

Progetto di ricerca

Titolo:

Impatto del **recettore androgenico** nella prognosi e nel trattamento del carcinoma della mammella.

Premesse e razionalità

Il 75% dei tumore della mammella esprime il recettore degli estrogeni (ER) e viene per tanto classificato “*tumore luminale*” [1,2]. Tale caratteristica ha una duplice valenza: (a) prognostica, in quanto tumori ER-positivi hanno un outcome più favorevole rispetto a tumori ER-negativi; (b) predittiva, poiché i tumori ER-positivi sono responsivi al trattamento con farmaci ormonali (anti-estrogenici). Tuttavia il 30% di queste pazienti recidiva o muore anche dopo molti anni dalla diagnosi primitiva. Esiste pertanto una forte necessità di avere addizionali parametri prognostico-predittivi e nuovi target terapeutici per meglio stratificare le pazienti con carcinoma mammario in gruppi di rischio di ricorrenza e per ottenere una miglior risposta terapeutica.

Alcuni studi hanno dimostrato un ruolo prognostico del recettore androgenico (AR), espresso in circa il 60-80% dei tumori mammari. Tuttavia nella pratica clinica l'utilizzo di AR, quale marcatore prognostico, non è previsto e necessita di essere validato.

AR nel carcinoma mammario *luminale* sembra inibire lo sviluppo del tumore antagonizzando il segnale attivato da ER e l'espressione di AR sembra essere correlata ad una prognosi migliore. Il nostro progetto si propone pertanto di validare il ruolo di AR nelle decisioni terapeutiche, attraverso una caratterizzazione della sua attività funzionale nel tumore della mammella *luminale*.

Dati preliminari:

1. Nostri studi preliminari suggeriscono che l'espressione di AR potrebbe identificare pazienti con tumori di tipo *luminale B* (ER+/HER2+ e ER+/HER2- con Ki67>20%, Consensus meeting of St. Gallen) [3,4] che non necessitano di chemioterapia associata al trattamento ormonale.
2. In pazienti con tumori *luminali-A* (ER+/HER2- con Ki67<20%, Consensus meeting of St. Gallen), l'assenza di espressione di AR, associata a diametro del tumore e stato linfonodale (ERPI: ER Prognostic Index), è in grado di identificare pazienti ad alto rischio di ricorrenza e morte dopo i 5 anni dalla diagnosi, momento concomitante con il termine della terapia anti-ormonale. Questa dato suggerisce la necessità di una prosecuzione della terapia oltre i classici 5 anni di trattamento [4].

Inoltre il nostro gruppo ha già a disposizione:

- una casistica retrospettiva di 780 pazienti con tumore *luminale*, completa di dati clinici, patologici e di follow up.
- 102 campioni di carcinoma della mammella congelato, ottenuti dalla serie sopracitata, già testati per la presenza di ER, AR a livello di mRNA e proteina.
- Linee cellulari di carcinoma mammario identificate con la Cancer Cell Line Encyclopedia, in cui sono presenti differenti livelli di espressione di ER ed AR.

- Linee cellulari di carcinoma mammario MCF7, T47D in cui abbiamo già testato il livello di mRNA e proteina per ER ed AR.

Piano di lavoro progettuale (articolazione del progetto e tempi di realizzazione, non superiori a 24 mesi dalla data di approvazione del progetto)

Articolazione del progetto:

Il presente progetto si pone tre obiettivi:

Obiettivo1: *identificare meccanismi molecolari indotti da AR nei tumori luminali (ER+), identificando specifici mRNA e microRNA correlati all'attività di AR, al fine di integrare l'espressione di AR con il suo livello di funzionalità.*

Su una serie di 102 tumori *luminali* della mammella, di cui è disponibile sia materiale congelato sia fissato in formalina e incluso in paraffina con espressione nota di AR in immunohistochimica, si procederà a:

Task 1.1: valutare il profilo di espressione genica totale per mRNA e per microRNA;

Task 1.2: identificare una signature trascrizionale di AR correlandola con il suo livello di espressione genico e proteico;

Task 1.3: caratterizzare la competenza funzionale di AR attraverso: (i) identificazione ed analisi di espressione differenziale di geni bersaglio di AR, nei tumori AR+ versus tumori AR-; (ii) selezione di geni di trascrizione utilizzabili per analisi di PCR realtime quantitativa (qPCR) utilizzando mRNA estraibile da tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina per validazione tecnica; (iii) validazione clinica dei dati molecolari su una casistica di 500 tumori luminali trattati esclusivamente con ormono terapia e con follow up noto.

Task 1.4: definizione di circuiti trascrizionali che coinvolgono microRNA, fattori di trascrizione e geni AR-modulati.

Obiettivo 2: *studiare le interazioni tra AR ed ER in linee cellulari di tumori mammari ER+. In particolare si intende (i) identificare e validare geni e microRNA dipendenti dall'azione di AR; (ii) valutare il ruolo di FOXA1, un fattore di trascrizione cruciale nell'interazione tra ER e DNA, correlandolo con l'espressione di AR.*

A questo scopo, linee cellulari ER+ (MCF7-T47D), in cui è nota l'espressione basale di AR e FOXA1 verranno trattate con estradiolo, deidrotestosterone, tamoxifene e bicalutamide. Si procederà quindi a:

Task 2.1: effettuare test di proliferazione, apoptosi ed invasione;

Task 2.2: confrontare i livelli proteici e di mRNA di AR, FOXA1 con quelli basali;

Task 2.3: creare profili di espressione genica e di microRNA, attraverso la (i) valutazione della variazione di espressione di geni appartenenti alla signature AR-dipendente, validati nell'obiettivo 1; (ii) definire signature di mRNA e microRNA sensibili ai vari trattamenti.

Obiettivo 3: *validare il ruolo di AR in una casistica retrospettiva di 1000 pazienti con carcinoma mammario iniziale, con un follow up medio di circa 10 anni.*

In base ai risultati ottenuti dal primo e dal secondo obiettivo una serie di geni, microRNA e proteine, quali FOXA1, legati all'attività di AR, saranno correlati con i dati clinici e di follow-up.

Su una serie di 1000 tumori mammari *luminali*, che saranno ottenuti dalle Anatomie Patologiche delle due sedi che collaborano con le sezioni LILT, si procederà a:

Task 3.1: valutare l'espressione di AR in immunohistochimica;

Task 3.2: validare il ruolo prognostico AR ed ERPI attraverso la correlazione con i dati clinici di follow up;

Task 3.4: selezionare mRNA e microRNA associati alla funzionalità di AR, identificati nell'obiettivo 1 e 2 al fine di ottimizzare la loro determinazione su tessuti fissati in formalina;

Task 3.5: correlare FOXA1, nuovi mRNA e microRNA con l'espressione di AR e con i dati clinici e di follow up in tumori ER+.

Metodi

Profilo di espressione genica: l'RNA totale sarà estratto da campioni congelati e da linee cellulari di carcinoma mammario in condizioni basali e dopo i diversi trattamenti. Il profilo di espressione genica sarà eseguito con Illumina Beadarrays (Illumina); piccoli RNA non codificanti, microRNA, saranno identificati utilizzando la next generation sequencing with Illumina smallRNA truSeq (Illumina). I dati dei microarray saranno analizzati con Genome studio e poi normalizzati ed analizzati con R-Bioconductor (Lumi and other packages) [5]. L'analisi dei microRNA sarà eseguita con miRanalyze [6]. Le analisi di espressione differenziale saranno eseguite con Limma per protein coding gene. I dati riguardanti RNAseq saranno analizzati mediante DEseq, RankProduct ed edgeR [7-9]. I geni selezionati saranno validati su tessuto con indagini qPCR.

Linee cellulari: Le linee cellulari saranno coltivate in presenza o in assenza di estradiolo (E2: 1-100 nM), diidrotestosterone (DHT: 1-100 nM), tamoxifene (TAM: 0.1-10 uM), e bicalutamide (0.1-10 uM) da soli o in varie combinazioni (ad esempio, E2 + TAM; DHT + bicalutamide; E2 + DHT; E2 + bicalutamide; DHT + TAM). A 24, 48 e 72 ore dopo il trattamento, la proliferazione cellulare, la vitalità, l'apoptosi e la migrazione verranno analizzate come segue: (i) la vitalità cellulare e la proliferazione con il WST1, il test BrdU ELISA e citometria a flusso dopo la colorazione di propidio ioduro; (ii) l'apoptosi mediante Cell Death Detection ELISA PLUS (Roche Applied Science) e l'attività della Caspasi 3. (iii) la migrazione cellulare utilizzando BD Biocoat Matrigel Invasion Camera (BD Biosciences).

Validazione su tumori umani: La partnership tra le due sezioni LILT, attraverso la collaborazione delle Anatomie Patologiche Universitarie di Torino e Novara, si propone di raggiungere nei due anni di progetto il numero di 1000 casi di carcinoma mammario ER+ fissati in formalina e inclusi in paraffina sui quali si procederà all'allestimento di tissue micro array (TMA). Su ogni caso verrà rivalutata l'espressione immunohistochimica di fattori prognostici classici (ER, PR, Ki67 ed HER2) e di AR, FOXA1, utilizzando un immunocoloratore automatizzato (BenchMark Autostainer, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA). Ogni sezione di tumore sarà poi analizzata con un sistema di analisi dell'immagine dedicato (Aperio, ScanScope); (cut-off per ER, PR e di espressione AR: 1% [1] per HER2: negativo o positivo [10]).

Analisi statistiche: Per ogni sottogruppo saranno eseguite analisi statistiche e di bioinformatica per valutare la correlazione tra l'espressione di AR, ERPI e tutti gli altri indicatori di follow-up dei dati clinici.

Tempi di realizzazione:

Dal mese 1 al mese 9: profilo di espressione genica di geni codificanti e non codificanti in una casistica di 102 tumori della mammella luminali.

Dal mese 1 al mese 12: creazione del modello "in vitro" usando linee cellulari di tumore della mammella ER+.

Dal mese 3 al mese 12: studio del ruolo di FOXA1 nello stimolare o inibire l'espressione di AR nelle linee cellulari mammarie.

Dal mese 9 al mese 22 : caratterizzazione di una signature di AR in campioni di tumore mammario e generazione di un algoritmo genomico.

Dal mese 12 al mese 22: profilo di espressione genica delle linee cellulari di carcinoma mammario, per identificare geni bersaglio dell'azione di AR.

Dal mese 6 al mese 24: raccolta della casistica e valutazione/validazione dell'impatto prognostico di AR e ERPI nei tumori luminali.

Risultati attesi dalla ricerca, con specifica evidenza agli approcci con elevato livello di trasferibilità sociale, in particolare all'interno del SSN

Una definizione più precisa della prognosi in pazienti con tumore della mammella è di fondamentale importanza clinica ed economico-sanitaria per ottimizzare le risorse disponibili e fornire alle pazienti la terapia più personalizzata. Gli scopi ultimi del progetto sono: (i) validare e confermare il ruolo funzionale e modulatore di AR nella progressione di tumori ER+, (ii) individuare nuovi marcatori utili per la definizione del rischio di recidiva, valutabili con metodiche rapidamente trasferibili alla pratica diagnostica di routine su tessuti fissati ed inclusi in paraffina. I dati saranno discussi ed estesi alla comunità degli oncologi per poter attuare nuove strategie terapeutiche attraverso studi clinici appropriati. Le pazienti potranno così giovare di una migliore personalizzazione della terapia identificando, grazie ai risultati ottenuti, donne affette da carcinoma della mammella di tipo *luminale* eleggibili alla sola ormonoterapia. Inoltre, validando i nostri dati preliminari su ERPI nei tumori *luminal-A*, avremo un ulteriore strumento per la selezione di pazienti che possono beneficiare di un prolungamento della terapia ormonale stessa, oltre i classici cinque anni, come suggerito da due trials clinici ATLAS ed aTTOm [11-12]. Infine, grazie agli studi effettuati mediante analisi molecolari, potrebbero essere identificati nuovi bersagli terapeutici da utilizzare in pazienti che sviluppano resistenza alla terapia ormonale con tamoxifene o inibitori dell'aromatasi.

Risultati attesi dalla ricerca, con specifica evidenza riguardo lo sviluppo di reti collaborative fra le Sezioni LILT e qualificate strutture operanti in ambito sanitario e di ricerca

Il progetto necessita della attività di rete delle sezioni di LILT di Torino e Novara, che già collaborano con professionisti nell'ambito della prevenzione e cura dei carcinomi mammari, per poter portare i dati sperimentali a livello di applicazione clinica. Le Anatomie Patologiche delle Università di Torino e Novara saranno promotrici della costituzioni di gruppi multidisciplinari che vedranno clinici, oncologi e chirurghi coinvolti nel progetto. Inoltre, i risultati dello studio saranno divulgati attraverso incontri con associazioni e pazienti. In tali occasioni, verranno forniti aggiornamenti utili alle donne per meglio conoscere i nuovi orizzonti di diagnosi e cura del tumore della mammella.

Sezioni LILT coinvolte nel progetto.

Sezione di Torino – Dott.ssa D.Tubino

Sezione di Novara – Dr.ssa G. Gambaro

Altre strutture coinvolte nel progetto

Università degli Studi di Torino - Dipartimento di Scienze Mediche

Università degli Studi del Piemonte Orientale (UPO) - Dipartimento di Scienze della Salute

Enti coinvolti nel progetto

Prof. Anna Sapino. Anatomia Patologica dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Città della Salute e della Scienza di Torino

Prof. Renzo Boldorini. Anatomia Patologica dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Ospedale "Maggiore Della Carità " di Novara

Bibliografia

1. Goldhirsch et al. Ann Oncol. 2013;24:2206-23
2. Goldhirsch et al. Ann Oncol. 2011 Aug;22(8):1736-47.
3. Castellano et al. Breast Cancer Res Treat. 2010;124:607-17.
4. Castellano et al. Ann Oncol. 2013;24:2292-97.
5. Du et al. Bioinformatics. 2008 1;24:1547-48.
6. Hackenberg et al. Nucleic Acids Res. 2011;39:D75-9.
7. Smyth. pp. 397;420. Springer, New York. 2005
8. Anders et al. Genome Biology, 2010;11:R106.
9. Hong et al. Bioinformatics. 2006; 22:2825-27.
10. Wolff et al. J Clin Oncol. 2007;25:118-45.
11. Lancet. 2013;381:805–816.
12. 2013 ASCO Annual Meeting