

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
ONCOLOGIA, EMATOLOGIA E PATOLOGIA

Ciclo 36

Settore Concorsuale: 06/F4 - MALATTIE APPARATO LOCOMOTORE E MEDICINA FISICA E RIABILITATIVA

Settore Scientifico Disciplinare: MED/33 - MALATTIE APPARATO LOCOMOTORE

COME PREVEDERE LA RISPOSTA AL TRATTAMENTO E LA PROGNOSE NEL
SARCOMA DI EWING IDENTIFICANDO BIOMARCATORI CIRCOLANTI NEL
SANGUE.

Presentata da: Benedetta Spazzoli

Coordinatore Dottorato

Manuela Ferracin

Supervisore

Davide Maria Donati

Co-supervisore

Katia Scotlandi

Esame finale anno 2024

Indice

1 – Abstract.....	3
2 – Introduzione	4
2.1 – Il Sarcoma Di Ewing	4
2.1.1 – Epidemiologia.....	6
2.1.2 – Caratteristiche Cliniche E Anatomo-Patologiche	6
2.1.3 – Diagnosi E Fattori Prognostici.....	9
2.1.4 – Meccanismo Eziopatogenetico	11
2.1.5 – Terapia	18
2.1.6 – Fattori Prognostici.....	20
3 – Biomarcatori Tumorali	23
3.1 – Biopsia Liquida.....	27
3.2 – I Microrna	29
3.2.1 – Biogenesi.....	29
3.2.2 – Meccanismo D'azione E Funzione Biologica	31
3.2.3 – Il Ruolo Dei Microrna Nei Tumori Maligni	33
4 – Materiali E Metodi	38
4.1 – Scopo Dello Studio.....	38
4.2 – Quantificazione Dei Microrna Da Plasma Tramite Rtpcr	39
5 – Risultati.....	44
6 – Conclzioni.....	62

7 – Bibliografia 64

1 – Abstract

Sarcoma di Ewing (SE), il secondo tumore primitivo dell'osso più frequente nella popolazione pediatrica, è un tumore maligno di origine mesenchimale molto aggressivo ed indifferenziato con una elevata tendenza a sviluppare metastasi polmonari e/o ossee. La prognosi dei pazienti con metastasi all'esordio rimane scarsa e sono necessarie nuove strategie per controllare la diffusione nel sangue delle cellule SE. Il sarcoma di Ewing è guidato da alterazioni indotte dal gene chimera EWS-FLI1 che agisce come fattore trascrizionale aberrante che induce la completa riprogrammazione dell'espressione genica. Le cellule dello Ewing sono anche caratterizzate da un'elevata espressione di CD99, una molecola della superficie cellulare che interagisce con EWS-FLI1 per sostenere la malignità del SE. Il sarcoma di Ewing ha un genoma molto stabile con pochissime alterazioni genetiche. A differenza della maggior parte dei tumori, la progressione del SE sembra dipendere da alterazioni epigenetiche. Si ritiene che EWS-FLI1 e CD99 abbiano un impatto considerevole sulla malignità delle cellule di SE, almeno in parte regolandone l'espressione diversi tipi di RNA non codificanti. Lo scopo del presente studio era di indagare il valore di miR-34a-5p (miR34a) come biomarcatore circolante per investigare la progressione della malattia e misurare la risposta terapeutica. Abbiamo valutato l'espressione del miR34a circolante in una coorte di pazienti affetti da EWS con tumore localizzato (PRI, n = 26) o con metastasi rilevabili alla diagnosi (PRI-Met, n = 19). Nel plasma di pazienti con tumori localizzati i livelli di miR34a risultano significativamente più alti rispetto a quelli dei pazienti PRI-Met. Nei pazienti PRI e PRI-Met, l'espressione di miR34a ha mostrato globalmente un aumento alla fine della chemioterapia preoperatoria, tranne che per due pazienti. Questi dati supportano l'idea che la rilevazione di un aumento nei livelli di miR34a possa essere una misura dell'efficacia di terapia.

2 – Introduzione

2.1 – Il Sarcoma di Ewing

Il sarcoma di Ewing è stato descritto per la prima volta nel 1921 come un “endotelioma diffuso dell’osso” dal patologo americano James Ewing. Nel suo articolo, pubblicato nei Proceedings of the New York Pathological Society [1], egli descrive il caso di una paziente di quattordici anni che presentava una massa tumorale a livello del radio, accompagnata da gonfiore e dolore. La paziente venne trattata con radioterapia, in seguito alla quale il tumore regredì, pertanto fu evidente ai medici che quello che stavano trattando era un tumore diverso dall’inizialmente ipotizzato osteosarcoma, in quanto quest’ultimo non è responsivo al trattamento radioterapico. All’analisi istologica si riscontrarono piccole cellule poliedriche e assenza di stroma intercellulare, che portarono Ewing a descrivere questa entità tumorale come “sarcoma a cellule rotonde” e a identificarne l’origine nell’endotelio dei vasi sanguigni del tessuto osseo. (Ewing J.; 1921)[1] Il Sarcoma di Ewing (ES) fa parte di una famiglia di tumori definita “Ewing Sarcoma Family of Tumours” (ESFT), la quale comprende, oltre al sarcoma di Ewing osseo, anche il sarcoma di Ewing extra-osseo, il tumore di Askin, che interessa in particolare la cavità toracica, e i tumori neuroectodermici primitivi periferici (pPNET). (Grunewald T. et al.; 2018) (Ludwig J.; 2008)[2] Storicamente il sarcoma di Ewing e i pPNET erano considerati entità tumorali distinte, in quanto il sarcoma di Ewing è meno differenziato rispetto al pPNET, il quale invece presenta differenziazione in senso neurale; inoltre il ES interessa primariamente il tessuto osseo, mentre il pPNET i tessuti molli. Questi due tumori sono stati inseriti nella stessa famiglia di tumori in quanto presentano lo stesso gene di fusione FET-ETS. (Kovar H.; 1998) [3] (Grier H. et al.; 1997) [4] Ad oggi, secondo la classificazione WHO del 2013, i tumori inclusi nella ESFT vengono definiti tutti come Sarcoma di Ewing (ES) in quanto presentano le stesse caratteristiche morfologiche e immunofenotipiche. (Grunewald T. et al.; 2018) [2] (Fletcher C. et al.; 2014) [5] Oltre ai tumori compresi nella ESFT esistono anche i sarcomi Ewing-like, i quali sono

stati definiti storicamente come sarcomi di Ewing "atipici"; questi vengono chiamati così in quanto sono anch'essi dei sarcomi a cellule rotonde con una morfologia simile a quella delle cellule del ES, ma a livello genetico non presentano il gene di fusione tipico FETETS, ma geni di fusione quali CICDUX4 e BCOR-CCNB3. (Carter C. S. et al.; 2019) [6] (Pierron G. et al.; 2012) [7].

Sono presenti ricerche approfondite e una base letteraria in rapida crescita sul ruolo della plasticità cellulare piuttosto che delle mutazioni genetiche nella regolazione dei processi metastatici nell'EWS. Un profilo genomico ed epigenomico completo ha rivelato che EWS-FLI1 guida una diffusa riprogrammazione epigenetica inducendo potenziatori specifici di EWS de novo e reprimendo potenziatori attivi in molti tipi di cellule. Questa prova indica che i fattori epigenetici probabilmente svolgono un ruolo critico nell'inizio e nella progressione dell'EWS. I microRNA (miRNA), una classe di piccole molecole di RNA a filamento singolo non codificanti conservate evolutivamente che svolgono un ruolo fondamentale nel silenziamento genico post-trascrizionale, fanno parte del meccanismo epigenetico ed è stato dimostrato il loro ruolo nella patogenesi e nella progressione dell'EWS. Molti RNA non codificanti sono regolati da EWS-FLI1 e sono attori chiave nella tumorigenesi di EWS, fornendo potenzialmente nuovi biomarcatori e approcci terapeutici. Oltre a EWS-FLI1, è stato scoperto che CD99, l'altro segno distintivo di EWS, il quale modula l'espressione dei miRNA. Il silenziamento di EWS-FLI1 o CD99 mediante RNA interferente corto (siRNA) induce l'arresto della crescita, l'apoptosi e la differenziazione delle cellule EWS e inibisce significativamente la tumorigenesi e le metastasi.

In questo studio, ci siamo concentrati sull'identificazione dei miRNA comunemente regolati da EWS-FLI1 e CD99. Abbiamo sfruttato set di dati disponibili al pubblico che riportavano firme di miRNA associate al silenziamento EWS-FLI1 o CD99 e identificato miR-214-3p come un miRNA represso condiviso. Questo miRNA è associato a importanti processi biologici, come la proliferazione cellulare, la regolazione della staminalità, l'invasività, la metastasi e la resistenza alla chemioterapia in diversi tipi di cancro. Il suo ruolo prognostico è stato convalidato nel sarcoma di Ewing, dove una maggiore espressione era associata a una prognosi migliore. (Nakatani, J Path, 2012 [8]; Marino, Ann Oncol, 2014; [9] Sciandra M

J Cell Commun Signal. 2020) [10].

2.1.1 – **Epidemiologia**

Il sarcoma di Ewing rappresenta il secondo tumore maligno dell'osso per frequenza dopo l'osteosarcoma e colpisce principalmente i bambini e i giovani adulti, con un picco di incidenza nella seconda decade di vita. L'incidenza nella prima decade di vita rappresenta un 20-30%, mentre durante la terza decade si ha circa il 10% di incidenza della malattia. (Bernstein M. et al.; 2006) [11](Esiashvili [12] N. et al.; 2008) Questo è un tumore raro, infatti la sua incidenza annuale è bassa e si assesta circa sugli 1,5 casi per milione, nei caucasici. È importante distinguere l'incidenza in base all'etnia in quanto la popolazione caucasica è la più colpita, mentre si ha un'incidenza nettamente inferiore negli asiatici, con un valore dello 0,8 casi per milione, ed è ancora più bassa nei pazienti di origine africana, dove si hanno solo circa 0,2 casi per milione. Nella popolazione caucasica inoltre l'incidenza di questo tumore è aumentata negli ultimi 30 anni, mentre è rimasta stabile negli altri gruppi etnici. Questo dimostra come il sarcoma di Ewing insorga a causa di riarrangiamenti genetici spontanei e che non sia quindi da attribuire a fattori ambientali o stili di vita. (Jawad M. U. et al.; 2009) [13](Grunewald T. et al.; 2018) (Ludwig J.; 2008)[2] Per quanto riguarda il sesso, i maschi sono leggermente più colpiti, con un rapporto tra maschio e femmina di 3:2; la ragione di questa differenza ad oggi rimane ancora poco chiara e solo studi genetici futuri saranno in grado di chiarire la questione. (Jawad M. U. et al.; 2009) [13].

2.1.2 – **Caratteristiche cliniche e anatomo-patologiche**

Come accennato in precedenza, il sarcoma di Ewing comprende sia il sarcoma di Ewing classico, che colpisce il tessuto osseo, sia il sarcoma di Ewing extra osseo, il quale interessa i tessuti molli, pertanto questo tumore può essere trovato in diverse zone dell'organismo. La localizzazione extra-ossea rappresenta circa il 30% dei casi, mentre quella ossea è

considerata la più frequente. (Choi E. et al.; 2014) [14] I siti ossei più colpiti sono le estremità inferiori (45%), la pelvi (20%), le estremità superiori (13%), lo scheletro assiale e le costole (13%) e le ossa facciali (2%); in particolare tra le ossa lunghe il femore è il più colpito, dove il tumore origina dalla regione metadiafisaria. (Grier H. et al.; 1997) [4] [15] (Burchill S. A.; 2003). I pazienti affetti da sarcoma di Ewing presentano dolore localizzato nel sito di insorgenza tumorale, che può essere intermittente, correlato a uno sforzo fisico e variabile di intensità e, per queste ragioni, spesso è scambiato per dolori di crescita; il dolore può essere accompagnato anche da una massa, la quale è palpabile se localizzata abbastanza in superficie, mentre non è invece visibile se il tumore interessa la pelvi o la parete toracica. La durata di questi sintomi, prima di avere una diagnosi, può andare da alcune settimane ad alcuni mesi. (Widhe B. et al.; 2000) [16] In base alla sede di insorgenza del tumore possono essere presenti degli ulteriori sintomi, ad esempio in caso di massa tumorale localizzata a livello della colonna vertebrale, si può avere compressione del midollo spinale. (Bernstein M. et al.; 2006) [11] Nel caso invece di interessamento della parete toracica i pazienti presentano spesso un versamento pleurico. (Horowitz M. E. et al.; 1992) Negli stadi avanzati della malattia e in presenza di metastasi possono essere presenti anche sintomi di tipo sistemico, come febbre, fatica, perdita di appetito e di peso. (Grunewald T. et al.; 2018) Il sarcoma di Ewing è un tumore molto aggressivo che tende a metastatizzare e, già al momento della diagnosi, circa nel 25% dei pazienti sono presenti lesioni metastatiche. Queste si localizzano principalmente nei polmoni e nella cavità pleurica, nel sistema scheletrico e nel midollo osseo, mentre sedi come i linfonodi regionali o il sistema nervoso sono localizzazioni colpite molto raramente. (Bernstein M. et al.; 2006) [11] A livello macroscopico il sarcoma di Ewing si presenta come una massa grigio-bianca, soffice, con aree necrotiche ed emorragiche e bordi infiltranti; a livello microscopico invece il sarcoma di Ewing viene suddiviso in 3 sottotipi istologici in base al diverso grado di differenziazione in senso neurale: il sarcoma di Ewing classico (meno differenziato), quello atipico e il pPNET (il più differenziato in senso neurale). Il sarcoma di Ewing classico presenta piccole cellule rotonde uniformi tra loro, con nuclei rotondi, cromatina sottile e i nuclei solitamente non sono visibili, inoltre il citoplasma è scarso e di colore chiaro, in quanto sono presenti al suo

interno accumuli di glicogeno. La variante di ES atipica, definita anche “a grandi cellule”, differentemente dal ES classico, è costituita da cellule con nuclei più grandi e dai contorni irregolari. Infine, a differenza della forma classica, i pPNET presentano un maggiore differenziamento in senso neurale, rappresentato dalla presenza di conformazioni cellulari definite rosette di Homer-Wright, ovvero accumuli di cellule con un core neurofibrillare, formato da processi citoplasmatici aggrovigliati. (Choi E. et al.; 2014) [14]

I marker che vanno a costituire il profilo immunofenotipico del sarcoma di Ewing sono diversi, in quanto non ne esiste uno specifico che identifica questo tumore, ma è necessaria la positività a più marker immunofenotipici per poter parlare di sarcoma di Ewing. (Shibuya R. et al.; 2014) [17] Il marker più conosciuto del ES è il CD99, una glicoproteina di membrana codificata dal gene MIC2, posizionato nelle braccia corte dei cromosomi X e Y. L'RNA messaggero (mRNA) di CD99 è sottoposto a splicing alternativo, che permette di ottenere due isoforme diverse della proteina: il tipo 1, o CD99 wild-type (CD99wt), che ha un peso molecolare di 32 kDa ed è formata da 185 amminoacidi, e il tipo 2, o CD99 short form (CD99sh) che ha un peso molecolare di 28 kDa ed è costituita da 161 amminoacidi. Questa proteina, nel Sarcoma di Ewing, gioca un ruolo fondamentale nella trasformazione tumorale agendo da oncogene, infatti è implicata in processi essenziali della cellula quali l'adesione, la differenziazione, la morte cellulare e la migrazione. (Manara M. C. et al.; 2018) Llombart-Bosch e colleghi hanno analizzato 415 Sarcomi di Ewing evidenziando come la proteina CD99 sia presente nel più del 97% dei casi con una positività sia a livello della membrana che del citoplasma e dimostrando quindi l'alta sensibilità e la validità di questo marcatore. La positività per il CD99, pur essendo sensibile, non basta però a identificare con sicurezza questo sarcoma, in quanto questa proteina è presente anche in altri tumori come il rhabdomiosarcoma, il sarcoma sinoviale, le leucemie e i linfomi. (Llombart-Bosch A. et al.; 2009) [18] (Choi E. et al.; 2014)[14] Il secondo marker per importanza è FLI1, ovvero la proteina più frequentemente coinvolta nel riarrangiamento genico che sta alla base del meccanismo patogenetico del ES e che è quindi 4 patognomico di questa patologia. La positività per FLI1 è visibile a livello nucleare anche a livelli elevati nel ES ma, così come accade per il CD99, anche in questo caso l'espressione non è specifica e identificativa del ES,

in quanto presente anche in linfociti normali e altri tumori, come ad esempio i linfomi. (Hornick J. L.; 2014) [19] Altri marker immunofenotipici riscontrabili nel ES sono ad esempio HNK1 (Leu7 o CD57), l'enolasi neurone-specifica (NSE) e la proteina S-100, i quali indicano un maggiore differenziamento neurale, che può essere riscontrabile più frequentemente nel sottotipo pPNET del sarcoma di Ewing. (Bernstein M. et al.; 2006) [11] Recentemente sono stati individuati altri marcatori per il ES quali NKX2.2 e la caveolina 1. In particolare quest'ultima è una proteina di membrana che è coinvolta nella formazione delle caveole e si è visto come questo marcatore sia fortemente espresso nel citoplasma, nel 96% dei casi analizzati; inoltre è presente in quei sarcomi che sono risultati negativi per CD99. (Llombart-Bosch A. et al.; 2009) [18] Per quanto riguarda NKX2.2, questa è una proteina che fa parte di una famiglia di fattori di trascrizione denominata NK2 ed è implicata nello sviluppo e nel differenziamento del sistema nervoso centrale ed è stato visto inoltre che è necessaria per la tumorigenesi del sarcoma di Ewing. Yoshida e colleghi hanno per primi studiato il potenziale diagnostico di questo marker andando a valutare attraverso immunisto chimica la presenza di NKX2.2 in 30 casi di Sarcoma di Ewing e in altri 130 sarcomi a piccole cellule rotonde; la positività alla proteina è stata rilevata nel 93% dei sarcomi di Ewing, mentre gli altri sarcomi erano per la maggior parte negativi (89%). Questo studio ha quindi dimostrato la validità della proteina NKX2.2 come marker immunisto chimico per il Sarcoma di Ewing. (Shibuya R. et al.; 2014) [17] [20] (Yoshida A. et al.; 2012)

2.1.3 – Diagnosi e fattori prognostici

Quando si ha il sospetto che un paziente sia affetto da sarcoma di Ewing, dopo aver analizzato la storia clinica del soggetto, il primo esame che viene effettuato è di tipo clinico e prevede l'ispezione e la palpazione di eventuali masse, riscontrabili per la maggior parte in casi di sarcoma di Ewing osseo localizzato a livello degli arti. Secondariamente si effettuano gli esami di laboratorio i quali però non sono molto informativi, in quanto attualmente non sono presenti marker diagnostici specifici riscontrabili a livello di urine o

sangue. (Grunewald T. et al.; 2018) [2] Le analisi del sangue spesso danno informazioni aspecifiche e riscontrabili anche in altre patologie come quelle infiammatorie; i soggetti affetti possono infatti presentare anemia, leucocitosi ed elevati globuli bianchi e, oltre a ciò, è possibile riscontrare elevati livelli sierici di proteina C reattiva, fosfatasi alcalina e di lattato deidrogenasi (LDH). Una grande quantità di quest'ultima in particolare viene associata ad una peggiore prognosi. Il passo successivo dell'iter diagnostico è rappresentato dalla diagnostica per 5 immagini che comprende la radiografia, la risonanza magnetica, la TAC e la PET. Alla radiografia il sarcoma di Ewing si presenta come una lesione osteolitica, in quanto la massa in formazione invade e distrugge il tessuto osseo circostante; successive indagini tramite TAC e risonanza magnetica sono necessarie per avere delle immagini con una più elevata definizione, con le quali vengono indicati il grado di coinvolgimento dell'osso, la presenza di lesioni dei tessuti molli extra-scheletriche e di lesioni metastatiche, principalmente presenti a livello polmonare. La PET viene utilizzata principalmente per valutare la presenza di metastasi, l'andamento della progressione tumorale e la risposta al trattamento. Una volta fatte queste indagini non si è ancora in grado di affermare con certezza la presenza del sarcoma di Ewing, in quanto questo entra in diagnosi differenziale con altre situazioni patologiche come ad esempio l'osteomielite, il linfoma maligno dell'osso o il neuroblastoma metastatico. È necessario quindi procedere con la valutazione della biopsia, che è considerata il gold standard diagnostico, tramite analisi istologiche, immunoistochimiche e molecolari, che sono in grado di fare una diagnosi differenziale ed indicare con certezza la presenza del sarcoma di Ewing. La morfologia delle cellule di questo tumore non è specifica ed è comune ad un eterogeneo gruppo di sarcomi definiti "a piccole cellule rotonde", l'immunoistochimica quindi può essere più informativa, anche se, come già citato precedentemente, non esiste un solo marker immunofenotipico che identifica questo tumore e, i marker a cui normalmente viene associato questo sarcoma, possono essere presenti anche in altre tipologie tumorali. Ad oggi quindi la diagnosi di sarcoma di Ewing può essere confermata solo attraverso l'analisi molecolare che, tramite RT-PCR e FISH, identifica la presenza del riarrangiamento cromosomico patognomico della patologia che porta alla formazione del gene di fusione EWSR-FLI1. (Ozaki T.; 2015) [21] (Grunewald

T. et al.; 2018) [2] Il sarcoma di Ewing, come è stato accennato in precedenza, è un tumore molto aggressivo con una elevata capacità di metastatizzare, pertanto, per valutare la prognosi dei pazienti e stratificarli al fine di sottoporli al trattamento più adeguato, il fattore prognostico più importante da considerare è sicuramente la presenza di metastasi alla diagnosi. I pazienti che presentano lesioni metastatiche al momento della diagnosi hanno una percentuale di sopravvivenza a 5 anni minore del 30%, a differenza invece dei pazienti con una lesione localizzata, che presentano una percentuale molto più alta di sopravvivenza a 5 anni, tra il 65 e il 75%. Tra i pazienti con metastasi al momento della diagnosi, è interessante notare che, se la localizzazione delle lesioni è a livello polmonare, la prognosi risulta essere migliore rispetto ai soggetti che presentano metastasi in altri siti. Per quanto riguarda invece i casi di sarcoma di Ewing localizzato, un fattore prognostico importante da valutare è la dimensione e il volume tumorale, in particolare nei soggetti dove il tumore si presenta con una grandezza maggiore agli 8 centimetri oppure con un volume maggiore ai 200 millilitri, la prognosi è infausta. (Gaspar N. et al.; 2015)[22] Un altro fattore prognostico da prendere in considerazione è il sito primario di localizzazione del tumore, infatti si è riscontrato che i pazienti con un tumore primitivo a livello delle ossa pelviche presentano una prognosi peggiore rispetto a soggetti con tumori in altre localizzazioni primarie. (Burchill S. A.; 2003) [15] (Bosma S. E. et al.; 2018) [23][24]

2.1.4 – Meccanismo eziopatogenetico

Molti sarcomi sono caratterizzati dalla presenza di traslocazioni cromosomiche che producono dei fattori di trascrizione aberranti, coinvolti nella trasformazione tumorale; il Sarcoma di Ewing ne è il tipico esempio, in quanto è causato dalla traslocazione bilanciata $t(11;22)(q24;q12)$, la quale risulta essere caratteristica della patologia ed è presente nell'85% circa dei casi di ES. (Delattre O, et al.; 1992) [24] (Turc-Carel C. et al.; 1988) [25] Questo riarrangiamento cromosomico causa la formazione di un prodotto di fusione tra i due geni EWSR1, localizzato sul cromosoma 22, e FLI1, che si trova sul cromosoma 11. Il gene EWSR1

codifica per una proteina definita EWS, che fa parte della famiglia di proteine TET (o FET) e che funge da attivatore trascrizionale. FLI1 invece appartiene alla famiglia dei fattori di trascrizione ETS e possiede la capacità di legarsi al DNA attraverso un dominio altamente conservato. La proteina chimerica di fusione che si viene a formare è definita EWS/FLI-1 e contiene il dominio ammino-terminale di EWS (dominio EAD), contenente un motivo che è in grado di associarsi all'RNA, e che esplica la sua funzione di attivatore trascrizionale grazie alla presenza di molte ripetizioni di serina-tirosina-glicina-glutammina, e il dominio terminale carbossilico di FLI1, che ha capacità di legare il DNA. (Sankar S. et al.; 2011) [26] Quindi quando questi due domini vengono a trovarsi vicini, fungono da potente attivatore trascrizionale aberrante che agisce da oncogene; in particolare il ruolo oncogenico di questo gene di fusione è stato dimostrato sulla linea cellulare di fibroblasti murini NIH3T3 nel 1993, in uno studio di William May e colleghi. I ricercatori hanno osservato che sia il gene FLI1 che il gene di fusione EWSR1/FLI1 possiedono entrambi la stessa capacità di legare il DNA e, sulla base di ciò, hanno comparato la capacità trasformante e quindi tumorigenica del solo gene FLI1 rispetto al gene di fusione EWS/FLI1 e hanno dimostrato che FLI1 possiede la capacità di trasformare le cellule NIH3T3 murine solo quando è associato al gene EWSR1. (May W. A. et al.; 1993) [27]

Il gene di fusione EWSR1/FLI1 può produrre diverse isoforme di proteine di fusione in base alla posizione in cui si ha la rottura durante la traslocazione. Il riarrangiamento genico infatti può interessare diversi esoni dei geni EWSR1 e FLI1, producendo diversi sottotipi proteici, tra questi i più frequenti sono il sottotipo 1, definito anche 7/6, perché è formato dalla fusione dell'esone 7 di EWSR1 e l'esone 6 di FLI1, e il sottotipo 2, o 7/5, formato invece dalla fusione dell'esone 7 di EWSR1 con l'esone 5 di FLI1. (Zucman J. et al.; 1993) [28] Come precedentemente accennato, il gene di fusione EWSR1/FLI1 è presente nel sarcoma di Ewing con una frequenza di circa l'85%, mentre nel restante 15% dei sarcomi di Ewing il gene EWSR1 si fonde con altre proteine appartenenti alla famiglia ETS. Come risultato della traslocazione t(21;22)(q22;q12) si ha infatti la fusione di EWSR1 con il gene che codifica per la proteina ERG e questa traslocazione è presente in circa il 10% dei casi di sarcoma di Ewing. La proteina ERG presenta il 68% di amminoacidi identici a FLI1 e i domini che

legano il DNA in queste due proteine sono per il 98% identici, il che porta a pensare che le due proteine abbiano un meccanismo d'azione simile nella patogenesi del Sarcoma di Ewing. (Sorensen P.H.B. et al.; 1994) [2] Inoltre con una frequenza minore dell'1% il gene EWSR1 si può unire alternativamente a geni codificanti per le proteine ETV1, ETV4 oppure a FEV, appartenenti anch'esse alla famiglia di proteine ETS; i geni di fusione contenuti EWSR1 e le proteine della famiglia ETS vengono comunemente indicati come geni di fusione EWS/ETS. (Sankar S. et al.; 2011) [26] Infine, in rari casi possono essere presenti fusioni "non-EWS", dove il gene EWSR1 è sostituito dal gene FUS, appartenente anch'esso alla famiglia di proteine TET. FUS si può legare alternativamente al gene ERG, a causa della traslocazione t(16;21)(p11;q24), o al gene FEV, causando la produzione di geni di fusione FUS/ERG e FUS/FEV. (Ng T. L. et al; 2007) [29] Anche se le funzioni delle proteine di fusione TET/ETS non sono state ancora comprese appieno, gli 8 studiosi concordano che la fusione tra le proteine TET e le proteine ETS causano la produzione di proteine di fusioni aberranti che mimano la struttura e la funzione della proteina di fusione EWSR1/FLI1. (Sankar S. et al.; 2011) [26] In generale quindi il prodotto di fusione che si viene a formare da queste traslocazioni bilanciate, più frequentemente la proteina EWSR1/FLI1, agisce come fattore di trascrizione aberrante, andando a colpire e a deregolare diversi geni target, causando così il fenotipo tumorale. Inizialmente si pensava che la deregolazione avvenisse solo in senso positivo, ovvero che la proteina di fusione avesse un ruolo di attivatore trascrizionale aberrante nei confronti dei bersagli, come avevano dimostrato May e colleghi nel loro studio sulle linee cellulari murine NIH3T3; successivamente però, ulteriori studi hanno dimostrato che la deregolazione avviene anche in senso negativo e che il prodotto di fusione ESR1/FLI1 ha la capacità quindi anche di andare a silenziare i geni bersaglio. (Lessnick S. L. et al.; 2012) [30] Per quanto riguarda la capacità di regolare positivamente a livello trascrizionale, EWSR1/FLI1 si associa, tramite il dominio di EWS, con diverse proteine che fanno parte del complesso proteico di trascrizione, come la subunità hsRBP7 dell'RNA polimerasi II e l'RNA elicasi; mentre per quanto riguarda l'azione deregolatoria, EWSR1/FLI1 interagisce con la proteina p300, sopprimendo la sua attività di acetiltransferasi istonica, inibendo di conseguenza la proteina p21. Quest'ultima gioca un ruolo fondamentale nella transizione

G1-S del ciclo cellulare, permettendo la differenziazione delle cellule normali e reprimendo la crescita tumorale e rappresenta essa stessa un target diretto di EWSR/FLI1. (Todorova R.; 2009) [31] (Nakatani F. et al.; 2003) [8] (Herrero-Martin D. et al.; 2011) [32] Oltre a reprimere direttamente la trascrizione, come nel caso della sopracitata proteina p300, EWS/FLI1 è in grado anche di regolare positivamente l'espressione di fattori di trascrizione aventi ruolo tipicamente inibente come NKX2.2 e NR0B1 (o DAX-1). (Toomey E. C. et al.; 2010) NKX2.2 è un fattore di trascrizione appartenente alla famiglia NK2 di geni homeobox, è coinvolta nello sviluppo del sistema nervoso e si è visto essere un gene target necessario nella trasformazione tumorale nel Sarcoma di Ewing. (Smith R. et al.; 2006) DAX-1 è una proteina che appartiene alla famiglia di recettori nucleari, di cui non si conosce il ligando, e che ha una funzione correlata principalmente alla steroidogenesi; essendo il sarcoma di Ewing non correlato con tessuti steroidogenici, i ricercatori si sono chiesti come mai questa proteina fosse così importante nella patogenesi del ES e quale ruolo avesse. Grazie a diversi studi funzionali si è visto che questa proteina è coinvolta nella proliferazione e nella crescita tumorale. (CidreAranaz F. et al.; 2015) Il prodotto di fusione EWSR1/FLI1 presenta molti altri geni target coinvolti nella tumorigenesi, tra cui alcuni esempi sono: VEGF, hTERT, CAV1 e GLI1; quest'ultima proteina è un fattore di trascrizione appartenente alla via di segnalazione molecolare Hedgehog e quando viene traslocata al nucleo ha la funzione di regolare positivamente la trascrizione di geni coinvolti nella proliferazione e nel differenziamento cellulare. (Toomey

E. C. et al.; 2010) [33] (Cidre-Aranaz F. et al.; 2015) [34] Per quanto riguarda il meccanismo con cui EWSR1/FLI1 regola i propri geni bersaglio, ed in particolare nel caso della regolazione positiva, si è visto che il prodotto di fusione riconosce e si lega a microsatelliti che contengono ripetizioni di GGAA; questi microsatelliti sono presenti nei promotori dei geni regolati positivamente dal gene di fusione, come ad esempio nei promotori di NR0B1 e di CAV1. (Gangwal K. Et al.; 2008) [35] Se si considerano invece i geni bersaglio che vengono regolati negativamente, EWSR1/FLI1 ha la capacità di legarsi al promotore anche di IGFBP3 e di reprimerne l'attività, in particolare nel caso di regolazione negativa la proteina di fusione non si lega ai microsatelliti con motivi ripetuti GGAA, in quanto quella

è una prerogativa della regolazione positiva. Quando IGFBP3 è regolata negativamente, questa non ha più la capacità di legarsi a IGF-1 e inibirne l'azione, pertanto il pathway molecolare di IGF-1 è costitutivamente attivo nelle cellule di sarcoma di Ewing. (Prieur A. et al.; 2004) [36]

Studi precedenti avevano già dimostrato che la via di segnalazione di IGF-1 era costitutivamente attiva all'interno delle linee cellulari di sarcoma di Ewing, infatti sia il fattore di trascrizione IGF-1 sia il suo recettore, IGF-1R, erano espressi. In precedenza, si pensava che questa fosse una via parallela a EWSR1/FLI1, mentre con la scoperta di IGFBP3 come target di EWSR1/FLI1, si è dimostrato che la via di IGF-1 è modulata dalla proteina chimerica stessa. (Toomey E. C. et al.; 2010) [33] La proteina di fusione EWSR1/FLI1, oltre a deregolare geni implicati direttamente nella proliferazione cellulare e più in generale nella tumorigenesi, è implicata anche nella regolazione epigenetica. La proteina chimerica infatti è in grado di legarsi alle sequenze ripetute GGAA ed in particolare, dove sono presenti 4 sequenze GGAA si va a formare un omodimero, composto da due proteine di fusione aberranti. Quest'ultimo fa sì che avvenga un riarrangiamento della cromatina e quindi la sua apertura, che induce uno stato di attivazione all'interno della cellula per tutti quei geni che si trovano nella zona accessibile della cromatina, come ad esempio oncogeni, che vengono quindi trascritti causando il fenotipo tumorale. (Riggi N. et al.; 2014) [37] Il meccanismo con cui avviene la regolazione epigenetica non è stato ancora del tutto compreso ma i ricercatori hanno ipotizzato che nel riarrangiamento cromatinico debbano essere coinvolte anche altre proteine. In uno studio recente di Boulay e colleghi si è visto che EWSR1/FLI1 recluta un complesso proteico ATPdipendente formato da 12/15 subunità, denominato BAF, che ha la funzione di regolare l'architettura genomica e l'accessibilità del DNA. Questo complesso viene reclutato a livello del legame tra la proteina chimerica e le sequenze ripetute GGAA, e interagisce fortemente con EWSR1/FLI1; BAF è risultato essere essenziale per aprire la cromatina e quindi attivare i geni target. (Boulay G. et al.; 2017) [38] Il riarrangiamento cromosomico che causa la formazione del gene di fusione EWS/FLI1 e la conseguente produzione della proteina chimerica EWSR1/FLI1 è il meccanismo patogenetico che sta alla base della trasformazione tumorale nel sarcoma di Ewing, in

quanto è coinvolta nella deregolazione di numerosi geni target e di importanti vie di segnalazioni cellulari. Ulteriori studi di sequenziamento hanno recentemente mostrato che in una piccola percentuale di tumori di Ewing sono presenti anche alcune mutazioni somatiche a carico di geni importanti per la progressione tumorale come TP53 (7%), STAG2 (1720%) e CDKN2A (12%). STAG2 è una proteina che fa parte di un complesso multiproteico essenziale per la coesione del centromero e per la regolazione della separazione dei cromatidi fratelli durante la mitosi. La mutazione di STAG2 è stata riportata in diversi tumori, dove la perdita di funzionalità di questa proteina causa aneuploidia; nel sarcoma di Ewing questo non avviene, quindi si è ipotizzato che la mutazione contribuisca alla patogenesi e soprattutto alla disseminazione e alla progressione tumorale attraverso altri meccanismi, come ad esempio l'alterazione dell'architettura della cromatina con una conseguente alterazione a livello della trascrizione genica. Per quanto riguarda CDKN2A, la mutazione di questo gene è mutualmente esclusiva alla mutazione di STAG2, mentre mutazioni di quest'ultimo possono essere associate anche alla presenza di mutazioni di TP53 e, quando questo avviene, la prognosi risulta essere sfavorevole. (Crompton B. D. et al.; 2014)[39] (Tirode F. et al.; 2014) [40] Nonostante i numerosi studi sulla patogenesi del sarcoma di Ewing, la cellula di origine da cui deriva questo tumore è ancora oggi una questione irrisolta e dibattuta nella comunità scientifica. Quando nel 1921 è stato descritto per la prima volta questo tumore, James Ewing aveva ipotizzato un'origine di tipo endoteliale, basandosi sulla forma delle cellule e sulla mancanza di stroma intercellulare; ad oggi si ipotizzano principalmente due diverse cellule di origine: le cellule della 11 cresta neurale e le cellule staminali mesenchimali (MSCs). Per quanto riguarda la prima ipotesi proposta, questa è sostenuta dal fatto che le cellule di sarcoma di Ewing possono esprimere sulla loro superficie dei marker specifici del differenziamento neurale, come ad esempio l'enolasi neuronospecifica (NSE) e la proteina S-100, inoltre in alcuni sarcomi di Ewing sono stati anche osservati, grazie alla microscopia elettronica, dei granuli neurosecretori. Un'altra evidenza a favore di questa ipotesi è che il sarcoma di Ewing e i tumori pPNET originano dallo stesso riarrangiamento genico e appartengono alla stessa famiglia tumorale, mentre ciò che li differenzia è l'estensione del differenziamento in senso neurale, infatti i pPNET

sono più differenziati in senso neurale rispetto ai sarcomi di Ewing. In aggiunta è stato visto anche che le linee cellulari di sarcoma di Ewing possono differenziare in senso neurale se vengono trattate con agenti inducenti la differenziazione. HuLieskovan e colleghi hanno però dimostrato che l'introduzione ectopica del gene di fusione EWSR1/FLI1 è in grado di indurre un fenotipo neurale di tipo Ewing in diverse linee cellulari, come ad esempio cellule di rhabdomyosarcoma, bloccando il programma differenziativo esistente, infatti anche a livello genico, il prodotto di fusione induce l'espressione di geni associati al differenziamento neurale. Questo dimostra innanzitutto che il fenotipo neurale è un risultato della sovra espressione del gene di fusione

EWSR1/FLI1 piuttosto che supportare l'ipotesi che la cellula di origine stessa sia neurale, allo stesso tempo ciò indica anche che la cellula da cui deriva il tumore probabilmente è un progenitore multipotente che è in grado di differenziarsi anche in derivati della cresta neurale. (Tu J. et al.; 2017) [41] (HuLieskovan S. et al.; 2005) [42] (Toomey E. C. et al.; 2010) [33] Ad oggi quindi l'ipotesi più accreditata è che la cellula di origine sia con molta probabilità la cellula staminale mesenchimale o un progenitore multipotente. Le cellule staminali mesenchimali vengono definite tali in quanto presentano una elevata capacità di rigenerarsi (self-renewal) e sono cellule multipotenti, ovvero possono dare origine a diversi differenziamenti, tra cui i principali sono il differenziamento osteogenico, lipogenico e condrogenico. Queste cellule non vengono identificate da un solo marcatore di superficie, ma da una combinazione di questi, tra cui CD44, CD73, CD90, CD105, CD29 e, oltre a questi, possono essere presenti altri marker di superficie, specifici del tessuto di origine. Le MSCs infatti sono cellule staminali dell'adulto, che si trovano in molti tessuti come midollo osseo, tessuto adiposo, tessuti fetali, polpa dentale e sangue periferico. (Bianco P. et al.; 2008) [43] (Ullah I. et al.; 2015) [44] Una prima considerazione che sostiene l'ipotesi delle MSCs come cellula di origine è che queste sono presenti in una ampia gamma di tessuti, comparabile all'ampia localizzazione del sarcoma di Ewing; infatti questo, pur essendo presente nella maggior parte dei casi nel tessuto osseo, è presente anche in diversi tessuti extra-ossei. (Lessnick S. L. et al.; 2012) [30] A supporto di questa tesi sono inoltre presenti diversi studi, come quello di Tirode e colleghi, dove in linee cellulari di sarcoma di Ewing è stato

silenziato, attraverso piccole sequenze specifiche di RNA a forcina (shRNA), il gene 12 di fusione EWSR/FLI1; ciò che ne è risultato è che le cellule silenziate hanno mostrato un profilo di espressione genica e caratteristiche simili a quelle delle MSCs. Le cellule silenziate presentavano sulla loro superficie dei marker staminali come il CD44, CD73 e il CD29 e inoltre manifestavano caratteristiche riconducibili ai tre destini differenziativi, dopo essere state incubate con i specifici cocktail. (Tirode F. et al; 2007) [40] In un altro studio invece Riggi e colleghi hanno indotto l'espressione di EWSR/FLI1 nelle MSCs e ciò che hanno visto è che innanzitutto queste cellule sono permissive all'espressione del gene di fusione e lo mantengono stabilmente senza che la proliferazione cellulare venga inibita, a differenza di altre linee cellulari primarie, le quali spesso vanno in apoptosi dopo l'introduzione di EWSR/FLI1; secondariamente, analizzando il profilo genetico di queste cellule, hanno osservato come questo sia comparabile al profilo del sarcoma di Ewing. Nelle MSCs trattate con il gene di fusione si ha ad esempio una iperespressione del gene EZH2, coinvolto nella proliferazione cellulare, ma anche l'espressione di numerosi geni coinvolti nella differenziazione neuronale e nello sviluppo della cresta neurale, che si è visto essere importanti nella tumorigenesi del sarcoma di Ewing, come i già citati NR0B1 e NKX2.2. (Riggi N. et al; 2008) [37] Questa ultima evidenza quindi suggerisce che le due ipotesi sulla cellula di origine potrebbero coesistere e, a sostegno di ciò, alcuni studi indicano che una porzione di MSCs nell'adulto potrebbe derivare dal neuroepitelio o da cellule staminali della cresta neurale e quindi conservare nell'adulto una doppia plasticità, ovvero dare origine sia al differenziamento mesenchimale che neuroectodermico. (Riggi N. et al.; 2009) [37] (Toomey E. C. et al.; 2010) [33]

2.1.5 – Terapia

L'approccio terapeutico utilizzato ad oggi per il sarcoma di Ewing si basa sulla multidisciplinarietà e quindi sull'utilizzo di diversi metodi terapeutici quali la chirurgia, la chemioterapia e la radioterapia. In particolare, quest'ultima è stata utilizzata come trattamento standard ancora prima dell'introduzione della chemioterapia in quanto sin

dalla prima descrizione del sarcoma da parte di James Ewing nel 1921, questo tipo di tumore è stato descritto come radiosensibile. Il trattamento localizzato del tumore ad oggi si avvale sia della resezione chirurgica, sia, in casi selezionati, del trattamento radioterapico, infatti studi recenti hanno dimostrato che la sola radioterapia, usata per il trattamento locale non era sufficiente, e presentava un più elevato rischio di recidiva locale rispetto all'utilizzo della sola chirurgia. La radioterapia quindi è attualmente raccomandata come trattamento locale post-operatorio in pazienti in cui la resezione chirurgica è incompleta e non ha permesso di lasciare margini puliti, inoltre si può utilizzare anche nel pre- 13 operatorio in pazienti dove è necessario diminuire il volume tumorale per facilitare la successiva resezione chirurgica. (DuBois S. G. et al.; 2015) [45] (Schuck A. et al.; 2003) [46] Essendo questo un tumore che metastatizza facilmente e molto precocemente, i pazienti trattati localmente con chirurgia e radioterapia, sviluppano molto frequentemente delle metastasi; è quindi necessario un trattamento sistemico chemioterapico. Fin dagli anni '70 la chemioterapia utilizzata veniva definita VAC, in quanto includeva vincristina, dactinomicina e ciclofosfamide, ai quali poi fu aggiunta la doxorubicina che aumentò la sopravvivenza. La chemioterapia viene utilizzata in particolare sia in assetto neoadiuvante (preoperatoria), quindi precedentemente al trattamento locale radioterapico o chirurgico, sia in assetto adiuvante, per tenere sotto controllo le metastasi dopo l'avvenuta resezione chirurgica. Negli anni '80, al regime chemioterapico VAC si aggiunsero anche l'ifosfamide e l'etoposide (IE), utilizzati come terapia di seconda linea. Attualmente sono in corso numerosi studi clinici per decretare quale sia il regime di trattamento migliore, ma ad oggi il trattamento standard in Europa per il sarcoma di Ewing prevede il regime VIDE: vincristina, ifosfamide, doxorubicina ed etoposide; mentre lo standard nel Nord America è rappresentato dal regime chemioterapico VDCIE, che comprende vincristina, doxorubicina, ciclofosfamide accompagnati da ifosfamide ed etoposide. La prognosi per i pazienti ad alto rischio, ovvero con malattia refrattaria e recidivante è infausta, con una sopravvivenza molto bassa, del 22-24%, pertanto per questi pazienti è stato tentato un approccio di chemioterapia mieloablativa ad alta dose, seguita da un trapianto di cellule staminali ematopoietiche autologhe per ricostituire il midollo osseo. (Meyers P. A. et al.; 2001) [47] Gli studi però non

hanno evidenziato un beneficio significativo di questo approccio, pertanto è necessario trovare nuovi bersagli terapeutici che siano in grado di aumentare la sopravvivenza dei soggetti colpiti dal sarcoma di Ewing. (Ozaki T.; 2015) [21] Diverse molecole biologiche sono in fase di studio per cercare di trovare delle terapie di tipo molecolare mirate verso le vie di segnale coinvolte nella patogenesi del sarcoma di Ewing, in particolare piccole molecole e peptidi diretti verso l'interazione tra il gene di fusione EWS/FLI1 con altre proteine facenti parte dei complessi di trascrizione, ad esempio l'RNA elicasi A, sono in fase di sperimentazione preclinica. Un altro target che era stato inizialmente ipotizzato essere valido consiste in IGF1R dato che, come accennato in precedenza, questa via di segnalazione è costitutivamente attiva nelle cellule di sarcoma di Ewing; durante gli studi clinici però è stata evidenziata l'inefficacia a lungo termine degli inibitori di questa proteina. Un ulteriore approccio che è stato tentato, e che sembra essere ben tollerato, prevede l'utilizzo di anticorpi monoclonali contro il VEGF, il fattore di crescita coinvolto nell'angiogenesi, e mira a colpire il microambiente tumorale. Infine si stanno studiando approcci immunologici anche contro il marcatore di membrana CD99, in particolare 14 l'anticorpo monoclonale contro il CD99, aggiunto al trattamento con doxorubicina, ha mostrato effetti antitumorali efficaci nei modelli preclinici (Scotlandi K. et al.; 2006) [48] (Gaspar N. et al.; 2015) [22]

2.1.6 – Fattori Prognostici

La presenza di metastasi alla diagnosi è universalmente riconosciuta come il fattore prognostico più importante nel sarcoma di Ewing: pazienti con malattia disseminata alla diagnosi hanno una probabilità di sopravvivenza a 5 anni inferiore al 30%. Lo studio EuroEwing99 ha elaborato un sistema di stratificazione in sottogruppi di rischio all'interno di questa categoria, tenendo conto del tipo e dall'estensione delle lesioni, dal volume del tumore primario, e dall'età. Combinando queste caratteristiche in uno score che assegna 1 punto a fattori quali età >14 anni, presenza di metastasi del midollo osseo, presenza di singola metastasi ossea, presenza di metastasi ossee e polmonari insieme, ed 1.5 punti a fattori quali volume del tumore primario >200ml e presenza di lesioni ossee multiple,

vengono individuate tre categorie di rischio: gruppo 1 (score ≤ 3 , 50% dei casi analizzati) con sopravvivenza libera da malattia (event-free survival, EFS) pari al 50%; gruppo 2 (score >3 e inferiore a 5) con EFS del 25% ; gruppo 3 (score ≥ 5) con EFS del 10% (Ladenstein et al., 2010) [49]. Per i pazienti con malattia localizzata alla diagnosi, gli attuali protocolli di terapia hanno permesso di raggiungere una sopravvivenza a 5 anni pari a circa il 70%. I fattori prognostici che in Europa vengono utilizzati per adattare la terapia in base al rischio per questa classe di pazienti includono: risposta istologica alla chemioterapia valutata sul pezzo operatorio in tumori resectabili (si definiscono poor responders casi con necrosi 8cm o se il volume è $>200\text{ml}$). Altri fattori clinici con valore prognostico (ma non utilizzati nelle decisioni relative al protocollo di terapia) includono 19 età, febbre ed elevati livelli di LDH. È importante infine ricordare che un fattore prognostico fortemente negativo è la recidivazione di malattia. La maggior parte delle ricorrenze si verifica entro i 3 anni di followup e la sopravvivenza in questi casi è inferiore al 25% (Paulussen et al., 2009) [50]. Diversi studi clinici di fase III sono ad oggi in corso con l'obiettivo di ottimizzare i protocolli terapeutici per i diversi gruppi di rischio identificati sulla base di queste caratteristiche: EWING2008 (ClinicalTrial.gov identificativo NCT00987636), ISG/AIEOP-EW1 (ClinicalTrial.gov identificativo NCT02063022), REECUR (EudraCT identificativo 2014-00025999) (Gaspar et al., 2015) [22]. Nonostante i protocolli terapeutici attuali abbiano portato ad un miglioramento sostanziale dell'aspettativa di vita dei pazienti con diagnosi di sarcoma di Ewing (la sopravvivenza prima dell'introduzione della chemioterapia era solo del 10%), si stima che nel complesso solo il 55% di essi riceva il trattamento appropriato. I dati di sopravvivenza attuali, infatti, ci dicono che: 80/100 nuovi pazienti diagnosticati hanno malattia localizzata alla diagnosi e di questi 60 sopravvivono (75%); 20/100 pazienti diagnosticati hanno malattia diffusa alla diagnosi, 5/20 con metastasi polmonari (2 di questi, 40%, sopravvivono) e 15 con altre metastasi (1 di questi sopravvive, 6%). In tutto sopravvivono 63 pazienti, 8 dei quali (tra quelli con malattia localizzata alla diagnosi) sarebbero sopravvissuti anche in assenza di chemioterapia. In tutto sono quindi 55/100 pazienti che hanno ricevuto un approccio terapeutico adeguato, mentre 65 sono stati sottoposti ad una terapia inefficace o non necessaria (Balamuth and Womer, 2010) [51]. In

questo quadro, la scoperta e lo sviluppo di biomarcatori molecolari è ampiamente auspicabile per poter indirizzare ciascun paziente ad un protocollo terapeutico personalizzato in base al rischio, e che sia il più efficace e meno tossico possibile.

3 – Biomarcatori tumorali

Secondo la risorsa BEST (Biomarkers, Endpoints, and other Tools), recentemente sviluppata da FDA (Food and Drugs Administration) ed NIH (National Institute of Health) allo scopo di armonizzare la terminologia utilizzata in ambito traslazionale, si definisce Biomarcatore 'una caratteristica misurata come indicatore di un processo biologico normale, patologico, o della risposta ad un'esposizione o intervento, incluso un intervento terapeutico. Caratteristiche molecolari, istologiche, radiografiche o fisiologiche sono tipi di biomarcatori. Sulla base del tipo di informazione restituita, e dell'utilizzo clinico che ne deriva, vengono classificati 20 diversi tipi di biomarcatori; quelli di maggiore rilevanza in ambito oncologico includono biomarcatori di suscettibilità o rischio, biomarcatori diagnostici, biomarcatori prognostici e biomarcatori predittivi.

§ Biomarcatori di suscettibilità o rischio:

indicano il potenziale di sviluppo di un determinato tipo di tumore in un individuo che non presenta in quel momento segni clinici di malattia. Un classico esempio di questo tipo di biomarcatori è la presenza di mutazioni germ-line a carico dei geni BRCA1/2, associata ad un aumentato rischio di sviluppo di cancro della mammella e dell'ovaio (Easton et al., 1995 [52]; Hall et al., 1990 [53]; Struwing et al., 1997 [54]; Thorlacius et al., 1998 [55]). L'effettiva utilità clinica dei biomarcatori di suscettibilità dipende fortemente dalla disponibilità di strategie di prevenzione o riduzione del rischio (nel caso citato, controlli di screening più frequenti, chemioterapia preventiva, o mastectomia bilaterale) (Henry and Hayes, 2012) [56].

§ Biomarcatori diagnostici:

vengono utilizzati per individuare o confermare la presenza di una certa malattia o condizione, e/o per identificare individui con uno specifico sottotipo di quella malattia o condizione. Lo sviluppo di questo tipo di biomarcatori dipende fortemente dalla performance clinica in termini di sensibilità (% di individui affetti da malattia che risultano

positivi al test) e specificità (% di individui non affetti da malattia che risultano negativi al test). Un esempio di biomarcatore diagnostico recentemente entrato in commercio è Cologuard, per la diagnosi precoce del carcinoma coloretale nelle feci di individui a medio rischio, basato sulla rilevazione di mutazioni a carico di KRAS e metilazione aberrante di NDRG4 e BMP3, insieme ad un saggio immunoistochimico per l'emoglobina (sensibilità: 92.3%, specificità: 86.6%)(Henry and Hayes, 2012) [56].

§ Biomarcatori prognostici:

indicano la probabilità del verificarsi di un evento clinico (ricorrenza o progressione) in pazienti precedentemente diagnosticati per una certa malattia o condizione clinica, indipendentemente dal tipo di trattamento. In ambito oncologico, la valutazione della prognosi del paziente si è storicamente basata sulla valutazione delle caratteristiche clinicopatologiche (sede e dimensioni tumorali, stato di diffusione della malattia); le moderne tecniche di indagine molecolare stanno permettendo un crescente utilizzo a questo scopo di caratteristiche molecolari come, ad esempio, livelli di espressione di specifici geni, o profili di espressione genica. Ad esempio, nel carcinoma mammario è stato sviluppato un sistema di scoring basato sull'espressione di un pannello di 21 geni che descrive la probabilità di ricorrenza e sopravvivenza in pazienti linfonodo-negativi trattati con tamoxifene (Paik et al., 2004) [57].

§ Biomarcatori predittivi:

identificano individui con una maggiore probabilità di rispondere all'esposizione ad un farmaco o agente ambientale. La risposta può manifestarsi come alleviamento dei sintomi, miglioramento della sopravvivenza, o evento avverso. Questi biomarcatori forniscono informazioni utili alle decisioni relative al trattamento dei pazienti, 21 identificando chi verosimilmente può trarre beneficio dall'utilizzo di uno specifico approccio terapeutico. Esempi di biomarcatori predittivi correntemente utilizzati in clinica includono: mutazioni somatiche a carico di KRAS nel carcinoma coloretale (pazienti mutati hanno una scarsa risposta alla terapia con anticorpi monoclonali anti-EGFR quali Cetuximab o Panitumumab) (Allegra et al., 2009) [58]; overespressione o amplificazione di HER2 nel

carcinoma mammario (associati a migliore esito clinico in seguito a trattamento con anticorpi monoclonali anti-HER2) (Piccart-Gebhart et al., 2005 [59]; Romond et al., 2005 [60]); sempre nel carcinoma mammario, la positività per l'espressione di ER (estrogen receptor) predice la sensibilità alla terapia endocrina con tamoxifene (Jordan, 2004) [61].

La scoperta di nuovi biomarcatori può derivare dallo studio della biologia del tumore o da approcci high-throughput (next-generation sequencing, microarray di espressione, studi di proteomica). L'effettivo utilizzo clinico di un nuovo biomarcatore passa attraverso le fasi di validazione analitica e clinica. La validazione analitica comprende studi riguardanti gli aspetti tecnici di misurazione del biomarcatore, ovvero studi che valutano l'adeguata sensibilità, specificità e robustezza del saggio utilizzato nella misurazione, che deve inoltre essere accurato e riproducibile in diversi laboratori. La validazione clinica fa riferimento agli studi tesi a dimostrare che il biomarcatore è in grado di discriminare in maniera affidabile due gruppi distinti nella popolazione (ad esempio: pazienti con elevata probabilità di ricorrenza vs gruppi con bassa probabilità di ricorrenza nel caso di biomarcatori prognostici, o pazienti con buona risposta ad un specifico tipo di terapia vs pazienti con scarsa risposta a quel tipo di terapia, nel caso di biomarcatori predittivi) (Henry and Hayes, 2012) [56]. Studi volti alla valutazione di parametri quali efficacia comparativa, rapporti rischio/beneficio e/o costo/efficacia legati all'utilizzo di un candidato biomarcatore concorrono (insieme agli studi di validazione precedentemente citati) a definire il quadro di utilità clinica relativo a quel biomarcatore. (Goossens et al., 2015 [62]; Henry and Hayes, 2012 [56]). Idealmente, un nuovo biomarcatore deve dimostrare 'elevata utilità clinica con elevato livello di evidenza'. Le linee guida TMUGS (Tumor Marker Utility Grading System) sviluppate dall'ASCO (American Society of Clinical Oncology), individuano il massimo livello di evidenza (LOE) come quello proveniente da studi clinici prospettici disegnati specificamente per la valutazione di un biomarcatore di interesse (LOE I) o studi clinici prospettici in cui la valutazione del biomarcatore non è l'obiettivo primario (LOE II) (Hayes et al., 1996) [56]. Sebbene questi siano i setting ideali per lo studio e lo sviluppo di nuovi biomarcatori, la realizzazione di questo tipo di studi è economicamente dispendiosa e può richiedere tempistiche molto lunghe; un'alternativa che può permettere di raggiungere ugualmente un

livello di evidenza adeguato è l'analisi retrospettiva di campioni raccolti in precedenti studi con design prospettico (setting prospettico-retrospettivo) (Simon et al., 2009) [63].

I microRNA (miRNA) sono corte sequenze di RNA endogeno, composte da circa 19-25 nucleotidi, che appartengono alla classe di RNA non codificanti (ncRNA), quindi non hanno la funzione di codificare per le proteine, ma rappresentano piuttosto una classe di regolatori genici. (Fabbri M. et al.; 2019 [64]) Queste sequenze sono altamente conservate a livello evolutivo in molti organismi multicellulari, che comprendono sia piante che animali, ed in particolare il primo miRNA è stato scoperto nel *Caenorhabditis elegans* da Lee e colleghi nel 1993. In questo studio i ricercatori scoprirono che il gene definito lin-4, implicato nel controllo dello sviluppo larvale del *C. elegans*, non codificava per una proteina ma produceva dei piccoli RNA, i quali presentavano delle sequenze complementari per un altro gene, lin-14, al quale lin-4 si legava modulandone l'espressione. (Lee R. C. et al.; 1993 [65]) Successivamente nel *C. elegans* venne scoperto un altro miRNA che aveva un ruolo simile a lin-4, il let-7, del quale si scoprirono dei geni omologhi anche nella *Drosophila*, in altri animali e nell'uomo. (Pasquinelli A. E. et al.; 2000 [66]) Queste scoperte diedero un notevole impulso alla ricerca in questo campo e successivamente vennero trovati numerosi altri miRNA, conservati nell'evoluzione e presenti in diverse specie, che erano simili ai primi miRNA scoperti ma, a differenza di questi ultimi, non erano correlati allo sviluppo, in quanto venivano espressi solo in determinati tipi cellulari. (Lagos-Quintana M. et al.; 2001 [67]) Questo evidenziò quanto lo spettro d'azione dei miRNA fosse ampio; infatti, ad oggi è riconosciuto il loro coinvolgimento in moltissimi processi cellulari, quali ad esempio la proliferazione, il differenziamento e la morte cellulare. (Bartel D. P.; 2004 [68]) Attualmente il numero dei loci genici per i miRNA negli esseri umani risulta essere di circa 2000 unità e rappresenta circa l'1-5% del totale dei geni. La scoperta di così tanti geni codificanti per i miRNA è stata possibile grazie innanzitutto alla messa a punto di strumenti bioinformatici che hanno sostituito il classico metodo di clonaggio, e successivamente grazie allo sviluppo di tecnologie di sequenziamento. (Vishnoi A. et al.; 2017 [69]) (Kozomara A. et al.; 2011 [70]) I software bioinformatici definiti MiRscan e miRseeker presentano una elevata sensibilità e hanno permesso di identificare decine di geni che sono poi stati verificati sperimentalmente;

in particolare MiRscan è utilizzato nei vertebrati, mentre miRseeker viene applicato nell'identificazione di geni codificanti miRNA negli insetti. Questi si basano sul fatto che i miRNA derivano da un precursore a forma di forcina (stemloop) conservato filogeneticamente e che presenta caratteristiche peculiari; i software vanno quindi a valutare il genoma dell'organismo analizzato alla ricerca delle sequenze in grado di ripiegarsi in modo tale da formare strutture secondarie a forma di forcina. (Lai E. C. et al.; 2003 [71]) (Lim L. P. et al.; 2003 [72]) (Bartel D. P.; 2004 [68]) I geni che codificano per i miRNA sono stati trovati in diverse localizzazioni genomiche, la maggior parte di questi si trovano a livello di regioni intergeniche, ovvero tra sequenze geniche codificanti per altre proteine, ma sono presenti anche sequenze codificanti per i miRNA che vengono ospitate all'interno di sequenze introniche di altri geni e si trovano orientati nello stesso senso di trascrizione dell'mRNA prodotto dal gene ospitante. Sono infine presenti dei geni raggruppati in cluster, che vengono trascritti come policistroni, e che comprendono più frequentemente dai due ai tre geni, anche se sono stati identificati anche cluster più numerosi. (Altuvia Y. et al.; 2005 [73]) (Cullen B. R.; 2004 [74])

3.1 – Biopsia liquida

I biomarcatori possono essere rilevati a livello del tessuto tumorale, e quindi necessitare di una biopsia, oppure nel sangue, o altri fluidi biologici. L'utilizzo di biopsie è associato ad una serie di inconvenienti: le procedure sono spesso poco confortevoli per il paziente e possono comportare complicazioni cliniche (Overman et al., 2013 [75]); la quantità di materiale ottenuto è solitamente molto limitata, e spesso la qualità è insufficiente per gli studi molecolari; l'informazione ottenuta da indagini condotte su prelievi bioptici rappresenta una fotografia statica di una porzione del tumore, che verosimilmente sottostima l'eterogeneità intra- ed inter-tumorale (Gerlinger et al., 2012 [76]); l'invasività della procedura rende difficilmente applicabile l'ottenimento seriale di biopsie, e di conseguenza impedisce il monitoraggio nel tempo di un determinato biomarcatore tissutale.

È da lungo tempo noto che nel sangue circola una quota di DNA libero (cfDNA); nei pazienti oncologici, i livelli di cfDNA sono più elevati rispetto a soggetti sani, e almeno una quota del cfDNA è di diretta derivazione tumorale (ctDNA): le alterazioni genetiche caratteristiche del tessuto tumorale possono essere detectate nel plasma di questi pazienti (Sorenson et al., 1994 [77]). Ad oggi, il tipo di alterazioni che possono essere ricercate nel plasma dei pazienti spaziano dalla singola mutazione ad analisi di whole-genome sequencing. Le moderne tecniche di next generation sequencing sono infatti state applicate con successo all'analisi del cfDNA, rendendo possibile lo studio di un ampio spettro di alterazioni di derivazione tumorale nel sangue. L'analisi delle caratteristiche genetiche e molecolari dei tumori in maniera non invasiva per il paziente tramite la raccolta di prelievi di sangue o altri fluidi biologici è ciò che viene denominato oggi 'biopsia liquida' (Wan et al., 2017 [78]). I vantaggi della biopsia liquida rispetto a quella convenzionale comprendono la non invasività per il paziente (che rende possibile l'ottenimento di maggiori quantità di materiale biologico, a diverse tempistiche), e una maggiore rappresentatività dell'eterogeneità tumorale, visto che il ctDNA non deriva da una porzione fisicamente definita del tumore ma dal complesso delle cellule tumorali presenti nell'organismo (Crowley et al., 2013 [79]). Le possibili applicazioni cliniche della biopsia liquida sono molteplici. Uno degli utilizzi di maggiore interesse riguarda la determinazione dello stage e della prognosi. È stato dimostrato che la concentrazione del ctDNA in pazienti in stadio avanzato è intorno alle 100 volte superiore rispetto a quella dei pazienti agli stadi primitivi. I livelli di ctDNA possono variare molto anche tra pazienti allo stesso stadio di malattia, variabilità che si ritiene essere il riflesso della correlazione del ctDNA con il volume tumorale e il grado di disseminazione metastatico. La positività per ctDNA è stata associata a una ridotta sopravvivenza in pazienti affetti da carcinoma coloretale, NSCLC e melanoma; i livelli di ctDNA correlano con un peggior esito clinico in pazienti affetti da carcinoma mammario, carcinoma ovarico e melanoma (Wan et al., 2017 [78]). La non invasività della biopsia liquida rende possibile il monitoraggio temporale della risposta alla terapia, della malattia minima residua ed eventuali ricorrenze. È stato mostrato nel carcinoma mammario come i livelli di ctDNA siano in grado di dare indicazione di risposta alla chemioterapia e di eventuale ricaduta in

tempi molto più brevi rispetto ad altri marcatori più comunemente utilizzati (es. CA15-3). Sebbene sia intuitivo pensare che risposta alla terapia significhi riduzione dei livelli di ctDNA, anche un transiente aumento dei livelli di questi a breve distanza dall'inizio della terapia può esserne indicativo, in conseguenza all'aumento di morte cellulare (Wan et al., 2017 [78]). Il rilevamento di ctDNA al primo follow up dopo chirurgia con intento curativo si è visto essere associato ad una ridotta sopravvivenza libera da ricadute in carcinoma coloretale e mammario; l'intervallo tra il rilevamento di ctDNA dopo trattamento e ricaduta clinica è in media di 10 mesi, suggerendo che la biopsia liquida possa aiutare a guidare le decisioni terapeutiche relative ai pazienti non rispondenti o con alto rischio di ricaduta in anticipo rispetto al verificarsi della ricaduta stessa (Garcia Murillas et al., 2015 [80]; Tie et al., 2016 [81]).

3.2 – I microRNA

3.2.1 – Biogenesi

La biogenesi dei miRNA avviene in due fasi, la prima a livello del nucleo e la seconda a livello del citoplasma e viene rappresentata schematicamente nella figura 4 sottostante. Nel nucleo si ha la produzione del trascritto primario, definito pri-miRNA, da parte alternativamente della RNA polimerasi II o della RNA polimerasi III. Nella maggior parte dei casi si ha una preferenza di azione della polimerasi II, la quale trascrive sia gli mRNA che alcuni ncRNA; la propensione per la polimerasi II è dimostrata dal fatto che la lunghezza dei pri-miRNA è di 1 kilobase (kb) più lungo dei trascritti della polimerasi III, inoltre il trascritto primario presenta la struttura CAP a una estremità e la coda poly-A, caratteristiche tipiche dei trascritti della polimerasi II. (Lee Y. et al.; 2004 [82]) In alcuni casi c'è però anche l'azione della RNA polimerasi III, come dimostrato dallo studio di Borchert e colleghi, e questo enzima opera in particolare in quei casi in cui dei cluster genici per i miRNA sono associati a ripetizioni Alu; queste ultime sono brevi sequenze intersperse di DNA che originariamente costituivano i siti di taglio per l'enzima di restrizione endonucleasi Alu.

(Borchert G. M.; 2006 [83]) Il trascritto primario ottenuto dalla trascrizione generalmente è composto da diverse kilobasi e presenta una forma a forcina; a livello del nucleo il pri-miRNA viene processato in premiRNA, il quale costituisce anch'esso una struttura a forcina ma con 60-70 nucleotidi in meno alla base. Questo taglio è eseguito da Drosha, una RNasi di tipo III, la quale forma un complesso proteico assieme a DGCR8, suo cofattore, che possiede due domini che legano i doppi filamenti di DNA e che quindi ha il ruolo di guidare Drosha sul pri-miRNA. (Han J. et al.; 2004 [84]) A questo punto il pre-miRNA può essere trasportato dal nucleo al citoplasma, grazie all'azione dell'esportina 5, un trasportatore nucleare RanGTP dipendente, che lega il pre-miRNA e lo trasporta al citoplasma attraverso dei canali nucleari di membrana. Quando il complesso arriva al citoplasma l'esportina 5 rilascia il pre-miRNA e contemporaneamente si ha l'idrolisi della molecola di GTP da parte del cofattore GTPasi Ran. (Yi R. et al.; 2003 [85]) Nel citoplasma si ha la seconda fase di processamento e quindi la maturazione del premiRNA grazie all'azione di un'altra RNasi di tipo III, definita Dicer; quest'ultima è un enzima altamente conservato negli organismi eucariotici ed è molto specifico. (Feng Y. et al.; 2012 [86]) Dicer forma un complesso proteico, andando ad associarsi ad altre proteine quali TRBP, PACT e la famiglia di proteine Argonata (Ago), per poi andare a tagliare entrambi i filamenti del pre-miRNA a circa 22 nucleotidi dalle estremità, eliminando la porzione circolare che univa la struttura a forcina, con la conseguente formazione di un duplex miRNA:miRNA, ovvero di un doppio filamento di RNA della lunghezza di circa 22 nucleotidi. Grazie a una RNA elicasi il duplex viene aperto e i due filamenti si dividono, uno viene definito filamento passeggero, mentre l'altro è chiamato filamento guida, e sarà proprio quest'ultimo, grazie a Dicer e alla proteina Ago2, che verrà caricato sul complesso RISC.

Inizialmente si pensava che il filamento passeggero venisse degradato, mentre ad oggi è riconosciuto il fatto che anch'esso può essere funzionale e può venire caricato, alternativamente al filamento guida, sul complesso RISC. Dopo il caricamento, il miRNA maturo e funzionale guida il complesso RISC sull'RNA messaggero target per silenziarlo; questo può avvenire attraverso due meccanismi distinti, il taglio diretto dell'RNA messaggero oppure l'inibizione della traduzione (Figura 4). (Schwartz D. S. et al.; 2003 [87])

(Wahid F. et al.; 2010 [88]).

3.2.2 – Meccanismo d'azione e funzione biologica

Dopo la biogenesi il miRNA maturo, associato al complesso RISC, è funzionale e va a riconoscere l'mRNA target in modo specifico per regolarne negativamente l'espressione genica; questo può avvenire attraverso due meccanismi post-trascrizionali, quindi a livello del trascritto maturo (mRNA). Se l'appaiamento tra il miRNA e il suo mRNA bersaglio è sufficientemente esteso e se il miRNA è associato con una proteina Argonauta 2 (Ago2), contenuta nel complesso RISC, che è in grado di catalizzare un taglio nucleolitico, allora il miRNA è in grado di tagliare direttamente il trascritto target; si ha quindi quel meccanismo d'azione che prevede il taglio diretto dell'RNA messaggero. (Liu J. et al.; 2004 [89]) Questo meccanismo è attivo più frequentemente nelle piante, mentre è più raro negli esseri umani e in altri mammiferi. Nell'uomo, infatti, il meccanismo che viene utilizzato più frequentemente è l'inibizione della traduzione che avviene senza il taglio diretto dell'mRNA da parte di Ago2 e che non richiede una completa complementarietà tra il miRNA e il suo mRNA target. Questo meccanismo prevede l'inibizione della traduzione del messaggero, la sua destabilizzazione e l'accelerazione della sua degradazione, grazie all'azione di diverse proteine, come ad esempio la proteina adattatrice TNRC6 (o GW182), reclutate dalle proteine Argonauta, presenti nel complesso RISC. GW182, grazie alla sua struttura flessibile che funge da ponte, contenente motivi ricchi di triptofano (W), riesce a fare da ponte tra le proteine Ago e altri complessi proteici, come i complessi citoplasmatici di deadenilasi PAN2-PAN3 e CCR4-NOT. I complessi di deadenilazione hanno la funzione di andare a deadenilare l'RNA messaggero, eliminando la coda di poli-A; successivamente, al messaggero deadenilato, viene eliminato anche il CAP, che causa la destabilizzazione dell'mRNA e la sua conseguente degradazione nel senso 5'-3' da parte di XRN1, una esoribonucleasi. Il reclutamento di GW182 causa anche una repressione della traduzione del messaggero target, grazie al richiamo di una elicasi, DDX6, che interagisce con il complesso CCR4-NOT, e inibisce la traduzione; un secondo meccanismo vede coinvolta l'elicasi eIF4A,

la quale rappresenta il fattore che permette l'inizio della traduzione e il 18 legame tra il messaggero e la subunità 43S del ribosoma, ed inoltre va a formare il complesso eIF4F, andandosi a legare ad eIF4G ed eIF4E. Nell'ambito di questo meccanismo, il miRNA interferisce con l'assemblaggio del complesso e la conseguente funzionalità di eIF4A, inibendo la traduzione. (Bartel D. P.; 2018 [90]) (Jonas S. and Izaurralde E.; 2015 [91])

Attraverso questi meccanismi i miRNA vanno quindi ad espletare la loro funzione di regolare negativamente l'espressione genica, a livello posttrascrizionale; questo è possibile grazie al riconoscimento tra il miRNA e il suo mRNA bersaglio, che avviene attraverso l'appaiamento di basi secondo Watson-Crick. In particolare, il riconoscimento e l'appaiamento avvengono tra i nucleotidi 2-7 del miRNA, che vengono definiti "regione seed", e la regione target dell'mRNA che è situata a livello 3'UTR, come era già stato visto per il primo miRNA identificato, lin-4, e per il suo target, lin14. (Bartel D. P.; 2009 [68]) Ad oggi sono stati sviluppati numerosi algoritmi in grado di predire i target di un miRNA che cercano le possibili sequenze a livello delle regioni 3' UTR complementari alla regione seed del miRNA preso in considerazione. Tra le sequenze predette, non tutte però saranno effettivi target del miRNA, sono quindi presenti dei falsi positivi; una strategia per cercare di eliminare i falsi positivi è quella di scegliere tra le regioni 3'UTR, quelle che sembrano essere le più conservate a livello evolutivo. Anche applicando questa regola si è visto che gli mRNA target di un 19 solo miRNA sono molti e questo dimostra l'elevata complessità del sistema di regolazione basato sui miRNA. (Bartel D. P.; 2018 [90]) Come accennato in precedenza è stato visto che molto spesso il filamento passeggero che si viene a formare dalla divisione del miRNA duplex in due filamenti, non viene eliminato e degradato, come era stato ipotizzato inizialmente; di conseguenza dallo stesso precursore si formano due miRNA distinti e funzionali, che vengono definiti 5' (o 5p) e 3' (o 3p) in base al braccio da cui derivano, i quali avranno sequenze diverse e quindi differenti mRNA bersaglio. Infine, avendo differenti target i due miRNA presenteranno quindi anche diverse funzioni biologiche e questo mette in luce quanto sia ampio il raggio d'azione di questi regolatori genici, i quali possiedono la capacità di regolare diversi processi fisiologici all'interno delle cellule. Infine, oltre al fatto che un solo miRNA può regolare diversi mRNA bersaglio, anche

un solo mRNA bersaglio può essere target di diversi miRNA. (Marco A. et al.; 2012 [92]) (Wahid F. et al.; 2010 [88]) Per quanto riguarda la funzione biologica, questa è stata studiata attraverso degli esperimenti di knockout (eliminazione) di specifici miRNA nel *C. elegans*, dai quali si è scoperto che la maggior parte dei miRNA avevano delle funzioni biologiche ridondanti; in particolare sono state analizzate diverse famiglie di miRNA, la cui deplezione è risultata in fenotipi anormali a carico del *C. elegans*. Gli studi poi sono continuati su altri modelli animali, fino ad arrivare ai topi e, in essi, essendo anche in questo caso presente una certa ridondanza nella funzionalità delle famiglie di miRNA, si è visto che sono necessari più knockout di miRNA appartenenti alla stessa famiglia perché il fenotipo anormale si manifesti. In generale esperimenti di knockout per diversi miRNA hanno portato alla comparsa di conseguenze importanti, quali ad esempio disordini neurologici, infertilità, cecità e sordità, disordini immunologici e l'insorgenza del cancro. Queste evidenze hanno quindi permesso di associare ai miRNA, soprattutto quelli più conosciuti e conservati attraverso le specie, per cui quindi era possibile disporre di un modello animale, una determinata funzione; mentre per i miRNA scoperti più recentemente e per quei miRNA non conservati filogeneticamente sono ancora necessari ulteriori studi per attribuire loro una funzione. (Bartel D. P.; 2018 [90])

3.2.3 – Il ruolo dei microRNA nei tumori maligni

Dati i numerosi target dei miRNA e visti gli esperimenti di knockout che hanno portato all'insorgenza di numerosi disordini, è riconosciuto che i miRNA siano regolatori genici coinvolti in numerose funzioni cellulari quali ad esempio, solo per citarne alcune, la proliferazione e la differenziazione cellulare; di conseguenza alterazioni nell'espressione di questi regolatori possono facilmente contribuire all'insorgenza di patologie, incluso il cancro. Questo è dimostrato anche dal fatto che l'espressione dei miRNA è diversa tra tessuti sani e tessuti tumorali, più in particolare in campioni tumorali derivanti da diversi tessuti quali polmoni, mammella, stomaco, prostata e colon, sono stati ritrovati particolari miRNA sovra espressi, che vengono ad oggi definiti anche oncomiR, che agiscono quindi

alla stregua degli oncogeni. (Esquela-Kersch A. and Slack F. J.; 2006 [93]) (Volinia S. et al.; 2005 [94]) Allo stesso tempo nei tessuti tumorali sono stati trovati anche miRNA sotto espressi; quindi questi regolatori possono agire anche al pari dei geni oncosoppressori, quando la perdita di espressione di questi è in grado di causare il fenotipo tumorale. Quindi sia un aumento (gain of function) che una perdita di funzione (loss of function) dei miRNA può portare alla tumorigenesi, e il loro ruolo di oncosoppressori o oncogeni dipende dal tipo di target del miRNA stesso. Ad esempio, se si sovra esprime un miRNA il cui messaggero target ha ruolo di oncosoppressore, essendo i miRNA regolatori negativi, si avrà una minore espressione dell'oncosoppressore e di conseguenza si instaurerà il fenotipo tumorale; il miRNA preso in considerazione in questo esempio sarà quindi considerato un oncomiR. Al contrario, se si ha una mancata produzione di un miRNA il cui target ha funzione di oncogene, la mancata regolazione negativa da parte del miRNA considerato, causerà una espressione eccessiva della proteina con funzionalità oncogenica che porterà all'insorgenza del tumore; in questo caso il ruolo del miRNA è quindi oncosoppressivo. (Zhang W. et al.; 2007 [95]) Nel 2002 uno studio di Calin e colleghi ha dimostrato per la prima volta la correlazione tra due specifici miRNA, il miR-15a e il miR-16-1, e la patogenesi tumorale, in questo caso la leucemia linfatica cronica a cellule B (B-CLL); in particolare i ricercatori hanno evidenziato come i geni per questi due miRNA erano situati a livello della regione cromosomica 13q14, la quale è deleta nella maggior parte dei casi di leucemia analizzati, e come questi fossero quindi coinvolti nella patogenesi della malattia. (Calin G. A. et al.; 2002 [96]) Da allora numerosi studi hanno dimostrato la presenza di miRNA deregolati in tessuti tumorali, come ad esempio la ridotta espressione dei miR-125b, miR145 e miR-155 nel cancro alla mammella. (Iorio M. V. et al.; 2005 [97]) Esempi invece di miRNA che sono iper espressi in diversi tipi di tessuti tumorali sono ad esempio il miR-155, il miR21 e il cluster miR-17-92. (Garzon R. et al.; 2009 [98]) L'alterata regolazione dei miRNA è causata da diverse anomalie genetiche come delezioni genomiche, mutazioni, amplificazioni e alterazioni epigenetiche e questo è dovuto dal fatto che i geni codificanti per i miRNA spesso sono localizzati in regioni genomiche definite "fragili", ovvero che sono frequentemente colpite da mutazioni che causano il cancro. (Calin G. A. et al.; 2004 [99]) Per

quanto riguarda la regolazione epigenetica, è stato visto che i geni codificanti per i miRNA vengono silenziati o attivati da parte di regolatori epigenetici come, ad esempio, la metilazione del DNA o le modificazioni a livello istonico; a dimostrazione di ciò è stato riportato che esistono geni per i miRNA che si trovano nelle isole CpG, ovvero in zone ricche di dinucleotide citosinaguanina, le quali sono 21 tipicamente soggetto di metilazione. (Fabbri M. and Calin G. A.; 2010 [100]) La deregolazione della produzione dei miRNA può essere anche associata ad una mancata biogenesi, la quale è causata a sua volta da alterazioni delle proteine coinvolte in essa quali Dicer, Drosha e le proteine Argonata; bassi livelli di queste proteine sono infatti stati evidenziati in diverse entità tumorali. (Esquela-Kerscher A. and Slack F. J.; 2006 [93]) Infine, così come avviene per i geni codificanti per proteine, anche i geni codificanti i miRNA vengono controllati a livello trascrizionale dai fattori di trascrizione, quindi una alterata produzione dei miRNA può essere dovuta anche alla presenza di fattori di trascrizione deregolati e i principali fattori di trascrizione che nel cancro solitamente vengono alterati sono p53 e c-Myc. (Peng Y. and Croce C.M.; 2016 [101]) Come accennato in precedenza, i miRNA sono regolatori negativi coinvolti in diverse funzioni fisiologiche e biologiche della cellula, così come sono coinvolti in tutti i tratti distintivi che caratterizzano la crescita e la proliferazione tumorale; sono quindi coinvolti nella proliferazione cellulare, nell'evasione dell'apoptosi, nell'angiogenesi e nell'invasione. (Dragomir M. P. et al.; 2020 [102]) Per quanto riguarda la proliferazione cellulare, questa è associata anche all'evasione dei segnali che normalmente la reprimono, infatti a livello cellulare, in condizioni fisiologiche, si ha un equilibrio tra il sostentamento e la soppressione della proliferazione; questo controllo avviene in particolare a livello del ciclo cellulare, il quale è finemente regolato. Diversi fattori di trascrizione come ad esempio E2F e diverse proteine, quali le cicline, sono coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare ed è stato visto che i miRNA sono coinvolti nella loro regolazione. Un'altra caratteristica fondamentale delle cellule tumorali è la loro capacità di evadere i segnali di apoptosi e il meccanismo principale con cui questo avviene è la perdita di funzionalità di p53, oltre a questo anche altri metodi sono stati messi appunto dalle cellule tumorali, come la iper regolazione dei segnali anti-apoptotici o l'inibizione delle vie di segnale apoptotiche. In studi recenti è stato

dimostrato come i miRNA siano coinvolti in queste vie di segnalazione, in particolare come questi siano correlati con la regolazione di p53, e di fattori anti-apoptotici come Bcl-2. Se si prendono in considerazione, infine, le caratteristiche tumorali di angiogenesi e invasione, con conseguente metastatizzazione, anche in questo caso i miRNA sono importanti regolatori di questi meccanismi, sono infatti coinvolti innanzitutto nella regolazione di TGF-beta, il quale induce il processo di transizione epiteliale-mesenchimale (EMT), fondamentale per l'invasione e la metastatizzazione. In secondo luogo i miRNA sono coinvolti anche nella regolazione del processo di angiogenesi, fondamentale per permettere alla massa tumorale di ricevere ossigeno e nutrienti durante la sua crescita. In particolare i miRNA vanno ad agire a livello di due fattori di trascrizione che sono principalmente coinvolti nell'angiogenesi, ovvero HIF, fattore indotto dall'ipossia e VEGF, il fattore di crescita endoteliale. (Peng Y. and Croce C.M.; 2016 [101])

Negli ultimi anni grazie a tecnologie quali l'RNA microarray sono stati individuati specifici miRNA sopra espressi o sotto espressi correlati a particolari tipi di cancro e questo ha permesso di porre le basi per usare questi miRNA circolanti come marcatori indicativi per la diagnosi e la prognosi. Questa è un'area in continua crescita grazie ai recenti studi che hanno dimostrato che le cellule tumorali sono in grado di rilasciare queste molecole e più in particolare di rilasciarle all'interno di microvescicole, grazie alle quali i miRNA non vengono degradati a livello del circolo sanguigno. Di tutti i miRNA analizzati si sono evidenziati in particolare un aumento di livelli di miR-21 e un abbassamento dei livelli di let-7, i quali sono i più frequentemente associati con la prognosi del paziente. (Hayes J. et al.; 2014 [103]) (Carter J. V. et al.; 2017 [104]) (Bertoli G. et al.; 2015 [105]) Oltre agli studi che vedono i miRNA utilizzati come biomarcatori, sono in corso ulteriori studi che mirano invece ad utilizzare i miRNA come agenti terapeutici, in particolare sono state studiate diverse strategie terapeutiche basate sui miRNA. Una prima strategia è quella di andare a rimpiazzare un miRNA che è stato perso, per ricostituire la sua funzione soppressiva, e la molecola che viene utilizzata viene definita "miRNA mimic", un oligonucleotide sintetico che mima la controparte fisiologica mancante. I miRNA mimic possono inoltre venire modificati chimicamente per avere una maggior stabilità e per poter andare a bersagliare

specifiche cellule tumorali; questi inoltre possono essere somministrati sia localmente che per via sistemica. Attualmente è in fase I di sperimentazione il mimic del miR-34 sia per tumori solidi che per quelli ematologici; questa molecola infatti ha mostrato in studi preclinici elevate potenzialità antitumorali. Oltre al miR-34, sono in fase di sperimentazione di tipo preclinico altri miRNA mimic, come ad esempio il miR-200, il miR-15 e il miR16. Un'altra strategia ad oggi investigata in diversi studi preclinici è costituita dall'utilizzo di antimiR, ovvero oligonucleotidi antisenso (ASOs), che hanno lo scopo di andare a sopprimere quei miRNA che nel cancro sono sopra espressi. Per quanto riguarda l'aspetto terapeutico sono ancora molto pochi i farmaci basati sui miRNA che sono passati dalla fase preclinica alla fase clinica, quindi sono necessari ulteriori studi in questo campo per trovare possibili miRNA da usare come agenti terapeutici. (Rupaimoole R and Slack F. J.; 2017 [106]).

4 – Materiali e Metodi

4.1 – Scopo dello studio

Durante il primo anno di lavoro, lo scopo si è concentrato su:

- Raccolta di specifici consensi informati. La procedura di campionamento ed il successivo trattamento dei dati clinici e genetici, necessitano di uno specifico consenso informato che è stato raccolto dal paziente al momento della diagnosi di sarcoma di Ewing. Lo scopo del presente studio era di indagare il valore di miR-34a-5p (miR34a) come biomarcatore circolante per investigare la progressione della malattia e misurare la risposta terapeutica. Uno dei miRNA maggiormente studiati per il suo coinvolgimento in molteplici meccanismi cellulari è il miR34a (Hermeking, Cell Death Diff, 2010). Il suo ruolo prognostico è stato validato nel SE, dove un'alta espressione di questo microRNA è risultata associata ad una migliore prognosi (Nakatani, J Path, 2010; Marino, Ann Oncol, 2014).
- Raccolta di campioni di sangue e plasma dei pazienti. Per ciascun paziente, il sangue è stato raccolto in momenti specifici ovvero al momento della diagnosi e al termine della chemioterapia preoperatoria, cioè prima dell'intervento chirurgico.

Abbiamo mirato a utilizzare la ddPCR per valutare i livelli di tre microRNA che abbiamo scoperto avere un ruolo oncosoppressivo a livello tissutale nel SE. La loro rilevazione nel plasma è di particolare interesse per definire un ruolo legato alla prognosi, progressione del tumore o qualsiasi risposta al regime terapeutico. Questi sono miR34a-5p, miR199a-3p e miR214.

Nelle cellule mesenchimali (MSC) e nel sarcoma di Ewing (EWS) e in campioni di tessuto, mediante qRT-PCR è stata analizzata l'espressione di miR-214-3p. Grazie a studi in vitro dopo trasfezione o silenziamento, sono stati valutati gli effetti biologici dell'iperespressione e della sottoespressione dei meccanismi di proliferazione del miR-214-3p e di migrazione cellulare. L'analisi in silico ha consentito l'identificazione del potenziale target validato di

HMGA1 mediante tecnica Western Blot.

Nel presente studio abbiamo, quindi, valutato l'espressione del miR34a circolante in una coorte di pazienti affetti da SE con tumore localizzato (PRI, n = 26) da un parte e dall'altra in una coorte di pazienti con metastasi rilevabili alla diagnosi (PRI-Met, n = 19).

Questi 45 pazienti in totale sono stati arruolati tutti presso l'Istituto Ortopedico Rizzoli, presentavano una diagnosi confermata istologicamente di SE, hanno iniziato tutti il trattamento chemioterapico presso l'Istituto Ortopedico Rizzoli. I pazienti sono stati arruolati in studi clinici e sono state raccolte le informazioni cliniche, il volume del tumore è stato calcolato mediante risonanza magnetica imaging (MRI). Il diametro massimo del tumore è stato misurato su tre piani e il volume del tumore è stato calcolato in base a formule adatte alla configurazione del tumore ellissoidale o cilindrica, considerando un fattore di correzione.

Il sangue periferico è stato ottenuto da pazienti durante il campionamento di routine, al momento della biopsia e al termine del trattamento chemioterapico neoadiuvante, prima dell'intervento chirurgico, quindi con nessun onere aggiuntivo per i pazienti stessi.

I campioni di sangue sono stati raccolti in provette EDTA da 9 ml e il plasma è stato preparato entro 1 ora trattenendo il surnatante dopo. I campioni sono stati conservati a -80 °C.

Il numero limitato di pazienti, di cui il plasma fosse disponibile per lo studio, e il loro breve tempo di follow-up non hanno consentito di eseguire analisi di sopravvivenza con le curve di Kaplan-Meier, ma è stato possibile affrontare esclusivamente indagini correlative.

I livelli di miR34a sono stati valutati nel plasma mediante quantificazione assoluta in RT-qPCR.

4.2 – Quantificazione dei microRNA da plasma tramite RTqPCR

Le fasi di lavoro sono le seguenti:

- a) Raccolta e conservazione del plasma;
- b) Estrazione RNA;
- c) Preparazione curva standard e retrotrascrizione;
- d) qPCR;
- e) Normalizzazione dati.

- a) Raccolta e conservazione del plasma

Appena ricevuto il prelievo (o comunque entro poche ore), si centrifuga il sangue periferico a 2000rpm x 10min. Si prelevare il surnatante acellulare (plasma) facendo attenzione a non contaminare con la parte cellulare sottostante. (Da 4ml di sangue si ottengono solitamente ~1.5-2ml di plasma). Si suddividere il plasma raccolto in aliquote da 200-250ul e congelarle subito a -80°C e conservano le aliquote a -80°C per almeno 1 mese e non oltre 3 mesi prima di procedere all'estrazione di acidi nucleici.

- b) Estrazione dell'RNA

Per l'estrazione dell'RNA si fa riferimento al protocollo "miRNesy mini kit" (Qiagen, cat.# 217004) con minime variazioni. In breve, si scongelano i campioni di plasma in ghiaccio e prelevano 200ul plasma da trasferire in eppendorf da 2ml. Si aggiunge 1ml Qiazol al campione, mescolando e pipettando. Si mantiene il campione a temperatura ambiente per 5 minuti e aggiunge al campione il pool di miRs di C. Elegans (cel-miR-39, 54, 338; vedi tabella sotto), 12.5fmoli di ogni miR per 200ul di plasma/siero (se lo stock è di 5nM, sono 5fmol/ul, usare 2.5ul).

Product	Name	Sequence
100nmole RNA oligo*	Cel-miR-39	5' rUrCrA rCrCrG rGrGrU rGrUrA rArArU rCrArG rCrUrU rG 3'
100nmole RNA oligo*	Cel-miR-54	5' rUrArC rCrCrG rUrArA rUrCrU rUrCrA rUrArA rUrCrC rGrArG 3'
100nmole RNA oligo*	Cel-miR-238	5' rUrUrU rGrUrA rCrUrC rCrGrA rUrGrC rCrArU rUrCrA rGrA 3'

*HPLC purified

Si prosegue secondo protocollo kit miRNeasy "Purification of total RNA, including small RNAs, from serum or plasma using the miRNeasy Mini Kit". Se si raccolgono 700ul di fase acquosa, si aggiunge 1ml di Etanolo 100% (1.5 volumi), ed effettuano 3 passaggi su colonna. Infine, si eluire in 35ul RNasefree H₂O del kit e conservare a -80C.

c) Preparazione curva standard e retrotrascrizione

Prima di procedere all'analisi quantitativa in qPCR, ciascun campione deve essere retrotrascritto in parallelo per il/i microRNA di interesse e per i cel-miRs aggiunti al momento dell'estrazione. La quantificazione del microRNA di interesse viene determinata in termini assoluti (numero di copie), in riferimento ad una curva standard generata effettuando diluizioni seriali di un oligo a RNA con sequenza uguale al microRNA di interesse.

La curva prevede la creazione di 12 diluizioni seriali partendo da uno stock iniziale a 1nM diluito 1:120 per la creazione del primo punto della curva; si procede poi alla creazione dei successivi punti sfruttando un fattore di diluizione 1:4, fino ad arrivare all'ultimo punto che non contiene più alcuna copia dell'oligonucleotide di riferimento (bianco).

La curva standard deve essere retro trascritta insieme ai campioni che andranno analizzati nella stessa piastra. Per la retro trascrizione utilizzare kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit.

Poichè la resa nell'estrazione di RNA da piccoli volumi di plasma è generalmente al di sotto del limite di quantificazione spettrofotometrica, in questo protocollo vengono utilizzati volumi fissi di RNA piuttosto che quantità fisse.

d) qPCR

I prodotti di retro trascrizione vengono diluiti combinando 28.9ul RNase-free H₂O con 5ul di prodotto di reazione; si allestiscono le reazioni (in duplicato) secondo il seguente schema:

	X1
TaqMan 2x PCR Mastermix	2.5
TaqMan Assay	0.25
Diluted RT product	2.25
vol tot	5

Programma di reazione:

95°C 10 min

-- 95°C 15s

-- 60°C 1min (40 cicli)

hold 4°C.

Considerando che per ciascun campione vengono analizzati almeno 4 miRNA

(miRNA di interesse es.miR34a + 3 cel-miRs).

e) Normalizzazione dei dati

Dopo la PCR Real Time, i Ct ottenuti dalle diluizioni di miR-34a sintetico vengono plottati verso il corrispondente numero di copie "teoriche", ottenendo così una curva dalla quale, interpolando i valori di Ct del miR-34a relativi ai campioni analizzati, è possibile calcolare il numero delle copie di miR-34° endogeno. Poiché al momento della retrotrascrizione si era partiti da volumi prestabiliti di RNA indipendentemente dalla loro quantificazione (che è sotto il limite di rilevazione dei più comuni spettrofotometri), è necessario un metodo di che permetta di correggere i risultati grezzi rispetto ad eventuali differenze nell'efficienza di RNA recovery tra i diversi campioni. Per questo motivo i Ct grezzi del miR-34a dei diversi campioni caricati su una piastra vengono normalizzati rispetto alla mediana dei Ct dei cel-miRs come di seguito riportato:

- Calcolare la media dei Ct dei 3 cel-miRs per ciascun campione
- Calcolare la mediana tra le medie Ct cel-miRs ottenute tra tutti i campioni della piastra
- Per ciascun campione, si calcola un fattore di normalizzazione sottraendo alla media dei

Ct dei cel-miRs la mediana calcolata al punto sopra.

- Il fattore di normalizzazione viene sommato ai valori grezzi di Ct ottenuti per il miRNA di interesse (miR-34a), ottenendo così il valore corretto per l'efficienza di estrazione.

Questi nuovi valori di Ct (normalizzati rispetto alla mediana degli spike-in) vengono interpolati nella retta standard per determinare il numero di copie del miRNA di interesse.

Risalendo a ritroso per tutti i fattori di diluizione successivi utilizzati nella procedura di analisi, si ottengono i dati definitivi che vengono tutti espressi come numero assoluto di copie di miRNA per uL di plasma iniziale.

5 – Risultati

Il ruolo e la valenza di miR34a come biomarcatore circolante sono stati studiati nella pubblicazione Sciandra et al, JCCS, 2020 [10]. Nello studio appena citato, la valutazione di miR34a è stata eseguita mediante qPCR, grazie alla preparazione di una curva standard per poter definire il numero di copie in circolazione presenti nel plasma dei pazienti affetti da sarcoma di Ewing. L'obiettivo di questa analisi è stato, invece, quello di analizzare l'espressione di miR34a nella ddPCR con lo scopo di poter effettuare confronti tra i due sistemi di rilevamento, qPCR e ddPCR, evidenziando possibili vantaggi e svantaggi per entrambi.

a) Valutazione dell'espressione di miR-34a-5p mediante ddPCR in campioni di plasma di pazienti affetti da EWS, con relativa ottimizzazione del sistema digitale.

Il ruolo e la valenza del miR34a come biomarcatore circolante sono stati oggetto di indagine nella pubblicazione Sciandra et al, JCCS, 2020 [10]. Nel suddetto studio la valutazione del miR34a è stata effettuata mediante qPCR, grazie all'allestimento di una curva standard per poter definire il numero di copie circolanti, nello specifico presenti nel plasma di pazienti affetti da sarcoma di Ewing.

Obiettivo di questa analisi è stato, invece, quello di analizzare l'espressione del miR34a in ddPCR con lo scopo di riuscire ad effettuare dei confronti tra i due sistemi di rilevazione, qPCR e ddPCR, evidenziando possibili vantaggi e svantaggi per entrambi.

Uno dei principali punti a favore della ddPCR è rappresentato dalla possibilità di definire con alta precisione la quantità di molecole target incapsulate in partizioni di microgocce discrete, ma ben definite volumetricamente, di acqua in olio. Questa quantifica viene ottenuta senza la necessità di una curva standard e in modalità indipendente dalla efficienza di reazione.

Per ciò che riguarda il materiale di partenza, si tratta dello stesso impiegato per la PCR Real time, vale a dire del cDNA retrotrascritto nelle stesse condizioni.

La miscela di reazione per la ddPCR è stata preparata in maniera analoga a quella di qPCR. La master mix è specifica per la digital in quanto è realizzata appositamente per consentire l'emulsione delle microgocce in olio al momento di formazione delle droplet.

Come saggio per il miR34a è stato utilizzato lo stesso della PCR real-time, dato che anche la chimica della ddPCR si può avvalere delle sonde a idrolisi.

Nelle prove iniziali, come punto di partenza per ciò che riguarda la quantità di cDNA, dalla mix di retrotrascrizione sono stati utilizzati:

- cDNA diluito quanto quello impiegato in qPCR
- cDNA ulteriormente diluito 1:2
- cDNA ancora più diluito 1:4

1^a prova

Nella prima prova, per settare la migliore quantità di cDNA da utilizzare per la rilevazione del miR34a, sono stati utilizzati i campioni di due pazienti che in qPCR erano stati classificati come alto (**High-2** e **High-1**) o basso esprimenti (**Low-1** e **Low-2**) il miR34a.

Il primo *quality check* prevede di analizzare il numero totale delle droplet che deve essere compreso tra 10.000 e 20.000 eventi. Valori più bassi non sono da considerarsi attendibili e suggeriscono possibili problematiche nella fase di generazione delle droplet o nel caricamento in piastra prima della amplificazione al termociclatore.

Altro parametro da considerare è il numero degli eventi positivi che non devono essere troppo elevati rispetto ai totali per evitare la saturazione delle droplet; questo, infatti, si tradurrebbe con una diminuita probabilità nello stimare efficacemente la concentrazione delle molecole target nel campione in analisi. Per questo occorre ottimizzare la concentrazione di target affinché ciascuna droplet possa contenere una e una sola molecola, piuttosto che multipli di esse.

Come si può evidenziare dalla immagine sottostante, per tutti e quattro i campioni analizzati tutte le quantità di cDNA utilizzate si rivelano utili per la rilevazione del target,

evitando la saturazione delle droplet (il *blank* corrisponde all'NTC, *no template control*).

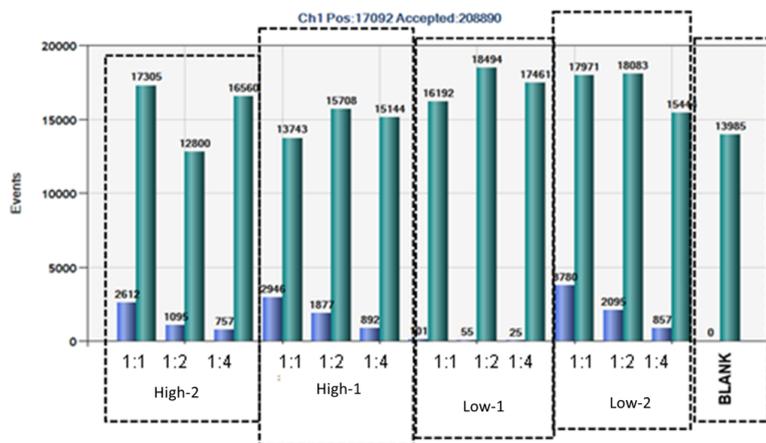
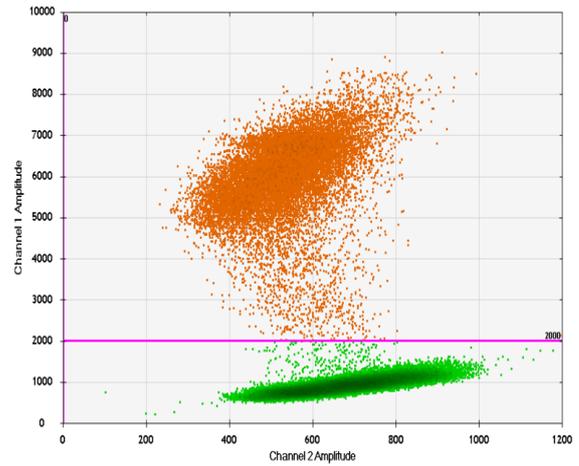
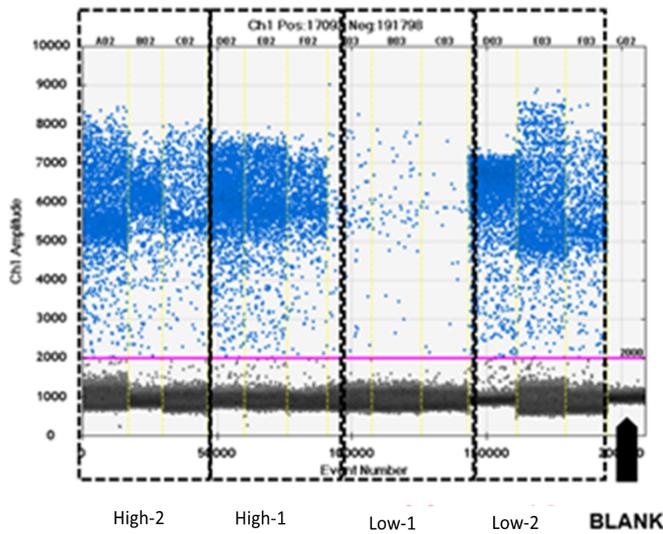


Grafico derivato dal software di analisi dello strumento ddPCR *QuantaSoft* che evidenzia il numero totale delle droplet (in verde) e la frazione di quelle

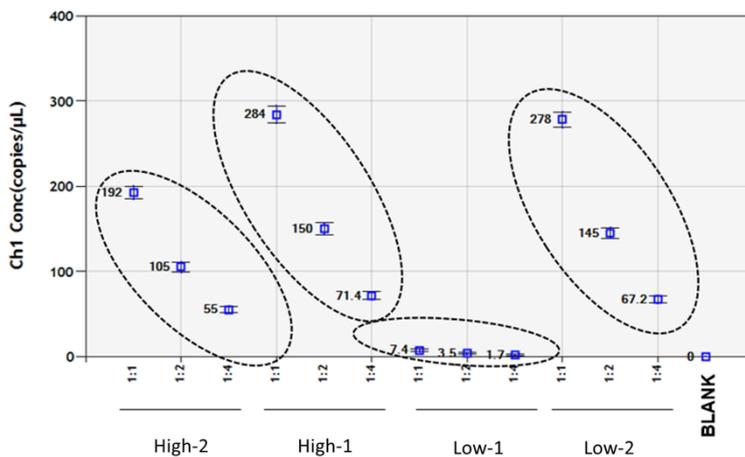
Il plot 1D (sotto, a sinistra) che misura l'ampiezza della fluorescenza mostra una buona separazione delle droplet positive (in blu) da quelle negative (in nero), dando indicazione che l'assay per il miR34a usato in qPCR funziona correttamente ed efficientemente anche in ddPCR.

Il grafico 2D della fluorescenza (sotto, a destra), che analizza tutti i campioni contemporaneamente, evidenzia una nuvola univoca (in arancione) che sottende alla specificità del saggio (non vi è presenza di aspecifico).



Sulla sinistra, plot 1D della ampiezza di fluorescenza che evidenzia la separazione delle droplet negative (in **nero**) dalle droplet positive (in **blu**); si può evidenziare la threshold (**linea rosa**) su 2000, esattamente al di sopra delle droplet negative.

Sulla destra, grafico 2D della ampiezza di fluorescenza che evidenzia la separazione delle droplet negative (in **verde**) dalle droplet positive (in **arancione**); la threshold è sempre la stessa (**linea rosa**).



Plot di concentrazione in cui i valori sono graficati come copie/ μ l dalla mix di reazione.

Per ciascun campione sono evidenziate le tre diluizioni di cDNA utilizzate (ovali tratteggiati).

Le barre di errore calcolate dal software QuantaSoft sono mostrate come intervalli di confidenza del 95%.

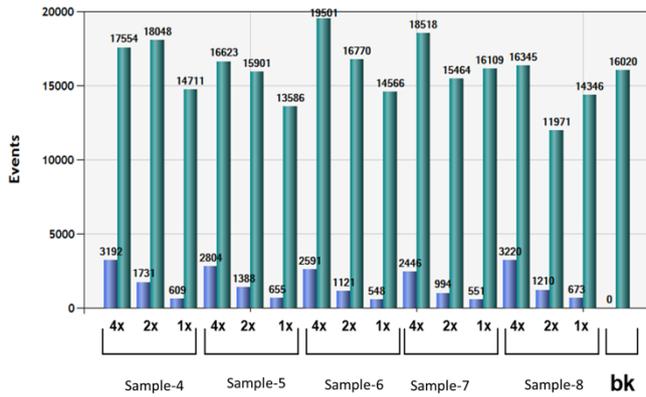
Dal grafico di concentrazione (*sopra*) è possibile rilevare il numero delle molecole di miR34a (esprese come copie/ μ l), considerando le tre diluizioni di cDNA per ciascun campione (cerchi tratteggiati in nero).

La ddPCR consente una rilevazione precisa e riproducibile dei campioni attraverso un range di concentrazione, evidenziando come i valori assoluti siano in perfetta scala di diluizione.

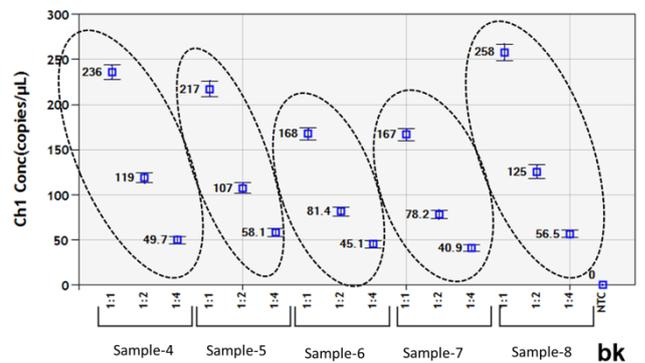
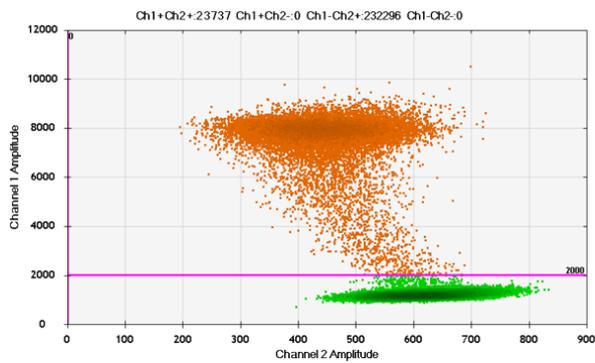
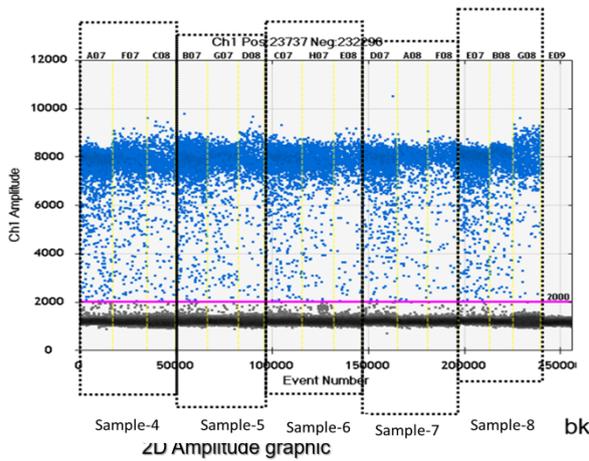
2^a prova

Nella prova successiva, è stato aumentato il numero dei campioni analizzati per escludere che quanto osservato nelle prime prove fosse legato esclusivamente ad una rappresentatività limitata per i quattro campioni iniziali.

Questa ulteriore prova conferma il corretto funzionamento tecnico del sistema e la quantità adeguata di cDNA da impiegare per l'analisi completa di tutti i campioni.



■ POSITIVE EVENTS
■ TOTAL EVENTS



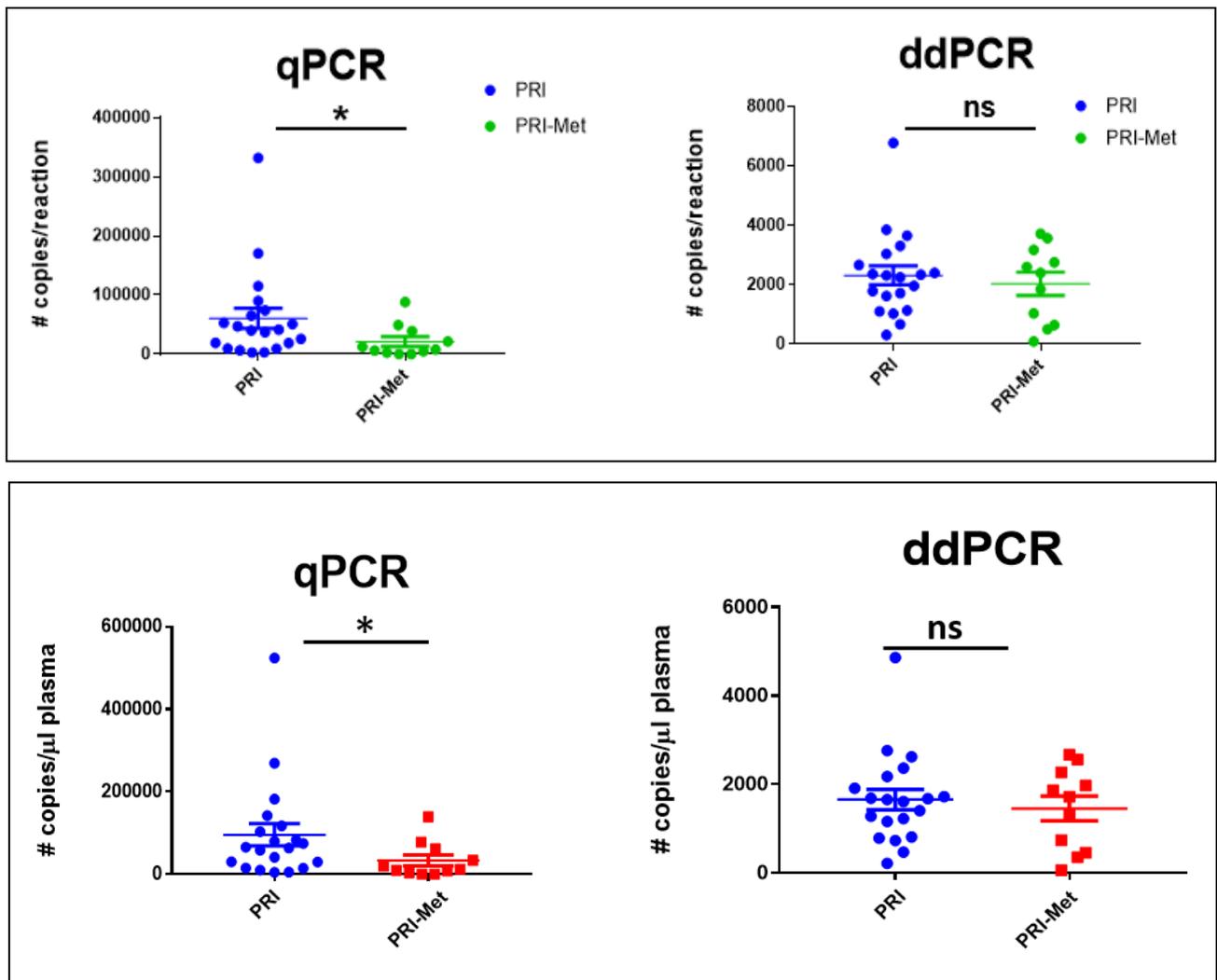
3^a prova

Negli esperimenti successivi, sono stati presi in esame tutti i campioni di plasma che erano stati analizzati in precedenza per il miR-34a in qPCR i cui risultati erano stati ottenuti mediante interpolazione su una curva standard a partire da un oligo a RNA per il miR34a. Nello specifico il plasma era stato isolato da due gruppi di pazienti colpiti da EWS, quelli con malattia localizzata (PRI) e quelli con la presenza di metastasi alla diagnosi (PRI-Met). Dai dati di PCR *real time* era emerso che l'espressione del miR34a risultava più elevata nel primo gruppo rispetto al secondo, con una differenza statisticamente significativa ($p < 0.05$). Sotto, in tabella, sono riportati i risultati a confronto ottenuti con entrambe le tecniche e sono stati riportati sia come # copie/reazione (considerando il pozzetto da cui è avvenuta la reazione di PCR e quindi calcolata la quantificazione), sia come # copie/ μ l di plasma. Da questa valutazione si può evincere che, al di là dei valori assoluti che risultano di ordini di grandezza differenti tra le due tecniche, le differenze riscontrate in ddPCR non riproducono quelle osservate in qPCR; infatti, i livelli di espressione nel complesso danno un risultato decisamente piatto e quanto viene misurato in ddPCR non consente di discriminare i due gruppi di pazienti (*vedi grafico successivo*).

PAZIENTE	PRI/PRI-Met	qPCR		ddPCR	
		# copie/rea zione	# copie/ µl plasma	# copie/reazion e	# copie/ µl plasma
1	PRI	2867	4527	660	474
2	PRI	19022	30033	3850	2763
3	PRI	18848	29758	2336	1677
4	PRI	9568	15106	1133	813
5	PRI	3318	5238	1098	788
6	PRI	6634	10474	3652	2621
7	PRI	9318	14712	2244	1610
8	PRI	25998	41047	1021	733
9	PRI	170474	269151	301	216
10	PRI	37034	58470	2662	1910
11	PRI	52862	83461	1784	1280
12	PRI	47298	74676	1709	1227
13	PRI	65271	103053	3300	2368
14	PRI	90058	142187	2310	1658
15	PRI	40248	63545	2354	1689
16	PRI	332082	524306	6776	4863
17	PRI	115305	182048	3036	2179
18	PRI	41489	65505	1958	1405
19	PRI	74299	117306	2398	1721
20	PRI	50856	80294	1617	1160
21	PRI-Met (bone)	49268	77786	2596	1863
22	PRI-Met (bone)	39183	61864	1032	740
23	PRI-Met (bone)	2527	3990	3168	2274
24	PRI-Met (bone)	12581	19863	3564	2558
25	PRI-Met (bone)	4954	7822	634	455
26	PRI-Met (bone+al)	21399	33786	3718	2668
27	PRI-Met (bone+al)	234	370	84	60
28	PRI-Met (lung)	293	463	499	358
29	PRI-Met (lung)	88242	139320	2750	1974
30	PRI-Met (lung+bone)	6266	9892	2398	1721
31	PRI-Met (lung+bone)	7825	12355	1844	1323

A confronto, le quantificazioni assolute del miR34a ottenute per i due gruppi di pazienti, PRI e PRI-Met, mediante **qPCR** (sulla sinistra) e **ddPCR** (sulla destra).

I valori sono rappresentati sia come copie/reazione sia come riferimento rispetto al volume di plasma utilizzato per l'analisi, copie/µl plasma.

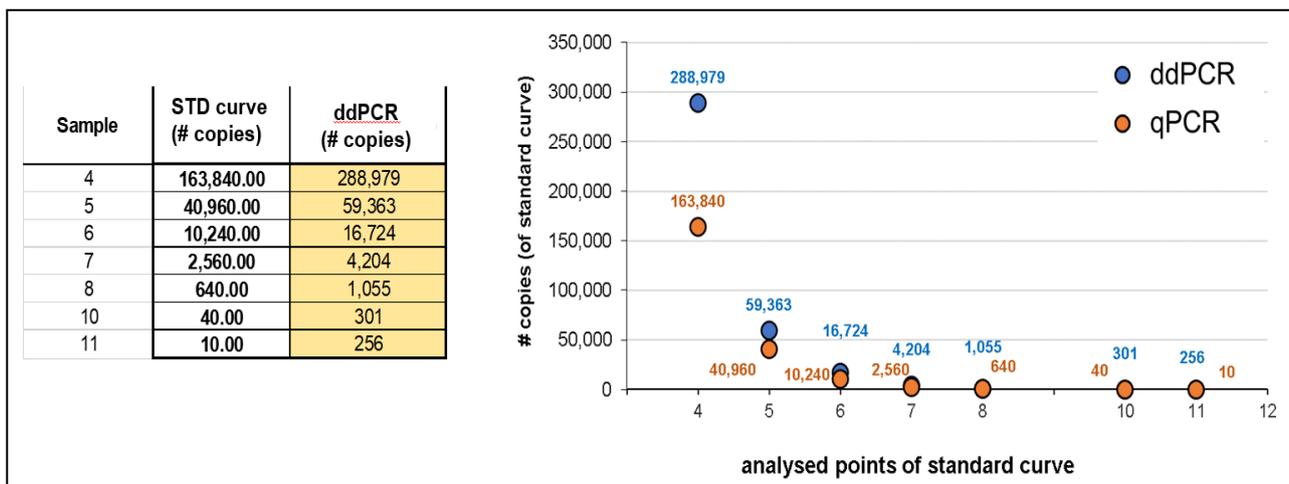


Quantificazione assoluta del miR34a circolante in pazienti EWS con malattia localizzata (PRI) o con metastasi alla diagnosi (PRI-Met). I livelli di miR34a sono stati misurati in qPCR e ddPCR ed espressi sia come #copie/reazione sia come #copie/μl plasma (* $p < 0.05$; Student's *t*-test; ns=not significant).

Alla luce delle consistenti diversità riscontrate per i dati ottenuti con le due tecniche, si è deciso di provare a quantificare in ddPCR anche alcuni punti della curva standard messa a punto con l'oligo a RNA per il miR34a, con lo scopo di capire se ci fossero similarità su quanto rilevato con lo strumento.

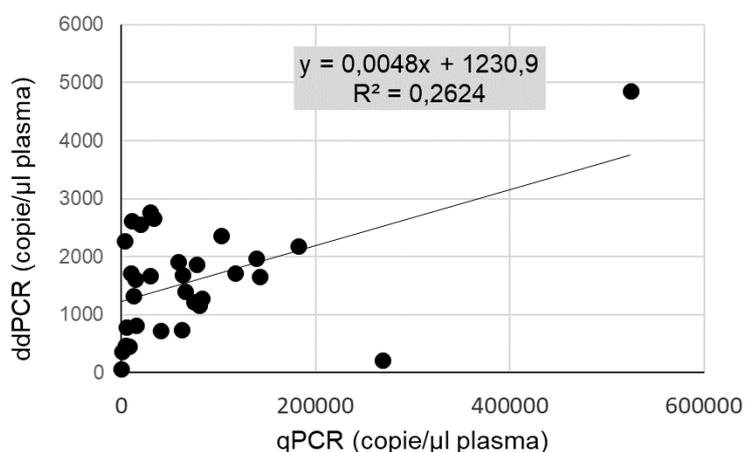
Nella tabella e nel grafico sono evidenziati, per i punti scelti per l'analisi, il numero delle copie valutato in qPCR (in arancione) e quello rilevato in ddPCR (in blu).

Nella fascia centrale delle curve gli ordini di grandezza vengono mantenuti per ciò che riguarda la quantificazione; invece, si osservano profonde differenze sui valori più alti e quelli più bassi, con qualche difficoltà di risoluzione.



A confronto, le quantificazioni assolute dell'oligo per il miR34a valutate per alcuni punti della curva standard e ottenute mediante qPCR e ddPCR.

A destra, i valori sono graficati per evidenziarne gli andamenti.



Una analisi di correlazione tra i risultati delle due tecnologie non evidenzia alcuna correlazione accompagnata da significatività statistica (test di correlazione di Spearman: $r=0.29$; $p\text{-value}=0.11$), come si può apprezzare anche dal grafico della retta di regressione.

b) *Valutazione dell'espressione di miR-199a-3p mediante ddPCR in campioni di plasma di pazienti affetti, mediante EWS, con relativa ottimizzazione del sistema digitale.*

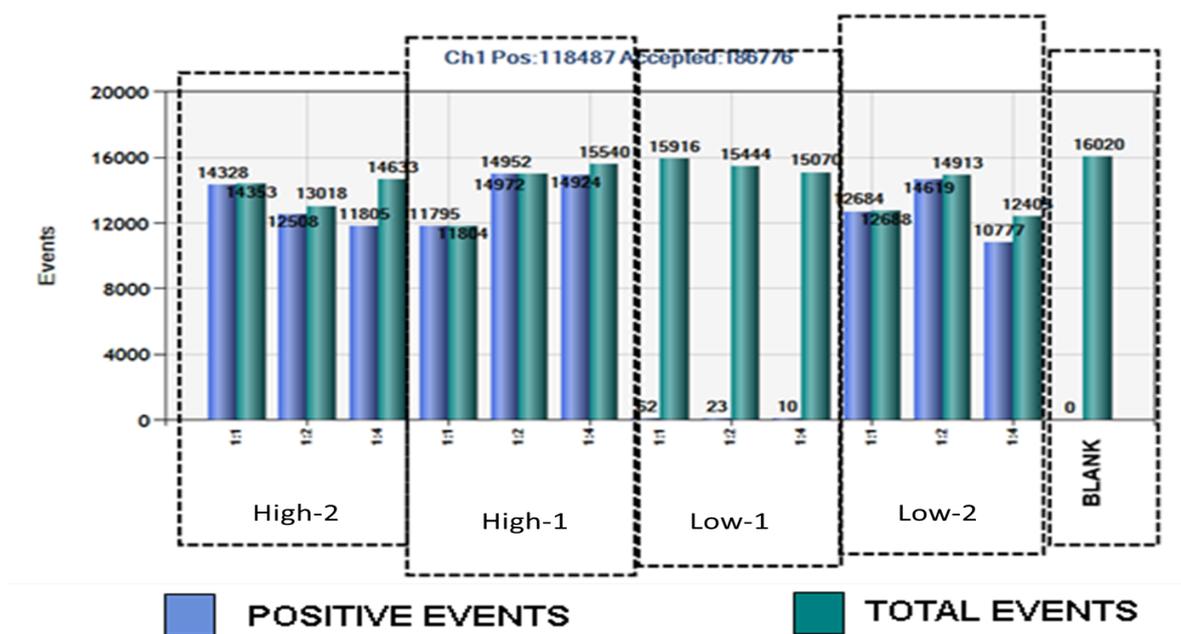
Anche l'espressione del miR199a-3p è stata valutata in ddPCR.

Data la agevole trasposizione del setting sperimentale dalla qPCR alla digital, in quanto entrambe sfruttano le stesse chimiche, come per il miRNA-34a si è deciso di utilizzare le stesse condizioni, per concentrazione di saggio e quantità di cDNA, per valutare i livelli di

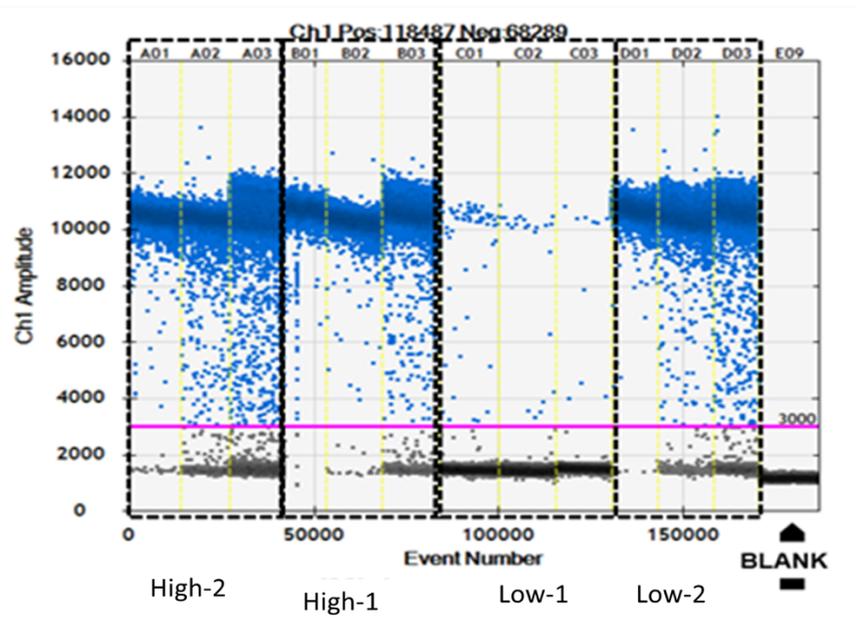
miR199a-3p circolanti.

Anche nel caso di questo miRNA sono stati utilizzati alcuni campioni di plasma come training set.

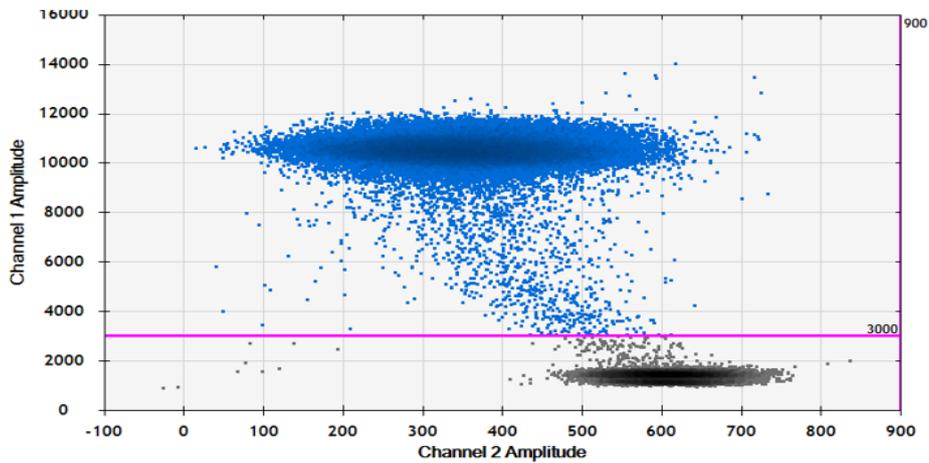
Sebbene il saggio della qPCR per il miRNA funzioni perfettamente, con un segnale chiaro e specifico, come si può evidenziare dai grafici mono- e bidimensionali della fluorescenza, in questo caso, si sono riscontrate delle problematiche sulle quantità di cDNA utilizzate; infatti, questi quantitativi si sono rilevati piuttosto elevati ai fini di una corretta risoluzione delle concentrazioni. Sebbene le droplet totali siano perfettamente nel range, le droplet positive sono totalmente saturate per tutti i campioni, fatta eccezione per il p14.



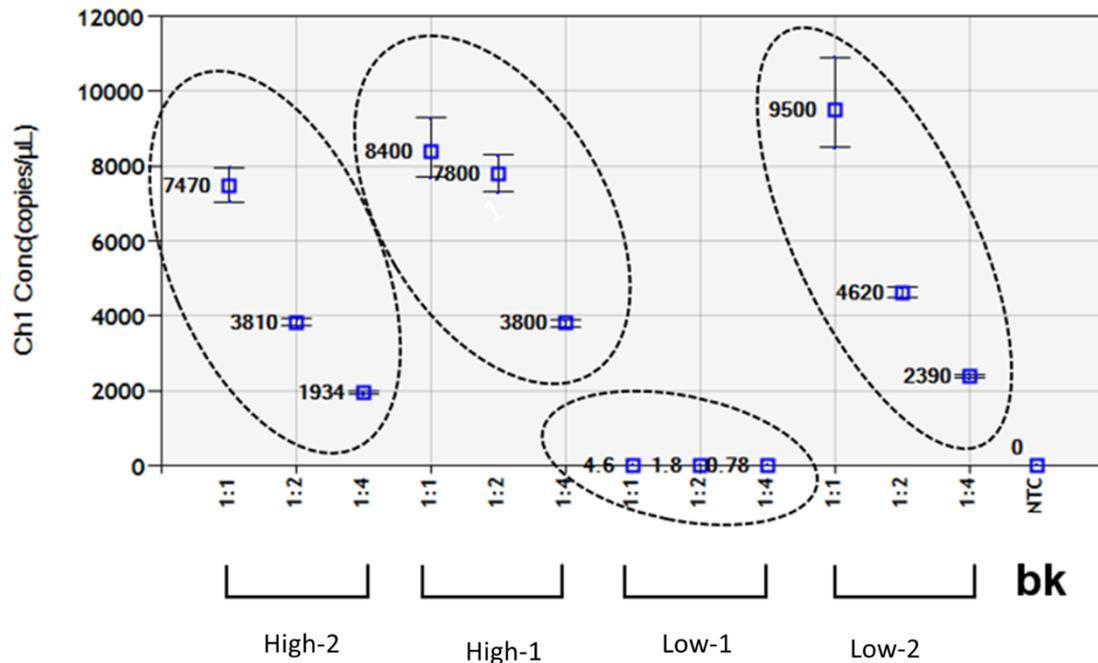
1D Amplitude graphic



2D Amplitude graphic



Il grafico di concentrazione mostra infatti che i livelli di miR199a-3p sono molto più alti rispetto a quelli del miR34a, considerando che i livelli del materiale di partenza sono esattamente gli stessi. Concentrazioni di molecole target dell'ordine di 2500 copie/ μ l sono già da considerarsi campioni ad alta concentrazione. In queste condizioni, infatti, non è affatto ovvio che ci saranno delle droplet vuote.

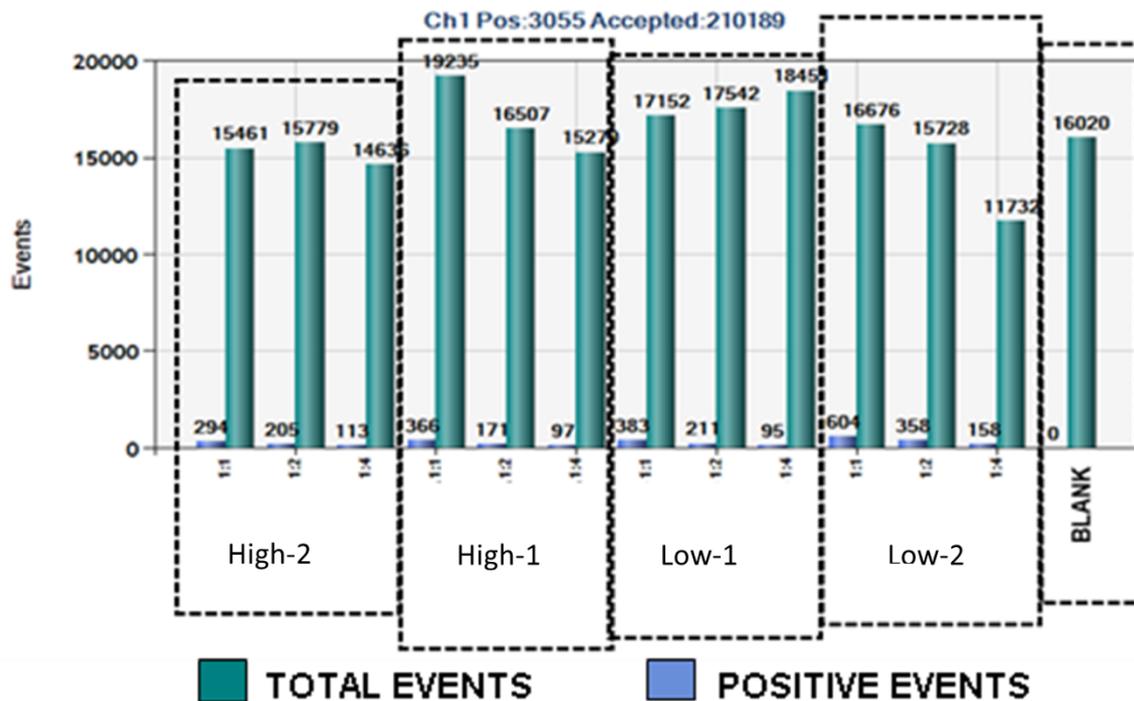


Inoltre, nel momento in cui viene dato in output un risultato di saturazione dalla macchina, viene fornito soltanto un segnale di errore ma non è possibile sapere anticipatamente di quanto risulta saturo il sistema e quali potranno essere le diluizioni utili per garantire una corretta e adeguata risoluzione dei livelli di espressione.

Per tale ragione risulta indispensabile titolare su scala più ampia la quantità di target da impiegare per la rilevazione affinché sia evitata la saturazione delle droplet con molecole di target; si deduce quindi che per il fatto che ogni campione risponde in maniera differente, trattandosi di plasma che è annoverabile tra le matrici biologiche complesse, la procedura di ottimizzazione può rivelarsi particolarmente indaginosa.

- c) *Valutazione dell'espressione di miR-214 mediante ddPCR in campioni di plasma di pazienti affetti da EWS, con relativa ottimizzazione del sistema digitale.*

Lo stesso percorso è stato seguito per ciò che riguarda il miR214. In questo caso, i primi test hanno permesso di evidenziare che le quantità iniziali di materiale utilizzato sono ottimali per la quantificazione dei microRNA senza causare saturazione del sistema.



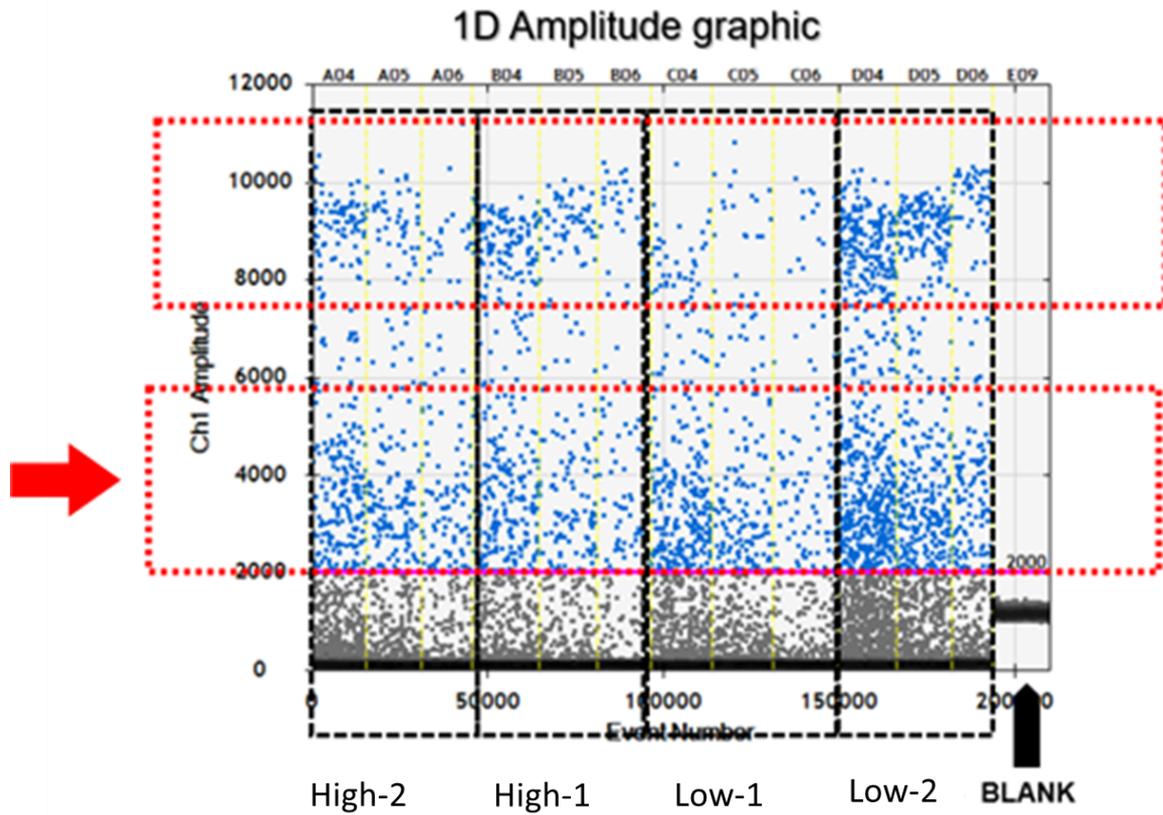
Tuttavia, come si può apprezzare dai grafici 1D e 2D sull'ampiezza della fluorescenza, i segnali di quantificazione del miR in esame evidenziano delle problematiche.

Il cluster tra 1000 e 3500 di ampiezza (**freccia rossa**) sembra suggerire una non completa efficienza di PCR. Questo potrebbe essere imputabile ad amplificazione di frammenti aspecifici oppure specifici ma di diversa lunghezza rispetto al principale oppure a un non corretto funzionamento dell'assay per il miR214 in ddPCR.

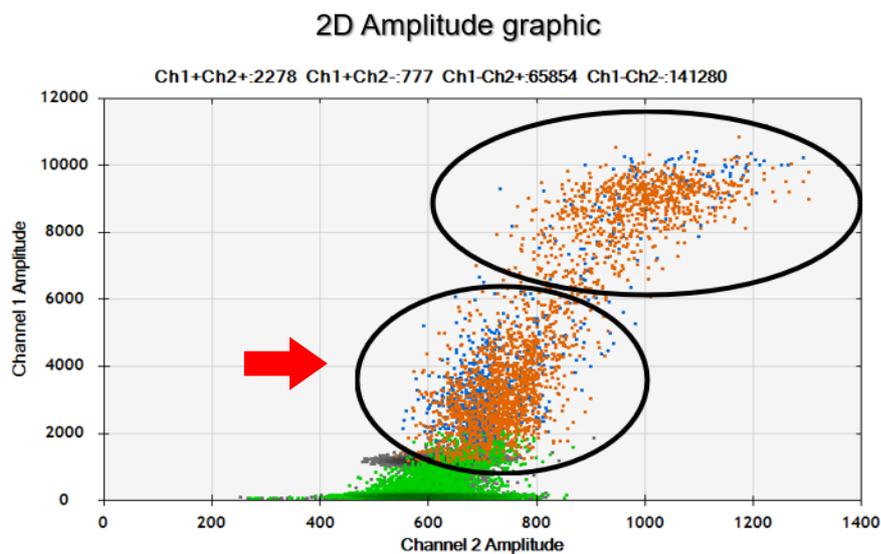
Sebbene sia possibile decidere di escludere questo cluster dalla determinazione quantitativa, ciò in realtà non è consigliabile senza una adeguata conoscenza della problematica.

Le prove di aggiustamento del sistema, aumentando il numero dei cicli per gestire la problematica non hanno portato a nessun miglioramento.

Altre possibilità potrebbero prevedere la variazione della temperatura di annealing, l'uso del DTT da aggiungere alla miscela di reazione.



Plot 1D della ampiezza di fluorescenza che evidenzia la doppia popolazione.
 Il segnale tra gli 8000 e 10.000 di ampiezza della fluorescenza corrisponde al segnale specifico; quello tra i 1000 e i 3000, a ridosso delle droplet negative (in nero) costituisce la popolazione di dubbia origine.



Plot 2D della ampiezza di fluorescenza. La popolazione di possibile specifico è evidenziata nel box tratteggiato indicato dalla freccia in rosso.

Per confermare che l'espressione di miR-214-3p dipende da EWS-FLI1 e da CD99, abbiamo

silenziato EWS-FLI1 o CD99 nelle linee cellulari EWS e osservato un aumento dell'espressione di miR-214-3p seguendo entrambe le condizioni. Questa scoperta indica che miR-214-3p ha un possibile ruolo oncosoppressivo nell'EWS. Infine, per verificare la rilevanza clinica di questi risultati, abbiamo confrontato l'espressione di miR-214-3p in campioni derivati da tumori primari localizzati o lesioni metastatiche. L'espressione di miR-214-3p era significativamente più bassa nelle metastasi rispetto ai tumori primari ed era assente in alcuni casi, confermando la relazione inversa tra espressione di miR-214-3p e aggressività EWS in ambito clinico.

Abbiamo focalizzato la nostra attenzione sul gene HMGA1, un bersaglio diretto convalidato di miR-214-3p nelle linee cellulari umane di cancro cervicale, coloretale ed endometriale [47,48]. Abbiamo valutato i livelli di espressione di HMGA1 dopo la sovra/sottoregolazione del miR-214-3p o dopo l'attivazione del CD99 con l'anticorpo. Come previsto, l'aumento dell'espressione di miR-214-3p ha ridotto l'espressione di HMGA1. Anche l'espressione di HMGA1 è stata ridotta dopo l'impegno del CD99 con l'anticorpo anti-CD99, dimostrando una correlazione inversa con l'espressione di miR-214-3p. Al contrario, quando il miR-214-3p endogeno è stato inibito utilizzando un antagomiR nelle cellule PDX-EW#2-C, i livelli della proteina HMGA1 sono aumentati. Nelle cellule PDX-EW#2-C abbiamo anche dimostrato che il silenziamento di HMGA1 ha portato ad una significativa riduzione della migrazione e della crescita cellulare. Il nostro studio riporta che miR-214-3p agisce come oncosoppressore in SE: *Cancers* 2022, 14, 1762 3 of 16 è costitutivamente represso nelle linee cellulari e nei campioni clinici ma viene riespresso dopo il silenziamento di EWS-FLI1 e/o CD99. Il ripristino di miR-214-3p limita la crescita e la migrazione delle cellule EWS e reprime l'espressione del gruppo ad alta mobilità AT-hook 1 (HMGA1), una piccola proteina non istonica che modifica l'accesso dei fattori regolatori al DNA, contribuendo alla regolazione generale dell'espressione genica.

L'espressione di miR34a nei surnatanti delle cellule EWS è stata verificata mediante RT-qPCR e si è scoperto che i livelli di miR34a rilasciati nel surnatante riflettono l'espressione di miR34a nella cellula di origine. I livelli di miR34a sono stati determinati mediante quantificazione assoluta in RT-qPCR. Abbiamo raccolto il campione prima dell'inizio del

trattamento medico e al fine della chemioterapia somministrata ai pazienti, prima del trattamento locale, e abbiamo notato che i pazienti dopo il trattamento chemioterapico mostrano un significativo aumento dei livelli di miR-34a nel sangue. Questa condizione si è verificata in tutti i casi tranne uno localizzato e un paziente metastatico.

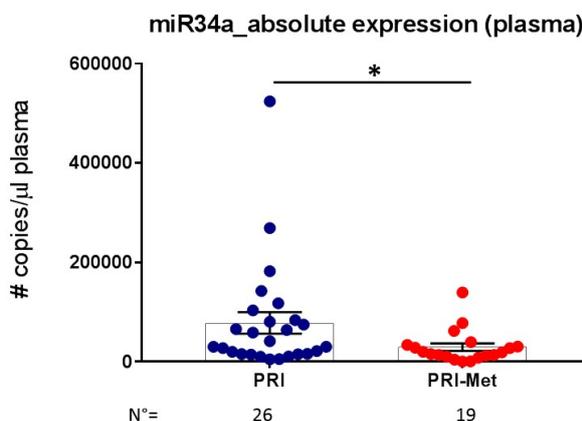
Sono stati analizzati anche i livelli di miR34a circolante rispetto all'esito clinico del paziente. Ad eccezione di un paziente deceduto, gli altri pazienti con PRI erano vivi. Al contrario, solo il 56% dei pazienti PRI-Met era ancora vivo. Coerentemente, i tre pazienti PRI-Met con miR34a elevato erano tutti ancora vivi.

Sebbene miR34a non abbia mostrato un cambiamento globale significativo nei pazienti con PRI Met, i suoi livelli sono aumentati globalmente alla fine della chemioterapia preoperatoria nei pazienti con PRI.

Questi dati supportano l'idea che si rilevi un aumento dei miR34a circolanti potrebbe essere un fattore utile da monitorare nel sarcoma di Ewing da seguire trattamento chemioterapico e come misura dell'efficacia della terapia. Nel plasma di pazienti con tumori localizzati all'esordio, inoltre, i livelli di miR34a risultano significativamente più alti rispetto a quelli dei pazienti PRIMet (77.803 ± 21.649 versus 29.103 ± 7.642 #copie/ μ l di plasma).

L'analisi della curva ROC mostra un valore di area sotto la curva (AUC) pari a 0.686 ($p < 0.05$), suggerendo che la valutazione dei livelli di miR34a nel plasma dei pazienti costituisce un tool prezioso per discriminare, con ragionevole accuratezza, i pazienti a basso o medio-alto rischio.

SOMMATORIA CAMPIONI NUOVI + CAMPIONI PUBBLICAZIONE SCIANDRA M. ET AL.



Welch's t test	
1	Table Analyzed
2	miR34a_ABS_PRI&PRI-Met (plasma)+P14
3	Column C
4	vs.
5	Column B
6	PRI-Met
7	vs.
8	PRI
9	Unpaired t test with Welch's correction
10	P value
11	0.0420
12	P value summary
13	*
14	Significantly different (P < 0.05)?
15	Yes
16	One- or two-tailed P value?
17	Two-tailed
18	Welch-corrected t, df
19	t=2.121 df=30.95
20	How big is the difference?
21	Mean \pm SEM of column B
22	77803 \pm 21649, n=26
23	Mean \pm SEM of column C
24	29103 \pm 7642, n=19
25	Difference between means
26	-48700 \pm 22958
27	95% confidence interval
28	-95526 to -1874
29	R squared (eta squared)
30	0.1269
31	F test to compare variances
32	F, Dfn, Dfd
33	10.98, 25, 18
34	P value
35	<0.0001
36	P value summary
37	****
38	Significantly different (P < 0.05)?
39	Yes

Fig. 1: Quantificazione assoluta del miR34a circolante in tutti i pazienti affetti da EWS con malattia localizzata (PRI) o con metastasi alla diagnosi (PRI-Met). I livelli di miR34a sono stati misurati in RT-qPCR ed espressi come n.copie/ μ l plasma (media \pm SEM; $p < 0.05$; Student's t-test).

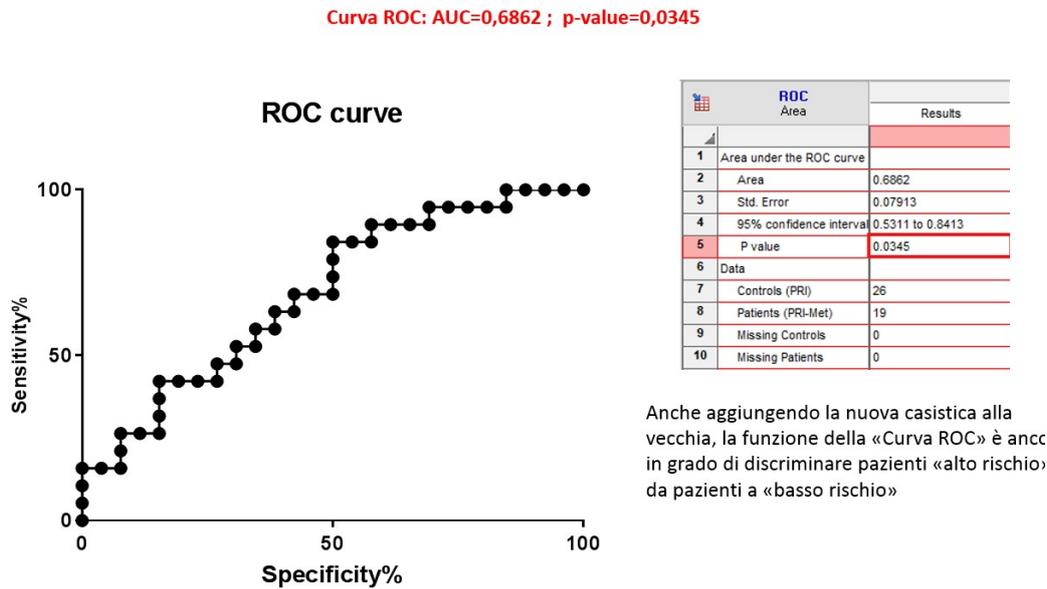


Fig 2: I dati di espressione del miR34a dei campioni PRI e PRI-Met sono stati utilizzati per elaborare il diagramma di ROC (Receiver Operating Characteristic).

RISULTATI: n° copie miR34a / uL plasma, QUADRO GENERALE

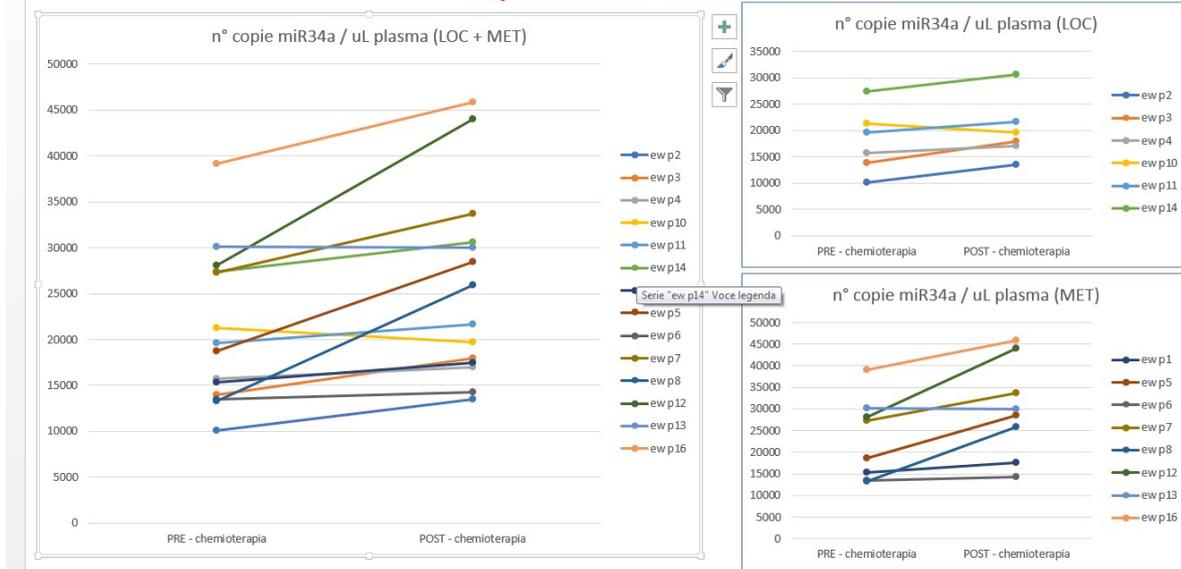


Fig.4: Livelli di miR34a nel plasma di solo i pz di cui si ha una quantificazione prima e dopo la chemioterapia, ovvero, 6 pazienti PRI (localizzati all'esordio) e 8 pazienti PRI-Met (metastatici all'esordio) prima (pre chemotherapy) e dopo la chemioterapia pre-operatoria (post chemotherapy). La misura del miR34a è stata determinata mediante quantificazione assoluta in RT-qPCR ed espressa come # copie/ μ l di plasma.

6 – Conclusioni

Dal punto di vista tecnico, la ddPCR si è rivelata una tecnica con notevole necessità di calibrazione e aggiustamenti del punto per riuscire a raggiungere il corretto punto di diluizione delle sequenze target che consenta una rilevazione efficiente e sicura, senza scivolare in un'eccessiva saturazione delle particelle.

Gli assay utilizzati non si sono comportati tutti alla medesima maniera: su 3 assay Thermo Fisher impiegati, uno non si è rivelato funzionale anche all'interno della master mix Bio-Rad usata per eseguire le analisi in ddPCR (miR-214). Pertanto, il passaggio successivo sarà l'allestimento di una curva standard con un oligo a RNA per questo miR per la quantificazione mediante qPCR.

I due saggi funzionanti analizzati danno segnali puliti e di sicura attribuzione (miR-34a e 199a-3p). Per quanto riguarda il miR34a, sfortunatamente non si è riusciti a replicare il risultato ottenuto analizzando tutti i plasmi dei pazienti di EWS esaminati (studio PROVABES); in altre parole, mentre il sistema in Real Time qPCR è riuscito a distinguere efficientemente i pazienti con lesioni primitive da quelli con lesioni metastatiche all'esordio, la ddPCR (nelle condizioni finora testate) non ha mostrato di possedere un range dinamico ed una sensibilità sufficiente per replicare la distinzione di tipologia di malattia che invece la Real Time è riuscita a raggiungere.

Invece, per il miR199a-3p è necessario procedere ad ulteriori prove di ricerca dello "sweet-spot" analitico in quanto l'espressione di tale micro-RNA è talmente elevata nel plasma di pazienti EWS da saturare tutte le droplet generate negli esperimenti a qualunque delle diluizioni provate finora. Sarà quindi necessario procedere a diluizioni quanto meno comprese tra 1:50 e 1:500.

Il prossimo passo sarà la preparazione di una curva standard con un oligo di RNA per questo miR per la quantificazione mediante qPCR. I due test operativi analizzati forniscono segnali puliti e affidabili (miR-34a e 199a-3p). Per quanto riguarda il miR34a, purtroppo non è stato possibile replicare il risultato ottenuto analizzando tutti i plasmi dei pazienti EWS

esaminati; in altre parole, mentre il sistema Real Time qPCR era in grado di distinguere in modo efficiente i pazienti con lesioni primarie da quelli con lesioni metastatiche all'esordio, il ddPCR (nelle condizioni finora testate) non ha mostrato un range dinamico e una sensibilità sufficienti per replicare la distinzione del tipo di malattia che Real Time è riuscita a raggiungere.

Per il miR199a-3p è invece necessario effettuare ulteriori test di ricerca dello "sweet-spot" analitico in quanto l'espressione di questo micro-RNA è talmente elevata nel plasma dei pazienti EWS da saturare tutte le goccioline generate negli esperimenti con una qualsiasi delle diluizioni testate finora.

Il nostro studio riporta che miR-214-3p agisce come oncosoppressore nel Sarcoma di Ewing. Infatti è costitutivamente represso nelle linee cellulari e nei campioni clinici ma viene espresso nuovamente dopo il silenziamento di EWSFLI1 e/o CD99.

Nella nostra serie di pazienti abbiamo notato che i pazienti dopo il trattamento chemioterapico mostrano un significativo aumento dei livelli di miR-34a. Questa condizione si è verificata in tutti i casi tranne uno localizzato e un paziente metastatico.

Questi dati supportano l'idea che si rilevi un aumento dei miR34a circolanti potrebbe essere un fattore utile da monitorare nel sarcoma di Ewing da seguire trattamento chemioterapico e come misura dell'efficacia della terapia.

7 – Bibliografia

1. Ewing J. The Classic: Diffuse endothelioma of bone. *Proceedings of the New York Pathological Society.* 1921;12:17. *Clin Orthop.* settembre 2006;450:25–7.
2. Grünewald TGP, Cidre-Aranaz F, Surdez D, Tomazou EM, de Álava E, Kovar H, et al. Ewing sarcoma. *Nat Rev Dis Primer.* 5 luglio 2018;4(1):5.
3. Zöllner SK, Amatruda JF, Bauer S, Collaud S, de Álava E, DuBois SG, et al. Ewing Sarcoma- Diagnosis, Treatment, Clinical Challenges and Future Perspectives. *J Clin Med.* 14 aprile 2021;10(8):1685.
4. Grier HE. The Ewing family of tumors. Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumors. *Pediatr Clin North Am.* agosto 1997;44(4):991–1004.
5. Mariño-Enríquez A, Fletcher CDM. Round cell sarcomas - biologically important refinements in subclassification. *Int J Biochem Cell Biol.* agosto 2014;53:493–504.
6. Carter CS, Patel RM. Important Recently Characterized Non-Ewing Small Round Cell Tumors. *Surg Pathol Clin.* marzo 2019;12(1):191–215.
7. Surdez D, Benetkiewicz M, Perrin V, Han ZY, Pierron G, Ballet S, et al. Targeting the EWSR1-FLI1 oncogene-induced protein kinase PKC- β abolishes ewing sarcoma growth. *Cancer Res.* 1 settembre 2012;72(17):4494–503.
8. Nakatani F, Ferracin M, Manara MC, Ventura S, Del Monaco V, Ferrari S, et al. miR-34a predicts survival of Ewing's sarcoma patients and directly influences cell chemo-sensitivity and malignancy. *J Pathol.* aprile 2012;226(5):796–805.
9. Marino MT, Grilli A, Baricordi C, Manara MC, Ventura S, Pinca RS, et al. Prognostic significance of miR-34a in Ewing sarcoma is associated with cyclin D1 and ki-67 expression. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* ottobre 2014;25(10):2080–6.
10. Sciandra M, De Feo A, Parra A, Landuzzi L, Lollini PL, Manara MC, et al. Circulating miR34a levels as a potential biomarker in the follow-up of Ewing sarcoma. *J Cell Commun Signal.* settembre 2020;14(3):335–47.
11. Bernstein M, Kovar H, Paulussen M, Randall RL, Schuck A, Teot LA, et al. Ewing's sarcoma family of tumors: current management. *The Oncologist.* maggio 2006;11(5):503–19.
12. Esiashvili N, Goodman M, Marcus RB. Changes in incidence and survival of Ewing sarcoma patients over the past 3 decades: Surveillance Epidemiology and End Results data. *J Pediatr Hematol Oncol.* giugno 2008;30(6):425–30.
13. Jawad MU, Cheung MC, Min ES, Schneiderbauer MM, Koniaris LG, Scully SP. Ewing sarcoma demonstrates racial disparities in incidence-related and sex-related differences in outcome: an analysis of 1631 cases from the SEER database, 1973-2005. *Cancer.* 1 agosto 2009;115(15):3526–36.
14. Choi EYK, Gardner JM, Lucas DR, McHugh JB, Patel RM. Ewing sarcoma. *Semin Diagn Pathol.* gennaio 2014;31(1):39–47.
15. Riley RD, Burchill SA, Abrams KR, Heney D, Sutton AJ, Jones DR, et al. A systematic review of molecular and biological markers in tumours of the Ewing's sarcoma family. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. gennaio 2003;39(1):19–30.
16. Widhe B, Widhe T. Initial symptoms and clinical features in osteosarcoma and Ewing sarcoma. *J Bone Joint Surg Am.* maggio 2000;82(5):667–74.
17. Shibuya R, Matsuyama A, Nakamoto M, Shiba E, Kasai T, Hisaoka M. The combination of CD99 and NKX2.2, a transcriptional target of EWSR1-FLI1, is highly specific for the diagnosis of Ewing sarcoma. *Virchows Arch Int J Pathol.* novembre 2014;465(5):599–605.
18. Perbal B, Lazar N, Zambelli D, Lopez-Guerrero JA, Llombart-Bosch A, Scotlandi K, et al. Prognostic relevance of CCN3 in Ewing sarcoma. *Hum Pathol.* ottobre 2009;40(10):1479–86.

19. Somarouthu BS, Shinagare AB, Rosenthal MH, Tirumani H, Hornick JL, Ramaiya NH, et al. Multimodality imaging features, metastatic pattern and clinical outcome in adult extraskeletal Ewing sarcoma: experience in 26 patients. *Br J Radiol.* giugno 2014;87(1038):20140123.
20. Yoshida A, Sekine S, Tsuta K, Fukayama M, Furuta K, Tsuda H. NKX2.2 is a useful immunohistochemical marker for Ewing sarcoma. *Am J Surg Pathol.* luglio 2012;36(7):993–9.
21. Ozaki T. Diagnosis and treatment of Ewing sarcoma of the bone: a review article. *J Orthop Sci Off J Jpn Orthop Assoc.* marzo 2015;20(2):250–63.
22. Gaspar N, Hawkins DS, Dirksen U, Lewis IJ, Ferrari S, Le Deley MC, et al. Ewing Sarcoma: Current Management and Future Approaches Through Collaboration. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 20 settembre 2015;33(27):3036–46.
23. Bosma SE, Ayu O, Fiocco M, Gelderblom H, Dijkstra PDS. Prognostic factors for survival in Ewing sarcoma: A systematic review. *Surg Oncol.* dicembre 2018;27(4):603–10.
24. Delattre O, Zucman J, Plougastel B, Desmaze C, Melot T, Peter M, et al. Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature.* 10 settembre 1992;359(6391):162–5.
25. Turc-Carel C, Aurias A, Mugneret F, Lizard S, Sidaner I, Volk C, et al. Chromosomes in Ewing's sarcoma. I. An evaluation of 85 cases of remarkable consistency of t(11;22)(q24;q12). *Cancer Genet Cytogenet.* giugno 1988;32(2):229–38.
26. Sankar S, Lessnick SL. Promiscuous partnerships in Ewing's sarcoma. *Cancer Genet.* luglio 2011;204(7):351–65.
27. May WA, Lessnick SL, Braun BS, Klemsz M, Lewis BC, Lunsford LB, et al. The Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1. *Mol Cell Biol.* dicembre 1993;13(12):7393–8.
28. Zucman J, Delattre O, Desmaze C, Epstein AL, Stenman G, Speleman F, et al. EWS and ATF-1 gene fusion induced by t(12;22) translocation in malignant melanoma of soft parts. *Nat Genet.* agosto 1993;4(4):341–5.
29. Ng TL, O'Sullivan MJ, Pallen CJ, Hayes M, Clarkson PW, Winstanley M, et al. Ewing sarcoma with novel translocation t(2;16) producing an in-frame fusion of FUS and FEV. *J Mol Diagn JMD.* settembre 2007;9(4):459–63.
30. Lessnick SL, Ladanyi M. Molecular pathogenesis of Ewing sarcoma: new therapeutic and transcriptional targets. *Annu Rev Pathol.* 2012;7:145–59.
31. Todorova R. In vitro interaction between the N-terminus of the Ewing's sarcoma protein and the subunit of RNA polymerase II hsRBP7. *Mol Biol Rep.* luglio 2009;36(6):1269–74.
32. Herrero-Martin D, Fourtouna A, Niedan S, Riedmann LT, Schwentner R, Aryee DNT. Factors Affecting EWS-FLI1 Activity in Ewing's Sarcoma. *Sarcoma.* 2011;2011:352580.
33. Toomey EC, Schiffman JD, Lessnick SL. Recent advances in the molecular pathogenesis of Ewing's sarcoma. *Oncogene.* 12 agosto 2010;29(32):4504–16.
34. Cidre-Aranaz F, Alonso J. EWS/FLI1 Target Genes and Therapeutic Opportunities in Ewing Sarcoma. *Front Oncol.* 2015;5:162.
35. Gangwal K, Sankar S, Hollenhorst PC, Kinsey M, Haroldsen SC, Shah AA, et al. Microsatellites as EWS/FLI response elements in Ewing's sarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 22 luglio 2008;105(29):10149–54.
36. Prieur A, Tirode F, Cohen P, Delattre O. EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3. *Mol Cell Biol.* agosto 2004;24(16):7275–83.
37. Riggi N, Knoechel B, Gillespie SM, Rheinbay E, Boulay G, Suvà ML, et al. EWS-FLI1 utilizes divergent chromatin remodeling mechanisms to directly activate or repress enhancer elements in Ewing sarcoma. *Cancer Cell.* 10 novembre 2014;26(5):668–81.
38. Boulay G, Sandoval GJ, Riggi N, Iyer S, Buisson R, Naigles B, et al. Cancer-Specific Retargeting of BAF Complexes by a Prion-like Domain. *Cell.* 21 settembre 2017;171(1):163–178.e19.

39. Crompton BD, Stewart C, Taylor-Weiner A, Alexe G, Kurek KC, Calicchio ML, et al. The genomic landscape of pediatric Ewing sarcoma. *Cancer Discov.* novembre 2014;4(11):1326–41.
40. Tirode F, Surdez D, Ma X, Parker M, Le Deley MC, Bahrami A, et al. Genomic landscape of Ewing sarcoma defines an aggressive subtype with co-association of STAG2 and TP53 mutations. *Cancer Discov.* novembre 2014;4(11):1342–53.
41. Tu J, Huo Z, Gingold J, Zhao R, Shen J, Lee DF. The Histogenesis of Ewing Sarcoma. *Cancer Rep Rev.* 2017;1(2).
42. Hu-Lieskovan S, Zhang J, Wu L, Shimada H, Schofield DE, Triche TJ. EWS-FLI1 fusion protein up-regulates critical genes in neural crest development and is responsible for the observed phenotype of Ewing's family of tumors. *Cancer Res.* 1 giugno 2005;65(11):4633–44.
43. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell.* 10 aprile 2008;2(4):313–9.
44. Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci Rep.* 28 aprile 2015;35(2):e00191.
45. DuBois SG, Krailo MD, Gebhardt MC, Donaldson SS, Marcus KJ, Dormans J, et al. Comparative evaluation of local control strategies in localized Ewing sarcoma of bone: a report from the Children's Oncology Group. *Cancer.* 1 febbraio 2015;121(3):467–75.
46. Schuck A, Ahrens S, Paulussen M, Kuhlen M, Könemann S, Rube C, et al. Local therapy in localized Ewing tumors: results of 1058 patients treated in the CESS 81, CESS 86, and EICESS 92 trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1 gennaio 2003;55(1):168–77.
47. Kushner BH, Meyers PA. How effective is dose-intensive/myeloablative therapy against Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor metastatic to bone or bone marrow? The Memorial Sloan-Kettering experience and a literature review. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 febbraio 2001;19(3):870–80.
48. Picci P, Scotlandi K, Serra M, Rizzi A. Prognostic and therapeutic targets in the Ewing's family of tumors (PROTHETS). *Adv Exp Med Biol.* 2006;587:1–12.
49. Ladenstein R, Pötschger U, Le Deley MC, Whelan J, Paulussen M, Oberlin O, et al. Primary disseminated multifocal Ewing sarcoma: results of the Euro-EWING 99 trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 10 luglio 2010;28(20):3284–91.
50. Paulussen M, Bielack S, Jürgens H, Casali PG, ESMO Guidelines Working Group. Ewing's sarcoma of the bone: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* maggio 2009;20 Suppl 4:140–2.
51. Balamuth NJ, Womer RB. Ewing's sarcoma. *Lancet Oncol.* febbraio 2010;11(2):184–92.
52. The genetics of breast and ovarian cancer - PubMed [Internet]. [citato 11 febbraio 2024]. Disponibile su: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7547224/>
53. Hall JM, Huey B, Morrow J, Newman B, Lee M, Jones E, et al. Rare HRAS alleles and susceptibility to human breast cancer. *Genomics.* gennaio 1990;6(1):188–91.
54. Struewing JP, Hartge P, Wacholder S, Baker SM, Berlin M, McAdams M, et al. The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med.* 15 maggio 1997;336(20):1401–8.
55. Thorlacius S, Struewing JP, Hartge P, Olafsdottir GH, Sigvaldason H, Tryggvadottir L, et al. Population-based study of risk of breast cancer in carriers of BRCA2 mutation. *Lancet Lond Engl.* 24 ottobre 1998;352(9137):1337–9.
56. Henry NL, Hayes DF. Cancer biomarkers. *Mol Oncol.* aprile 2012;6(2):140–6.
57. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 30 dicembre 2004;351(27):2817–26.
58. Allegra CJ, Aberle DR, Ganschow P, Hahn SM, Lee CN, Millon-Underwood S, et al. National Institutes of Health State-of-the-Science Conference statement: Diagnosis and Management of Ductal Carcinoma In Situ September 22-24, 2009. *J Natl Cancer Inst.* 3 febbraio 2010;102(3):161–9.
59. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al.

Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 20 ottobre 2005;353(16):1659–72.

60. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Davidson NE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 20 ottobre 2005;353(16):1673–84.

61. Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer.* aprile 2004;4(4):253–65.

62. Goossens N, Nakagawa S, Hoshida Y. Molecular prognostic prediction in liver cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 28 settembre 2015;21(36):10262–73.

63. Simon J, Arthur C, McGuire VA. Gene-targeting vectors. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2009;561:127–44.

64. Fabbri M, Girmata L, Varani G, Calin GA. Decrypting noncoding RNA interactions, structures, and functional networks. *Genome Res.* settembre 2019;29(9):1377–88.

65. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 3 dicembre 1993;75(5):843–54.

66. Mondol V, Pasquinelli AE. Let's make it happen: the role of *let-7* microRNA in development. *Curr Top Dev Biol.* 2012;99:1–30.

67. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science.* 26 ottobre 2001;294(5543):853–8.

68. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 23 gennaio 2004;116(2):281–97.

69. Vishnoi A, Rani S. MiRNA Biogenesis and Regulation of Diseases: An Overview. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2017;1509:1–10.

70. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.* gennaio 2011;39(Database issue):D152-157.

71. Lai EC. RNA sensors and riboswitches: self-regulating messages. *Curr Biol CB.* 1 aprile 2003;13(7):R285-291.

72. Lim LP, Lau NC, Weinstein EG, Abdelhakim A, Yekta S, Rhoades MW, et al. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* 15 aprile 2003;17(8):991–1008.

73. Altuvia Y, Landgraf P, Lithwick G, Elefant N, Pfeffer S, Aravin A, et al. Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(8):2697–706.

74. Cullen BR. Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell.* 22 dicembre 2004;16(6):861–5.

75. Overman MJ. Rare but real: management of small bowel adenocarcinoma. *Am Soc Clin Oncol Educ Book Am Soc Clin Oncol Annu Meet.* 2013;189–93.

76. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med.* 8 marzo 2012;366(10):883–92.

77. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao SL. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol.* 1994;3(1):67–71.

78. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA - PubMed [Internet]. [citato 12 febbraio 2024]. Disponibile su: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28233803/>

79. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol.* agosto 2013;10(8):472–84.

80. Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer - PubMed [Internet]. [citato 12 febbraio 2024]. Disponibile su: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26311728/>

81. Tie J, Wang Y, Tomasetti C, Li L, Springer S, Kinde I, et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med.* 6 luglio 2016;8(346):346ra92.

82. Lee NS, Rossi JJ. Control of HIV-1 replication by RNA interference. *Virus Res.* 1 giugno

2004;102(1):53–8.

83. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol.* dicembre 2006;13(12):1097–101.

84. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 15 dicembre 2004;18(24):3016–27.

85. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 15 dicembre 2003;17(24):3011–6.

86. Feng Y, LoGrasso PV. Rho kinase inhibitors: a patent review (2012 - 2013). *Expert Opin Ther Pat.* marzo 2014;24(3):295–307.

87. Schwartz D, Decker CJ, Parker R. The enhancer of decapping proteins, Edc1p and Edc2p, bind RNA and stimulate the activity of the decapping enzyme. *RNA N Y N.* febbraio 2003;9(2):239–51.

88. Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim YY. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim Biophys Acta.* novembre 2010;1803(11):1231–43.

89. Liu J, Lu Y. Colorimetric biosensors based on DNAzyme-assembled gold nanoparticles. *J Fluoresc.* luglio 2004;14(4):343–54.

90. Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell.* 22 marzo 2018;173(1):20–51.

91. Jonas S, Izaurralde E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet.* luglio 2015;16(7):421–33.

92. Marco A. Regulatory RNAs in the light of Drosophila genomics. *Brief Funct Genomics.* settembre 2012;11(5):356–65.

93. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer.* aprile 2006;6(4):259–69.

94. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* 15 agosto 2005;65(16):7065–70.

95. Zhang W, Dahlberg JE, Tam W. MicroRNAs in tumorigenesis: a primer. *Am J Pathol.* settembre 2007;171(3):728–38.

96. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 26 novembre 2002;99(24):15524–9.

97. Iorio MV, Casalini P, Piovan C, Braccioli L, Tagliabue E. Breast cancer and microRNAs: therapeutic impact. *Breast Edinb Scotl.* ottobre 2011;20 Suppl 3:S63-70.

98. Garzon R. MicroRNA profiling of megakaryocytes. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2009;496:293–8.

99. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2 marzo 2004;101(9):2999–3004.

100. Fabbri M, Calin GA. Epigenetics and miRNAs in human cancer. *Adv Genet.* 2010;70:87–99.

101. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2016;1:15004.

102. Dragomir MP, Kopetz S, Ajani JA, Calin GA. Non-coding RNAs in GI cancers: from cancer hallmarks to clinical utility. *Gut.* aprile 2020;69(4):748–63.

103. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy - PubMed [Internet]. [citato 12 febbraio 2024]. Disponibile su: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25027972/>

104. Carter JV, Galbraith NJ, Yang D, Burton JF, Walker SP, Galandiuk S. Blood-based microRNAs as biomarkers for the diagnosis of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer.* 14 marzo 2017;116(6):762–74.

105. MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer - PubMed [Internet]. [citato 12 febbraio 2024]. Disponibile su: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26199650/>

106. Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of

cancer and other diseases. Nat Rev Drug Discov. marzo 2017;16(3):203–22.