

Digital droplet PCR su biopsia liquida e modelli computazionali per l'ottimizzazione della diagnosi precoce del melanoma cutaneo

Sezione LILT Proponente: Catania

Responsabile Scientifico Dr. Saverio Candido

1. Premesse e rationale

Il melanoma cutaneo è il tumore della pelle più aggressivo. Esso è maggiormente frequente nel mondo occidentale con un'incidenza annua dell'1,6% (circa 120.000 nuovi casi; GLOBOCAN 2012) (Ferlay J et al, 2013). Oggi il melanoma cutaneo rappresenta una delle maggiori sfide terapeutiche in quanto il management della malattia è difficoltoso e non sempre le terapie risultano efficaci. Spesso la prognosi del melanoma cutaneo è negativa, soprattutto quanto diagnosticato negli stadi avanzati della malattia poiché la presenza di numerose alterazioni molecolari favoriscono l'insorgenza di meccanismi di resistenza che rendono inefficaci gli attuali approcci terapeutici utilizzati (Manzano JL et al, 2016).

Numerosi studi sul melanoma cutaneo hanno mostrato come mutazioni a carico dei pathways Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK) e PI3K/AKT (AKT) rappresentano un fattore determinante nell'induzione della proliferazione cellulare incontrollata, nell'inibizione dei processi apoptotici e nello sviluppo di meccanismi di resistenza ai trattamenti chemioterapici (McCubrey JA et al, 2012). L'attivazione di questi pathways è spesso dovuta a mutazioni specifiche, alcune delle quali già note e ampiamente descritte, a carico dei geni di Ras, PTEN, PI3K e B-RAF (McCubrey et al, 2012). La precisa caratterizzazione delle mutazioni presenti, come ad esempio presenza di mutazione B-RAF^{V600E} o PI3KCA^{H1047R} (Hugdahl E et al, 2016; Candido et al, 2014), in un soggetto predisposto allo sviluppo di melanoma per familiarità genetica, numero di nevi o esposizione cronica o intermittente a raggi UV, potrebbe essere utile per predire l'insorgenza di melanoma e il comportamento biologico del tumore ad un dato trattamento, nonché la possibilità di predire lo sviluppo di recidive. Oggi per la caratterizzazione molecolare di un tumore è possibile ricorrere a metodiche meno invasive e demolitive e con costi contenuti come la biopsia liquida, ovvero, l'analisi del DNA tumorale circolante (ctDNA). Da un semplice prelievo di sangue è infatti possibile isolare le molecole di DNA rilasciate in circolo dalle cellule tumorali e da queste stabilire le caratteristiche genetiche del tumore (Qin Z et al, 2016).

Inoltre, un numero sempre crescente di lavori scientifici mostra come l'applicazione di sistemi di modellistica computazionale in campo bio-medico possa essere di supporto alle attività di prevenzione, diagnosi e cura delle malattie. L'analisi *in silico* viene sempre di più adoperata per analizzare i cambiamenti molecolari (pattern mutazionali) che avvengono nelle cellule tumorali (Pennisi M et al, 2016). L'analisi computazionale di uno specifico pattern mutazionale è quindi di supporto alla medicina di precisione poiché in grado di scoprire nuovi target molecolari utili per la costruzione di nuove terapie personalizzate allo scopo di impedire lo sviluppo di meccanismi di resistenza del tumore nei confronti dei farmaci antitumorali.

Il melanoma cutaneo rappresenta un ottimo modello tumorale per l'applicazione di sistemi computazionali proprio per il suo assetto molecolare estremamente variabile e per i dati disponibili

riguardanti le alterazioni geniche a carico dei pathways precedentemente citati (Pappalardo F et al, 2016).

L'utilizzo di questi modelli computazionali non solo permette di disegnare terapie personalizzate per ogni paziente del quale si conoscono le mutazioni a carico dei pathways ma, sulla base delle mutazioni riscontrate, permette anche di predire lo sviluppo di melanoma quando la malattia non è ancora conclamata e stabilire se il tumore è resistente o meno ai trattamenti farmacologici utilizzati.

2. Ipotesi scientifica

L'ipotesi qui formulata è che l'identificazione di mutazioni a carico dei pathways Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK) e PI3K/AKT (AKT) mediante biopsia liquida direttamente nel plasma di soggetti a rischio di sviluppo di melanoma cutaneo permetterebbe di diagnosticare la malattia in uno stadio precoce diminuendo le complicanze dovute ad un tumore aggressivo quale è il melanoma cutaneo. Una seconda ipotesi è che l'individuazione di specifiche mutazioni a carico dei pathways MAPKs e AKT, mediante biopsia liquida, possa essere utilizzata come tool diagnostico per prevenire lo sviluppo di recidive o l'insorgenza di meccanismi di resistenza alle terapie biologiche mirate correntemente utilizzate. Inoltre, la simulazione *in silico* sul funzionamento dei pathways molecolari oggetto di studio, che tiene conto delle alterazioni geniche osservate nel ctDNA dei pazienti, potrebbe fornire nuove indicazioni per lo sviluppo di approcci terapeutici personalizzati (monoterapia o terapia combinata) specifici per il pattern mutazionale di ogni paziente in grado di evitare lo sviluppo di resistenza alla terapia.

3. Obiettivi

Nel presente progetto, mediante biopsia liquida, verranno ricercate le principali mutazioni che coinvolgono i pathways MAPKs e AKT direttamente nel plasma di soggetti predisposti allo sviluppo di melanoma cutaneo tramite l'analisi del DNA tumorale circolante utilizzando la tecnologia ad alta sensibilità della digital droplet PCR.

Inoltre, l'individuazione di queste mutazioni consentirà di stabilire un pattern mutazionale tipico dei pazienti maggiormente predisposti allo sviluppo di recidive o all'insorgenza di meccanismi di resistenza farmacologica. Ciò consentirà di diagnosticare in maniera precoce quali soggetti sono maggiormente a rischio di ricaduta per poter intervenire tempestivamente con nuovi trattamenti personalizzati.

Le mutazioni identificate verranno infine utilizzate per istruire il modello computazionale disponibile presso l'Università di Catania e di simulare *in silico* la risposta farmacologica del tumore al fine di suggerire nuove strategie terapeutiche in grado di aumentare l'efficacia farmacologica e impedire lo sviluppo di resistenze.

Tale modello computazionale open source potrà essere reso disponibile ai clinici per suggerire interventi personalizzati in grado di superare i fenomeni di resistenza.

4. Materiali e metodi

La rete collaborativa posta in essere tra Sezione provinciale LILT di Catania, Sezione provinciale LILT di Caserta e Istituto Nazionale Tumori "G. Pascale" di Napoli si occuperà di arruolare i soggetti

predisposti allo sviluppo di melanoma cutaneo e i pazienti già affetti da malattia appartenenti alle aree metropolitane di Catania, Caserta e Napoli. Ai fini dello studio verranno arruolati soggetti di sesso femminile e maschile ai quali verrà somministrato un questionario validato per raccogliere tutti i dati socio-demografici. I dati clinici invece saranno desunti dalle cartelle cliniche di ciascun paziente e verranno utilizzati per la trattazione statistica degli stessi.

Per la biopsia liquida ogni soggetto verrà sottoposto a 2 prelievi di sangue periferico, uno per la separazione del siero e il secondo prelievo per la separazione di plasma e buffy coat. Dopo aver effettuato i due prelievi ematici, le due provette verranno centrifugate a 2500 rpm per 5 minuti per far separare la componente liquida dalla componente corpuscolata del sangue. Le stock di plasma, siero e buffy coat così ottenute verranno congelate a -80°C e spedite presso il laboratorio di ricerca della LILT di Catania per la successiva analisi biomolecolari.

Dai campioni di plasma verrà estratto il DNA tumorale circolante mediante appositi kit commerciali. Il DNA così ottenuto verrà utilizzato per la ricerca delle principali mutazioni a carico dei geni coinvolti nei pathways sopracitati. L'analisi verrà condotta mediante analisi in digital droplet PCR (Bio-Rad Laboratories, Inc, California, USA) in grado di determinare la presenza di una copia del gene mutato con una sensibilità di 1:200.000 copie.

Questa prima fase consentirà di stabilire quali soggetti a rischio di melanoma presentano le mutazioni prese in esame e stabilire il pattern mutazionale presente nei pazienti in stato iniziale o avanzato di malattia e di distinguere i pazienti a basso ed alto rischio di sviluppo di recidiva o di meccanismi di farmaco-resistenza.

Il pattern mutazionale determinato in maniera specifica per ogni paziente verrà in seguito inserito all'interno del modello computazionale realizzato dall'Unità operativa diretta dal prof. Francesco Pappalardo disponibile presso il Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università di Catania. Tale modello, facendo ricorso ad equazioni differenziali e reti Booleane, è in grado di riprodurre la cascata dinamica dei pathways Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK) e PI3K/AKT (AKT) tenendo conto delle mutazioni riscontrate. Ciò consentirà di simulare *in silico* la risposta biologica del tumore alle terapie convenzionali e di proporre un piano terapeutico personalizzato al fine di aumentare l'efficienza terapeutica e ridurre il rischio di recidive o di meccanismi di resistenza.

5. Modalità di misurazione dei risultati

I risultati relativi alle mutazioni a carico dei pathways Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK) e PI3K/AKT (AKT), analizzate mediante Digital Droplet PCR (Bio-Rad Laboratories, Inc, California, USA) che permette di quantificare il numero di copie mutate per mL presenti nel campione di DNA circolante tumorale.

I risultati ottenuti dall'analisi computazionale verranno espressi come incremento o decremento dei valori di AKT ed ERK (effettori finali dei pathways sopracitati) ottenuti dall'analisi *in silico* dei pathways nelle seguenti condizioni: a) in assenza di mutazioni (condizione basale); b) in presenza di mutazioni identificate per ogni paziente; c) in presenza di trattamento farmacologico. Le variazioni di espressione di AKT ed ERK prese qui in esame verranno espresse in mmol/ml.

I risultati relativi ai dati clinici dei pazienti arruolati quali mutazioni a carico di Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK), mutazioni a carico di PI3K/AKT (AKT), grandezza del tumore, livello di Clark, spessore di Breslow, infiltrazione linfonodale e presenza di metastasi verranno estrapolati dalle cartelle cliniche

disponibili. La raccolta di tali dati permetterà di definire differenti cluster di pazienti (es. basso, medio ed alto rischio di recidiva).

6. Analisi statistica

Verrà condotta l'analisi differenziale mediante opportuni test statistici (Wilcoxon e Mann-Whitney t di Student e ANOVA) dell'abbondanza relativa di mutazioni a carico dei geni coinvolti nei meccanismi di regolazione dei pathways Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK) e di PI3K/AKT (AKT) tra i gruppi di pazienti stratificati in base alle varie caratteristiche clinico-patologiche del tumore.

References

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on day/month/year.
2. Manzano JL, Layos L, Bugés C, de Los Llanos Gil M, Vila L, Martínez-Balibrea E, Martínez-Cardús A. Resistant mechanisms to BRAF inhibitors in melanoma. *Ann Transl Med.* 2016 Jun;4(12):237. doi: 10.21037/atm.2016.06.07.
3. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Montalto G, Cervello M, Nicoletti F, Fagone P, Malaponte G, Mazzarino MC, Candido S, Libra M, Bäsecke J, Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Milella M, Tafuri A, Cocco L, Evangelisti C, Chiarini F, Martelli AM. Mutations and deregulation of Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascades which alter therapy response. *Oncotarget.* 2012 Sep;3(9):954-87.
4. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Franklin RA, Montalto G, et al. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR Cascade Inhibitors: How Mutations Can Result in Therapy Resistance and How to Overcome Resistance. *Oncotarget.* 2012;3: 1068–1111.
5. Hugdahl E, Kalvenes MB, Puntervoll HE, Ladstein RG, Akslen LA. BRAF-V600E expression in primary nodular melanoma is associated with aggressive tumour features and reduced survival. *Br J Cancer.* 2016 Mar 29;114(7):801-8. doi: 10.1038/bjc.2016.44.
6. Candido S, Rapisarda V, Marconi A, et al. Analysis of the B-RAFV600E mutation in cutaneous melanoma patients with occupational sun exposure. *Oncol Rep.* 2014;31:1079-1082
7. Pennisi M, Russo G, Di Salvatore V, Candido S, Libra M, Pappalardo F. Computational modeling in melanoma for novel drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 2016 Jun;11(6):609-21. doi: 10.1080/17460441.2016.1174688.
8. Qin Z, Ljubimov VA, Zhou C, Tong Y, Liang J. Cell-free circulating tumor DNA in cancer. *Chin J Cancer.* 2016 Apr 7;35:36. doi: 10.1186/s40880-016-0092-4.
9. Computational Modeling of PI3K/AKT and MAPK Signaling Pathways in Melanoma Cancer. Pappalardo F, Russo G, Candido S, Pennisi M, Cavalieri S, Motta S, McCubrey JA, Nicoletti F, Libra M. *PLoS One.* 2016 Mar 25;11(3):e0152104. doi: 10.1371/journal.pone.0152104.