

## 2. Progetto di ricerca presentato dalla sede LILT di Trento

### **Innovazione nella diagnosi tempestiva del melanoma invasivo: approccio basato su marcatori presenti in melanosomi e su test preclinici in modelli sperimentali.**

#### *Premesse e razionale*

Il melanoma è un tumore maligno che origina dai melanociti della cute e delle mucose. Il melanoma ha un decorso progressivo a stadi, caratterizzati da aspetti istologici e prognostici diversi, che portano ad una classificazione dei melanomi secondo Breslow in millimetri di spessore (*Breslow, 1970*). Nel primo stadio il melanoma cutaneo ha uno spessore inferiore a 0,75 mm e prognosi favorevole, se sottoposto ad una pronta rimozione chirurgica. Per spessori crescenti, corrispondenti a stadi progressivi d'infiltrazione del tessuto circostante e alla formazione di metastasi, la prognosi del melanoma è sempre meno favorevole. E' quindi evidente che prevenire la progressione da melanoma in situ a melanoma infiltrante rappresenta una strategia promettente per ridurre la mortalità che è dovuta esclusivamente alla formazione di metastasi.

#### *Ipotesi scientifica alla base del progetto*

Studi recenti (*Dror et al., 2016; commentato da Anelli e Mione, 2016*) hanno dimostrato il ruolo di RNA non codificanti (ncRNAs) nel promuovere l'invasione locale e metastatica del melanoma in situ attraverso un trasferimento diretto di ncRNAs al tessuto circostante. Secondo tale studio, I principali vettori del trasferimento sono i melanosomi, organelli specifici dei melanociti che in condizioni fisiologiche servono a trasferire melanina alle cellule dell'epidermide per proteggerla dai raggi UV.

Poiché la progressione del melanoma ha inizio con l'infiltrazione localizzata del derma, cui fa seguito la diffusione metastatica attraverso il sistema vascolare e linfatico, la possibilità di prevenire l'infiltrazione attraverso un blocco del rilascio di melanosomi contenenti RNA non codificanti con potenzialità pro-oncogenica, rappresenta un approccio concreto e precoce di prevenzione dei processi di metastatizzazione del melanoma.

#### *Obiettivi, descritti come obiettivi generali del progetto*

L'obiettivo principale del nostro progetto è l'identificazione di RNA non codificanti contenuti nei melanosomi, che agiscono come "istruttori" per i fibroblasti del derma e allo stesso tempo rappresentano dei marcatori facilmente rilevabili del processo d'invasione (punto 1 e 2 del disegno sperimentale). Il secondo obiettivo è quello di utilizzare modelli sperimentali per l'identificazione di farmaci che blocchino il rilascio dei melanosomi o il loro uptake da parte delle cellule target (punto 3 del disegno sperimentale). A tale proposito indagheremo sulle proprietà di farmaci già approvati dall'Agenzia Europea del Farmaco per usi in altre patologie, per favorirne l'immediato nuovo utilizzo nella pratica clinica.

#### *Materiali e metodi, comprensivi del materiale oggetto dello studio, degli esami e delle analisi necessari per condurre lo studio, delle metodologie di ricerca*

Il disegno sperimentale del progetto è basato su 3 linee di azione:

1) analisi di linee cellulari di melanociti e melanoma, per identificare le principali specie di RNA codificante e non-codificante presenti nei melanosomi mediante tecniche d'isolamento degli organelli e sequenziamento massivo (*Watanabe et al., 2005*).

2) analisi di campioni di nevi, melanoma e melanoma metastatico (collezionati al momento della rimozione chirurgica e da campioni paraffinati), per validare i dati ottenuti in cellule in coltura mediante PCR quantitativa (qPCR) e ibridazione in situ.

3) Screening preclinico in colture cellulari e nel modello di melanoma progressivo in zebrafish (*Santoriello et al., 2010 PLoS One, 5(12): e15170*), con una libreria di farmaci approvati da EMA (European Medicines Agency) e già in uso nella clinica per altri scopi, per identificazione farmaci che blocchino il rilascio di melanosomi o l'uptake di ncRNAs da parte dei fibroblasti del derma. Il materiale oggetto dello studio è rappresentato da colture cellulari di melanoma (MALME-3M e SK-MEL-28) e di melanociti primari (HEMn-LP), da materiale paraffinato proveniente dalla Trentino Biobank (melanomi in situ, infiltranti e nevi), da campioni freschi (melanomi in situ, infiltranti e nevi), e da zebrafish della linea Kita: Ras, che sviluppa melanomi (*Santoriello et al., 2010*). Dalle colture cellulari si otterranno preparazioni di melanosomi attraverso tecniche di centrifugazione differenziata ed arricchimento mediante immunopanning (*Gardiner et al., 2016*). Si procederà poi alla costruzione di librerie per il sequenziamento di ncRNAs e mRNAs. Una volta identificati i ncRNAs arricchiti nei melanosomi di melanoma, se ne studierà la localizzazione in campioni di melanomi invasivi grazie a tecniche di ibridazione in situ. Queste analisi concorreranno alla identificazione di una "signature" di capacità invasiva del melanoma (un set di geni i cui livelli di espressione definiscono quei melanomi in situ con alta capacità infiltrante). L'ultimo passaggio sarà uno screening farmacologico volto ad identificare farmaci che siano in grado di bloccare il rilascio dei melanosomi da parte delle cellule di melanoma. La capacità di tali farmaci di impedire l'infiltrazione del melanoma nei tessuti circostanti verrà verificata in un modello progressivo di melanoma in zebrafish.

#### *Modalità di misurazione dei risultati*

Il progetto si compone di una serie di analisi, che verranno condotte in parallelo se possibile e produrranno quindi risultati valutabili singolarmente, ma che allo stesso tempo contribuiranno al successo degli obiettivi generali. L'identificazione dei ncRNAs presenti in melanosomi di cellule di melanoma, ma assenti in melanosomi di melanociti normali, verrà valutato attraverso il sequenziamento massivo e successiva analisi bioinformatica. La conferma o meno dell'accumulo di questi marcatori in melanomi infiltranti verrà effettuata attraverso ibridazione in situ in sezioni di melanoma e qPCR in un numero appropriato di campioni debitamente annotati per grado e caratteristiche isto-patologiche.

Tutte le valutazioni comparative si basano sull'uso di melanociti normali (per le colture cellulari) e nei (per i campioni istologici) come controlli. Per gli screening preclinici nel modello zebrafish, i risultati verranno valutati sulla base di un fenotipo facilmente rilevabile: la normalizzazione della pigmentazione nelle larve, che è aumentata di oltre il 100% durante la progressione del melanoma. Lo screening utilizzerà una libreria di farmaci approvati per l'uso nella clinica di malattie diverse dall'European Medicines Agency, derivata da un'aliquota della Prestwick library di proprietà del Cibio.

Per la valutazione del meccanismo d'azione dei farmaci che sono in grado di ridurre la pigmentazione nel melanoma di zebrafish, utilizzeremo metodi di biologia molecolare in cellule di melanoma.

#### *Analisi statistica.*

Per la significatività dei risultati ottenuti dal sequenziamento massivo, un numero minimo di 3 campioni (melanosomi isolati da colture di melanoma invasivo o di melanociti di controllo) per ciascuna linea cellulare verrà usato. Una differenza di almeno 2 folds (in scala logaritmica) e un p-value minore di 0.05 ci permetterà di identificare i ncRNAs che sono presenti a livelli

significativamente più alti in campioni di melanoma e non nei controlli. Una procedura simile verrà applicata all'analisi dei dati di qPCR.

L'ibridazione in situ usando sonde specifiche per i diversi ncRNAs produrrà dati qualitativi che riguardano la localizzazione delle specie di RNA in esame. Essendo la tecnica di ibridazione in situ altamente specifica per ciascun ncRNA in studio, non ci aspettiamo falsi positivi, quindi anche un numero ridotto di casi (10 per ciascun tipo di melanoma, invasivo o in situ, e 10 nevi) dovrebbe essere sufficiente per confermare o no le osservazioni ottenute dagli studi in vitro. Per gli scopi del progetto è comunque fondamentale arrivare a disporre di una casistica adeguata.

Per lo screening farmacologico, ci sarà una fase di pre-screening con un dosaggio standard (10 micromolare) di ciascun farmaco, su 3 linee cellulari ed almeno 10 larve per farmaco, che verrà poi ripetuto con tutti i farmaci che hanno dimostrato un effetto, a 3 dosi diverse.

Lo screening farmacologico non prevede l'utilizzo di zebrafish oltre i 5 giorni di vita, ed è quindi esente dalla regolamentazione sull'uso di animali nella ricerca (D.Lgs.26/2014). Per i campioni di pazienti verrà richiesta l'approvazione dello studio (condotto in completo anonimato) da parte del comitato etico dell'Ospedale Santa Chiara di Trento o degli altri enti fornitori.

#### *Referenze citate*

Anelli V, Mione M. Melanoma niche formation: it is all about melanosomes making CAFs. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2016 Oct 23. doi: 10.1111/pcmr.12545 (2016).

Breslow, Alexander. "Thickness, Cross-Sectional Areas and Depth of Invasion in the Prognosis of Cutaneous Melanoma". *Annals of Surgery.* 172 (5): 902–8.(1970).

Dror S, Sander L, Schwartz H, et al. Melanoma miRNA trafficking controls tumour primary niche formation. *Nat Cell Biol.* 18(9):1006-17 (2016).

Gardiner C, Di Vizio D, Sahoo S, Théry C, Witwer KW, Wauben M, Hill AF. Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. *J Extracell Vesicles.* 31;5:32945 (2016)

Santoriello C, Gennaro E, Anelli V, Distel M, Kelly A, Köster RW, Hurlstone A, Mione M. Kita driven expression of oncogenic HRAS leads to early onset and highly penetrant melanoma in zebrafish. *PLoS One.* 10;5(12):e15170 (2010)

Watabe, H., Kushimoto, T., Valencia, J. C. & Hearing, V. J. in *Current Protocols in Cell Biology* (eds Bonifacino, J. S. et al.) Ch. 3, Unit 3, 14 (2005).