si è proceduto con il breeding delle colonie murine per ottenere il genotipo utile Winnie-APC^{min} da utilizzare per il progetto proposto. Attualmente, sono pochissimi i topi a disposizione con questo genotipo perché si è verificata una riduzione nelle nascite con genotipo utile e i pochi topi ottenuti non hanno raggiunto il timing previsto dal progetto proposto che era di 8-10 settimane. Attualmente, si è provveduto alla stesura del protocollo per l'autorizzazione alla sperimentazione animale e sarà sottomesso all'organismo preposto nel più breve tempo possibile. Inoltre, utilizzando le feci di animali utilizzati per altre sperimentazioni, si è provveduto al setting della metodica di isolamento del microbiota intestinale in forma di sospensione liquida.

Progetto n. 19: “Studio degli effetti di polifenoli estratti da due varietà di uva sul profilo lipidomico cellulare e sulle diverse frazioni delle LDL sieriche; possibili applicazioni nella sindrome metabolica”

Responsabile Scientifico: dott.ssa Maria Notarnicola

Partecipanti: Valeria Tutino, Isabella Gigante, Valentina De Nunzio, Maria Gabriella Caruso, Nicola Veronese, Francesco Russo, Antonella Orlando, Rosa Anna Milella (collaboratore esterno)

Background

L'alimentazione occupa un ruolo centrale nel contrastare le malattie legate al metabolismo e la Dieta Mediterranea si pone in prima fila come un modello equilibrato di alimentazione, capace di prevenire l'insorgenza della sindrome metabolica [1], una condizione caratterizzata dalla coesistenza di diversi fattori di rischio (obesità, ipertensione, ipercolesterolemia, insulino-resistenza) che predispongono a malattie cardiovascolari e al diabete. Diete come quella Mediterranea, ricche di polifenoli (flavonoidi e non flavonoidi), sono in grado di esercitare un'elevata azione anti-infiammatoria, antitrombotica ed antiproliferativa. Tra la frutta con un elevato contenuto di polifenoli ritroviamo l'uva, importante pilastro della Dieta Mediterranea, la cui produzione si concentra prevalentemente nella regione Puglia e che fa dell'Italia uno dei principali produttori di uva da tavola al mondo. Numerosi sono gli studi che dimostrano come i polifenoli dell'uva esercitano un'importante azione di protezione dall'insorgenza delle malattie cardiovascolari, neurodegenerative e dal cancro [2]. Poche informazioni si hanno invece sugli effetti sulla salute derivanti dal consumo di uva da tavola.

Per molto tempo gli effetti benefici dei polifenoli sulla salute sono stati attribuiti esclusivamente alla loro azione antiossidante diretta, tuttavia, negli ultimi anni è emerso che i polifenoli possono interagire con i meccanismi di segnalazione intracellulare, possono modulare l'attività dei fattori di trascrizione e conseguentemente influenzare l'espressione dei geni. I polifenoli assunti con la dieta sono in grado di influenzare la composizione degli acidi grassi contenuti nelle membrane cellulari [3,4], suggerendo che lo studio delle molecole lipidiche nelle membrane cellulari (analisi lipidomica) può essere considerato un valido approccio per valutare lo stato nutrizionale di un individuo.

Inoltre, poiché un ruolo importante nell'insorgenza di malattie dismetaboliche viene sicuramente svolto dai livelli sierici delle diverse frazioni delle Lipoproteine a Bassa Densità (LDL), la presenza, nel siero, delle frazioni più piccole delle LDL, come la frazione 3 e la frazione 4, è stata spesso associata all'insorgenza di patologie cardiovascolari e all'infarto del miocardio [5,6].

Obiettivi dello studio:

Il principale obiettivo dello studio è valutare gli effetti di una miscela di polifenoli estratti da 2 varietà di uva da tavola sul profilo lipidomico di membrana e sui livelli delle diverse frazioni di LDL, e di comprendere i meccanismi molecolari che sostengono gli effetti salutistici dell'uva da tavola.

Risultati

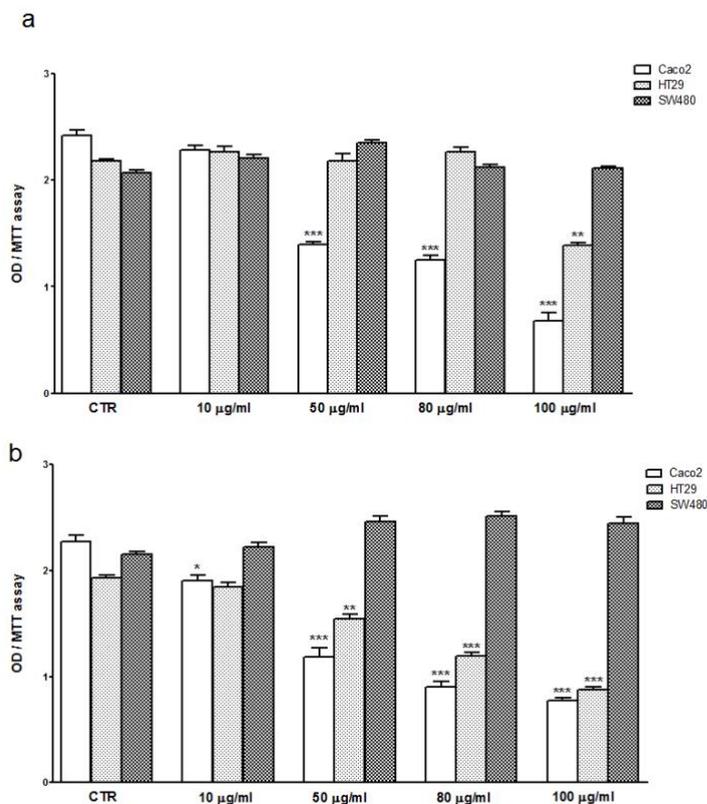
Studio in vitro: Lo studio *in vitro* ha permesso di valutare gli effetti anti-infiammatori ed anti-proliferativi di una miscela di polifenoli, estratti da 2 varietà di uva da tavola, su 3 linee cellulari umane a diverso grado di differenziazione. Inoltre sulle cellule trattate con gli estratti polifenolici dell'uva, è stata effettuata l'analisi lipidomica delle membrane cellulari.

Nel corso del 2019, primo anno del progetto, è stata effettuata innanzi tutto la caratterizzazione degli estratti delle 2 varietà di uva, l'Autumn Royal e l'Egnatia e in seguito sono state studiate le loro capacità antiossidante, anti-proliferativa e anti-infiammatoria.

La tabella mostra i polifenoli estratti, le loro concentrazioni e la capacità antiossidante totale della miscela di polifenoli delle 2 varietà di uva.

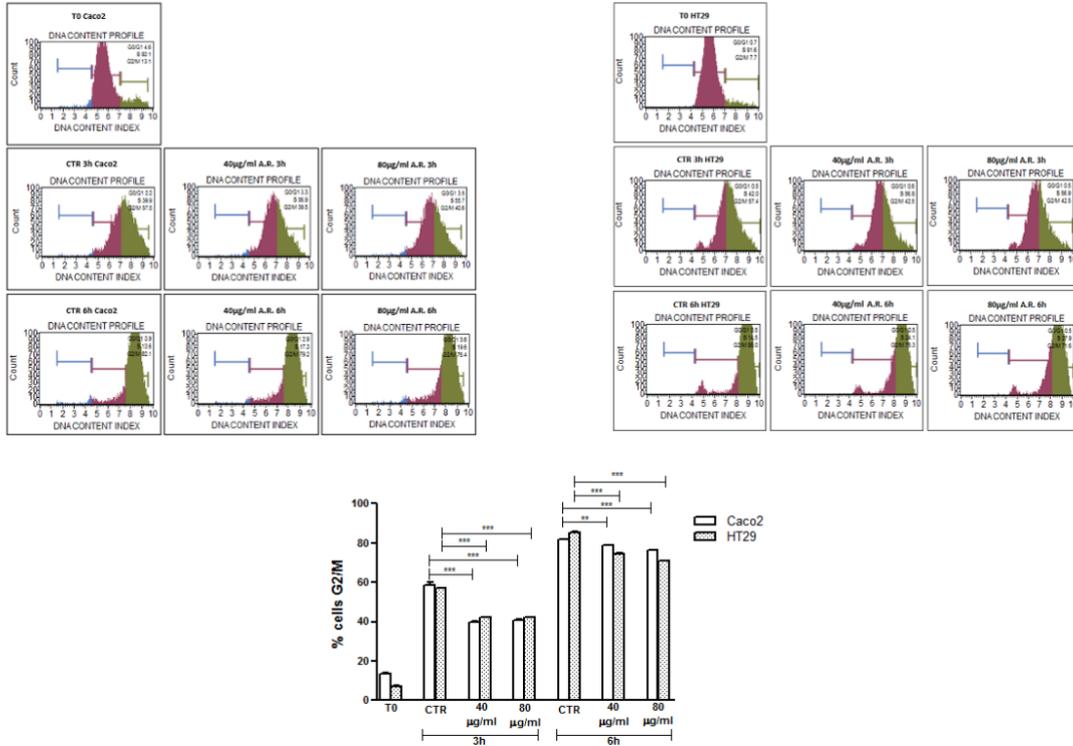
	Autumn Royal	Egnatia
TPC(mg GAE/g dw)	63.17 ±1.97	46.21 ± 1.46*
Df3G	1.12 ± 0.03	0.33 ± 0.02 *
Cy3G	0.26 ± 0.01	0.09 ± 0.001 *
Pt3G	1.31 ± 0.03	0.57 ± 0.04 *
Pn3G	1.68 ± 0.05	1.75 ± 0.05
Mv3G	11.06 ± 0.22	6.36 ± 0.19 *
Mv3-coumaroyl-G	5.54 ± 0.16	4.03 ± 0.12 *
Mv3G EQ1	0.38 ± 0.03	0.21 ± 0.01 *
Mv3G EQ2	0.62 ± 0.05	0.48 ± 0.03
Mv3G EQ3	0.63 ± 0.05	0.75 ± 0.06
∑ Anthocyanins (mg Mv EQ/g dw)	22.63 ±0.68	14.57 ± 0.44 *
Flavonols(mg querc EQ/g dw)	1.78 ± 0.05	0.28 ± 0.02 *
Flavanols (mg cat EQ/g dw)	3.58 ± 0.11	2.44 ± 0.07 *
DPPH(μM TE /g dw)	241.7 ± 7.7	133.2 ± 6.4*
ABTS (μM TE /g dw)	610.5 ± 5.2	298.3 ± 3.7*
ORAC (μM TE /g dw)	602.9 ± 21.5	399.4 ± 33.8*

La varietà Autumn Royal ha mostrato una più alta capacità antiossidante rispetto all'Egnatia, mentre quest'ultima ha mostrato una maggiore attività antiproliferativa, in particolare con la linea cellulare Caco2. Nella figura seguente, Panel a: MTT con Autumn Royal e Panel b: MTT con Egnatia.

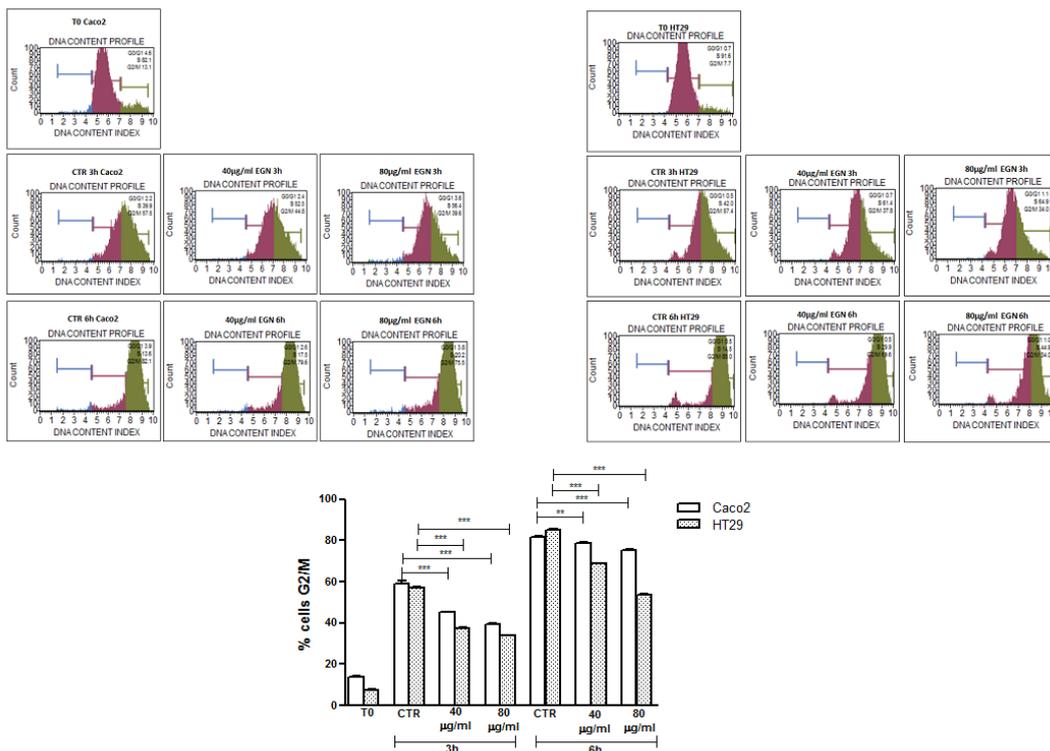


Sono stati anche studiati gli effetti dei 2 estratti polifenolici sul ciclo cellulare delle cellule trattate:

Autumn Royal



Egnatia



Entrambi gli estratti polifenolici erano in grado di influenzare il ciclo cellulare, bloccando le cellule in fase S del ciclo.

Le cellule trattate con gli estratti polifenolici di Autumn Royal e Egnatia sono state sottoposte ad analisi lipidomica. La tabella che segue mostra la media percentuale degli acidi grassi ritrovati nelle membrane delle cellule Caco2 (panel A) e SW480(panel B) trattate per 48 ore con le due varietà di uva alle concentrazioni di 20, 50, and 80 $\mu\text{g/ml}$

Tabella

a

Caco2 Fatty Acids (%)	CTR	Autumn Royal			Egnatia		
		20 µg/ml	50 µg/ml	80 µg/ml	20 µg/ml	50 µg/ml	80 µg/ml
Palmitic acid (C16:0)	25.57±1.13	26.22±0.48	26.24±0.46	27.29±0.42*	27.57±0.40*	28.91±0.33*	27.19±0.45*
Stearic acid (C18:0)	12.98±1.72	13.54±0.54	14.73±0.80*	16.59±0.63*	16.08±0.84*	19.32±0.49*	19.77±0.69*
Palmitoleic acid (C16:1n7)	20.67±1.59	19.23±0.31*	18.67±0.48*	16.41±0.44*	15.90±0.67*	15.08±0.74*	11.66±0.58*
Oleic acid (C18:1n9)	17.10±0.68	15.79±0.70*	14.59±0.56*	14.29±0.75*	15.26±0.41*	14.50±0.61*	13.65±0.47*
Saturated fatty acids (SFAs)	42.62±2.52	43.01±0.71	45.07±0.10*	48.25±0.30*	46.22±0.78*	52.31±0.57*	50.71±0.69*
Monounsaturated fatty acids (MUFAs)	43.66±2.47	40.92±0.64*	41.59±0.67*	36.27±0.58*	37.38±0.99*	33.30±0.49*	30.30±0.68*
Palmitoleic acid/Palmitic acid ratio (SCD1)	0.81±0.09	0.73±0.02*	0.71±0.02*	0.60±0.01*	0.57±0.02*	0.52±0.02*	0.43±0.02*
Oleic acid/Stearic acid ratio (SCD1)	1.34±0.21	1.16±0.09*	0.99±0.06*	0.86±0.07*	0.95±0.08*	0.75±0.03*	0.69±0.04*
Total SCD1	1.07±0.31	0.95±0.23	0.85±0.15*	0.73±0.14*	0.76±0.20*	0.63±0.12*	0.56±0.14*

b

SW480 Fatty Acids (%)	CTR	Autumn Royal			Egnatia		
		20 µg/ml	50 µg/ml	80 µg/ml	20 µg/ml	50 µg/ml	80 µg/ml
Palmitic acid (C16:0)	24.64±0.54	24.15±0.32	26.44±0.36*	26.82±0.24*	25.15±0.28	24.49±0.85	24.53±0.54
Stearic acid (C18:0)	13.73±2.48	15.03±2.49	14.97±2.49	18.09±1.58*	14.32±2.17	16.61±0.48*	17.29±0.76*
Palmitoleic acid (C16:1n7)	5.42±1.06	4.63±1.18	4.96±1.18	4.99±1.01	4.74±1.16	4.81±1.72	4.47±1.78
Oleic acid (C18:1n9)	24.13±1.55	23.06±0.53	21.93±0.39*	20.52±2.01*	23.89±0.65	23.67±0.67	20.67±1.96*
Saturated fatty acids (SFAs)	43.48±0.99	44.87±0.66*	47.14±0.64*	48.80±0.41*	42.86±0.30	43.60±0.65	45.42±0.48*
Monounsaturated fatty acids (MUFAs)	40.05±2.44	38.17±0.34	34.34±0.69*	32.61±0.58*	39.15±0.63	37.34±0.98*	36.37±1.46*
Palmitoleic acid/Palmitic acid ratio (SCD1)	0.22±0.04	0.19±0.04	0.19±0.04	0.18±0.03	0.18±0.04	0.19±0.07	0.18±0.07
Oleic acid/Stearic acid ratio (SCD1)	1.81±0.39	1.58±0.32	1.50±0.31	1.16±0.06*	1.71±0.37	1.42±0.07	1.21±0.10*
Total SCD1	1.02±0.86	0.88±0.75	0.84±0.72	0.66±0.50	0.95±0.83	0.81±0.64	0.68±0.53

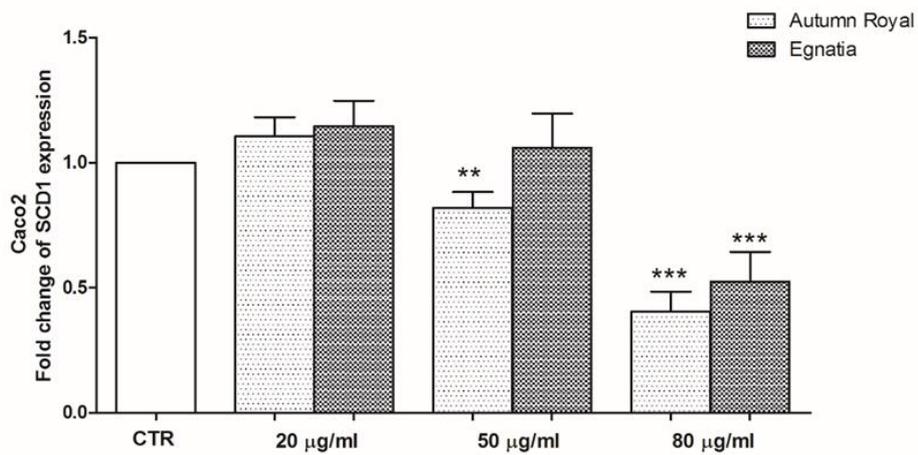
Mean value ± Standard Deviation (SD) of three consecutive experiments. P-value was determined by ANOVA with Dunnett's post-test.

*P<0.05 versus the control group (CTR).

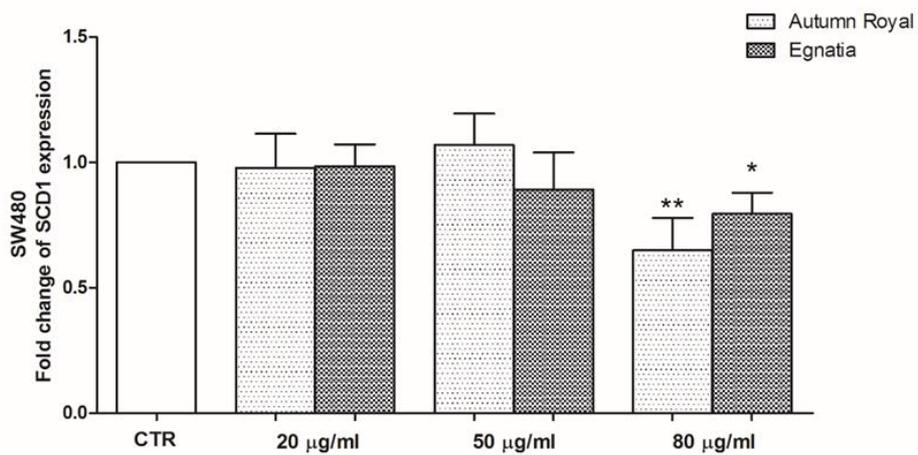
I dati del profilo lipidomico di membrana mostrano che i polifenoli estratti dalle 2 varietà di uva sono in grado di influenzare la fluidità della membrana delle cellule, che viene regolata dall'enzima Stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1).

Il trattamento con gli estratti portava ad una riduzione dei livelli dell'enzima SCD1, sia nelle Caco2 (panel a) che nelle SW480 (panel b)

a

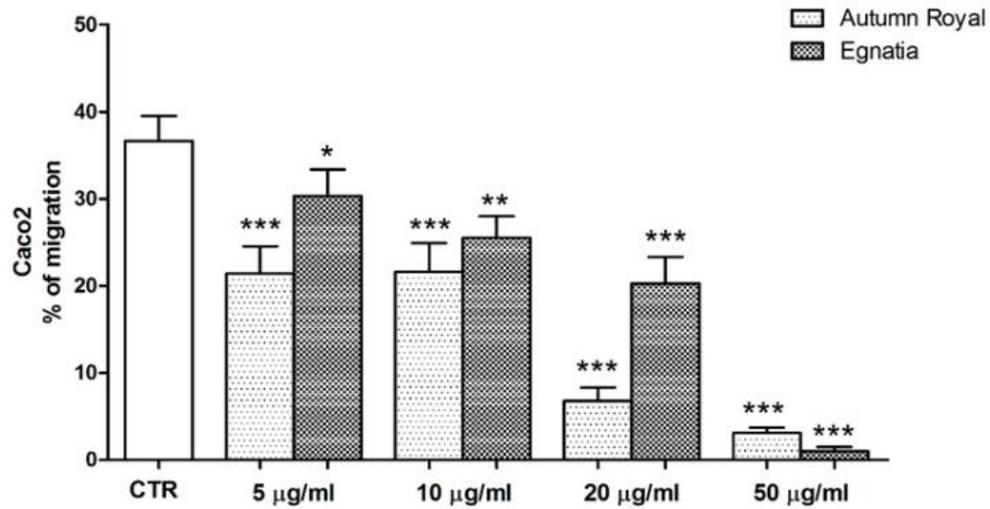


b

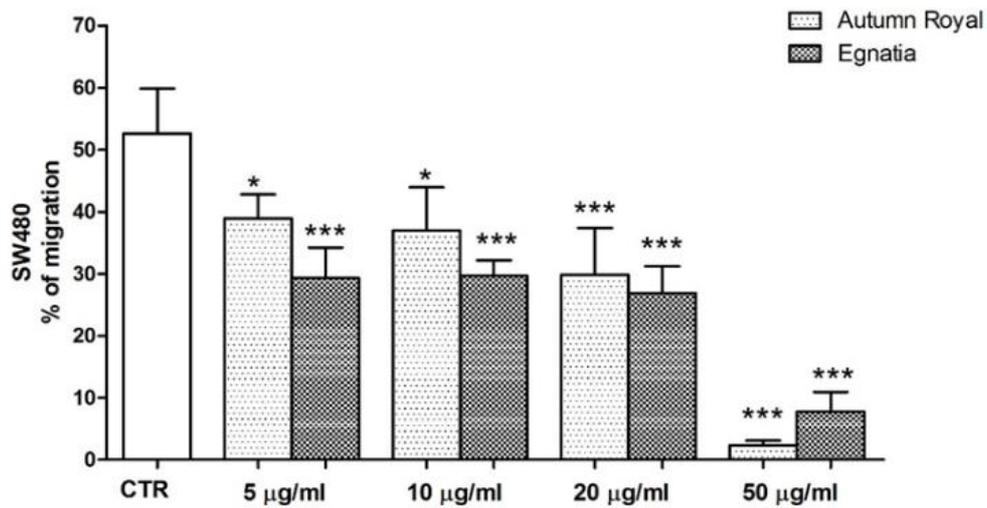


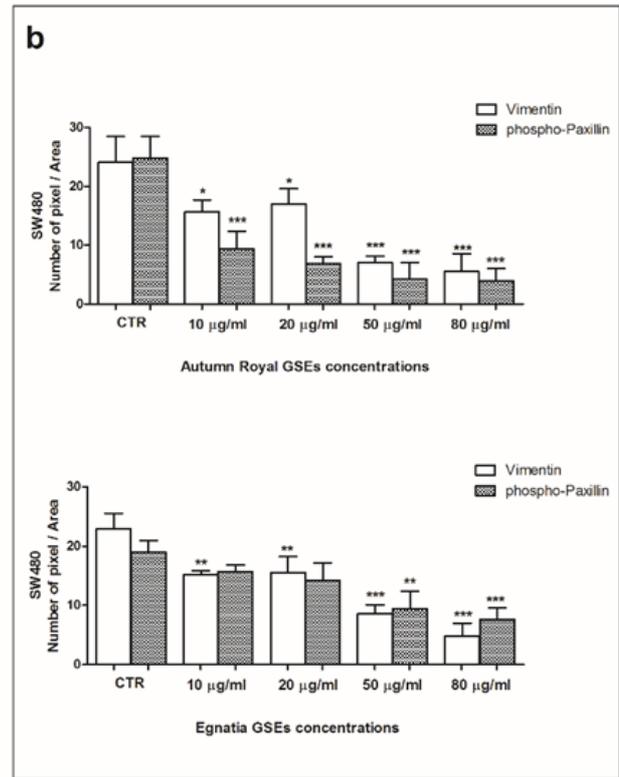
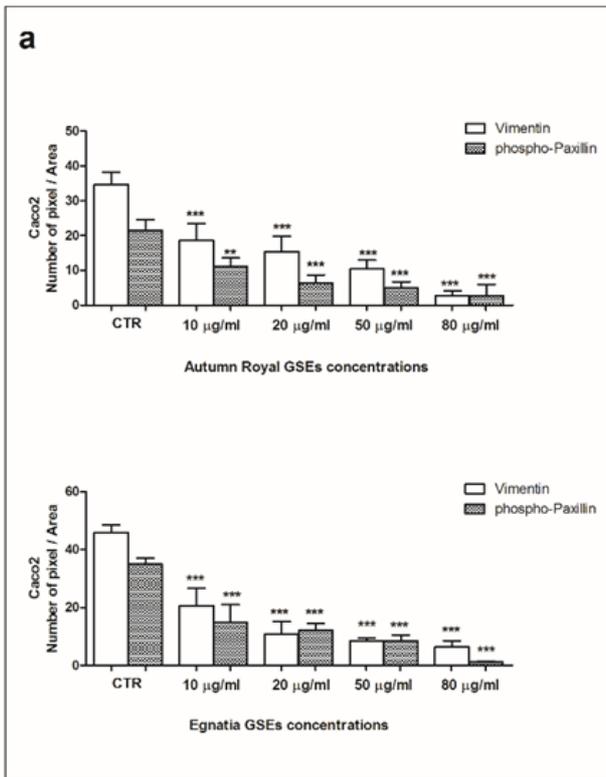
Le figure che seguono mostrano che entrambi gli estratti d'uva inibivano la migrazione cellulare e questa inibizione era associata alla riduzione dei livelli delle proteine coinvolte nella riorganizzazione del citoscheletro (Vimentina e fosfo-Paxillina).

a



b





Studio clinico

Per quanto riguarda lo studio clinico previsto dal progetto, da settembre a dicembre 2019 sono stati reclutati 40 soggetti, randomizzati in due gruppi, di cui un gruppo controllo, che riceveva solo consigli dietetici, e un gruppo di trattamento a cui veniva somministrata uva (varietà Autumn Royal 5g per kg di peso corporeo). Il trattamento con uva durava 3 settimane.

Nel corso del 2020 e 2021, (seconda e terza annualità del Progetto) saranno effettuate le analisi lipidomiche, nonché lo studio del pattern sierico delle LDL e tutte le indagini molecolari finalizzate allo studio dei miRNA plasmatici e dei geni coinvolti nel metabolismo lipidico e nei processi infiammatori.

La tabella che segue mostra le caratteristiche cliniche dei soggetti arruolati nel trial clinico valutate a T0, a T1 (dopo 3 settimane) e a T2 (dopo 3 settimane dalla fine del trattamento)

Tabella

	Soggetti (n=40)	
	Controllo (n=20)	Trattamento (n=20)
Sesso		
Maschio	4	8
Femmina	16	12
Età (mean ± SD)	43.53±10.14	47.19±10.48
Glicemia(mean ± SD)		
T0	80.84±6.39	80.84±6.39
T1	83.67±7.49	80.18±5.98
T2	80.00±9.81	77.41±10.67
AST(mean ± SD)		
T0	19.00±4.15	19.00±4.15
T1	18.60±6.50	18.59±3.65
T2	19.07±4.33	19.71±5.64
ALT (mean ± SD)		
T0	20.06±8.78	20.06±8.78
T1	21.87±11.03	19.59±6.74
T2	19.93±7.96	18.53±7.19
Gamma-GT (mean ± SD)		
T0	17.41±8.93	17.41±8.93
T1	15.80±7.99	15.94±6.60
T2	15.47±7.68	14.65±6.65
Colesterolo (mean ± SD)		
T0	195.0±35.35	195.0±35.35
T1	182.1±27.93	193.5±36.92
T2	188.9±33.96	198.8±41.85
HDL (mean ± SD)		
T0	54.09±12.12	54.09±12.12
T1	51.40±10.62	55.29±11.79
T2	51.33±11.60	54.88±13.13
LDL (mean ± SD)		
T0	123.1±29.74	123.1±29.74
T1	115.1±23.65	124.7±36.27
T2	123.1±27.33	127.7±37.74
Trigliceridi (mean ± SD)		
T0	89.06±68.90	89.06±68.90
T1	76.00±36.03	67.35±25.49
T2	72.53±45.29	81.06±49.53
PCR-r (mean ± SD)		
T0	0.14±0.26	0.14±0.26
T1	0.13±0.36	0.30±0.76
T2	0.24±0.67	0.10±0.26

Bibliografia:

1. Li B et al. [Nonalcoholic Fatty Liver Disease Cirrhosis: A Review of Its Epidemiology, Risk Factors, Clinical Presentation, Diagnosis, Management, and Prognosis](#). Can J Gastroenterol Hepatol. 2018 Jul 2;2018:2784537
2. Rasines-Perea Z et al. Grape Polyphenols' Effects in Human Cardiovascular Diseases and Diabetes. Molecules. 2017;22:68.
3. Galbete C. et al. [Evaluating Mediterranean diet and risk of chronic disease in cohort studies: an umbrella review of meta-analyses](#). Eur J Epidemiol. 2018 Jul 20. doi: 10.1007/s10654-018-0427-3
4. Notarnicola M et al. Increased serum levels of lipogenic enzymes in patients with severe liver steatosis. Lipids Health Dis. 2012 Oct 30;11:145.
5. Gentile M et al. [Association between Lp\(a\) and small dense LDL in menopausal women without metabolic syndrome](#). Acta Cardiol. 2018 doi:10.1080/00015385.2018.1481599
6. Gentile M et al. [Association between body shape index and small dense LDL particles in a cohort of mediterranean women: findings from Progetto ATENA](#). J Clin Biochem Nutr. 2017 Sep;61(2):130-134. doi: 10.3164/jcbn.17-13. Epub 2017 Aug 11.

LINEA 3

MEDICINA PARTECIPATIVA IN GASTROENTEROLOGIA

Per la linea di ricerca n. 3 “Medicina Partecipativa in Gastroenterologia”, i principali risultati raggiunti dai singoli Laboratori per ciascun progetto per l’anno 2019 sono i seguenti:

Progetto n. 20:

Progetto n. 21: Diete, microbiota intestinale e metabolomica: valutazione di possibili sinergie

Responsabile: dott. Gioacchino Leandro

Partecipanti: Maria Gabriella Caruso, Lorenzo Drago, Ornella Rotolo, Maria Notarnicola

Background:

Lo studio delle interazioni tra alimentazione, microbiota intestinale e salute è un campo molto vasto e nuovo. La dieta è in grado di modificare l'espressione di molti geni batterici popolanti l'intestino dell'ospite, oltre che il tipo di batteri stessi, con la conseguenza che, a seconda del substrato a disposizione a livello intestinale, vengano prodotti metaboliti capaci di influenzare positivamente o negativamente la salute dell'individuo. Evidenze scientifiche dimostrano un nesso di causalità tra salute del microbiota e sviluppo di malattie infiammatorie intestinali, malattie cronico-degenerative, includenti il cancro e patologie nefrologiche (1,2,3,4).

I benefici apportati al microbiota dal largo consumo di fibre e da uno scarso apporto di proteine animali, testimoniato dall'analisi di campioni fecali, è già noto alla letteratura (5,6,7). La produzione di acidi grassi a catena corta (SCFAs) e un pH più acido delle feci conseguenti alla fermentazione delle fibre alimentari crea un ambiente meno adatto al prosperare di specie batteriche dal riconosciuto effetto patogeno e pro-infiammatorio (*Bacteroides spp*, *E.coli*, *Enterobacteriaceae*) e uno sviluppo di specie benefiche come i *Firmicutes*. Al contrario, i prodotti finali della fermentazione di substrati proteici, con pH superiore a 6,5, come acido solfidrico e ammoniaca, contribuiscono alla patogenesi di molti disturbi gastro-intestinali, come IBS, dispepsia funzionale, cancro al colon retto. Alla luce di questi dati della letteratura, modulare la strategia dietetica da somministrare al paziente potrebbe rivelarsi un vero e proprio mezzo terapeutico e preventivo nei confronti di patologie tanto intestinali quanto sistemiche, dal momento che la dieta dei paesi occidentali industrializzati risulta sempre più ricca di proteine animali e di zuccheri e povera di alimenti di origine vegetale.

Studi presenti in letteratura confermano l'esistenza di un insieme di geni comune alla maggior parte dei soggetti ("microbiome core"); a partire da questo set di geni, il microbioma si differenzia a causa di diversi fattori: lo stato di salute dell'ospite, la sua dieta, l'ambiente in cui esso vive, il suo genotipo e l'eventuale contatto con altre colonie batteriche (8).

Nonostante l'eterogeneità riscontrata nel microbioma, si è giunti ad una classificazione degli individui basata sulla composizione batterica intestinale, definendo gli "enterotipi" come unità fondamentali di questa classificazione (9). Sulla base dell'analisi di sequenze di DNA provenienti da 39 campioni appartenenti a soggetti di sei diverse nazionalità si sono infatti individuati tre ceppi batterici principali (*Bacteroides*, *Prevotella* e *Ruminococcus*) i quali sono indipendenti da età, sesso, zona geografica di appartenenza o dieta, ed in base alla prevalenza di uno di essi, ogni individuo viene catalogato in uno dei tre enterotipi. Lo studio condotto dal MetaHIT ha evidenziato come sussista una relazione tra l'enterotipo di appartenenza e le funzioni del soggetto, quali ad esempio la produzione di alcune vitamine, la predisposizione all'obesità e forse anche il gruppo sanguigno (10). Si è inoltre evidenziato come il microbiota sia influenzato dallo stile di vita del soggetto, in particolar modo dalla dieta. Nel caso di dieta ricca di proteine e grassi animali si registra una predominanza dell'enterotipo *Bacteroides*, mentre una dieta composta principalmente da carboidrati comporta una predominanza di *Prevotella*. Si nota però che non si può effettuare una netta separazione degli enterotipi; si può piuttosto parlare di due tipologie di microbiota definiti "biome types" (*Bacteroides-Ruminococcus* e *Prevotella*) intesi come un continuo gradiente anziché come gruppi distinti (11). Nei soggetti è dunque possibile trovare maggior abbondanza di uno dei due "types", ma ci sarà sempre una loro parziale sovrapposizione.

La recente diffusione di tecniche di sequenziamento *high-throughput* ha apportato notevoli sviluppi nello studio del genoma umano e batterico, che consentono di produrre enormi quantità di sequenze

ad un costo minore e ad una velocità superiore rispetto alle tecniche precedenti. Si possono infatti ottenere fino a 20 milioni di basi in contemporanea, rendendo tali tecnologie adatte a sequenziare genomi sempre più grandi.

In questo scenario di ricerca innovativa in forte crescita l'IRCCS De Bellis potrebbe avere un ruolo chiave, vista la posizione indiscussa di opinion leader nel territorio nella elaborazione di diete per soggetti obesi o in sovrappeso, l'ampio bacino d'utenza afferente alla struttura e la difficoltà di altri centri nell'arruolare soggetti sani al fine di coinvolgerli in studi di ricerca che prevedano una rigida adesione a uno specifico piano alimentare

Stato di avanzamento del progetto (prima annualità):

Il progetto (Prot. N 36 del CE De Bellis) è stato approvato dal CE in data 17 maggio 2017 Prot. N 92/CE 18/05/2017. Ad oggi è stata avviata la procedura per un Accordo di Collaborazione con l'IRCCS Ospedale Galeazzi ed è iniziato il reclutamento dei soggetti presso l'Ambulatorio di Nutrizione Clinica dell'Istituto. Sono stati arruolati 2 soggetti sani per ciascun braccio di ricerca (6 in totale) con BMI compreso tra 29 e 33, età compresa tra i 18 e i 60 anni che negli ultimi 3 mesi non hanno assunto farmaci e pre/probiotici, a cui è stata somministrata una dieta iperproteica, mediterranea o latte-ovo-vegetariana a seconda della randomizzazione effettuata. Sono stati acquisiti parametri antropometrici (peso, altezza, circonferenze corporee), composizione corporea mediante bioimpedenziometria, calorimetria indiretta per ottenere il valore del metabolismo basale, analizzate le analisi emato-chimiche e il referto di ecografia dell'addome superiore al fine di conoscere l'eventuale presenza di steatosi epatica.

Per ciascun soggetto è stato prelevato quindi il primo campione fecale per analizzarne il microbiota al T0.

Obiettivo 1:

Caratterizzare il microbiota intestinale con metodiche di metagenomica in soggetti sovrappeso/obesi prima e dopo precise terapie nutrizionali.

Obiettivo 2:

Valutare se variazioni del microbiota intestinale correlano con parametri antropometrici e clinico-laboratoristici.

Metodologie e analisi statistiche:

In quanto funzionali alla elaborazione della dieta e al fine di trarre le valutazioni finali, ci si è avvalsi di:

- parametri antropometrici: circonferenza vita, fianchi, collo e polso;
- ecografia addome superiore;
- valutazione della composizione corporea mediante bioimpedenziometria;
- valutazione del metabolismo basale mediante calorimetria indiretta;
- elaborazione e somministrazione, a tre gruppi di soggetti reclutati, di tre tipi di diete personalizzate sulla base del valore individuale di metabolismo basale (dieta A iperproteica, dieta B latte ovo-vegetariana, dieta C mediterranea);

- somministrazione di un diario settimanale in cui il soggetto annoterà quotidianamente gli alimenti assunti ed eventuali sintomi gastrointestinali post-prandiali (ripienezza, meteorismo, discomfort intestinale, gonfiore addominale ecc..)
- caratterizzazione e studio del microbiota umano. L'analisi del materiale genetico prevede 2 step: il primo consiste nel processare i campioni biologici ed estrarne il DNA, mentre in un secondo momento esso viene sequenziato, in modo da trovare l'ordine delle basi nucleiche lungo la catena di DNA. Attualmente lo sviluppo delle recenti tecniche di sequenziamento *high-throughput* hanno portato a progressi notevoli in quest'ambito grazie ai principali vantaggi legati alla capacità di produrre centinaia di milioni di read in breve tempo poiché si effettua il sequenziamento di un solo gene (il 16S del DNA ribosomiale) che, essendo specifico delle specie batteriche, ne consente la discriminazione;

Risultati attesi:

Dopo aver rispettato per due mesi la dieta ipocalorica, ci si aspetta:

- un calo ponderale da parte di tutti i soggetti, indipendentemente dal tipo di dieta somministrata;
- un cambiamento dei sintomi gastro-intestinali collegati alla fermentazione di substrati diversi (fibre alimentari o proteine di origine animale);
- dall'analisi dei campioni fecali dei tre gruppi di soggetti, una modifica sostanziale del microbiota intestinale, come suggerito dalla letteratura, che includa una proliferazione dei batteri benefici per l'intestino (es. *Lachnospirae Prevotella*) nei soggetti che hanno attuato le diete ad alto consumo di fibre alimentari provenienti da legumi, frutta e vegetali (dieta vegetariana e mediterranea) con liberazione di metaboliti dai riconosciuti effetti benefici per la salute, quali gli acidi grassi a corta catena (short-chain fatty acids, SCFA). Al contrario, negli individui che hanno seguito una dieta ricca di proteine animali e grassi saturi una predominanza dell'enterotipo *Bacteroides*, associato a più basse concentrazioni di SCFA.

Descrizione della complementarità e della sinergia del gruppo di ricerca:

L'Ambulatorio di Nutrizione Clinica vanta di un ampio bacino d'utenza che permetterebbe l'arruolamento di soggetti sovrappeso/obesi rispondenti ai criteri di inclusione del progetto.

La Gastroenterologia 1, l'Ambulatorio di Nutrizione Clinica e il Centro Trial di codesto Istituto in collaborazione con il laboratorio di Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche, IRCCS Ospedale Galeazzi, Università di Milano, è in grado di sviluppare il progetto di ricerca proposto grazie sia alle professionalità che vi lavorano, sia al personale borsista dedicato al progetto.

Bibliografia:

- 1) [Lopez-Legarrea P](#) et al: Review article: "The influence of Mediterranean, carbohydrate and high protein diets on gut microbiota composition in the treatment of obesity and associated inflammatory state". [Asia-Pac J Clin Nutr](#) 2014;23(3):360-8
- 2) [Robert A. Koehn](#), et al. "Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis". *Nat Med*. 2013 May; 19(5): 576–585.
- 3) Kim E, et al. : "Review of the association between meat consumption and risk of colorectal cancer". *Nutr Res*. 2013.

- 4) Eustacchio et al: “What would you like to eat? A Mediterranean diet, please! Kidney and blood pressure research 2014
- 5) [Zimmer J](#) et al: “A vegan or vegetarian diet substantially alters the human colonic faecal microbiota” . [Eur J Clin Nutr](#). 2012 Jan;66(1):53-60.
- 6) [Yao CK](#) et al: “ Review article: insights into colonic protein fermentation, its modulation and potential health implications” [Aliment Pharmacol Ther](#); 2016 Jan;43(2):181-96
- 7) [Cobarrutia A](#). et al: “Dietary intervention impact on gut microbial gene richness”, [Nature](#). 2013 Aug 29;500(7464):585-8.
- 8) Turnbaugh PJ et al: “[The human microbiome project](#)”. [Nature](#). 2007 Oct 18;449(7164):804-10.
- 9) [Arumugam M](#). et al: “Enterotypes of the human gut microbiome”.[Nature](#). 2011 May 12;473(7346):174-80.
- 10) [Kau AL](#) et al: “Human nutrition, the gut microbiome and the immune system”.[Nature](#). 2011 Jun 15;474(7351):327-36.
- 11) [Huse SM](#) et al: “A core human microbiome as viewed through 16S rRNA sequence clusters” [PLoS One](#). 2012;7(6):e34242.

Rilevanza traslazionale e impatto per l’SSN

Possibilità di formulare diete e consigli alimentari più personalizzati non solo sulla base dei parametri antropometrici, ma soprattutto rispetto alle caratteristiche del microbiota individuale.

Progetto n. 22: Nutrizione, Attività Fisica: Effetto sull'incidenza di Malattie Croniche e sul Microbiota Intestinale. Uno Studio di Coorte Retrospettivo in un Campione di Popolazione dell'Italia Meridionale (Micol 4).

Responsabile: dott. Alberto Ruben Osella

Partecipanti: Alberto Ruben Osella, Angela Teresa Di Lorenzo, Caterina Bonfiglio, Isabella Franco, Antonella Mirizzi, Antonella Bianco, Angelo Campanella, Paolo Sorino, Pesole Letizia, Fabio Fucilli, Giuseppe Di Giovanni, Nicola Giampaolo.

Background

La coorte MICOL (Castellana Grotte) è stata assemblata nel 1985 ed era costituita da 2472 soggetti. La coorte è stata oggetto di studio nel 1992 e nel 2005, anno in occasione del quale è stato effettuato un nuovo campionamento della popolazione per sopperire all'invecchiamento della coorte. Infine, tra il 2013 ed il 2014 sono stati ulteriormente reclutati i soggetti aventi un'età uguale o superiore a 65 anni. Per il completamento di questo terzo follow-up saranno reclutati i 1450 soggetti del progetto Micol, di età compresa tra i 64 e i 40 anni.

Obiettivo dello studio

Primari:

1) Stimare l'incidenza di Malattie Croniche (MCV, DMT2, tumori, tumori legati alla dieta e DMT2) nella popolazione generale di un'area geografica definita; 2) Analisi Età-Periodo-Coorte della mortalità 1985-2017 della stessa popolazione; 3) Stimare l'incidenza di Malattie Croniche in sottogruppi di soggetti normopeso, sovrappeso e obesi (metabolicamente sani e malati); 4) Stimare l'effetto dei diversi stili di vita e la loro eventuale evoluzione su obesità, DMT2, mortalità generale e specifica e sulle caratteristiche del microbiota intestinale; 5) Ipotizzare una serie di rapporti causali tra variabili e sintetizzarle in un'ipotesi composta relativa alle dipendenze epidemiologiche tra cause ed effetti.

Secondari:

Eseguire un'analisi di sensibilità allo scopo di stimare l'impatto di differenti scenari sull'insorgenza di Malattie Croniche.

Materiali e metodi

La metodologia di lavoro include le seguenti tappe: 1) Raccolta dati; 2) Input dei dati; 3) Analisi statistica e presentazione dei risultati.

Raccolta dati: I soggetti arruolati verranno intervistati da un medico e da un nutrizionista; verrà effettuato un prelievo venoso ed un'ecografia epatica. Verranno inoltre compilati i questionari IPAQ ed il questionario alimentare Onconut. Un software ad-hoc è stato disegnato per l'input dei dati. Il programma sarà in grado di identificare dati in un range logico e plausibile. Il personale tecnico del laboratorio di Epidemiologia effettuerà l'input ed il controllo dei dati mancanti.

L'analisi statistica include le seguenti tappe: 1) pulizia dei dati, 2) analisi statistica e 3) presentazione di risultati. Tutte le tappe saranno documentate e automatizzate allo scopo di ottenere risultati rintracciabili e riproducibili.

Risultati / stato di avanzamento per la terza annualità del progetto

Il richiamo per la terza volta del progetto Micol (di età < 65 anni) ha previsto una fase iniziale di creazione dei file operativi per lo svolgimento dello studio: foglio informativo, consenso informato, lettera da inviare ai medici di famiglia, lettera di invito dei soggetti facenti parte del campione, predisposizione della routine ematica, questionario di anamnesi.

Lo stile di vita (dieta) è stato misurato con Food-frequency Questionnaire sviluppato dal Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica dell'IRCCS Saverio de Bellis e che è stato usato in molti studi epidemiologici condotti dal Laboratorio. La misurazione dell'attività fisica è stata effettuata tramite il questionario internazionale per l'attività fisica (IPAQ), nella sua forma lunga e versione italiana.

Ai soggetti del progetto è stato fatto un prelievo ematico, la Bioimpedenziometria e l'ecografia dell'addome superiore. Parte del sangue è stato destinato alla Biobanca. In questo studio è stato raccolto anche raccolto un campione di feci.

Il follow-up dei soggetti appartenenti alla coorte Micol under 65 anni ha cominciato la sua fase operativa il 01 Settembre 2017 e l'ha terminata il 31 Agosto 2019. Sono stati arruolati 900 soggetti che aggiunti ai 790 appartenenti alle categorie di età più avanzate più i morti fanno un totale di 1800 soggetti. A tutt'oggi sono stati inputati tutti i dati raccolti: Anamnesi, dati Antropometrici e Bioimpedensometrici, dati ematici, e tutte le informazioni dei questionari somministrati

Progetto n. 23: Analisi costo-beneficio di un intervento basato sulla dieta mediterranea e l'attività fisica in pazienti diabetici e steatosici

Responsabile: dott. Alberto Ruben Osella

Partecipanti: Alberto Ruben Osella, Angela Teresa Di Lorenzo, Caterina Bonfiglio, Isabella Franco, Antonella Mirizzi, Antonella Bianco, Angelo Campanella, Paolo Sorino, Pesole Letizia, Fabio Fucilli, Giuseppe Di Giovanni, Nicola Giampaolo.

Background

L'attività fisica ha sempre giocato un ruolo fondamentale nella prevenzione e trattamento delle malattie cronico degenerative. In 1569, Mercurial scrisse che “l'esercizio è una naturale propensione dell'essere umano il cui proposito è mantenere la salute e recuperarla quando è andata persa.”

In 2050 la proporzione di persone di più di 60 anni crescerà fino al 40% e la proporzione di coloro di più di 80 anni al 10-15%. Inoltre, l'età al pensionamento continua ad aumentare.

Questo significa che in prospettiva uno di ogni tre adulti che lavorano avrà più di 50 anni. Manterrà la capacità di lavoro ed una vita indipendente e autosufficiente sia nella vita quotidiana sia nel tempo libero diventerà cruciale nelle prossime decadi.

Un aspetto importante è mantenere una buona forza muscolare. Le sfide che propongo gli anziani (>60 anni) non sono differenti di quelle che propongo persone più giovani ma nei casi individuali, dipendendo dell'età, adattazioni funzionali e strutturale ed una diminuita capacità in generale dev'essere considerata.

Nella misura che la vita del soggetto sia meno attiva più presto si manifesteranno i cambiamenti. I principali cambiamenti sono una ridotta capacità motoria in generale insieme a problemi vestibolari. Inoltre ad una riduzione delle fibre muscolari (tipo 1 e 2 principalmente negli arti inferiori), la responsabilità di questi cambiamenti ricade su fattori neuronali (riduzione del numero di motoneuroni) e disfunzioni della funzione meccanica del muscolo (per esempio frequenza massima ridotta o ridotta elasticità)

La forza muscolare diminuisce gradualmente dal 30esimo anno fino al 50esimo anno di vita. Nella sesta decade, è stato osservato un'ulteriore diminuzione non lineare del 16% e nell'ottava decade questa diminuzione può raggiungere il 30%. Questo risulta in un'ulteriore riduzione dello scambio di

informazione sensoriale-motoria con una riduzione della qualità della coordinazione inter e intramuscolare. La perdita funzionale della forza e dell'equilibrio è il risultato logico

Alcuni studi hanno dimostrato che l'allenamento può contrastare gli effetti dell'età.

Gli anziani inoltre sono portatori di una o più malattie croniche o fattori di rischio per malattie croniche di cui l'Italia non è esente.

In Italia tra il 1998 ed il 2012 la prevalenza de alcuni fattori di rischio associati a malattie cardiovascolari è aumentata notevolmente. Questo trend è stato osservato in entrambi i sessi ed in tutte le classi sociali. In particolare, il Diabete si presenta come un fattore importante nella proporzione di malattie croniche così come l'obesità e le dislipidemie.

E' stato segnalato l'importanza dell'attività fisica sia come prevenzione primaria e secondaria ma anche come terapia.

In questo ambito si inserisce questo progetto che si propone di integrare l'attività fisica e la dieta nell'ambito del Diabete Mellitus e l'Obesità e l'impatto costo beneficio per il SSN. Il progetto è inoltre propedeutico ad un'integrazione dell'IRCCS con il territorio.

Obiettivo dello studio

Obiettivo 1:

L'effetto dell'Attività Fisica e della Dieta Mediterranea sulla Dislipidemia nel confronto dei un regime terapeutico farmacologico verrà studiato tramite le tecniche statistiche proprie dell'analisi costo-beneficio ed utilizzando diversi statistici tra i pazienti con dislipidemia

Obiettivo 2:

L'effetto dell'Attività Fisica e della Dieta Mediterranea sulla Dislipidemia nel confronto dei un regime terapeutico farmacologico verrà studiato tramite le tecniche statistiche proprie dell'analisi costo-beneficio ed utilizzando diversi statistici tra i pazienti diabetici.

Materiali e metodi

Saranno arruolati soggetti con diagnosi di Diabete Mellito tipo II e con dislipidemie. Il campione da arruolare è composto di 40 per ogni gruppo (diabetici, dislipidemici, controlli). L'intervento da valutare consiste nella somministrazione di una dieta mediterranea a basso indice glicemico (LGIMD) e di un programma di attività fisica confezionato in base alle esigenze di ogni singolo paziente e calibrato su di un'intensità massima pari al 65% della Frequenza Cardiaca Massima.

Sarà chiesta la collaborazione dei MMMGG per il referral di pazienti al protocollo di ricerca.

Valutazione Funzionale

Cardiovascolare: Test del camino (2 km)

Test Flessibilità: Seat and Reach Test. Da seduti si deve portare il torace avanti il massimo possibile. Si misurano i centimetri che oltrepassano i piedi (+) o quelli che mancano per raggiungerli.

I test della forza: sono eseguiti per i vari gruppi muscolari degli arti superiori e inferiori e si considerano validi per un determinato carico quando il paziente riesce a fare 10 ripetizioni dell'esercizio senza fatica (quadricipite, tricipite surale, deltoide, bicipite brachiale, tricipite brachiale). I dati della valutazione funzionale permetteranno di proporre due programmi alternati di allenamento della forza e un programma aerobico stabilito in base alla FFC saranno effettuate tre sedute settimanali della durata di un'ora. Per assicurare che il lavoro sia effettuato in condizioni di aerobiosi sarà controllata la concentrazione di acido lattico che non dovrà superare il valore di 3 mmol/l. Questo accertamento verrà effettuato nelle prime tre settimane di allenamento.

Analisi Statistica: La dimensione del campione è stata calcolata prendendo in considerazione un errore di tipo I pari allo 0.05 e di tipo II pari allo 0.10. La correlazione tra le misure dei diversi pazienti è stata fissata allo 0.4. Per la riduzione di una categoria nella severità della steatosi epatica, di 25 mg/dl della glicemia sono necessari 30 pazienti per gruppo.

L'analisi statistica prevede la descrizione dei pazienti in tabelle di contingenza secondo le caratteristiche delle variabili considerate: continue (media e SD) o categorica (%). Saranno applicati modelli lineari misti per la valutazione dell'effetto di entrambi gli interventi sui parametri biologici misurati ripetutamente. Sarà eseguita inoltre un'analisi costo-beneficio applicando diversi stimatori.

Risultati / stato di avanzamento per la annualità del progetto

Il Progetto è iniziato a marzo 2018. Il ritardo di inizio studio è stato dovuto ai rallentamenti nell'espletamento della gara per l'assegnazione della struttura sportiva dove svolgere l'attività fisica prevista dal protocollo di studio (DDG 454 del 22.06.17) e degli strumenti necessari al monitoraggio di parametri biochimici durante le sedute di palestra (acido lattico, glicemia). Le sedute in palestra si svolgono da lunedì al sabato. I partecipanti svolgono l'attività in palestra 3 volte a settimana e hanno la possibilità di scegliere se svolgere l'attività i giorni dispari o quelli pari. Il gruppo che ha scelto i giorni lunedì, mercoledì e venerdì ha accesso alla palestra in tre turni diversi: alle 8, alle 10 e alle 14. Le attività nei giorni di martedì, giovedì e sabato si svolgono in un unico turno alle ore 7. A fine 2019 abbiamo arruolati 60 soggetti. Hanno concluso il progetto 37 soggetti.

Ad oggi i risultati legati all'attività fisica sono soddisfacenti ed in linea con le nostre aspettative. Abbiamo riscontrato un miglioramento generale dei parametri clinici: riduzione dei valori del colesterolo LDL e dell'indice HOMA. Riduzione della Steatosi Epatica. Riduzione delle dosi di farmaci come Metformina, statina e pillola della pressione.

Progetto n. 24: Confronto di una dieta Mediterranea a basso indice glicemico (LGIMD) con una dieta mediterranea a basso indice glicemico e a km0 con basso indice infiammatorio (LGIMD2.0). Valutazione dell'aderenza e valutazione degli effetti sull'infiammazione di basso grado e sul profilo biochimico- metabolico

Responsabile: dott. Alberto Ruben Osella

Partecipanti: Alberto Ruben Osella, Angela Teresa Di Lorenzo, Caterina Bonfiglio, Isabella Franco, Antonella Mirizzi, Antonella Bianco, Angelo Campanella, Paolo Sorino, Pesole Letizia, Fabio Fucilli, Giuseppe Di Giovanni, Nicola Giampaolo.

Background

Dai dati Istat emerge che i pazienti cronici in Puglia hanno un impatto sul Sistema Sanitario Regionale pari a circa 3,1 miliardi di euro all'anno. La Puglia risulta così essere terza in Italia (dopo Sardegna e Calabria) per numero di abitanti con tre o più cronicità gravi e seconda (dopo la Sardegna) per numero di abitanti con una cronicità grave. Tra i fattori di rischio delle patologie croniche c'è l'infiammazione di basso grado, caratterizzata da un'aumentata concentrazione di marcatori infiammatori in assenza di sintomi evidenti. Recenti studi associano questa condizione allo sviluppo del cancro, delle malattie cardiovascolari e del diabete di tipo 2 e gli stessi suggeriscono che l'infiammazione di basso grado è mitigata da comportamenti di promozione della salute come abitudini alimentari sane, attività fisica, mantenimento del peso corporeo. (1) (2) (3)

Da sempre la dieta mediterranea viene studiata per la prevenzione e il trattamento delle malattie croniche. In questo senso l'esperienza maturata nel Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica tramite la progettazione e conduzione di più trial clinici con diversi tipi di diete che includevano la Dieta Mediterranea a basso Indice Glicemico (LGIMD) senza restrizione calorica costituisce un importante punto di partenza per la ricerca dell'effetto globale della dieta sulle malattie croniche. La LGIMD confezionata dal laboratorio ha un Indice Glicemico minore di 50. Inoltre, non più del 10% delle calorie giornaliere totali provengono da grassi saturi. Le caratteristiche della dieta soddisfano i criteri accettati dalla letteratura come ottimali sia per la struttura della Dieta Mediterranea sia come supporto terapeutico nutrizionale. Tuttavia, i dati sulla bassa aderenza della popolazione allo schema dietetico portano a riflettere: i soggetti sanno di dover cambiare abitudini alimentari ma non agiscono con scelte e comportamenti coerenti.

La LGIMD, spesso risulta troppo restrittiva, poco aperta alle innovazioni in campo alimentare e poco legata ai nuovi modelli di produzione e di consumo. Inoltre, alcuni dei prodotti accostati a questo modello alimentare negli ultimi anni sono oggetto di grandi produzioni industriali con ingredienti di bassa qualità e provenienza non sempre specificata. Per il consumatore medio risulta difficile scindere gli alimenti virtuosi da quelli di bassa qualità, soprattutto in condizioni socio-economiche più basse. La Dieta Mediterranea deve essere intesa come alimentazione basata su alimenti tipici del bacino Mediterraneo, ovvero prodotti naturali e non raffinati. Una dieta così concepita può contribuire a modulare l'inflammatione. La ricerca negli ultimi anni ha dimostrato che ci sono alimenti in grado di stimolare uno stato infiammatorio, e altri che possono contribuire a ridurlo. (4) In particolare, esistono numerose prove sulla relazione tra la dieta mediterranea e un'inflammatione di basso grado sia negli studi osservazionali che di intervento. Una recente review e una meta-analisi di studi randomizzati controllati hanno dimostrato che un modello alimentare mediterraneo riduce l'inflammatione e migliora la funzione endoteliale (5). Uno studio di 12 mesi su soggetti ad alto rischio di malattia cardiovascolare che hanno aderito allo studio PREDIMED ha mostrato che i biomarcatori infiammatori correlati all'instabilità della placca, come la proteina C-reattiva e l'interleuchina-6, erano ridotti nei gruppi assegnati a un MD rispetto al basso contenuto di grassi gruppo dieta (6) .

Obiettivo dello studio

Lo studio si propone di creare uno schema con indicazioni nutrizionali che siano più sostenibili e di somministrare tali indicazioni alla popolazione di riferimento per favorire l'aderenza alla dieta. Punto di partenza del lavoro è l'esperienza maturata dal laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica sullo schema del semaforo LGIMD senza restrizione calorica, modificandolo e migliorandolo; alla luce delle ultime evidenze e innovazioni in campo alimentare verranno favoriti gli alimenti stagionali e a km0, non raffinati, con indice infiammatorio più basso e rapporto densità nutrienti/costo migliore.

Materiali e metodi

La metodologia di lavoro includerà le seguenti tappe: 1) Raccolta dati; 2) Input dei dati; 3) Analisi statistica e presentazione dei risultati.

1) Raccolta dati: I soggetti arruolati verranno intervistati da un medico e da un nutrizionista; verrà effettuato un prelievo venoso ed un'ecografia epatica. Verranno inoltre compilati i questionari IPAQ, EPIC, abitudini consumi alimentari, SAT-P, SF 32, un diario alimentare e l'atlante delle porzioni. Verranno inoltre raccolti dati relativi allo stato socio-economico del soggetto all'arruolamento.

2) Un software ad-hoc verrà disegnato per l'input dei dati. Il programma sarà in grado di identificare dati in un range logico e plausibile. Il personale tecnico del laboratorio di Epidemiologia effettuerà l'input ed il controllo dei dati mancanti.

L'analisi statistica includerà le seguenti tappe: 1) pulizia dei dati, 2) analisi statistica e 3) presentazione di risultati. Tutte le tappe saranno documentate e automatizzate allo scopo di ottenere risultati rintracciabili e riproducibili.

3) Analisi Statistica

Analisi Statistica: Ai dati verranno applicati il test del Chi-quadrato e il t-test per variabili discrete e continue rispettivamente.

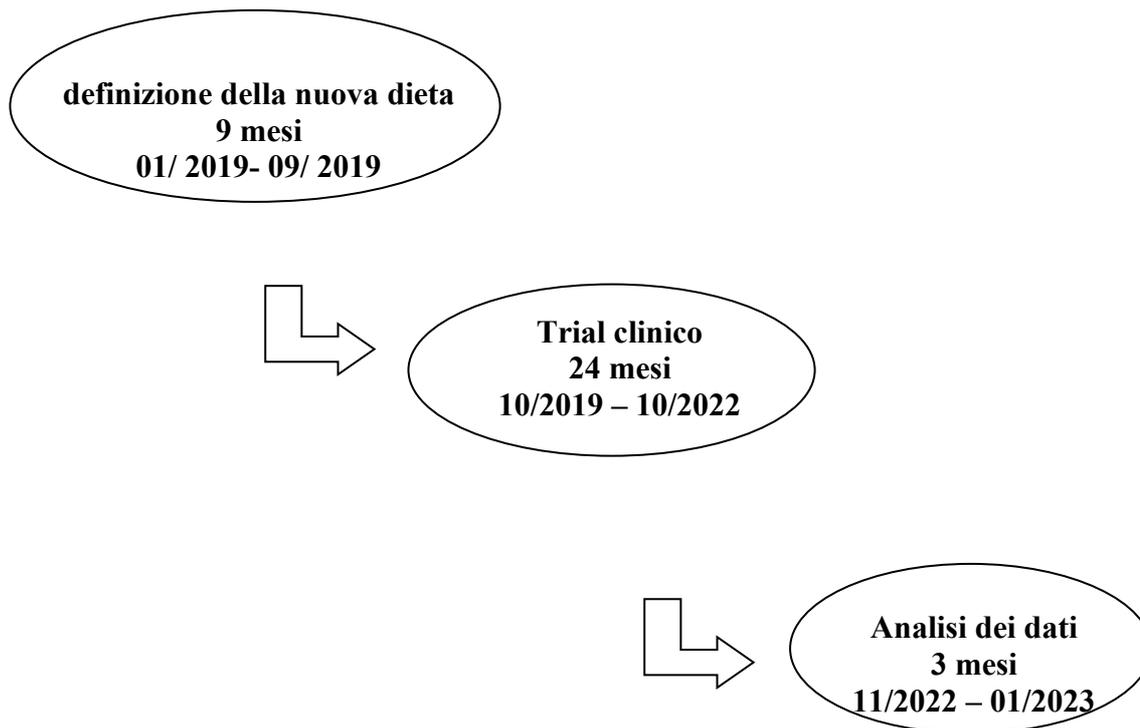
Il metodo Generalized Estimating Equation (GEE) particolarmente adatto all'analisi di dati misurati ripetutamente sullo stesso soggetto verrà utilizzato per valutare l'effetto degli interventi sugli outcomes.

I registri alimentari saranno analizzati utilizzando il software MètaDieta® e i risultati espressi come percentuale dell'apporto calorico totale per ogni prodotto alimentare consumato. Per calcolare l'IMA, si considereranno i quattro mesi centrali della sperimentazione; sono stati scelti rispettivamente la prima, la seconda, la terza e la quarta settimana del secondo, terzo, quarto e quinto mese.

Per l'analisi statistica sarà utilizzato il software Stata 16.1 tramite comandi ufficiali e routine scritte dagli utenti.

Risultati / stato di avanzamento per la annualità del progetto

Il Timeline / Prodotti finali nel progetto presentato per la ricerca corrente 2019 prevedeva:



Il progetto dieta mediterranea 2.0 è nato dall'analisi di numerosi studi presenti in letteratura scientifica che hanno dimostrato il ruolo benefico della dieta Mediterranea nei confronti delle patologie cronico-degenerative. Come da programma, la prima annualità ha visto lo studio approfondito e l'ampliamento della bibliografia presente nel progetto lavorando agli obiettivi prefissati da Marzo 2019.

Per la validazione del nuovo questionario sono necessarie 200 risposte provenienti da una popolazione random di età compresa tra i 30 e i 60 anni. La popolazione di studio è stata selezionata dalle liste elettorali del comune di Castellana Grotte con l'intercessione dell'ufficio anagrafe che ha fornito la lista degli indirizzi di residenza. A tali indirizzi stiamo provvedendo gradualmente ad inviare una lettera nella quale presentiamo gli obiettivi dello studio e esortiamo i soggetti selezionati a collaborare attraverso la compilazione del questionario.

Le risposte costituiranno il bagaglio d'informazione preziosissimo e utile alla progettazione della nuova dieta mediterranea più legata ai consumi e alle potenzialità del nostro territorio.

Allo stato attuale sono stati ricevuti 25 FFQ compilati via sito dell'IRCCS e sono stati predisposti in tutte le sale d'attesa dell'ospedale sia la pubblicità del progetto sia il QR code che può essere utilizzati dagli utenti in attesa di essere ricevuti da un operatore sanitario e mentre aspettano un parente.

Il controllo di qualità degli FFQ pervenuti evidenzia un'ottima percentuale di completezza e coerenza delle risposte. Sono state, inoltre, inviate le lettere di invito a tutti i 400 soggetti selezionati in modo

random dall'elenco elettorale del Comune di Castellana Grotte e siamo in attesa delle risposte delle quali siamo molto fiduciosi.

La preparazione del trial si è completata a Dicembre 2019 con l'identificazione dei soggetti e la realizzazione di tutte le procedure preliminari all'inizio del trial.

CRITICITA' INCONTRATE: Tra le maggiori criticità c'è la lunghezza del questionario che presenta circa 150 domande per un tempo di risposta stimato intorno ai 20 minuti. Per minimizzare il rischio di non risposta, invieremo lettere a circa 400 persone. Attualmente ne sono state inviate 100 e le risposte pervenute sono in totale 34.

Progetto n. 25: Valutazione del profilo lipidomico e delle LDL piccole e dense nelle malattie cronico degenerative in una coorte di soggetti over 65 dell'Italia Meridionale: studio nested caso-controllo

Responsabile: dott.ssa Maria Gabriella Caruso

Partecipanti: Nicola Veronese, Maria Notarnicola, Giampiero De Leonardis

Background:

La “Lipidomica” studia le molecole dei lipidi in modo “dinamico”, ovvero non solo comprendendo la struttura e le funzioni, ma soprattutto seguendo i cambiamenti che si verificano durante il “metabolismo cellulare”, in condizioni fisiologiche e patologiche, e definendone i ruoli nell’ambito del complesso equilibrio funzionale di un organismo vivente [1-5]. L’analisi lipidomica di membrana include la descrizione quantitativa dei lipidi costituenti la membrana cellulare. I lipidi di membrana non presentano la medesima composizione quantitativa, ma variano a seconda del tessuto e del compartimento cellulare. La diversità nei residui di acidi grassi è necessaria per modulare le proprietà biofisiche e biochimiche delle membrane, la cui composizione deve essere in accordo con le necessità cellulari in ogni condizione metabolica.

Il doppio strato fosfolipidico, con caratteristiche anfipatiche, costituente base della membrana cellulare, è stato definito il pacemaker metabolico della cellula, in grado di descrivere il network di attività e di segnali veicolati alla e dalla membrana. La parte idrofobica della membrana è costituita dagli acidi grassi (saturi, mono- e polinsaturi) che provengono sia dalla sintesi endogena che dalla dieta (soprattutto per gli acidi grassi essenziali omega-6 ed omega-3). Il controllo omeostatico della composizione dei fosfolipidi di membrana è essenziale per la crescita cellulare e per la sopravvivenza ed è finemente regolato. Diverse evidenze scientifiche hanno dimostrato che alterazioni della composizione lipidica della membrana cellulare sono associate al diabete, alle malattie cardiovascolari ed al cancro, considerato oggi una patologia metabolica dal momento che le cellule riprogrammano i loro pathways metabolici per sostenere l’elevata attività proliferativa. Le alterazioni del metabolismo lipidico sono spesso una conseguenza dell’attivazione di oncogeni che promuovono la trasformazione in senso neoplastico di un tessuto [6]. Precedentemente, noi abbiamo dimostrato che il tessuto colico tumorale presenta elevate attività non solo dell’enzima FAS (acido grasso sintetasi), ma anche di altri enzimi lipogenici come LPL (Lipoprotein Lipasi), HMGCoA reduttasi e FPPS (Farnesyl pirofosfato sintetasi) [7-10].

Inoltre, recentemente, un nostro studio ha dimostrato, su un numero ristretto di casi, un alterato profilo degli acidi grassi di membrana nei pazienti con CRC rispetto ai pazienti con patologie gastrointestinali non neoplastiche [11]. Si osservava soprattutto una riduzione dei livelli degli acidi grassi polinsaturi della serie omega-3 (n-3 PUFA) e un alterato rapporto n-6/n-3 PUFA.

Recentemente, particolare attenzione è rivolta al dosaggio sierico delle LDL piccole e dense, considerate attendibili marcatori biochimici associati ad un aumentato rischio di patologie metaboliche [12-14].

La combinazione del profilo lipidomico della membrana dei globuli rossi e il dosaggio dei livelli sierici delle LDL piccole e dense nei casi incidenti di cancro e di infarto del miocardio, associati a parametri biochimici canonici sarà importante per ottenere una descrizione accurata dello scenario delle trasformazioni metaboliche che possono evidenziarsi in queste patologie.

Il progetto parte con il vantaggio di una coorte già stabilita e seguita per dieci anni. Per ogni soggetto conosciamo la storia medica, lo stile di vita, esposizione a fattori nutrizionali e parametri di laboratorio classici. Inoltre, disponiamo di campioni biologici conservati nella biobanca su cui andare

a dosare markers enzimatici o recettoriali che possono aiutare nell'identificazione di profili metabolici precoci di malattie complesse come il diabete, malattie cardiovascolari e cancro.

Stato di avanzamento del progetto (terza annualità):

Il progetto è proseguito nell'anno 2018 con la selezione dal data base MICOL III (2005) dei casi di cancro e infarto e controlli sani ed è stato creato un nuovo data base. Contemporaneamente è stato effettuato il dosaggio delle LDL piccole e dense di alcuni di questi campioni come di seguito riportati: E' stata anche rivalutata la coorte e sono stati aggiornati i dati di mortalità specifica a dicembre 2016. Grazie alla ripresa dello studio della coorte MICOL, sono stati ricavati dati e associazioni con vari determinanti di malattia e patologie croniche che hanno permesso la pubblicazione di alcuni lavori scientifici di seguito riportati.

L'analisi lipidomica sui campioni non sarà effettuata perchè sui GR congelati da più di 20 anni il risultato non sarebbe attendibile.

Lavori pubblicati 2018

- 1) Potato Consumption Is not Associated with Higher Risk of Mortality: A Longitudinal Study among Southern Italian Older Adults. Osella AR, Veronese N, Notarnicola M, Cisternino AM, Misciagna G, Guerra V, Nitti A, Campanella A, Caruso MG. *J Nutr Health Aging*. 2018;22(6):726-730. doi: 10.1007/s12603-018-1018-4.
- 2) Menopause Does Not Affect Fatty Liver Severity In Women: A Population Study in a Mediterranean Area. Veronese N, Notarnicola M, Osella AR, Cisternino AM, Reddavid R, Inguaggiato R, Guerra V, Rotolo O, Zinzi I, Chiloiro M, Leandro G, Correale M, Tutino V, Misciagna G, Bonfiglio C, Caruso MG. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2018;18(5):513-521. doi: 10.2174/1871530318666180423101755.
- 3) Dietary fiber and health outcomes: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. Veronese N, Solmi M, Caruso MG, Giannelli G, Osella AR, Evangelou E, Maggi S, Fontana L, Stubbs B, Tzoulaki I. *Am J Clin Nutr*. 2018 Mar 1;107(3):436-444. doi: 10.1093/ajcn/nqx082.
- 4) Coffee Intake and Liver Steatosis: A Population Study in a Mediterranean Area. Veronese N, Notarnicola M, Cisternino AM, Reddavid R, Inguaggiato R, Guerra V, Rotolo O, Zinzi I, Leandro G, Correale M, Tutino V, Misciagna G, Osella AR, Bonfiglio C, Giannelli G, Caruso MG; MICOL Group. *Nutrients*. 2018 Jan 15;10(1). pii: E89. doi: 10.3390/nu10010089.

Obiettivi specifici dello studio:

Obiettivo specifico 1

Stimare l'effetto delle LDL piccole e dense sull'incidenza del Cancro e di infarto del miocardio

Obiettivo specifico 2:

Stimare l'effetto dell'interazione tra LDL piccole e dense e aderenza alla dieta Mediterranea sull'incidenza del Cancro e infarto del miocardio

Obiettivo 1:

La valutazione dei livelli delle LDL piccole e dense nel siero dei casi incidenti di cancro e di infarto del miocardio sarà effettuata utilizzando il Lipoprint System, una piattaforma tecnologica basata su

una elettroforesi dei lipidi con un gel non denaturante di poliacrilamide. Il sistema separa 7 sub-frazioni di LDL a diversa densità e mobilità elettroforetica. La frazione delle LDL piccole e dense sarà ottenuta in percentuale rispetto alle LDL totali osservate.

Obiettivo 2:

L'interazione tra patterns dietetici e profili lipidici sarà valutata mediante tests statistici appropriati al fine di individuare profili metabolici precoci di malattie complesse come le malattie cardiovascolari e il cancro.

Dati preliminari:

Indicazioni preliminari sull'efficienza dello studio delle LDL piccole e dense vengono fornite da lavori condotti nell'area di:

- Pauciullo P, et al. *Atherosclerosis* 203 (2009) 320–324.
- Gentile M et al. *Clinica Chimica Acta* 2008;388; 179–183
- Gentile M et al. *Clinica Chimica Acta* 2013;426: 1–5

Metodologie e analisi statistiche:

Disegno dello Studio

Studio nested caso-controllo in una coorte di soggetti over 65 di un'area Mediterranea del Sud Italia.

Dati preliminari

La tabella mostra il numero di campioni su cui è stato effettuato il dosaggio delle LDL piccole e dense e di altri parametri biochimici del metabolismo lipidico.

n. campioni	Causa di morte	Dosaggi		
40/75	CANCRO	LDL	FASN	HMGCoA
42/85	CVD	LDL	FASN	HMGCoA
30/150	caso controllo CANCRO	LDL		
9/170	caso controllo CVD	LDL		

Metodologia di lavoro

La coorte comprende 800 soggetti con età over 65 in un'area Mediterranea del sud Italia. A dicembre 2016, 85 soggetti avevano avuto infarto del miocardio e 75 avevano sviluppato un tumore. Dalla stessa coorte saranno individuati 2 soggetti controllo senza nessuno degli outcomes di interesse che verranno appaiati per sesso, età per ogni caso; quindi in totale saranno oggetto dello studio 480 soggetti.

La coorte è stata arruolata nel 2005/2006 con un progetto finalizzato finanziato dal Ministero della Salute e condotto dal Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica, Laboratorio di Biochimica della Nutrizione e Laboratorio di Patologia Clinica dell'IRCCS Saverio de Bellis.

All'arruolamento i soggetti furono visitati, completarono un FFQ validato, furono ottenuti dettagli della loro storia medica ed i campioni di sangue conservati.

Nel 2013 i soggetti che a questa data avevano almeno 65 anni sono stati richiamati e sottoposti agli stessi controlli dell'arruolamento e gli eventi di malattia sono stati registrati. La diagnosi di ognuno degli eventi riferiti sarà validata con i medici di famiglia di ciascun soggetto, secondo i seguenti

indicatori di malattia certa: la diagnosi di evento cardiovascolare sarà effettuata sulla base della diagnosi di Infarto Acuto del Miocardio insieme ad almeno un ECG che evidenzi lesioni acute del miocardio alla dimissione ospedaliera; la diagnosi di cancro sarà basata sulla presenza di diagnosi clinica e istopatologica o di dati ospedalieri che indichino procedure chirurgiche o terapie mediche per il cancro.

Nel 2016 dal registro SDO e dall'ufficio anagrafe sono stati ricavati i dati di mortalità generale, mentre quelli di mortalità specifica non sono stati ancora aggiornati.

Analisi LDL piccole e dense

La valutazione dei livelli delle LDL piccole e dense nel siero dei casi incidenti di cancro e di infarto del miocardio, nonché dei controlli appartenenti tutti alla stessa coorte, conservato a -80°C , sarà effettuata utilizzando il Lipoprint System, una piattaforma tecnologica basata su una elettroforesi dei lipidi con un gel non denaturante di poliacrilamide. Il sistema separa 7 sub-frazioni di LDL a diversa densità e mobilità elettroforetica. La frazione delle LDL piccole e dense sarà ottenuta in percentuale rispetto alle LDL totali osservate.

Analisi Statistica

La descrizione del campione verrà effettuata con tabelle di contingenza utilizzando modelli statistici appropriati per dati quantitativi (media, deviazione standard) e qualitativi (percentuali).

Verranno utilizzati inoltre due tipi di modellistica: regressione logistica classica e con effetti random ed analisi della sopravvivenza. Il modello di regressione logistica multipla è particolarmente utile per quantificare l'associazione esistente tra un fattore di rischio (esposizione), in questo caso le LDL piccole e dense, e l'outcome binario di interesse. Ciò nonostante in certi casi esistono differenze tra gli individui che li rendono eterogenei tra di loro ma questa eterogeneità non è stata misurata né osservata. Per questo motivo verrà utilizzato un modello logistico misto che permette di modellare il rapporto esposizione-outcome tenendo conto di questa eterogeneità. Inoltre dopo il processo di stima dei parametri di interesse (Odds Ratio) degli effetti principali verranno esplorate tutte le interazioni biologicamente plausibili all'uopo di ottenere un modello valido e biologicamente parsimonioso. Successivo approccio alla stima dei parametri sarà la stima delle distribuzioni marginali con l'obiettivo di ottenere la probabilità del verificarsi dell'outcome per le varie combinazioni delle variabili contenute nel modello. Verrà inoltre effettuato un'analisi di sensibilità dei parametri stimati con l'obiettivo di saggiare quanto sono resistenti le stime ottenute alla proposta di scenari estremi. In questo analisi di sensibilità verranno presi in considerazione errori sistematici di classificazione, informazioni e confounding.

Il software statistico Stata 14.1 verrà utilizzato per tutte le analisi statistiche (Stata Statistical Software: Release 14, College Station, TX , USA).

Risultati attesi:

Ci aspettiamo una significativa associazione tra i profili lipidici delle membrane eritrocitarie e livelli sierici di LDL piccole e dense e l'incidenza di infarto del miocardio e tumori del colon retto, prostata e mammella, tenendo conto dei fattori di rischio metabolici comuni. Se questa associazione esiste, i nostri risultati potrebbero essere utili per identificare quegli individui esposti a rischi metabolici e consentirà la progettazione di formulazioni nutraceutiche protettive o interventi nutrizionali mirati a correggere queste alterazioni.

Analisi dei rischi, possibili problemi e soluzioni:

Lo stato dell'arte nella ricerca scientifica ed il forte razionale dello studio costituiscono delle basi importanti per il successo dello studio e per ridurre aspetti critici dello stesso. La coorte è ben strutturata, l'approccio metodologico riguardante la combinazione delle LDL piccole e dense, in diverse condizioni di salute dovrebbe assicurare che gli obiettivi del progetto verranno raggiunti.

Un aspetto critico potrebbe essere costituito dalla difficoltà di intervenire tramite i medici di famiglia per proporre nuovi interventi dietetici o nutraceutici basati su aspetti “omici” emergenti dal progetto. Comunque la comunità dei medici di famiglia di Castellana trovano nel nostro IRCCS un punto di riferimento come dimostra la continua collaborazione dall’anno 1985 fino ad oggi.

Innovazioni:

Il recente sviluppo delle piattaforme “omiche” offre l’opportunità di identificare marcatori precoci di un insulto patogeno e anche profili tipici associati.

Attraverso la costruzione di banche dati di profili lipidici integrando il nuovo dosaggio delle LDL piccole e dense con altri parametri biochimici ed enzimatici del pathway lipidico di soggetti all’infarto del miocardio e cancro sarà possibile creare prototipi di nutraceutici o diete personalizzate. L’innovazione del nostro progetto è diretta verso la medicina personalizzata. La potenza dell’integrazione di profili lipidici risiede nella sua capacità di personalizzare il profilo, che è il risultato della combinazione di analisi e storia del soggetto al fine di tracciare una storia individuale, che collega tra loro i vari elementi di familiarità, dieta, stile di vita e la funzione metabolica .

Descrizione della complementarietà e della sinergia del gruppo di ricerca:

Il Laboratorio di Biochimica Nutrizionale e l’ambulatorio di Nutrizione Clinica ha una consolidata esperienza di collaborazione con altre unità operative dell’IRCCS. In particolare vanta un’intensa collaborazione con il Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica, che ha prodotto anche in quest’ultimo anno la pubblicazione di lavori scientifici su riviste internazionali.

Timeline / Prodotti finali:

Primo anno del progetto:

Nel primo anno e ½ del progetto sono stati individuati e validati i casi incidenti di infarto del miocardio e cancro nella coorte ed è stato costruito l’apposito database che include tutta l’informazione clinica e nutrizionale di cui si era in possesso.

Secondo anno del progetto:

E’ stata aggiornata la mortalità generale e quella specifica per infarto e cancro. I casi sono stati in parte appaiati con i controlli.

E’ stata avviato il dosaggio delle LDL piccole e dense, che continuerà per il terzo anno..

Terzo anno del progetto:

Dosaggio delle LDL piccole e dense in tutti i campioni (casi e controlli);

I profili lipidici e delle LDL piccole e dense verranno ad altri fattori nutrizionali e farmacologici, nonché di aderenza alla dieta mediterranea, per costruire panels integrati della valutazione biochimica complessiva.

Alla luce dei risultati finali tutto il data base verrà trasferito al software Stata per l’analisi statistica finale

Fasi del progetto	Attività	Anno	G en	Fe b	Ma r	Apr	Ma g	Gi u	L ug	A go	Sett	Ot t	Nov	Di c
Fase 1	Raccolta del data base	Primo												
	Campionamento materiale biologico	secondo												
	Analisi delle LDL piccole e dense	Secondo e terzo												
Fase 3	Integrazione dei risultati ed analisi dei dati e pubblicazioni scientifiche	Terzo												

Rilevanza traslazionale e impatto per l'SSN

Lo sviluppo di piattaforme strutturate per studiare profili biochimici del metabolismo lipidico offre un'opportunità per identificare markers precoci di insulti patogenetici ed anche profili tipici di trasformazioni metaboliche e neoplastiche. L'identificazione di questi cambiamenti metabolici fornisce una finestra privilegiata di osservazione di meccanismi patogenetici, atta ad identificare diagnosi precoce e markers prognostici di malattie complesse con conseguente adozione di misure preventive

Con la costruzione di database basati sul profilo lipidico integrato con l'analisi e il dosaggio delle LDL piccole e dense in soggetti con infarto del miocardio e cancro, è possibile creare prototipi di nutraceutici sulla base di profili diagnostici individuali e basati sulle reali necessità dei soggetti. La strategia del progetto è mirata verso la medicina personalizzata. La potenza della diagnosi del profilo lipidico così come applicata in questo progetto, ricade nella sua abilità a personalizzare il profilo, il quale è il risultato della combinazione di analisi di laboratorio e dati medici storici del soggetto all'uopo di rintracciare la storia individuale e metterla in rapporto ai vari elementi della storia familiare, stile di vita, abitudini dietetiche e funzione metabolica

Progetto n. 26: “Studio pre-clinico e clinico dei meccanismi fisiopatologici, cellulari e molecolari della regolazione della barriera intestinale in risposta a diete a differente composizione in carboidrati”

Responsabile: dott. Francesco RUSSO

Partecipanti: Giuseppe RIEZZO, Michele LINSALATA, Caterina CLEMENTE, Antonella ORLANDO, Benedetta D’ATTOMA, Manuela MARTULLI, Laura PROSPERO, Maria NOTARNICOLA, Maria Gabriella CARUSO, Valeria TUTINO, Isabella GIGANTE, Valentina DE NUNZIO, Guglielmina CHIMIANTI, Linda MONACI

Background – studio clinico

Il presente progetto di ricerca corrente valuta indaga le potenzialità terapeutiche di differenti regimi alimentari nel trattamento della IBS-D. L’attività di ricerca si articola su uno studio clinico ed uno pre-clinico. Il primo consiste di un trial clinico randomizzato, singolo cieco, in cui si valuta la sintomatologia GI, lo stato nutrizionale e psicologico, il profilo ematochimico, la permeabilità intestinale (PI), il profilo infiammatorio e la lipidomica dei pazienti con D-IBS prima e dopo trattamento per 90 giorni con l’impiego di due diete adottate per la gestione dell’IBS (una dieta a basso contenuto di oligosaccaridi fermentabili, disaccaridi, monosaccaridi e polioli (FODMAPs) vs. una serie di consigli dietetici utili per i pz. con IBS). Questi carboidrati sono poco assorbiti nell'intestino tenue e possono passare integri nel colon, dove aumentano l'acqua endoluminale attraverso l'attività osmotica e inducono la produzione di gas a causa della loro fermentazione ad opera della flora batterica intestinale. Ciò a sua volta può causare distensione addominale e diarrea. Una dieta povera di FODMAPs sembra essere particolarmente utile in pazienti affetti da IBS, anche se finora pochi trials randomizzati hanno riportato dati a favore della effettiva superiorità di una dieta lowFODMAPs rispetto alla pratica dietetica tradizionale utilizzata per i pazienti con IBS (ovvero incoraggiare un pasto regolare e "mangiare sano"; evitare grandi pasti; ridurre l'assunzione di grassi; scoraggiare l'assunzione eccessiva di fibre, in particolare le fibre insolubili; ridurre la caffeina; evitare cibi che inducono meteorismo).

Lo studio pre-clinico si basa su una sperimentazione in vitro condotta su linee cellulari umane di tumore intestinale in cui si valutano gli effetti del plasma dei pazienti IBS-D, sottoposti ai due diversi tipi di dieta, sulla modulazione della permeabilità intestinale (PI) studiando l’espressione di differenti proteine di giunzione intercellulare. Parallelamente, in un modello sperimentale animale di disbiosi intestinale, che riproduce abbastanza fedelmente i sintomi clinici di pazienti affetti da IBS, si valutano gli effetti delle differenti diete sul ruolo potenziale della PI e del microbiota intestinale nella patogenesi dell’IBS.

Risultati / stato di avanzamento

Allo scopo di realizzare una pubblicazione a metà del percorso di reclutamento dei pazienti con IBS-D ci siamo concentrati sui primi 20 pazienti trattati con FODMAPs. Ciò è stato possibile in quanto si tratta di un trial mono cieco. Il background di studio riguardava sostanzialmente il legame tra flogosi minima presente nell’IBS e il trattamento dietetico a basso contenuto in FODMAPs (LFD) allo scopo di chiarire i meccanismi fisiopatologici mediante i quali LFD migliora il profilo dei pazienti IBS-D.

Obiettivo dello studio

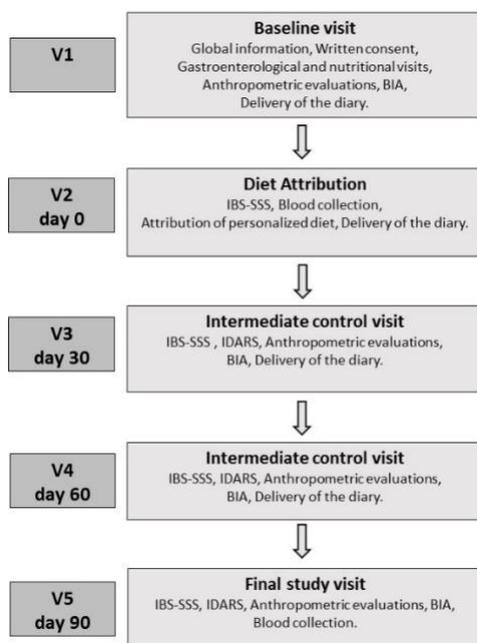
Abbiamo ipotizzato che una LFD a lungo termine possa indurre cambiamenti nel profilo dei sintomi - misurati tramite questionario validato (nello specifico IBS-SSS: Syndrome Severity Scoring System), modificare le caratteristiche antropometriche (BMI: Body Mass Index ; PhA: Phase Angle; BCM: Body Cell Mass; FM: Fat Mass; FFM: Fat Free Mass; TBW: Total Body Water; ECW: Extra

Cellular Water), i marker di flogosi (proteina C-reattiva, cicloossigenasi-2 e prostaglandina E2) e gli acidi grassi della membrana eritrocitaria (FA) in pazienti con IBS-D.

Materiali e metodi

Venti pazienti IBS-D sono stati sottoposti a 90 giorni di LFD personalizzata e sono stati valutati regolarmente durante visite programmate come riportato in figura.

Figura relativa al disegno dello studio



Alla fine della dieta, sia i sintomi IBS che i parametri antropometrici sono risultati significativamente migliorati. Una riduzione significativa della prostaglandina E2 ha accompagnato queste riduzioni. Per quanto riguarda gli AF, anche i livelli di acido arachidonico (AA) e il rapporto acido AA/eicosapentaenoico, marcatori putativi della flogosi, sono significativamente ridotti.

I dati salienti sono riportati dal lavoro dal titolo **“Improved symptom profiles and minimal inflammation in IBS-D patients undergoing a long-term low-FODMAP diet: a lipidomic perspective”** di Antonella Orlando, Valeria Tutino, et al. accettato su Nutrients il 01.06.2020.

Figura relativa alla riduzione del IBS-SSS prima e dopo la LFD.

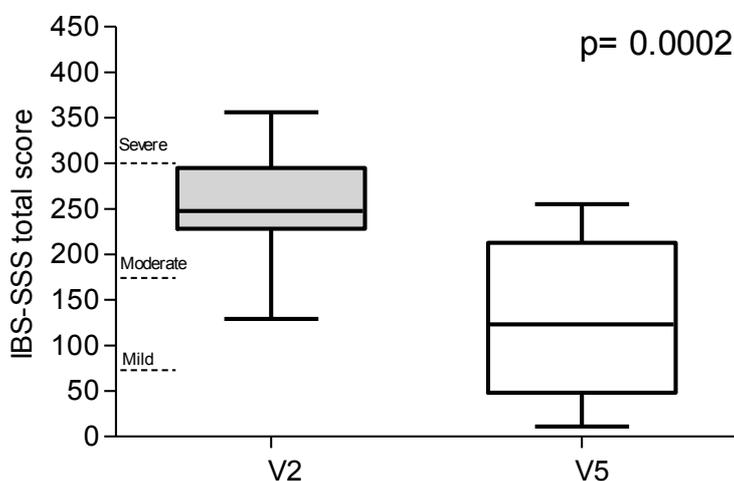


Tabella descrittiva della concentrazione sierica dei lipidi e dei principali marcatori di infiammazione sistemica a V2 (attribuzione della dieta) e V5 (visita finale).

	V2 (n = 20)	V5 (n = 20)	p
Total cholesterol (mg/dl)	184.20 ± 7.74	179.30 ± 7.46	ns
LDL (mg/dL)	109.70 ± 6.33	106.70 ± 6.71	ns
HDL (mg/dL)	57.85 ± 2.51	55.15 ± 2.71	ns
LDL:HDL ratio	1.93 ± 0.12	1.97 ± 0.13	ns
Triglycerides (mg/dL)	84.35 ± 7.57	86.90 ± 10.40	ns
CRP (mg/dL)	0.17 ± 0.04	0.13 ± 0.01	ns
COX-2 (u/L)	10.30 ± 1.18	10.19 ± 1.13	ns
PGE2 (pg/mL)	36.71 ± 7.86	28.95 ± 7.46	0.0005

LDL: Low Density Lipoprotein; HDL: High Density Lipoprotein; CRP: C-Reactive Protein; COX-2: Cyclooxygenase-2; PGE2: Prostaglandin E2. Dati espressi come media ± SEM. analisi statistica Student's Paired t-test, p<0.05; ns: non significativo.

Tabella relativa al dosaggio degli acidi grassi valutati con indagine lipidomica in V2 (attribuzione della dieta) e V5 (visita finale).

Red Blood Cell Membrane Fatty Acids	V2 (n= 20)	V5 (n= 20)	p	n.v. (% rel.)
SFAs				
C16:0 Acido Palmitico	19.19 ± 0.52	21.50 ± 0.75	ns	17 – 27
C18:0 Acido Stearico	14.82 ± 0.42	15.46 ± 0.91	ns	13 – 20
MUFAs				
C16:1n7 Acido Palmitoleico	0.51 ± 0.13	0.60 ± 0.35	ns	0.2 – 0.5
C18:1n9 Acido Oleico	13.64 ± 0.55	14.26 ± 0.59	ns	9 – 18
C18:1n7 Acido Vaccenico	1.17 ± 0.06	1.19 ± 0.05	ns	0.7 – 1.3
PUFAs				
C20:4n6 Acido arachidonico (AA)	16.32 ± 0.62	14.58 ± 0.34	0.037	13 – 17
C20:5n3 Acido Eicosapentaenoico (EPA)	0.86 ± 0.08	0.82 ± 0.21	ns	0.5 – 0.9
C22:6n3 Acido Docosahexaenoico (DHA)	5.23 ± 0.4	5.62 ± 0.55	ns	5 – 7
FA Totali				
SFAs	43.52 ± 0.77	45.30 ± 1.88	ns	30 – 40
MUFAs	20.1 ± 0.84	20.66 ± 0.72	ns	13 – 23
PUFAs	35.07 ± 1.3	33.62 ± 2.32	ns	28 – 39
Indici FA				
n-6 PUFAs/n-3 PUFAs	3.91 ± 0.28	3.28 ± 0.16	0.048	3 – 4.5
AA/EPA	23.25 ± 2.43	17.04 ± 1.0	0.025	< 15

Dati espressi come media ± SEM. analisi statistica Student's Paired t-test, p<0.05; ns: non significativo n.v.: valori normali; SFAs: Saturated fatty acids; MUFAs: Monounsaturated fatty acids; PUFAs: Polyunsaturated fatty acids; FAs: Fatty acids.

Tabella relative all'analisi della regressione tra lo score dei sintomi IBS e i dati antropometrici, nutrizionali e infiammatori.

Parametri	β	Std.Error (β)	p	95% CI
FODMAP contenuto	10.28	4.46	0.042	1.54 – 19.02
BMI	87.83	20.15	0.001	48.33 – 127.33
COX-2	34.04	10.73	0.009	13.01 – 51.07
AA/EPA	4.17	1.55	0.021	1.13 - 7.21

Tutte le variabili sono state calcolate come differenza tra prima e dopo il trattamento. L'analisi di regressione lineare è stata eseguita considerando l'IBS-SSS come variabile dipendente e le altre variabili come variabili indipendenti. BMI: indice di massa corporea; COX-2: cicloossigenasi-2; Rapporto AA / EPA: rapporto tra acido arachidonico e acido eicosapentaenoico.

Come è chiaramente evidente l'effetto della dieta riguarda tutti i differenti aspetti: ovvero la dieta, il peso corporeo, le variabili nutrizionali e i parametri infiammatori. Per esempio la riduzione di 1 g/die di FODMAP determina una riduzione di 10,28 unità IBS-SSS (Il contenuto medio in FODMAPs calcolato nello studio passava da 20,73 gr/die a 3,27 gr/die). In conclusione, la LFD ha modificato i sintomi e i marker infiammatori collegati alle FA. Pertanto, i dati infiammatori e lipidomici potrebbero essere utili per la comprensione di quei meccanismi molecolari alla base del miglioramento dei sintomi nei pazienti con IBS-D sottoposti a trattamenti dietetici specifici, come l'LFD.

Background – studio pre-clinico

L'alterazione dell'integrità dell'epitelio intestinale può essere determinata sia da fattori intestinali che sistemici. Nel caso dell'IBS, i mediatori di infiammazione, quali ad esempio i prodotti delle mastcellule, possono contribuire a una alterazione della funzione di barriera intestinale. La tryptase è una serino-proteasi rilasciata durante il processo di degranolazione delle mastcellule. Nei pazienti con IBS, e in particolare negli IBS-D, è stato riportato un aumentato rilascio di tryptase. L'esposizione luminale alla tryptase influenza, inoltre, la permeabilità paracellulare sia in sistemi *in vitro* che *ex vivo*.

Le alterazioni nella funzione di barriera, così come si osservano in patologie funzionali quali l'IBS come pure in condizioni neoplastiche del tratto GI, possono favorire l'ingresso dei batteri e dei loro prodotti. Il lipopolisaccaride (LPS), componente predominante nella parete cellulare dei batteri Gram-negativi, è risultato in grado di influenzare la funzione di barriera. In condizioni fisiologiche, l'LPS non è in grado di attraversare l'epitelio integro, ma in presenza di una ridotta integrità epiteliale, riesce a attraversare la barriera GI. Sebbene siano note le potenzialità di tali mediatori a livello sistemico, dove possono essere agevolmente dosati, poco è ancora noto circa i più fini effetti a livello molecolare sulla funzione di barriera intestinale in modelli sperimentali *in vitro*.

Risultati / stato di avanzamento

Sperimentazione *in vitro*

Sulla base di tali premesse, il progetto prevedeva una sperimentazione *in vitro* condotta su una linea cellulare umana di tumore intestinale (Caco-2). Preliminarmente, su tali cellule è stato valutato l'effetto sulla vitalità cellulare di concentrazioni crescenti di tryptase ed LPS nonché della loro co-somministrazione, in presenza e in assenza dei rispettivi inibitori. Attualmente si sta procedendo all'allestimento di colture in monostrato mediante l'uso di inserti, al fine di valutare gli effetti di tryptase ed LPS sulla modulazione della permeabilità intestinale attraverso la misura della resistenza elettrica transepiteliale e il flusso di markers fluorescenti, nonché l'espressione di differenti proteine di giunzione intercellulare.

Parallelamente si sta effettuando il dosaggio dei livelli di tryptase ed LPS sui campioni di plasma dei pazienti IBS-D sottoposti ai due diversi tipi di dieta. Successivamente, tali campioni plasmatici saranno saggiati sulle cellule Caco-2 al fine di valutare il loro effetto sulla modulazione della permeabilità intestinale, e di correlare i livelli di tryptase e l'alterazione della funzione di barriera rispetto al pre e post intervento dietetico.

Sperimentazione *in vivo*

Nel corso del 2019, dopo autorizzazione Ministeriale (n° 901/2018-PR) a procedere con la sperimentazione animale, sono stati acquistati dalla Charles River n.° 6 animali, specie *Rattus norvegicus*, ceppo ratti WISTAR, quattro femmine (F) e due maschi (M), tutti aventi età 28-34 gg. Dopo una decina di giorni di adattamento, è stato avviato il breeding con schema delle due *mating cage* 1 M+2F.

Ci sono state quattro cucciolate:

- 31/05/2019 sono nati 13 cuccioli;
- 01/06/2019 sono nati 17 cuccioli;
- 19/07/2019 sono nati 12 cuccioli;
- 21/07/2019 sono nati 11 cuccioli.

Delle quattro cucciolate, due sono state sottoposte a separazione materna (SM) per tre ore al giorno a partire dal secondo giorno di vita fino al quattordicesimo, per indurre loro in età neonatale uno stress causa poi in età adulta di una condizione patologica paragonabile a quella della IBS umana. Mentre le altre due cucciolate non hanno subito la separazione materna.

Alle quattro settimane dalla nascita, si è proceduto allo svezzamento degli animali e alla pianificazione dei seguenti gruppi sperimentali:

NUMERO ANIMALI	MASCHI	FEMMINE	NATI IL	SEPARAZIONE MATERNA (IBS)
13	9	4	31/05/2019	NO
17	12	5	01/06/2019	SI
12	5	7	19/07/2019	NO
11	5	6	21/07/2019	SI

Dopo 10 settimane di trattamento gli animali sono stati sacrificati. La Tabella che segue riassume lo schema dell'esperimento:

NUMERO ANIMALE TRATTAMENTO		TOT. PER	NUMERO ANIMALI per cucciolata	SEPARAZIONE E MATERNA (IBS)	ORGANI PRELEVATI
FODMAP		30	13	NO	Cervello, cuore, fegato, stomaco, intestino (prox., med., dist.), colon
			17	SI	Cervello, cuore, fegato, stomaco, intestino (prox., med., dist.), colon
STANDARD		23	12	NO	Cervello, cuore, fegato, stomaco, intestino (prox., med., dist.), colon
			11	SI	Cervello, cuore, fegato, stomaco, intestino (prox., med., dist.), colon

Al sacrificio, dai campioni tissutali in formalina, sono state effettate le indagini istologiche per valutare la flogosi a livello gastro-intestinale ciascun animale. La tabella di seguito riporta i risultati ottenuti:

SESSO	TAG	DIETA	IBS	Campione	FLOGOSI					Follicoli Reattivi	
					Assente	Lieve	Moderata	Severa	A/C	SI	NO
					0	1	2	3			
F	121	Fodmap	NO	Stomaco		x					
				Int. Pross.			x U.				
				Int. Med.			x U.		minuti		
				Int. Dist.		x E.					
				Colon		x I. E.					
F	132	Fodmap	SÌ	Stomaco	x						
				Int. Pross.			x E.				
				Int. Med.		x I.					
				Int. Dist.			x U.		volumi nosi		
				Colon		x I.			minuti		
M	142	Fodmap	SÌ	Stomaco						x in necrosi massiva	
				Int. Pross.			x U. I.				
				Int. Med.			x U. I.		volumi nosi		
				Int. Dist.			x U.		volumi nosi		
				Colon		x I.			volumi nosi		
M	144	Fodmap	NO	Stomaco							
				Int. Pross.		x E. I.					
				Int. Med.		x E. I.					
				Int. Dist.			x U. I.				
				Colon		x					
M	145	Standard	SÌ	Stomaco		x antro/p					
				Int. Pross.			x U.		minuti		
				Int. Med.		x E.					
				Int. Dist.		x E. I.					
				Colon		x I.					
F	151	Standard	SÌ	Stomaco		x antro/p					
				Int. Pross.		x E. I.					
				Int. Med.		x E. I.					
				Int. Dist.			x U.				
				Colon		x I.			volumi nosi		
M	157	Standard	NO	Stomaco			x focale				
				Int. Pross.		x E.					
				Int. Med.		x E. I.					
				Int. Dist.		x E. I.					
				Colon		x I.					
F	164	Standard	NO	Stomaco	x						
				Int. Pross.			x U. I.				
				Int. Med.			x E.				
				Int. Dist.			x U. I.				
				Colon		x					

Legenda: antro/p=antro pilorico; U= ulcera; E= erosioni; I= ischemia

ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI DELL'ISTITUTO

ANNO 2019

Linea 1 – Medicina di Precisione in Gastroenterologia

- Calcium regulates HCC proliferation as well as EGFR recycling/degradation and could be a new therapeutic target in HCC. Modica Teresa Maria Elisa, Dituri Francesco, MANCARELLA SERENA, Pisano Claudio, Fabregat Isabel, Giannelli Gianluigi. *Cancers*.
- Chasing the FOXO3: insights into its new mitochondrial lair in colorectal cancer landscape. Grossi Valentina, Fasano Candida, Valentina Cestini, Lepore Signorile Martina, Paola Sanese, Cristiano Simone. *Cancers*.
- Down-regulation of cannabinoid type 1 (CB1) receptor and its downstream signaling pathways in metastatic colorectal cancer. Tutino Valeria, Caruso Maria Gabriella, De Nunzio Valentina, Lorusso Dionigi, Nicola Veronese, Gigante Isabella, Notarnicola Maria, Giannelli Gianluigi. *Cancers*
- Elevated AA/EPA Ratio Represents an Inflammatory Biomarker in Tumor Tissue of Metastatic Colorectal Cancer Patients. Tutino Valeria, De Nunzio Valentina, Caruso Maria Gabriella, Nicola Veronese, Lorusso Dionigi, Di Masi Marta, Benedetto Maria Lucrezia, Notarnicola Maria. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES*
- Epigenetic upregulation and functional role of the mitochondrial aspartate/glutamate carrier isoform 1 in hepatocellular carcinoma. Vittoria Infantino, Dituri Francesco, Paolo Convertini, Anna Santarsiero, Ferdinando Palmieri, Simona Todisco, MANCARELLA SERENA, Giannelli Gianluigi, Vito Iacobazzi. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-MOLECULAR BASIS OF DISEASE*
- Eribulin Mesylate as Third or Subsequent Line Chemotherapy for Elderly Patients With Locally Recurrent or Metastatic Breast Cancer: A Multicentric Observational Study of GIOGer (Italian Group of Geriatric Oncology)-ERIBE. Silvana Leo, Ermenegildo Arnoldi, Lazzaro Repetto, Zaira Coccorullo, Saverio Cinieri, Palma Fedele, Marina Cazzaniga, Vito Lorusso, Agnese Latorre, Campanella Giovanna Anna, Mariangela Ciccarese, Caterina Accettura, Salvatore Pisconti, Antonio Rinaldi, Cosimo Brunetti, Mimma Raffaele, Luigi Coltelli, Salvatore Spazzapan, Lucia Fratino, Luciana Petrucelli, Laura Biganzoli. *ONCOLOGIST*
- Evaluation of 99th percentile and reference change values of a high-sensitivity cTnI method: A multicenter study. Aldo Clerico, Andrea Ripoli, Silvia Masotti, Veronica Musetti, Rosalia Aloe, Mariella Dipalo, Sara Rizzardi, Ruggero Dittadi, Cinzia Carrozza, Simona Storti, Lucia Belloni, Marco Perrone, Tommaso Fasano, Simone Canovi, Correale Mario, Concetta Prontera, Cristina Guiotto, Domenico Cosseddu, Marco Migliardi, Sergio Bernardini. *CLINICA CHIMICA ACTA*
- FOXO3 on the road to longevity: lessons from SNPs and chromatin hubs. Paola Sanese, Forte Giovanna, Disciglio Vittoria, Grossi Valentina, Cristiano Simone. *Computational and Structural Biotechnology Journal*
- FOXO3a from the Nucleus to the Mitochondria: a Round Trip in Cellular Stress Response. Fasano Candida, Disciglio Vittoria, Bertora Stefania, Lepore Signorile Martina, Cristiano Simone. *Cells*

- Frizzled-10 Extracellular Vesicles Plasma Concentration is Associated With Tumoral Progression In Patients With Colorectal And Gastric Cancer. Scavo Maria Principia, Antonio Cigliano, Nicoletta Depalo, Elisabetta Fanizza, Maria Grazia Bianco, Nunzio Denora, Valentino Laquintana, Maria Lucia Curri, Lorusso Dionigi, Lotesoriere Claudio, Panarese Alba, Giannelli Gianluigi. *Journal of Oncology*
- FZD10 Carried by Exosomes Sustains Cancer Cell Proliferation. Scavo Maria Principia, Depalo Nicoletta, Rizzi Federica, Ingrosso Chiara, Fanizza Elisabetta, Chieti Annarita, Messa Caterina, Denora Nunzio, Laquintana Valentino, Striccoli Marinella, Curri Maria Lucia, Giannelli Gianluigi. *Cells*
- Imaging modification of colon carcinoma cells exposed to lipid based nanovectors for drug delivery: a scanning electron microscopy investigation Nicoletta Depalo, Elisabetta Fanizza, Fabio Vischio, Nunzio Denora, Valentino Laquintana, Annalisa Cutrignelli, Marinella Striccoli, Giannelli Gianluigi, Angela Agostiano, Maria Lucia Curri, Scavo Maria Principia *RSC Advances*
- Increased nerve twigs in small intestinal mucosa with programmed cell death-ligand 1 and somatostatin receptor type 2A expression in recurrent Crohn disease A case report. Caruso Maria Lucia, Di Pinto Federica, Ignazzi Antonia, Coletta Sergio, Valentini Annamaria, Cavalcanti Elisabetta, De Michele Francesco. *MEDICINE*
- Integrated small dense Low Density Lipoprotein profile in cardiovascular disease and cancer: a longitudinal study. Notarnicola Maria, De Nunzio Valentina, Tutino Valeria, Nicola Veronese, Guerra Vito, Osella Alberto Ruben, Caruso Maria Gabriella. *ANTICANCER RESEARCH*
- Liquid Biopsy as Surrogate for Tissue for Molecular Profiling in Pancreatic Cancer: A Meta-Analysis Towards Precision Medicine. Claudio Luchini, Nicola Veronese, Alessia Nottegar, Vera Cappelletti, Maria G. Daidone, Lee Smith, Christopher Parris, Lodewijk A A Brosens, Caruso Maria Gabriella, Liang Cheng , Christopher L Wolfgang , Laura D Wood, Michele Milella, Roberto Salvia, Aldo Scarpa. *Cancers*
- News about non-secretory exocytosis: mechanisms, properties, and functions. D'Alessandro Rosalba, Jacopo Meldolesi. *Journal of Molecular Cell Biology*
- News about the Role of the Transcription Factor REST in Neurons. Garcia-Manteiga Jose M., D'Alessandro Rosalba, Meldolesi Jacopo. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES*
- Novel transforming growth factor beta receptor I kinase inhibitor galunisertib (LY2157299) in advanced hepatocellular carcinoma. Faivre Sandrine, Santoro Armando, Kelley Robin K, Gane Ed, Costentin Charlotte E, Gueorguieva Ivelina, Smith Claire, Cleverly Ann, Lahn Michael M, Raymond Eric, Benhadji Karim A, Giannelli Gianluigi. *LIVER INTERNATIONAL*
- One-stage percutaneous trans-hepatic biliary treatment for malignant jaundice: a safe, quick and economical treatment option. Fucilli Fabio, Raffaella Licinio, Lorusso Dionigi, Pietro Giorgio, Caruso Maria Lucia. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*
- Ramucirumab and GSK1838705A Enhance the Inhibitory Effects of Low Concentration Sorafenib and Regorafenib Combination on HCC Cell Growth and Motility. D'Alessandro Rosalba, Refolo Maria Grazia, Iacovazzi Palma Aurelia, Pesole Pasqua Letizia, Messa Caterina, Carr Brian Irving. *Cancers*
- Regorafenib compared with lomustine in patients with relapsed glioblastoma (REGOMA): a multicentre, open-label, randomised, controlled, phase 2 trial. Giuseppe Lombardi, Gian Luca De Salvo, Alba Ariela Brandes, Marica Eoli, Roberta Ruda, Marina Faedi, Lolli Ivan, Andrea Pace, Bruno Daniele, Francesco Pasqualetti, Simona Rizzato, Luisa Bellu, Ardi Pambuku, Miriam Farina, Giovanna Magni, Stefano Indraccolo, Marina Paola Gardiman, Riccardo Soffietti, Vittorina Zagonel. *LANCET ONCOLOGY*

- Signaling networks in cholangiocarcinoma: molecular pathogenesis, targeted therapies and drug resistance. Laura Fouassier, Marco Marzioni, Marta B. Afonso, Steven Dooley, Kevin Gaston, Giannelli Gianluigi, Cecilia M. P. Rodrigues, Elisa Lozano, MANCARELLA SERENA, Oreste Segatto, Javier Vaquero, Jose J. G. Marin, Cédric Coulouarn. LIVER INTERNATIONAL
- SVR12 rates higher than 99% after sofosbuvir/ velpatasvir combination in HCV infected patients with F0-F1 fibrosis stage: A real world experience. Alessandra Mangia, Valeria Piazzolla, Anna Giannelli, Egidio Visaggi, Nicola Minerva, Vincenzo Palmieri, Immacolata Carraturo, Domenico Potenza, Nicola Napoli, Gianfranco Lauletta, Vincenzo Tagarielli, Rosanna Santoro, Piccigallo Ernesto, Sergio De Gioia, Angelo Chimenti, Giuseppe Cuccorese, Antonio Metrangolo, Michele Mazzola, Ernesto Agostinacchio, Giuseppe Mennea, Carlo Sabbà, Marina Cela, Massimiliano Copetti, Ruggiero Losappio. PLoS One
- The Interactivity between TGF β and BMP Signaling in Organogenesis, Fibrosis, and Cancer. Dituri Francesco, Cossu Carla, MANCARELLA SERENA, Giannelli Gianluigi. Cells
- Transforming Growth Factor- Promotes Morphomechanical Effects Involved in Epithelial to Mesenchymal Transition in Living Hepatocellular Carcinoma. Mariafrancesca Cascione, Stefano Loporatti, Dituri Francesco, Giannelli Gianluigi. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES
- Tumor microenvironment immune types in gastric cancer are associated with mismatch repair however, not HER2 status. Valentini Annamaria, Di Pinto Federica, Coletta Sergio, Guerra Vito, Armentano Raffaele, Caruso Maria Lucia. Oncology Letters
- Validation of Hepatocellular Carcinoma Experimental Models for TGF-beta Promoting Tumor. MANCARELLA SERENA, Krol Silke, Crovace Alberto, Stefano Loporatti, Dituri Francesco, Martina Frusciante, Giannelli Gianluigi. Cancers

Linea 2 – Medicina Preventiva/Predittiva in Gastroenterologia

- A case report of esophageal actinomyces in an immunocompetent patient and review of the literature. Palmitessa Valeria, Renato Cuppone, Rosa Monno, Luciana Fumarola, Lippolis Antonio. New Microbiologica
- A Specific Mutation in Muc2 Determines Early Dysbiosis in Colitis-Prone Winnie Mice. Liso marina, Stefania De Santis, Verna Giulio, Dicarolo Manuela, Maria Calasso, Angelo Santino, Gigante Isabella, Rajaraman Eri, Sathuwarman Raveenthiraraj, Anastasia Sobolewski, Palmitessa Valeria, Lippolis Antonio, Mastronardi Mauro, Armentano Raffaele, Serino Grazia, Maria De Angelis, Marcello Chieppa. INFLAMMATORY BOWEL DISEASES
- Administration Timing Is the Best Clinical Outcome Predictor for Adalimumab Administration in Crohn's Disease. Mastronardi Mauro, Curlo Margherita, Cavalcanti Elisabetta, Burattini Osvaldo, Renato Cuppone, Tauro Romina, De Santis Stefania, Serino Grazia, Pesole Pasqua Letizia, STASI ELISA, Caruso Maria Lucia, Donghia Rossella, Guerra Vito, Pietro Giorgio, Marcello Chieppa. Frontiers in Medicine
- An uncommon etiology of pancreatitis after endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration. Osvaldo Burattini, Giuseppe Losurdo, Marangi Stefania, Curlo Margherita, Mastronardi Mauro, Pietro Giorgio, Pisani Antonio. ENDOSCOPY
- BACE inhibitors in clinical development for the treatment of Alzheimer's disease. Francesco Panza, Madia Lozupone, Vincenzo Solfrizzi, Sardone Rodolfo, Carla Piccininni, Vittorio Dibello, Roberta Stallone, Giannelli Gianluigi, Antonello Bellomo, Antonio Greco, Antonio Daniele, Davide Seripa, Giancarlo Logroscino, Bruno Imbimbo. Expert Review of Neurotherapeutics

- Curriculum for endoscopic submucosal dissection training in Europe: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Position Statement. Pedro Pimentel-Nunes, Mathieu Pioche, Eduardo Albéniz, Frieder Berr, Pierre Deprez, A. Ebigbo, Pieter Dewint, Aryn Haji, Panarese Alba, Bas L. A. M. Weusten, Evelien Dekker, James E. East, David S. Sanders, Gavin Johnson, Marianna Arvanitakis, Thierry Ponchon, Mário Dinis-Ribeiro, Raf Bisschops. *ENDOSCOPY*
- Endoscopic submucosal dissection: Italian national survey on current practices, training and outcomes. Roberta Maselli, Federico Iacopini, Francesco Azzolini, Lucio Petruzzello, Mauro Manno, Luca De Luca, Paolo Cecinato, Giancarla Fiori, Teresa Staiano, Erik Rosa Rizzotto, Stefano Angeletti, Angelo Caruso, Franco Coppola, Gianluca Andrisani, Edi Viale, Guido Missale, Panarese Alba, Alessandro Mazzocchi, Paola Cesaro, Mariachiara Campanale, Pietro Occhipinti, Ottaviano Tarantino, Cristiano Crosta, Piero Brosolo, Sandro Sferrazza, Emanuele Rondonotti, Arnaldo Amato, Lorenzo Fuccio, Guido Costamagna, Alessandro Repici. *Digestive Endoscopy*
- Gastric polyposis and desmoid tumours as a new familial adenomatous polyposis clinical variant associated with APC mutation at the extreme 3'-end. Disciglio Vittoria, Fasano Candida, Filomena Cariola, Forte Giovanna, Grossi Valentina, Paola Sanese, Lepore Signorile Martina, Nicoletta Resta, Lotesoriere Claudio, Alessandro Stella, Lolli Ivan, Cristiano Simone. *JOURNAL OF MEDICAL GENETICS*
- Germline pathogenic variant in PIK3CA leading to symmetrical overgrowth with marked macrocephaly and mild global developmental delay. Zollino Marcella, Ranieri Carlotta, Grossi Valentina, Leoni Chiara, Lattante Serena, Mazzà Daniela, Cristiano Simone, Resta Nicoletta. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*
- Iatrogenic Kaposi sarcoma of the terminal ileum following short-term treatment with immunomodulators for Crohn disease. STASI ELISA, De Santis Stefania, Cavalcanti Elisabetta, Armentano Raffaele. *MEDICINE*
- Mucin phenotype of Differentiated Early Gastric Cancer: an immunohistochemistry study supporting therapeutic decision making. Cavalcanti Elisabetta, Francesco De Michele, Lantone Giulio, Panarese Alba, Caruso Maria Lucia. *Cancer Management and Research*
- Pharmacotherapy for the treatment of depression in patients with Alzheimer's disease: a treatment-resistant depressive disorder. Madia Lozupone, Maddalena La Montagna, Francesca D'Urso, Carla Piccininni, Sardone Rodolfo, Vittorio Dibello, Giannelli Gianluigi, Vincenzo Solfrizzi, Antonio Greco, Antonio Daniele, Nicola Quaranta, Davide Seripa, Antonello Bellomo, Giancarlo Logroscino, Francesco Panza. *EXPERT OPINION ON PHARMACOTHERAPY*
- Quercetin Exposure Suppresses the Inflammatory Pathway in Intestinal Organoids from Winnie Mice. Dicarlo Manuela, Teti Gabriella, Verna Giulio, Iiso Marina, Cavalcanti Elisabetta, Sila Annamaria, Raveenthiraraj Sathuwarman, Mastronardi Mauro, Santino Angelo, Serino Grazia, Lippolis Antonio, Sobolewski Anastasia, Falconi Mirella, Marcello Chieppa. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES*
- Quercetin-Induced miR-369-3p Suppresses Chronic Inflammatory Response Targeting C/EBP-beta. Galleggiante Vanessa, De Santis Stefania, Iiso Marina, Verna Giulio, Sommella Eduardo, Mastronardi Mauro, Campiglia Pietro, Marcello Chieppa, Serino Grazia. *MOLECULAR NUTRITION & FOOD RESEARCH*
- Safety and efficacy of non-steroidal anti-inflammatory drugs to reduce ileus after colorectal surgery - EuroSurg Collaborative, A. Spinelli, M. Marco, F. Di Candido, M. Bevilacqua, D. Tringali, E. Bevilacqua, V. Panizzo, Gn. Piozzi, Marino Fabio, F. Carbone, P. Incollingo, FM. Romano. *BRITISH JOURNAL OF SURGERY*
- The Activation Status of the TGF-β Transducer Smad2 Is Associated With a Reduced Survival in Gastrointestinal Cancers: A Systematic Review and Meta-Analysis. Iliaria Girolami, Nicola Veronese, Lee Smith, Caruso Maria Gabriella, Reddavid Rosa, Leandro

Linea 3 – Medicina Partecipativa in Gastroenterologia

- A Simplified Genomic Profiling Approach Predicts Outcome in Metastatic Colorectal Cancer. Carlo Capalbo, Francesca Belardinilli, Domenico Raimondo, Edoardo Milanetti, Umberto Malapelle, Pasquale Pisapia, Valentina Magri, Alessandra Prete, Silvia Pecorari, Mariarosaria Colella, Anna Coppa, Bonfiglio Caterina, Arianna Nicolussi, Virginia Valentini, Alessandra Tessitore, Beatrice Cardinali, Marialaura Petroni, Paola Infante, Matteo Santoni, Marco Filetti, Valeria Colicchia, Paola Paci, Silvia Mezi, Flavia Longo, Enrico Cortesi, Paolo Marchetti, Giancarlo Troncone, Diana Bellavia, Gianluca Canettieri, Giuseppe Giannini. *Cancers*
- An In Vitro Study on Mitochondrial Compensatory Response Induced by Gliadin Peptides in Caco-2 Cells. Orlando Antonella, Chimienti Guglielmina, Pesce Vito, Fracasso Flavio, Lezza Angela Maria Serena, Russo Francesco. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES*
- Association of the Glycaemic Index and Glycaemic Load With Colorectal Cancer in the Population of Córdoba (Argentina): Results of a Case-Control Study Using a Multilevel Modelling Approach. Eugenia Haluszka, Valentina Luciana Dávila, Laura Rosana Aballay, Maria del Pilar Diaz, Osella Alberto Ruben, Camila Niclis. *BRITISH JOURNAL OF NUTRITION*
- Biopsychosocial frailty and the risk of incident dementia: The Italian longitudinal study on aging. Vincenzo Solfrizzi, Emanuele Scafato, Madia Lozupone, Davide Seripa, Andrea Schilardi, Carlo Custodero, Sardone Rodolfo, Lucia Galluzzo, Claudia Gandin, Marzia Baldereschi, Antonio Di Carlo, Domenico Inzitari, Giannelli Gianluigi, Antonio Daniele, Carlo Sabbà, Giancarlo Logroscino, Francesco Panza. *Alzheimers & Dementia*
- Chronic functional constipation is strongly linked to vitamin D deficiency. Panarese Alba, Pesce Francesco, Pietro Porcelli, Riezzo Giuseppe, Iacovazzi Palma Aurelia, Leone Carla Maria, De Carne Massimo, Rinaldi Caterina Mammone, Shahini Endrit. *WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY*
- Collagen proportionate area is an independent predictor of long-term outcome in patients with non-alcoholic fatty liver disease. Buzzetti Elena, Hall Andrew, Ekstedt Mattias, Manuguerra Roberta, Guerrero Misa Marta, Covelli Claudia, Leandro Gioacchino, Luong TuVinh, Kechagias Stergios, Manesis Emanuel K, Pinzani Massimo, Dhillon Amar P, Tsochatzis Emmanuel A. *ALIMENTARY PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS*
- Comparative analysis of 2 commercial molecular tests for the detection of gastroenteric viruses on stool samples. Sciandra Ilaria, Livia Piccioni, L. Coltella, S. Ranno, Giannelli Gianluigi, F. Falasca, Guido Antonelli, C. Concato, O. Turriziani. *DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASE*
- Deletion of OGG1 Results in a Differential Signature of Oxidized Purine Base Damage in mtDNA Regions. Chimienti Guglielmina, Pesce Vito, Fracasso Flavio, Russo Francesco, de Souza-Pinto Nadja Cristhina, Bohr Wilhelm A, Lezza Angela Maria Serena. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES*
- Diagnosis of chronic anaemia in gastrointestinal disorders: A guideline by the Italian Association of Hospital Gastroenterologists and Endoscopists (AIGO) and the Italian Society of Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition (SIGENP). Luca Elli, Lorenzo Norsa, Angelo Zullo, Antonio Carroccio, Carlo Girelli, Salvatore Oliva, Claudio Romano, Leandro Gioacchino, Massimo Bellini, Riccardo Marmo, Marco Soncini, Fabio Monica,

- Vincenzo De Francesco, Emma Paulon, Maria Domenica Cappellini, Irene Motta, Francesca Ferretti, Stefania Orlando, Pasquale Mansueto, Elisabetta Buscarini, Guido Manfredi, Carlo Agostoni, Carolina Tomba, Renato Cannizzaro. DIGESTIVE AND LIVER DISEASE
- Diet Quality, Obesity and Breast Cancer Risk: An Epidemiologic Study in Cordoba, Argentina. Julia Becaria Coquet, Victor Ramón Caballero, María Cecilia Camisasso, María Florencia González, Camila Niclis, María Dolores Román, Sonia Edith Muñoz, Carla M. Leone, Procino Filippo, Osella Alberto Ruben, Laura Rosana Aballay. NUTRITION AND CANCER-AN INTERNATIONAL JOURNAL
 - Dietary inflammatory index and mortality: a cohort longitudinal study in a Mediterranean area. Nicola Veronese, CISTERNINO ANNA MARIA, Nitin Shivappa, James R. Hébert, Notarnicola Maria, Reddavid Rosa, Rosa Inguaggiato, Guerra Vito, Antonio Logroscino, Rotolo Ornella, Marisa Chiloiro, Leandro Gioacchino, De Leonardis Giampiero, Tutino Valeria, Giovanni Misciagna, L Fontana, Caruso Maria Gabriella. JOURNAL OF HUMAN NUTRITION AND DIETETICS
 - Differences in Liver TFAM Binding to mtDNA and mtDNA Damage between Aged and Extremely Aged Rats. Chimienti Guglielmina, Picca Anna, Fracasso Flavio, Marzetti Emanuele, Calvani Riccardo, Leeuwenburgh Christiaan, Russo Francesco, Lezza Angela Maria Serena, Pesce Vito. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES
 - Effects of Long-Term Administration of Lactobacillus Reuteri DSM-17938 on Circulating Levels of 5-HT and BDNF in Adults With Functional Constipation. Riezzo Giuseppe, Guglielmina Chimienti, Orlando Antonella, Benedetta D'Attoma, Caterina Clemente, Russo Francesco. Beneficial Microbes
 - Effects of some food components on non-alcoholic fatty liver disease severity. Mirizzi Antonella, Franco Isabella, Leone Carla Maria, Bonfiglio Caterina, cozzolongo raffaele, Notarnicola Maria, Giannuzzi Vito, Tutino Valeria, De Nunzio Valentina, Bruno Irene, Buongiorno Claudia, Campanella Angelo, Valentina Deflorio, Pascale Annamaria, Procino Filippo, Sorino Paolo, Osella Alberto Ruben. Nutrients
 - Fatty acid synthase inhibitor orlistat impairs cell growth and down-regulates PD-L1 expression of a human T-cell leukemia line. Giorgia Cioccoloni, Angelo Aquino, Notarnicola Maria, Caruso Maria Gabriella, Enzo Bommassar, Manuela Zonfrillo, Simona Caporali, Isabella Faraoni, Cristina Villivà, Maria Pia Fuggetta, Ornella Franzese. JOURNAL OF CHEMOTHERAPY
 - Fatty liver and mortality: a cohort population study in south Italy. Caruso Maria Gabriella, Nicola Veronese, Notarnicola Maria, CISTERNINO ANNA MARIA, Reddavid Rosa, Inguaggiato Rosa, Guerra Vito, Donghia Rossella, Logroscino Antonio, Rotolo Ornella, Chiloiro Marisa, Leandro Gioacchino, De Leonardis Giampiero, Tutino Valeria, Misciagna G, Bonfiglio Caterina, Guerra Rocco, Osella Alberto Ruben. BMJ Open
 - Five common errors to avoid in clinical practice: the Italian Association of Hospital Gastroenterologists and Endoscopists (AIGO) choosing wisely campaign. STASI ELISA, Andrea Michielan, Gaetano Cristian Morreale, Alessandro Tozzi, Ludovica Venezia, Francesco Bortoluzzi, Omero Triossi, Marco Soncini, Leandro Gioacchino, Giuseppe Milazzo. Internal and Emergency Medicine
 - Hospital admission for digestive diseases: Gastroenterology units offer a more effective and efficient care. Antonio Balzano, Flavia Carle, Cristina Tamburini, Fabio Monica, Giuseppe Milazzo, Paolo Spolaore, Marco Galadini, Fulvio Basili, Luigi Ricciardiello, Elisabetta Buscarini, Leandro Gioacchino. DIGESTIVE AND LIVER DISEASE
 - Investigation on the allergen profile of the soluble fraction of autoclaved peanuts and its interaction with Caco-2 cells. Bavaro Simona L, Orlando Antonella, De Angelis Elisabetta, Russo Francesco, Monaci Linda. Food & Function

- Low prevalence of Gemycircularvirus DNA in immunocompetent and immunocompromised subjects. Lisa Macera, Pietro Giorgio Spezia, Chiara Medici, Francesca Falasca, Sciandra Ilaria, Guido Antonelli, Daniele Focosi, Mauro Pistello, Fabrizio Maggi. *New Microbiologica*
- Magnesium and Health Outcomes: An Umbrella Review of Systematic Reviews and Meta-Analyses of Observational and Intervention Studies. Nicola Veronese, Jacopo Demurtas, Gabriella Pesolillo, Stefano Celotto, Tommaso Barnini, Giovanni Calusi, Caruso Maria Gabriella, Notarnicola Maria, Reddavide Rosa, Brendon Stubbs, Marco Solmi, Stefania Maggi, Alberto Vaona, Joseph Firth, Lee Smith, Ai Koyanagi, Ligia Dominguez, Mario Barbagallo. *EUROPEAN JOURNAL OF NUTRITION*
- Mediterranean diet and knee osteoarthritis outcomes: A longitudinal cohort study. Nicola Veronese, Ai Koyanagi, Brendon Stubbs, Cyrus Cooper, Giuseppe Guglielmi, Rene Rizzoli, Leandro Punzi, Domenico Rogoli, Caruso Maria Gabriella, Rotolo Ornella, Notarnicola Maria, Nasser Al-Daghri, Lee Smith, Jean-Yves Reginster, Stefania Maggi. *CLINICAL NUTRITION*
- Mediterranean Diet Pyramid: A Proposal for Italian People. A Systematic Review of Prospective Studies to Derive Serving Sizes. Annunziata D'Alessandro, Lampignano Luisa, Giovanni De Pergola. *Nutrients*
- Non-alcoholic fatty liver disease is associated with higher metabolic expenditure in overweight and obese subjects: A Case-Control Study. Reddavide Rosa, CISTERNINO ANNA MARIA, Inguaggiato Rosa, Rotolo Ornella, Zinzi Iris, Nicola Veronese, Guerra Vito, Fucilli Fabio, Di Giovanni Giuseppe, Leandro Gioacchino, Giannico Sara, Caruso Maria Gabriella. *Nutrients*
- Nutritional interventions and cognitive-related outcomes in patients with late-life cognitive disorders: A systematic review. Vincenzo Solfrizzi, Pasquale Agosti, Madia Lozupone, Carlo Custodero, Andrea Schilardi, Vincenzo Valiani, Andrea Santamato, Sardone Rodolfo, Vittorio Dibello, Luca Dilena, Roberta Stallone, Maurizio Ranieri, Antonello Bellomo, Antonio Greco, Antonio Daniele, Davide Seripa, Carlo Sabbà, Giancarlo Logroscino, Francesco Panza. *NEUROSCIENCE AND BIOBEHAVIORAL REVIEWS*
- Promising therapies for the treatment of frontotemporal dementia clinical phenotypes: from symptomatic to disease-modifying drugs. Giancarlo Logroscino, Bruno P. Imbimbo, Madia Lozupone, Sardone Rodolfo, Rosa Capozzo, Petronilla Battista, Chiara Zecca, Vittorio Dibello, Giannelli Gianluigi, Antonello Bellomo, Antonio Greco, Antonio Daniele, Davide Seripa, Francesco Panza. *EXPERT OPINION ON PHARMACOTHERAPY*
- Real-life Glecaprevir/Pibrentasvir in a Large Cohort of Patients With Hepatitis C Virus Infection: The MISTRAL Study. Marcello Persico, Andrea Aglitti, Michele Milella, Carmine Coppola, Vincenzo Messina, Ernesto Claar, Ivan Gentile, Fernando Sogari, Paola Pierri, Lorenzo A. Surace, Filomena Morisco, Paolo Tundo, Giuseppina Brancaccio, Gaetano Serviddio, Pietro Gatti, Antonio P. Termite, Giovan G. Di Costanzo, Benedetto Caroleo, cozzolongo raffaele, Nicola Coppola, Annamaria Longo, Luca Fontanella, Alessandro Federico, Valerio Rosato, Irene Terrenato, Mario Masarone. *LIVER INTERNATIONAL*
- Sensorial frailty: age-related hearing loss and the risk of cognitive impairment and dementia in later life. Francesco Panza, Madia Lozupone, Sardone Rodolfo, Petronilla Battista, Marco Piccininni, Vittorio Dibello, Maddalena La Montagna, Roberta Stallone, Pietro Venezia, Angelo Liguori, Giannelli Gianluigi, Antonello Bellomo, Antonio Greco, Antonio Daniele, Davide Seripa, Nicola Quaranta, Giancarlo Logroscino. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*
- Social Dysfunction in Older Age and Relationships with Cognition, Depression, and Apathy. Lozupone Madia, Panza Francesco, Piccininni Marco, Copetti Massimiliano, Sardone Rodolfo, Imbimbo Bruno P, Stella Eleonora, D'Urso Francesca, Barulli Maria Rosaria, Battista Petronilla, Grasso Alessandra, Tortelli Rosanna, Capozzo Rosa, Coppola Francesco,

- Abbrescia Daniela Isabel, Bellomo Antonello, Giannelli Gianluigi, Quaranta Nicola, Seripa Davide, Logroscino Giancarlo. JOURNAL OF ALZHEIMERS DISEASE
- The Age-related Central Auditory Processing Disorder: Silent Impairment of the Cognitive Ear. Sardone Rodolfo, Petronilla Battista, Francesco Panza, Madia Lozupone, Griseta Chiara, Castellana Fabio Stefano, Rosa Capozzo, Maria Ruccia, Emanuela Resta, Davide Seripa, Giancarlo Logroscino, Nicola Quaranta. Frontiers in Neuroscience
 - The Association between Dietary Magnesium Intake and Magnetic Resonance Parameters for Knee Osteoarthritis. Nicola Veronese, La Tegola Luciana, Caruso Maria Gabriella, Maggi Stefania, Guglielmi Giuseppe. Nutrients
 - The Challenge of Antidepressant Therapeutics in Alzheimer's Disease. Madia Lozupone, Maddalena La Montagna, Francesca D'Urso, Carla Piccininni, Angelo Rinaldi, Massimiliano Beghi, Cesare Maria Cornaggia, Sardone Rodolfo, Vincenzo Solfrizzi, Antonio Daniele, Davide Seripa, Giannelli Gianluigi, Antonello Bellomo, Francesco Panza. Advances in Experimental Medicine and Biology
 - The relationship between dietary vitamin K and depressive symptoms in late adulthood: a cross-sectional analysis from a large cohort study. Francesco Bolzetta, Nicola Veronese, Brendon Stubbs, Marianna Noale, Alberto Vaona, Jacopo Demurtas, Stefano Celotto, Chiara Cacco, Alberto Cester, Caruso Maria Gabriella, Reddavid Rosa, Notarnicola Maria, Stefania Maggi, Ai Koyanagi, Michele Fornaro, Joseph Firth, Lee Smith, Marco Solmi. Nutrients
 - Trends in Adherence to the Mediterranean Diet in South Italy: A Cross Sectional Study. Nicola Veronese, Notarnicola Maria, CISTERNINO ANNA MARIA, Rosa Inguaggiato, Guerra Vito, Reddavid Rosa, Donghia Rossella, Rotolo Ornella, Iris Zinzi, Leandro Gioacchino, Tutino Valeria, Giovanni Misciagna, Caruso Maria Gabriella. NUTRITION METABOLISM AND CARDIOVASCULAR DISEASES
 - Uric acid and potassium serum levels are independent predictors of blood pressure non-dipping in overweight or obese subjects. Zupo Roberta, Castellana Fabio Stefano, Boninfante Barbara, Lampignano Luisa, Lattanzio Antonio, Sardone Rodolfo, Giannelli Gianluigi, De Pergola Giovanni. Nutrients
 - Women in LOVE: Lacto-Ovo-Vegetarian Diet Rich in Omega-3 Improves Vasomotor Symptoms in Postmenopausal Women. An Exploratory Randomized Controlled Trial. Rotolo Ornella, Iris Zinzi, Nicola Veronese, CISTERNINO ANNA MARIA, Reddavid Rosa, Rosa Inguaggiato, Leandro Gioacchino, Notarnicola Maria, Tutino Valeria, De Nunzio Valentina, De Leonardis Giampiero, Guerra Vito, Donghia Rossella, Fucilli Fabio, Raffaella Licinio, Anna Mastrosimini, Caterina Rinaldi, Tiziana Daddabbo, Nicola Giampaolo, Palma Anna Iacovazzi, Giannico Sara, Caruso Maria Gabriella. Endocrine Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets

Castellana Grotte, li 30 giugno 2020

Il Direttore Scientifico
Prof. Gianluigi Giannelli

