

PROGETTO DI RICERCA

STUDIO DELLA ESPRESSIONE DEI *LONG NON CODING RNA* NEI PAZIENTI AFFETTI DA TUMORI STROMALI GASTROINTESTINALI (GIST).

Proposto dalla dott.ssa Nadia Barraco per il Concorso per l'ammissione al Corso di Dottorato di Ricerca (XXIX ciclo) in "Oncologia e Chirurgia Sperimentali-Internazionale " dell'Università degli Studi di Palermo.

Introduzione

Ad oggi suscita grande interesse il ruolo di una nuova classe di RNA, con funzione non codificante, di lunghezza superiore ai 200 nucleotidi: i cosiddetti RNA non codificanti lunghi (lncRNA) (1). I lncRNA vengono trascritti dall'RNA polimerasi II, mappano in regioni introniche ed intergeniche e vanno incontro a modificazioni post-trascrizionali, localizzandosi sia a livello nucleare che citoplasmatico (2). I lncRNA regolano l'espressione genica o inducendo una degradazione dell'mRNA target o inibendone la traduzione. Tale funzione si realizza in seguito all'appaiamento del lncRNA con le regioni 3' UTRs (untranslated regions) del messaggero target (3). Sulla base dei geni target, recenti studi suggeriscono che i lncRNAs sono implicati in numerosi processi biologici quali il controllo del ciclo cellulare, apoptosi (4), sviluppo e differenziamento (5), nonché nella regolazione epigenetica dell'espressione genica (6).

L'alterata espressione di alcuni lncRNA è stata correlata a particolari tipi di tumore (7) e può essere utilizzata come marker predittivo di progressione tumorale in pazienti affetti da tumori stromali gastrointestinali (GIST). Recenti evidenze sperimentali hanno infatti dimostrato che lncRNA come H19 (8) e HOTAIR sono overespressi in diverse linee cellulari tumorali (9). In particolare, HOTAIR è overespresso in tessuti primari e metastatici di GIST, associati ad una scarsa sopravvivenza dei pazienti e all'insorgenza di recidive (10). È noto essere coinvolto in diverse funzioni biologiche che contribuiscono alle caratteristiche di malignità cellulare, le quali possono essere attenuate in seguito alla sua rimozione. Studi *in vitro* hanno mostrato come il *Knock-down* di HOTAIR induca inibizione della proliferazione cellulare, suggerendone un ruolo cruciale nei processi di tumorigenesi (9,10). *In vivo*, i ridotti livelli di HOTAIR hanno confermato l'inibizione della crescita tumorale attraverso l'analisi dei livelli di espressione di marker proliferativi e induzione dei processi apoptotici (11).

La maggior parte delle terapie antitumorali non sono in grado di eradicare definitivamente il tumore e risultano insufficienti nel trattamento di pazienti con forme avanzate di carcinoma colon-rettale. Le terapie attualmente impiegate per pazienti GIST prevedono l'utilizzo dell'imatinib, un inibitore tirosin chinasi. GISTs possono sviluppare mutazioni sporadiche nei protooncogeni c-KIT e PDGFR α (platelet-derived growth factor receptor alpha), i quali codificano per le proteine KIT e PDGFR α rispettivamente. Le alterazioni molecolari non producono sufficienti informazioni per predire la biologia dei GIST The molecular alteration

does not produced sufficient information to predict the biology of GISTs, ma il potenziale malign dei GIST può anche essere delineato considerando la *size* tumorale, l'indice mitotico e altri fattori prognostici chiave come la sede del tumore.

In questo contesto, i lncRNA, ad oggi poco esplorati, potrebbero fornire un valido campo di ricerca. In questo progetto ci si propone di analizzare l'espressione dei lncRNA in pazienti affetti da GIST, al fine di identificare nuovi marcatori prognostici e predittivi di risposta al trattamento. Questo permetterebbe di far luce su alcuni meccanismi molecolari ancora poco conosciuti e individuare nuove strategie terapeutiche.

Obiettivi

Scopo della ricerca è pertanto quello di valutare, su tessuti di GIST, la deregolazione dei lncRNA, in considerazione al possibile stato mutazionale. Un primo obiettivo di questo progetto consiste nel:

- valutare retrospettivamente i profili di espressione dei lncRNA in campioni di tessuto paraffinato di pazienti GIST;
- validare, su una più ampia casistica di pazienti, l'espressione dei lncRNA deregolati che presentano un Fold Change maggiore o uguale a 2, insieme ad un valore di attendibilità statistica (P value) minore di 0.05, tramite Real-Time PCR;
- esaminare eventuali correlazioni statistiche tra i lncRNA che risultano essere maggiormente deregolati e la risposta alla terapia tenendo in considerazione lo stato mutazionale ed i principali parametri istologici;

I promotori dei lncRNA presentano diversi elementi di regolazione genica che possono mediare la risposta a differenti tipi di stimolazione.

Nella tumorigenesi, eventi che giocano un ruolo importante sono le modificazioni epigenetiche a livello di specifiche regioni del genoma. Specificatamente, studi di bioinformatica hanno messo in evidenza la presenza di molteplici isole CpG nei promotori dei geni che codificano per i lncRNA (16). Per cui, sarà interessante valutare le possibili alterazioni epigenetiche sulle regioni del promotore di queste piccole molecole regolatorie, per meglio comprendere i meccanismi molecolari. Quindi, sarà utile:

- studiare eventuali alterazioni epigenetiche sulle regioni promotore dei lncRNA deregolati al fine di comprendere meglio i meccanismi alla base dell'alterata espressione di questi RNA nei tessuti in esame.

Un secondo momento del progetto prevede una fase, *in vitro*, utile a chiarire i meccanismi molecolari alla base di questi processi. Un altro obiettivo di questo progetto è:

- effettuare delle analisi funzionali inibendo specificamente i lncRNA che sembrano associarsi meglio alla risposta al trattamento chemioterapico, mediante silenziamento genico, in diverse linee cellulari di GIST per poi valutarne le capacità proliferative e migratorie attraverso opportuni saggi;
- individuare i possibili target dei lncRNA selezionati, studiando i profili di espressione genica, in linee cellulari di GIST in cui è stato effettuato il silenziamento genico per questi RNA non codificanti rispetto a quelle non silenziate, tramite analisi microarray;

- validare questi risultati sia a livello genico che a livello proteico mediante Real Time PCR e Western blot, rispettivamente.

Materiali e Metodi

In una prima fase, lo studio prevede la raccolta, da archivi anatomico-patologici, di campioni di pazienti GIST. Verranno registrati la storia clinica, i principali parametri istologici e lo stato mutazionale.

In una fase successiva si procederà con l'estrazione dei lncRNA da tessuto paraffinato tramite miRNeasy FFPE Kit (Qiagen). I lncRNA così ottenuti dovranno essere retrotrascritti tramite High Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), analizzandone i profili di espressione mediante analisi microarray. I lncRNA up- e down-regolati che presentano un *Fold Change* maggiore o uguale a 2, insieme ad un valore di attendibilità statistica (*P value*) minore di 0.05, verranno validati, su altri campioni di tessuto paraffinato, tramite Real Time PCR. I campioni saranno analizzati mediante Applied Biosystems 7900HT usando TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems).

A questo punto verrà effettuata un'analisi statistica dei risultati, utilizzando i principali software, per analizzare eventuali correlazioni con la risposta alla terapia e la prognosi.

Per valutare lo stato di metilazione del promotore dei lncRNA deregolati, sarà eseguita l'estrazione del DNA da tessuto paraffinato tramite QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen). Il DNA estratto verrà trattato con sodio bisolfito, attraverso il quale le citosine non metilate vengono deamminate e solfonate per essere convertite in uracile, mentre le 5'-metil-citosine rimangono inalterate. I campioni così ottenuti verranno successivamente analizzati mediante il saggio Methylation Specific PCR, una tecnica ampiamente utilizzata per lo studio della metilazione delle isole CpG che sfrutta specifici primers: un set di primers che riconosce il DNA modificato dal trattamento con sodio bisolfito e non metilato, e un set di primers che riconosce il DNA non modificato e metilato. I campioni verranno così amplificati e infine analizzati tramite corsa elettroforetica su gel di agaroso al 2%. In questo tipo di valutazione ogni campione potrà essere normalizzato contro uno dei due possibili standard di riferimento (100% metilato e non metilato). I risultati derivati dall'analisi della metilazione dei lncRNA saranno confrontati con la loro espressione, misurata con metodo TaqMan.

Per gli studi *in vitro* verranno utilizzate diverse linee cellulari di GIST.

Il silenziamento dei lncRNA di interesse verrà effettuato attraverso small-interfering RNA (siRNA) (Thermo Scientific Dharmacon) utilizzando oligonucleotidi specifici e aggiungendo DharmaFECT_ four nel mezzo di coltura.

La proliferazione sarà effettuata con il kit commerciale CyQuant® Cell Proliferation Assay (Molecular Probes, Invitrogen, Milano I.). Il protocollo prevede, trascorso l'intervallo di tempo stabilito per l'esperimento, di eliminare da ogni pozzetto tutto il terreno presente. La piastra viene quindi congelata almeno una notte alla temperatura di -80°C. Viene quindi scongelata lentamente a temperatura ambiente e per ciascun pozzetto allestito si dispensa uno specifico tampone di lisi, aggiunto di un particolare colorante CyQuant® GR, seguendo le indicazioni della ditta fornitrice. La piastra viene incubata al riparo dalla luce e si procede quindi alla lettura dell'assorbimento tramite spettrofotofluorimetro (filtro di eccitazione 480 nm, filtro di emissione 520 nm). La migrazione verrà effettuata mediante scratch assay. Questo saggio valuta la capacità delle cellule di riformare un monostrato confluento dopo l'azione meccanica di taglio eseguita con un puntale sterile per pipette. Si procede togliendo il terreno dalla piastra e lavando con soluzione fisiologica. Si pratica quindi in corrispondenza del diametro della piastra, in senso longitudinale, un'incisione superficiale con un puntale. Si lava di nuovo con soluzione fisiologica per togliere le cellule che si sono sollevate durante operazione. Viene aggiunto quindi terreno senza siero, eventualmente addizionato di fattori

solubili ed ad intervalli regolari di tempo e si valuta la capacità delle cellule di rimarginare il taglio. Per la valutazione dell'adesione cellulare a diversi substrati verrà usato il saggio quantitativo CAFCA (*Centrifugal Assay for Fluorescent-based Cell Adhesion*). Le piastre verranno prima funzionalizzate rivestendole con proteine specifiche della matrice extracellulare, poi verrà valutata la capacità adesiva a due substrati collagenici, collagene di tipo I e collagene di tipo VI. I rivestimenti verranno allestiti sfruttando soluzioni delle proteine di interesse in tampone bicarbonato pH 9.6, alla concentrazione standard di 20 µg/ml e lasciati depositare a 4°C per tutta la notte. Il giorno successivo, dopo aver eliminato la soluzione di rivestimento in eccesso, ciascun pozzetto verrà saturato per circa 2 ore con una soluzione di PBS (*Phosphate Buffered Saline*, soluzione salina tamponata con fosfato) contenente l'1% di BSA, precedentemente inattivata a 56°C per 15 minuti. Quale controllo negativo, alcuni pozzetti verranno rivestiti della sola soluzione saturante. Si procederà quindi al distacco delle cellule con tripsina e all'opportuna conta, al fine di disporre di circa $5 \cdot 10^4$ cellule per pozzetto. Le cellule verranno quindi risospese in terreno completo e poste per 30 minuti in incubatore a 37°C per consentire la riespressione delle integrine, componenti fondamentali nel mediare l'adesione cellulare ai diversi componenti della matrice. Le cellule verranno quindi marcate con calceina^{AM}, (Molecular Probes, colorante estereo incorporato dalle cellule vitali, idrolizzato e così convertito in un fluoroforo verde (filtro di eccitazione a 485 nm; filtro di emissione a 535 nm). Dopo la marcatura, le cellule saranno pronte per essere risospese e seminate nei rispettivi pozzetti, nei quali sono stati precedentemente depositati 200µl di mezzo CAFCA contenente il 2% di inchiostro (al fine di mascherare la fluorescenza). Le piastre verranno quindi centrifugate per 5 minuti alla velocità di 1000 rpm in una centrifuga per piastre e lasciate in incubatore per 15 minuti al fine di stabilizzarne il processo adesivo. Le piastre verranno infine assemblate montando le componenti superiori, a loro volta riempite di mezzo CAFCA completo di inchiostro, e nuovamente centrifugate in senso opposto (durata: 5 minuti, velocità: 500 rpm).

Per osservare i livelli di espressione di tutti i geni presenti nella linee cellulari prese in considerazione nello studio, per identificare i possibili target dei lncRNA, sarà utilizzata la tecnica dei *microarray* che permette di monitorare l'intero genoma in un singolo chip. Per valutare l'espressione genica nelle differenti condizioni prese in esame, verrà utilizzato un kit fornito dalla ditta *Affymetrix* (*Affymetrix GeneChip Expression 3'-Amplification Reagents Hybridization Control Kit*) seguendo il relativo manuale di istruzioni (*GeneChip® Expression Analysis Technical Manual*).

Si studieranno i livelli genici dei target tramite Real-Time PCR utilizzando i saggi Taqman come precedentemente descritto. Verranno invece valutati i livelli proteici attraverso la tecnica *Western Blot analysis*.

Bibliografia

- (1) B. Banfai, H. Jia, J. Khatun, E. Wood, B. Risk, W.E. Gundling Jr et al. **Long noncoding RNAs are rarely translated in two human cell lines.** *Genome Res.*, 22 (2012), pp. 1646–1657
- (2) Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. **Long non-coding RNAs: insights into functions** *Nature Reviews Genetics* 2009;10(3):155–9.
- (3) Federica C., Francesca L. and Michela G. **Non coding RNAs and Cancer.** *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 17085-17110.
- (4) Wapinski O, Chang HY. **Long noncoding RNAs and human disease.** *Trends in CellBiology* 2011;21(6):354–61.
- (5) Clark MB, Mattick JS. **Long noncoding RNAs in cell biology.** *Seminars in Cell & Devel-opmental Biology* 2011;22(4):366–76.
- (6) Mattick JS, Amaral PP, Dinger ME, Mercer TR, Mehler MF. **RNA regulation of epige-netic processes.** *Bioessays* 2009;31(1):51–9.

- (7) Tsai MC, Spitale RC, Chang HY. **Long intergenic noncoding RNAs: new links in cancer progression.** Cancer Research 2011;71(1):3–7.
- (8) Matouk IJ, Mezan S, Mizrahi A, Ohana P, Abu-Lail R, Fellig Y, et al. **The oncofetal H19 RNA connection: hypoxia, p53 and cancer.** Biochimica et Biophysica Acta 2010;1803(4):443–51.
- (9) Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, et al. **Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis.** Nature 2010;464(7291):1071–6.
- (10) Kogo R, Shimamura T, Mimori K, Kawahara K, Imoto S, Sudo T, et al. **Long non-coding RNA HOTAIR regulates polycomb-dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers.** Cancer Research 2011;71(20):6320–6.
- (11) Kim K, Jutooru I, Chadalapaka G, Johnson G, Frank J, Burghardt R, et al. **HOTAIR is a negative prognostic factor and exhibits pro-oncogenic activity in pancreatic cancer.** Oncogene 2012.

Agrigento, li
07/11/2013

Firma