

Introduzione

Il carcinoma testa collo a cellule squamose (HNSCC) è la sesta causa di mortalità per tumore in tutto il mondo. Il fumo, gli abusi di alcol e l'infezione da virus del papilloma umano (HPV) sono associati con l'insorgenza di questa patologia.

Diversi biomarcatori sono stati studiati per il loro potenziale ruolo nella patogenesi del cancro e come fattori prognostici. Tra questi i più noti sono i non-coding RNA (ncRNA), che si suddividono in base alla loro lunghezza in small ncRNAs (<200 nucleotidi, tra cui micro-RNA, miRNA, small interfering RNAs, siRNAs, e PIWI-interactin RNA, piRNAs) e long ncRNAs (lncRNAs).

I lncRNAs costituiscono un gruppo molto eterogeneo di molecole di RNA con dimensioni maggiori di 200 nucleotidi e un ampio spettro di funzioni cellulari e molecolari. E' stato dimostrato che i lncRNAs sono coinvolti nello sviluppo e nella progressione del cancro e possono essere usati come biomarcatori prognostici e target terapeutici.

Recentemente, Ling et al (2013) hanno dimostrato l'esistenza di un nuovo lncRNAs, il CCAT2 (Colon Cancer Associated Transcript 2) trascritto dalla regione genomica 8q24. Il locus genomico CCAT2 è altamente conservato e porta lo SNP rs6983267 (G > T), che è associato con la predisposizione al tumore al colon, ovaio, prostata e con il rischio di metastasi di tumore alla mammella. CCAT2 promuove la crescita dei tumori e favorisce la metastatizzazione, regola la trascrizione del gene MYC ed è implicato nella cascata del segnale di WNT nel cancro coloretale. CCAT2 lncRNA ha un ruolo prognostico nel cancro della mammella e nel carcinoma polmonare non a piccole cellule. Tuttavia, nonostante l'associazione tra lo SNP rs6983267 e il rischio di sviluppare un tumore sia stata dimostrata, i meccanismi molecolari e cellulari coinvolti restano in gran parte sconosciuti. Inoltre, nel cancro colon-rettale, è stato dimostrato che alti livelli di CCAT2 (aumento di 10 volte) sono associati più a tumori con stabilità dei microsatelliti (MSS) rispetto ai tumori con instabilità dei microsatelliti (MSI). Si ipotizza che alti livelli di espressione di CCAT2 possano indurre insatibilità cromosomica (CIN), che rappresenta la caratteristica principale dei MSS.

Le alterazioni dei microsatelliti (MSI, CIN e perdita di eterozigotità) possono rappresentare un potenziale marcatore molecolare per stratificare i pazienti nel carcinoma del distretto testa-collo, anche se questi meccanismi non sono ancora stati studiati in questo tipo di patologia.

La nostra ipotesi è che il lncRNA CCAT2 potrebbe avere un ruolo oncogenico anche nel HNSCC e l'obiettivo di questo studio è di determinare il valore prognostico di CCAT2. Inoltre verranno valutati la sua relazione con altri fattori prognostici già noti nel tumore testa collo (p16, EGFR, TP53, HPV e fumo) e se i livelli di espressione di CCAT2 possono predire la sopravvivenza e la presenza di metastasi in pazienti HNSCC.

Scopo del lavoro e piano sperimentale

Obiettivo 1: Valutazione dell'espressione di CCAT2 in linee cellulari HNSCC e correlazione con il genotipo dello SNP rs6983267

Abbiamo a disposizione un pannello di linee cellulari tumorali HN di origine umana: CAL 27 e CAL 33 (lingua), CAL 166 (multiple metastasi di adenocarcinoma parotide), Hep2 (laringe), HNO41 (orofaringe), HNO91 (cavità orale) e HN5 (HNSCC). Il DNA genomico viene isolato utilizzando il kit QIAamp DNA mini (Qiagen). La genotipizzazione è valutata dal sequenziamento del DNA utilizzando l'analizzatore genetico ABI 3130 (Applied Biosystem). L'espressione di ogni gene (CCAT2 e le due GAPDH di controllo interno e U6) è valutata mediante qRT-PCR in un ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

Obiettivo 2: Raccolta di tessuto tumorale e di siero da pazienti HNSCC e creazioni di un database dedicato

Tessuto tumorale fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE) e sangue periferico da ciascun paziente HNSCC sono abitualmente raccolti (previo raccolta di consenso informato) in una biobanca dedicata. Fino ad ora, abbiamo già 277 campioni di tessuto raccolti retrospettivamente da pazienti HNSCC di cui abbiamo completi dati clinici, e 177 campioni di siero. Abbiamo in programma di arruolare circa 40 nuovi pazienti HNSCC all'anno. In totale, analizzeremo circa 400 pazienti per l'espressione CCAT2 sia sul tessuto (raccolto alla diagnosi) che su siero (raccolto alla diagnosi, alla fine del trattamento e ad ogni follow-up). Un database clinico è rigorosamente mantenuto e aggiornato ad ogni visita durante il follow up. La diagnosi e la rappresentazione delle cellule tumorali nelle sezioni di tessuto è sempre verificato tramite revisione istopatologico.

Obiettivo 3: Genotyping dello SNP rs6983267 e valutazione dell'espressione di CCAT2 nei tessuti FFPE e sieri di pazienti HNSCC.

Dai tessuti tumorali FFPE, il DNA genomico verrà estratto con protocollo standard tra cui proteinasi K trattamento. L'RNA sarà ottenuto utilizzando il kit RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation kit (Ambion) mentre, per i campioni di siero, l'RNA verrà estratto utilizzando l'RNA Purification Kit Total (Norgen). L'amplificazione e la genotipizzazione saranno effettuate come descritto al punto 1.

Obiettivo 4: Analisi di MSI e MSS in linee cellulari e nei tessuti HNSCC e correlazione con i livelli di espressione di CAAT2

L'analisi MSI sarà effettuata con un test multiplex PCR (Promega) che contiene un pannello di primer fluorescenti per la co-amplificazione dei sette marcatori (NR-21, BAT-26, BAT-25, NR-24, MONO-27, PENTA etichettato C e PENTA D). I prodotti di PCR saranno analizzati mediante elettroforesi capillare utilizzando un analizzatore genetico ABI 3130 (Applied Biosystem). L'analisi dei dati sarà effettuata utilizzando il software Genescan. Cambiamenti nella dimensione di alleli con 3 o più coppie o uno o più dei 5 marcatori saranno segnati come MSI positivo. Viceversa, cambiamenti nella dimensione di alleli con 2 o meno paia di basi sono stati valutati come MSS.

Obiettivo 5: Valutazione del possibile ruolo oncogenico di CCAT2 in linee cellulari mediante studi funzionali in vitro

Eseguiamo analisi funzionali utilizzando linee cellulari di tumore HN, valutando la correlazione tra l'espressione CCAT2 e la crescita cellulare, l'aderenza e la formazione di colonie. Per valutare la capacità di crescita e di aderenza, useremo la linea CAL166 che esprime bassi livelli di CCAT2. Cloneremo CCAT2 in un vettore di espressione retrovirale e lo trasdurremo nella linea cellulare CAL166, indagando la capacità di formare colonie. I cloni saranno valutati per CIN. Per valutare se CCAT2 influenza l'invasione delle cellule in vitro, silenzieremo la linea cellulare HN5 (che esprime i massimi livelli di CAAT2 tra le linee di cellule che abbiamo analizzato). Le cellule saranno trasfettate con 50 Nm di siRNA tramite lipofectamin 2000 (Life Technologies) per 48 ore prima di raccogliere l'RNA per l'analisi. La capacità invasiva sarà valutata con un test di migrazione in vitro.

Obiettivo 6: Valutazione dell'espressione di CCAT2, dello SNP rs6983267 status e dei parametri clinici in pazienti HNSCC

L'analisi statistica sarà diretta all'identificazione di correlazioni tra i profili molecolari di CCAT2 in HNSCC e di outcomes clinici definiti (predisposizione di metastasi, la sopravvivenza globale, la

risposta alla chemio-radioterapia e la sopravvivenza libera da ricaduta loco-regionale). Il confronto dei dati sarà effettuato utilizzando test di Kaplan-Meier, Fisher exact, t-Student, test di Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. L'analisi multivariata verrà eseguita su livelli di espressione lncRNA CCAT2 al fine di dimostrarne il valore eventuale predittivo indipendente nel HNSCC. Le analisi verranno eseguite utilizzando il programma statistico SPSS 13. I p-value saranno considerati statisticamente significativi se $p < 0.05$.

Dati preliminari

1. Abbiamo già analizzato i livelli di espressione di CCAT2 nelle otto linee cellulari HN riportate nell'Obiettivo 1. I risultati sono riportati in Fig. 1 e Fig. 2.

Fig. 1. I livelli di espressione in linee cellulari HN normalizzati con U6, come descritto nell'Obiettivo 1. La tabella sotto mostra i valori assoluti relativi agli outputs in ciascuna linea cellulare.

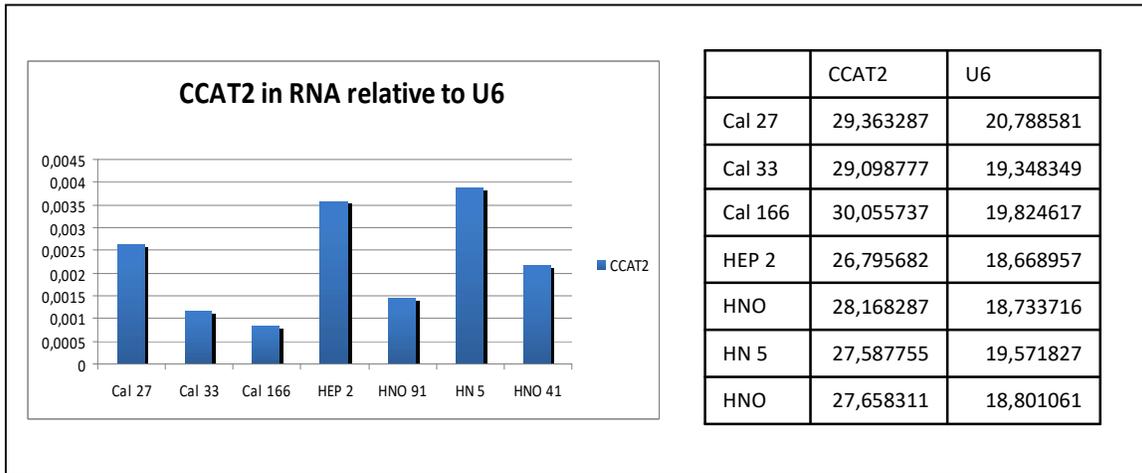
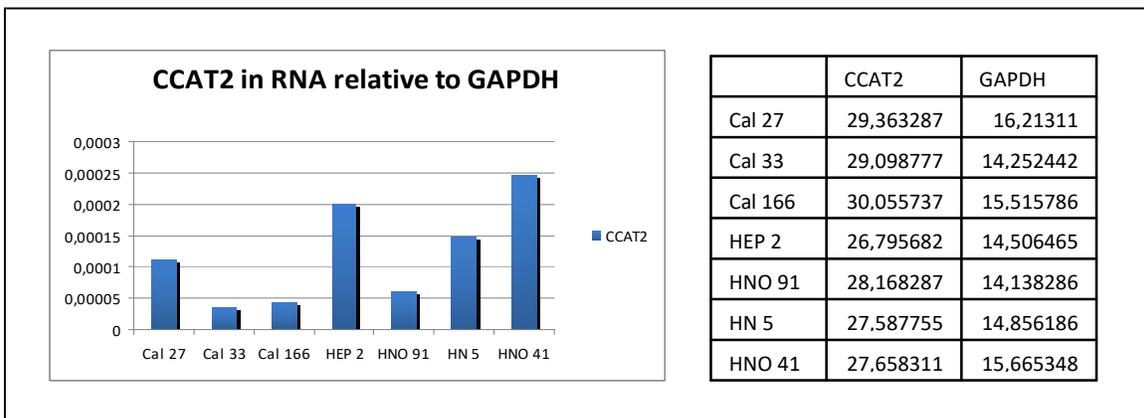


Fig. 2. Livelli di espressione in linee cellulari HN normalizzati con GAPDH, come descritto nell'Obiettivo 1. La tabella sotto mostra i valori assoluti relativi agli outputs in ciascuna linea cellulare.



2. Fino ad ora, abbiamo già raccolto sezioni di tessuto incluse in paraffina per 277 pazienti HNSCC reclutati nel periodo 1999-2013, con un follow-up mediano di 19 mesi (range 1-192), suddivisi in

90 Orofaringe e 187 non-Orofaringe (47 le femmine e 230 maschi) e 177 sieri che corrispondono a 137 pazienti all'inizio del trattamento e 40 campioni raccolti alla fine del trattamento. I dati clinici e molecolari per ogni paziente sono registrati in un database istituzionale dedicato. I dati clinici includono età di insorgenza, performance status (PS), il trattamento, lo stadio (tumore-T, nodi-N), classificazione (G), habitus al fumo, tumori primari e sito secondario per tutti i pazienti. Abbiamo registrato anche le tossicità di grado 3-4, come ematologica, gastrointestinale e tossicità cutanee, mucosite e disfagia, al fine di correlarle eventualmente con i risultati molecolari. Dati istopatologici e molecolari comprendono l'espressione di EGFR e p16, lo stato di HPV, lo stato mutazionale di TP53, il polimorfismo Arg72Pro p53 in p53, e lo SNP rs2279744 in MDM2.

Risultati attesi dalla ricerca

Questa ricerca permetterà di identificare un nuovo marcatore prognostico utile per la selezione dei pazienti affetti da HNSCC. La possibilità di predire con uno strumento semplice (la misurazione dei livelli di espressione di CCAT2 su tessuto/siero) la prognosi dei pazienti affetti da HNSCC permetterà un miglior approccio terapeutico per questo tipo di pazienti.

Se validato nella pratica clinica e su casistiche indipendenti, questo permetterà di ottimizzare il protocollo terapeutico nel singolo paziente minimizzando tossicità ed effetti indesiderati, inutili (e costosi) ricoveri ospedalieri, e di portare a una migliore qualità di vita dei pazienti.

In termini di risvolti economico/occupazionali, prevediamo inoltre di arruolare con borsa di studio biennale un ricercatore postdoc coinvolto a tempo pieno nel progetto.