

Telling Science and Innovation

Prefazione di

Luigi Nicolais

Rare Plat Net

A cura di

Valentina Battista

Il progetto

Rare.Plat.Net – “Innovazioni diagnostiche e terapeutiche per tumori neuroendocrini, endocrini e per il glioblastoma attraverso una piattaforma tecnologica integrata di competenze cliniche, genomiche, ICT, farmacologiche e farmaceutiche”

Il progetto utilizza metodiche, tecnologie e procedure all'avanguardia, e nuove molecole per la diagnosi precoce iniziale e di recidiva di malattia, per la definizione di precise categorie tumorali a differente prognosi, per la predizione di risposta a terapie più mirate ed efficaci e meno tossiche, in grado di essere attive sia sulle forme ben differenziate a crescita indolente che in quelle scarsamente differenziate più aggressive.

L'obiettivo generale del progetto è di migliorare la gestione clinica di pazienti affetti da neoplasie rare come i tumori aggressivi ipotalamo-ipofisari, i carcinomi corticosurrenalici, i NET ed i glioblastomi.

Partners: BioCam S.c.ar.l. Ca.Re.BioS Srl, CNR (IEOS, ICAR), EHealthNet Genomix4Life Srl Laboratorio Cesare Pandolfi & C Sas, Materias Srl, Neatec SpA, S.D.N. SpA, SoftLab SpA, Sync Lab S.r.l., Tecnova S.c.ar.l., Università Telematica San Raffaele Università degli Studi di Napoli Federico II, Università degli Studi di Salerno

Il progetto è cofinanziato dall'Unione Europea, dallo Stato Italiano e dalla Regione Campania, nell'ambito del POR Campania FESR 2014-2020

Il miglior effetto di qualsiasi libro è incitare il lettore a darsi da fare.

Thomas Carlyle

Materias ringrazia tutti gli autori per il loro prezioso contributo.

Ai sensi della legge sui diritti d'Autore e del codice civile è vietata la riproduzione di questo libro o di parte di esso con qualsiasi mezzo, elettronico, meccanico, per mezzo di fotocopie, microfilms, registrazioni o altro, senza il consenso dell'autore e dell'editore.

Finito di stampare a marzo 2022

INDICE

Progetto Rare.Plat.Net: l'importanza della gestione multidisciplinare nella ricerca e nel management clinico dei pazienti affetti da tumori endocrini rari	9
Caratterizzazione biochimica e biomolecolare di tumori neuroendocrini	14
Nanoparticelle polimeriche per rilascio mirato e controllato di farmaci per la terapia del cancro	20
Terapia del glioblastoma umano con nanovettori a bersaglio molecolare	26
Studio delle mutazioni geniche in tumori rari attraverso le interazioni tra miRNA e geni target	36
Immunoterapia nel carcinoma midollare della tiroide	42
Identificazione e caratterizzazione dello scambiatore sodio/calcio NCX2 quale nuovo bersaglio molecolare nello sviluppo e nel controllo farmacologico del glioblastoma umano	47
Caratterizzazione genomica e trascrittonica di tumori neuroendocrini gastro-entero-pancreatici	53
Analisi dei miRNA come possibili biomarcatori per la diagnosi dei tumori neuroendocrini	62
Una Soluzione per la Gestione della Privacy dei Dati Medico/Clinici	71
Realizzazione di un software prototipale a supporto dell'accreditamento UNI EN ISO 2038:2020 "Biobanking - Requisiti generali per il biobanking"	77
Una pipeline bioinformatica innovativa per lo studio delle patologie oncologiche basata sull'analisi di reti multiple	92
Una procedura per l'estrazione del gene-gene mutation network core per reti di mutazione genica	98
Gli strumenti a supporto dell'Innovazione nei Tumori Neuroendocrini (NET) e nei tumori rari	104

PREFAZIONE

Prof. Luigi Nicolais

*«Ma sopra tutte le invenzioni stupende, qual
eminenza di mente fu quella di colui che
s'immaginò di trovar modo di comunicare i
suoi più reconditi pensieri a qualsivoglia altra
persona, benché distante per lunghissimo
intervallo di luogo e di tempo? Parlare con
quelli che son nell'Indie, parlare a quelli
che non sono ancora nati né saranno se
non di qua a mille e dieci mila anni? E con
qual facilità? Con i vari accozzamenti di
venti caratteruzzi sopra una carta.»*

Galileo Galilei, *Dialogo sopra i due massimi sistemi del mondo* (1632)

Il 12 marzo del 1610 Galileo Galilei pubblica a Venezia, presso la piccola tipografia di Tommaso Baglioni, il *Sidereus Nuncius*. Un' opera che segna “una svolta in cui le epoche si dividono” e apre le porte alla scienza moderna, caratterizzata da tre momenti fondamentali: osservare, interpretare, comunicare. L'osservazione nasce dallo sguardo verso la natura, dalla quale ne deriva il racconto. L'interpretazione spinge Galileo alla ricerca di un significato da condurre ad un modello comune, spiegabile e scalabile. E infine, lo scienziato sente un bisogno nuovo, quello di comunicare e condividere con tutti coloro che hanno «gli occhi nella testa e nel cervello» le proprie scoperte in modo che appartengano a tutta l'umanità. Ed è proprio da qui, dalla comunicazione del sapere che si nasconde la forza di una nuova scienza, basata su una conoscenza pubblica e condivisa, portando a compimento quel processo definito come «l'abbattimento del paradigma della segretezza», che rappresenta uno dei capisaldi della «rivoluzione scientifica». Con il *Sidereus Nuncius* si inaugura, in tutte le sue principali componenti e in tutte le sue relazioni principali, quel sistema che oggi

chiamiamo “comunicazione della scienza”, una scienza capace di crescere perché i contributi di ogni singolo ricercatore si sommano generando sapere diffuso, in un'unica impresa collettiva e pubblica. Nasce così nel Seicento la “comunità scientifica”, il cui scopo è la creazione tra i suoi membri di un consenso razionale di opinione intorno ai fatti della natura. Nell'era della conoscenza, la scienza entra nel quotidiano, permea la nostra società, si infiltrata tra le maglie della politica, nelle logiche economiche, nel dibattito culturale, diventa arena di scelte e discussioni a cui sono chiamati a prendere parte attiva tutti i cittadini. In un nuovo contratto fra scienza e società, i ricercatori sono chiamati a spiegare significato e utilità degli studi che intendono compiere, e i propri spazi vanno dunque negoziati, e per negoziare occorre comunicare, che vuol dire conoscersi reciprocamente e dialogare. I progetti di ricerca scientifica creano valore e hanno un rilevante impatto sociale, ma spesso incontrano grandi difficoltà nell'essere conosciuti e condivisi dalla società e dagli stakeholder, rendendo ostico il trasferimento tecnologico e quindi l'applicazione pratica dei risultati ottenuti. Il progetto di ricerca, Rare Plat Net nell'ambito delle patologie oncologiche rare, ha un forte impatto sulla società civile, poiché affronta una tematica a forte ricaduta sociale. Per questi motivi, le ricerche condotte dagli illustri gruppi di ricerca all'interno del progetto ed i risultati ottenuti devono trovare ampia divulgazione anche tra i “non addetti ai lavori”. Materias, in collaborazione con il Partner capofila Biocam srl, presenta questo volume al fine di favorire la disseminazione dei risultati della ricerca e come questi possano essere applicati. Una missione capace di alimentare la riflessione scientifica e professionale sulle pratiche cliniche, sulle evidenze d'efficacia, nonché sulle tecniche e sulle metodiche di valutazione e di intervento, al fine d'implementare modelli operativi sempre più basati sulla integrazione dei saperi e delle competenze. I contributi raccolti rispondono a criteri di rigore scientifico e divulgativo in consonanza con la visione e la missione del progetto. La conoscenza, quindi è un bene pubblico e tutti hanno il diritto, ciascuno nel proprio ruolo e con le proprie skills, a co-partecipare alle scelte di politica della scienza. Perché come scriveva Francis Bacon, la scienza non è un bene appropriabile, non deve essere a vantaggio di questo o di quello, ma è un bene comune: deve essere a vantaggio dell'intera umanità.

Progetto Rare.Plat.Net: l'importanza della gestione multidisciplinare nella ricerca e nel management clinico dei pazienti affetti da tumori endocrini rari

ABSTRACT

I tumori endocrini rari quali i tumori neuroendocrini, i tumori ipotalamo-ipofisari e il carcinoma corticosurrenalico rappresentano una sfida per la ricerca scientifica e la gestione clinica in quanto patologie eterogenee che richiedono un impegno specifico per le complessità diagnostiche, il decorso clinico variabile e le difficoltà nella scelta terapeutica. La collaborazione integrata di specialisti di aree diverse, in grado di affrontare la patologia globalmente, si rende determinante al fine di migliorare il percorso di cura e la sopravvivenza dei pazienti. Questi obiettivi sono alla base del progetto “Innovazioni diagnostiche e terapeutiche per tumori neuroendocrini, endocrini e per il glioblastoma attraverso una piattaforma tecnologica integrata di competenze cliniche, genomiche, ICT, farmacologiche e farmaceutiche” RARE.PLAT.NET che ha visto l'impegno e la collaborazione di esperti in diversi settori di ricerca e ha contribuito a creare una rete di collaborazione per il prosieguo degli studi in quest'ambito.

I TUMORI ENDOCRINI RARI

I tumori rari rappresentano il 24% di tutte le nuove diagnosi di cancro e riguardano circa 900.000 persone in Italia (Gatta 2017). Tra i tumori endocrini rari sono annoverati i tumori neuroendocrini (NET), i tumori ipotalamo-ipofisari e il carcinoma corticosurrenalico (CCS). Per queste patologie non sono ancora disponibili metodologie sufficientemente avanzate e affidabili per una diagnosi precoce, che consenta di migliorare efficacemente la prognosi e individuare rapidamente eventuali recidive. Inoltre, dal punto di vista terapeutico, sebbene il panorama si sia discretamente ampliato negli ultimi anni, la scelta delle diverse terapie e della loro sequenza sono ampiamente dibattuti.

Il progetto RARE.PLAT.NET è stato ideato con l'obiettivo di migliorare la gestione clinica di pazienti affetti proprio da queste patologie, attraverso lo sviluppo di nuove metodiche, tecnologie, procedure, e molecole per la diagnosi precoce iniziale e di recidiva di malattia, per la definizione di precise categorie tumorali a differente prognosi, per la predizione di risposta a terapie più mirate ed efficaci e meno tossiche, in grado di essere attive sia sulle forme ben differenziate a crescita indolente che in quelle scarsamente differenziate più aggressive. Questo progetto

è stato condotto nell'ambito del Centro di Eccellenza ENETS (European Neuroendocrine Tumor Society) di riferimento europeo per i tumori neuroendocrini, unitamente alla Rete ENDO ERN (European Reference Network on Rare Endocrine Conditions) per il reclutamento e il follow-up di pazienti con tumori endocrini rari.

I TUMORI NEUROENDOCRINI RARI

Le stime epidemiologiche ci indicano che l'incidenza di queste neoplasie è in costante aumento. In particolare, i pazienti affetti da NET differenziati sono spesso costretti a convivere con la malattia per molti anni ed effettuare terapie croniche complesse non prive di effetti collaterali. I NET sono tumori rari che originano dal sistema neuroendocrino diffuso. Le cellule del sistema neuroendocrino hanno distribuzione ubiquitaria all'interno dell'organismo. Più frequentemente le forme di NET originano dal tratto digerente e anche da quello respiratorio. Altre sedi meno frequenti di origine dei NET sono il tratto genito-urinario, la cute (merkelomi), la tiroide (carcinoma midollare), i surreni e i gangli nervosi (feocromocitomi e paragangliomi). L'incidenza complessiva dei NET è in progressivo aumento, stimata a circa 5 nuovi casi per 100.000 per anno (Dasari 2017). Anche se nella maggior parte dei casi si tratta di patologie sporadiche, circa il 10% dei NET è a trasmissione ereditaria, insorgendo nell'ambito di sindromi neoplastiche ereditarie più spesso autosomiche dominanti con mutazioni di geni oncosoppressori quali MEN-1, VHL, NF1, TSC, SDH e del protooncogene RET. Le classificazioni anatomo-patologiche si sono modificate negli ultimi anni cercando di unire alla migliore caratterizzazione tissutale e ultrastrutturale una possibile correlazione con la prognosi. Il grado di proliferazione delle cellule neoplastiche, espresso mediante la valutazione dell'indice mitotico o del Ki-67, è uno dei parametri più importanti nell'inquadramento dei NET in quanto corrella direttamente con la prognosi. L'indice mitotico esprime il rapporto tra il numero di cellule in proliferazione e il numero totale di cellule all'interno di una neoplasia. Il Ki-67 è un antigene espresso dalle cellule durante la fase attiva del ciclo cellulare (G1-M), identificato mediante l'utilizzo dell'anticorpo monoclonale MIB-1, utilizzato come fattore discriminante nella distinzione di lesioni a basso o ad alto potenziale maligno. Più frequentemente i NET sono tumori ben differenziati ad indice proliferativo basso-intermedio. I NET del polmone seguono una diversa classificazione in base alla presenza di necrosi e mitosi. Per tutti i NET esiste un sottogruppo a scarsa differenziazione e ad alto indice proliferativo, che comprende i carcinomi neuroendocrini scarsamente differenziati. In particolare, i NET differenziati sono caratterizzati da una lunga storia naturale di malattia, anche in caso di presenza di lesioni metastatiche e ciò determina la necessità di effettuare terapie croniche, multiple e anche in associazione, complesse e non prive di effetti collaterali (Faggiano 2017). Frequentemente, infatti, i NET si presentano con metastasi già alla diagnosi, prevalentemente al fegato. Per quanto riguarda i biomarcatori di malattia, allo stato attuale la cromogranina-A è il miglior marcitore neuroendocrino tissutale, mentre il suo ruolo diagnostico, prognostico e predittivo di risposta come marcatore

circolante è scarso.

I tumori ipotalamo-ipofisari sono neoplasie estremamente rare, e le caratteristiche epidemiologiche e di mortalità sono talora non ancora del tutto note. I tumori ipotalamo-ipofisari includono neoplasie secernenti, e non, a comportamento biologico aggressivo, carcinomi ipofisari, adenomi atipici, craniofaringiomi, tumori a cellule germinali, cordomi, gliomi e meningiomi. Alcune di queste neoplasie mostrano tendenza all'invasione locale, resistenza al trattamento e rapida recidiva con elevato indice mitotico. I carcinomi dell'ipofisi possono provocare metastasi a distanza e la prognosi è scarsa poiché questi tumori recidivano spesso dopo interventi chirurgici radicali con scarsa risposta a radioterapia e chemioterapia (Colao 2010). Tra le opzioni terapeutiche oltre alla chemioterapia con temozolamide, sono stati proposti il pasireotide, ligando dei recettori della somatostatina che sopprime potenzialmente la secrezione ormonale nelle colture primarie di tumore ipofisario e potrebbe rappresentare una terapia promettente anche per le neoplasie ipotalamo-ipofisarie a comportamento aggressivo e maligno. Inoltre l'inibitore di mTOR (mammalian target of rapamycin), everolimus, ha mostrato di inibire la proliferazione cellulare nelle colture primarie di neoplasie ipofisarie, riducendo la crescita cellulare e promuovendo l'apoptosi e pertanto, potrebbe rappresentare una promettente opzione terapeutica (Pivonello 2018), analogamente alla terapia anti-angiogenica.

Il carcinoma corticosurrenale (CCS) è uno dei tumori solidi più aggressivi, come evidenziato da una sopravvivenza allo stato metastatico inferiore al 15%. Esso ha un'incidenza di circa 1-2 nuovi casi per milione per anno, con un'aumentata frequenza durante l'infanzia e la IV-V decade di vita. La chirurgia resta la sola opzione curativa, ma solo per i pazienti che ricevono diagnosi precoce, mentre le opzioni terapeutiche per i pazienti con una malattia avanzata restano limitate. Pertanto, nuovi approcci terapeutici sono necessari per questo tipo di patologia (Fassnacht 2011).

ARRUOLAMENTO E ATTIVITÀ MULTIDISCIPLINARI

Alla base di tutte le attività progettuali è stata posto il reclutamento dei pazienti affetti dai tumori oggetto di studio. In particolare, sono stati sottoposti a indagini diagnostiche di tipo clinico, biochimico e strumentale tutti i pazienti giunti all'osservazione con sospetto tumore neuroendocrino, tumore aggressivo ipotalamo-ipofisario o carcinoma corticosurrenale afferenti sia in regime ambulatoriale che di ricovero. Sono stati inclusi pazienti con tumori neuroendocrini rari sia sporadici che parte di sindromi neoplastiche endocrine e neuroendocrine ereditarie. Sono stati raccolti i dati anamnestici, clinici, biochimici e strumentali radiologici, sia morfologici che funzionali, per un corretto inquadramento clinico-patologico dei pazienti ed è stata ottenuta la conferma istologica. Il reclutamento ha incluso la raccolta e la valutazione dei parametri clinici antropometrici, nonché di quelli relativi alla patologia in studio quali dimensioni e caratteristiche radiologiche del tumore, valutazione dei parametri di risposta alle terapie (sopravvivenza) e di tossicità (eventi avversi, qualità della vita), unitamente alla valutazione di parametri anatomopatologici (istotipo, sede, stadio, grado di differenziazione,

indici proliferativi, marcatori immunoistochimici, espressione in vivo dei recettori della somatostatina e della dopamina) per elaborazione di programmi clinici, biochimici e radiologici (morfo-funzionali) di follow-up. L'impostazione del follow-up per i pazienti arruolati è avvenuta in ambito dedicato e secondo criteri di aggressività clinica, radiologica e istologica del tumore. È stato contestualmente avviato lo screening genetico familiare nelle sindromi neoplastiche endocrine e neuroendocrine ereditarie. Sono stati inoltre raccolti campioni biologici (sangue e siero), nonché campioni chirurgici tissutali di neoplasie endocrine rare. È stato creato un protocollo, proposto e approvato dal comitato etico per la creazione di un bio-repository relativo ai tumori rari di interesse. È stato inoltre utilizzato un database per la condivisione dai dati con i partner del progetto. I campioni sono stati processati con colorazione con ematossilina-eosina, colorazioni isto- ed immunoistochimiche, indagini ultrastrutturali e refertati secondo i più recenti criteri classificativi. Le terapie praticate sono state registrate in modo da definire combinazioni e sequenze terapeutiche e variazioni in termini di efficacia e/o tossicità. In particolare, per quanto riguarda le indagini strumentali sono stati avviati studi funzionali con nuovi traccianti quali la DOPA, per individuare la possibilità di diagnosi precoce di recidiva e per individuare lesioni di dimensioni ridotte. È stato utilizzato il database per la condivisione dai dati con i partner del progetto. I dati clinici-patologici dei pazienti con i diversi tumori endocrini rari sono stati posti in data base condivisi al fine di individuare algoritmi di analisi e correlazione di dati, basati sull'integrazione di tecniche di machine learning, pattern recognition e computational intelligence da attivare su infrastrutture di calcolo con processori di ultima generazione anche per l'identificazione di biomarkers diagnostici e prognostici dei tumori rari di interesse. Inoltre ai fini dell'analisi dei campioni ematici e tissutali sono state avviate le analisi previste per la correlazione dei dati clinico-patologici con i dati molecolari messi a disposizione dalle unità di ricerca di base con l'obiettivo di migliorare la definizione prognostica e la strategia terapeutica. Sono ad oggi in studio potenziali marcatori molecolari e morfo funzionali di diagnosi precoce. A seguito della validazione di specifici predittori di risposta alla terapia si stanno sviluppando le terapie a bersaglio molecolare specifiche, mirate al caratteristico pathway mutato in collaborazione con i partner di progetto. È stato inoltre pubblicato uno studio in cui è stato analizzato il ruolo dell'epigenetica in ambito diagnostico e terapeutico per i NET (Colao 2020).

In conclusione, l'aumento dell'incidenza e della necessità di cure oncologiche per le neoplasie endocrine rare stimolano la ricerca di nuove strategie di diagnosi, analisi molecolare e farmaci innovativi. Per questi motivi è indispensabile la collaborazione non solo di specialisti di diverse aree mediche, tra i quali endocrinologi, radiologi, anatomico-patologi, medici nucleari, oncologi, chirurghi, gastroenterologi, figure professionali relative alla ricerca di base come biologi, genetisti, biotecnologi, ma anche ingegneri per l'elaborazione dei dati e lo sviluppo di tecnologie in grado di imprimere una svolta concreta alla ricerca e alla cura di queste neoplasie.

Roberta Modica¹, Claudia Pivonello¹, Maria Laura Del Basso De Caro², Paolo Cappabianca³, Annamaria Colao^{1,4}.

1 - Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia, Università Federico II di Napoli.

2 - Dipartimento di Scienze Biomediche Avanzate, Università Federico II di Napoli.

3 - Dipartimento di Neuroscienze e Scienze Riproduttive e Odontostomatologiche, Università Federico II di Napoli.

4 - Titolare Cattedra Unesco Educazione alla Salute e allo Sviluppo Sostenibile, Università Federico II di Napoli.

Referenze

- Colao A, de Nigris F, Modica R, Napoli C. Clinical Epigenetics of Neuroendocrine Tumors: The Road Ahead. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 Dec 15;11:604341. doi: 10.3389/fendo.2020.604341. PMID: 33384663; PMCID: PMC7770585.
- Fassnacht M, Libé R, Kroiss M, Allolio B. Adrenocortical carcinoma: a clinician's update. *Nat Rev Endocrinol*. 2011 Jun;7(6):323-35. doi: 10.1038/nrendo.2010.235. Epub 2011 Mar 8. PMID: 21386792.
- Gatta G, Capocaccia R, Botta L, Mallone S, De Angelis R, Ardanaz E, Comber H, Dimitrova N, Leinonen MK, Siesling S, van der Zwan JM, Van Eycken L, Visser O, Žakelj MP, Anderson LA, Bella F, Kaire I, Otter R, Stiller CA, Trama A; RARECAREnet working group. Burden and centralised treatment in Europe of rare tumours: results of RARECAREnet-a population-based study. *Lancet Oncol*. 2017 Aug;18(8):1022-1039. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30445-X. Epub 2017 Jul 4. Erratum in: *Lancet Oncol*. 2017 Aug;18(8):e433. PMID: 28687376.
- Colao A, Ochoa AS, Auriemma RS, Faggiano A, Pivonello R, Lombardi G. Pituitary carcinomas. *Front Horm Res*. 2010;38:94-108. doi: 10.1159/000318499. Epub 2010 Jul 5. PMID: 20616500.
- Dasari A, Shen C, Halperin D, Zhao B, Zhou S, Xu Y, Shih T, Yao JC. Trends in the Incidence, Prevalence, and Survival Outcomes in Patients with Neuroendocrine Tumors in the United States. *JAMA Oncol*. 2017 Oct 1;3(10):1335-1342. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.0589. PMID: 28448665; PMCID: PMC5824320.
- Pivonello C, Patalano R, Solari D, Auriemma RS, Frio F, Vitulli F, Grasso LFS, Di Cera M, De Martino MC, Cavallo LM, Cappabianca P, Colao A, Pivonello R. Effect of combined treatment with a pan-PI3K inhibitor or an isoform-specific PI3K inhibitor and everolimus on cell proliferation in GH-secreting pituitary tumour in an experimental setting. *Endocrine*. 2018 Dec;62(3):663-680. doi: 10.1007/s12020-018-1677-2. Epub 2018 Jul 31. PMID: 30066286.
- Faggiano A, Lo Calzo F, Pizza G, Modica R, Colao A. The safety of available treatments options for neuroendocrine tumors. *Expert Opin Drug Saf*. 2017 Oct;16(10):1149-1161. doi: 10.1080/14740338.2017.1354984. Epub 2017 Jul 20. PMID: 28705090.

Caratterizzazione biochimica e biomolecolare di tumori neuroendocrini

ABSTRACT

Nell'ambito dello sviluppo di nuove tecnologie diagnostiche finalizzate alla diagnosi e terapia dei tumori, la MeriGen Diagnostic ha definito una serie di saggi per fornire un supporto applicato per la valutazione dei processi funzionali del paziente e per la caratterizzazione molecolare della patologia. In particolare, nell'ambito dello studio dell'influenza del diabete, dell'insulino-resistenza e dell'obesità sui tumori sono stati selezionati e validati i dosaggi dei seguenti ormoni: Grelina; Adiponectina, Leptina, GH, IGF-1, IGFBP3, GLP-1. Il settore di biologia molecolare del Laboratorio MeriGen Diagnostic si è occupato dello sviluppo di un sistema di caratterizzazione molecolare dei pazienti affetti da tumori neuroendocrini rari. Nello specifico, abbiamo approntato una metodologia per definirne le CNV (Copy Number Variants) (Retterer et al 2014) in pazienti affetti da neoplasie al fine di identificare i parametri predisponenti e/o causativi. Si riportano infine validazioni di saggi di mutazioni in Sanger e/o Digital PCR e le applicazioni in prospettiva sui pazienti affetti da tumori neuroendocrini.

VALUTAZIONE DEI PROCESSI FUNZIONALI DEL PAZIENTE

Gli ormoni Leptina, Adiponectina, Grelina, GLP-1 e IGFBP3, sono stati rilevati e quantificati mediante tecnologia ELISA o RIA. Gli adipociti sono la maggior sorgente di Leptina e i livelli circolanti correlano strettamente con la massa adiposa. Il ruolo primario della leptina è il controllo dell'appetito e la regolazione della funzione endocrina ipotalamica. I livelli di Adiponectina sono inversamente correlati all'obesità ed all'insulino-resistenza. Essa svolge azione anti-aterogena ed anti-infiammatoria. La Grelina ha proprietà orezzizzanti, ovvero aumenta la ricerca e l'assunzione di cibo, e diminuisce il consumo di energia riducendo l'attività fisica. Alti livelli di Grelina risultano pertanto correlati ad un aumento del peso corporeo soprattutto per quanto riguarda la massa grassa (Vendrell et al, 2004). Il glucagon-like peptide 1 (GLP-1) è un ormone prodotto dall'intestino che stimola la secrezione di insulina e inibisce la secrezione di glucagone da parte del pancreas. Il suo rilascio avviene dopo il pasto, ovvero quando la glicemia sale per effetto dei carboidrati introdotti col cibo. IGFBP3, chiamato anche enterostaminina, è un ormone in grado di controllare crescita e sviluppo delle cellule staminali dell'intestino. Difetti nella produzione di questo ormone possono dare problemi di malassorbimento, diarrea, ritardo nella crescita associata allo sviluppo anormale dell'intestino. L'ormone della crescita (GH), o ormone somatotropo, è una proteina prodotta dalle cellule somatotrope dell'ipofisi anteriore secreta in modo pulsatile soprattutto nelle prime ore di sonno. Il GH controlla la produzione di somatomedine (IGF-1) da parte

dei tessuti periferici, soprattutto a livello epatico. L'IGF-1 riveste un ruolo importantissimo nei processi di crescita del bambino e mantiene i suoi effetti anabolici anche in età adulta. L'IGF-1 ha attività insulino-simile e promuove la proliferazione e la differenziazione cellulare, soprattutto a livello cartilagineo e muscolare. La grelina, oltre a provocare un aumento dell'appetito, l'ossidazione del glucosio e la lipogenesi, stimola anche la secrezione di GH. In contrasto con la grelina, il GH promuove la lipolisi, la produzione di glucosio e la secrezione di insulina. Sia la grelina che il GH sono soppressi dall'assunzione di nutrienti, soprattutto dal glucosio. Nonostante questi effetti ampliamente descritti, il ruolo dell'ormone GH nella regolazione della grelina non è ancora del tutto chiarito. È stato riscontrato che condizioni quali obesità e sindrome metabolica sono caratterizzate da un aumento della leptina circolante parallelamente ad una diminuzione dell'adiponectina. Conseguenzialmente, il rapporto adiponectina/leptina potrebbe essere utilizzato come marker per valutare disfunzioni del tessuto adiposo (Frühbeck et al, 2018).

In particolare, durante lo sviluppo del progetto i livelli sierici di Leptina e Grelina sono stati misurati tramite tecnica del dosaggio radioimmunologico (Radio Immuno Assay, RIA), quelli di adiponectina tramite tecnica ELISA. Il test ELISA si basa sull'utilizzo di anticorpi marcati con un enzima (generalmente la perossidasi), in modo che i coniugati risultanti abbiano una attività sia immunologica che enzimatica. Avendo uno dei componenti (antigene o anticorpo) adeso alla piastra, la reazione antigene-anticorpo è immobilizzata e pertanto potrà facilmente essere evidenziata con l'addizione del substrato che, reagendo con l'enzima, produrrà una colorazione osservabile a vista e quantificabile con lo spettrofotometro. Il saggio è quantitativo grazie ad una curva di calibrazione con standard a concentrazione nota. La tecnica RIA è utilizzata per dosare qualsiasi composto immunogenico disponibile in forma pura e marcabile radioattivamente. Possiede un'elevata sensibilità (ordine dei pg/mL), elevata specificità, elevata precisione. Gli elementi chiave del saggio sono: l'anticorpo (Ab, di classe IgG) specifico per l'antigene da determinare (Ag), il campione contenente l'Ag e l'Ag marcato radioattivamente (Ag*) in forma pura (di solito si utilizza nella marcatura lo iodio-125). Anche con questa tecnica la quantizzazione avviene mediante interpolazione dei dati ottenuti con una retta di taratura. I dosaggi di IGF1 e GH sono stati effettuati mediante analizzatore automatico a chemiluminescenza Liaison®. Sono stati analizzati campioni di volontari sani per la validazione dei seguenti kit commerciali disponibili: Meridian Healthcare, DRG Instruments GmbH, Labor Diagnostika nord gmbh, Bio Vendor. Per l'adiponectina umana i kit utilizzati hanno mostrato una sensibilità media di 1 ng/ml e un range tra 1 e 200 ng/ml. Per la grelina i kit RIA utilizzati hanno mostrato una sensibilità media di 100 pg/ml con un range tra 100 e 10,000 pg/ml. Per la leptina è stata utilizzata la medesima tecnica con un limite di rilevabilità di 0,5 ng/ml. La popolazione analizzata è composta da volontari sani, di ambo i sessi. Per una maggiore completezza dei dati sono stati analizzati parametri utili alla valutazione del quadro clinico generale.

PARAMETRO	CONCENTRAZIONE MEDIA ± D.S.
Glicemia a digiuno (mg/dL)	88 ± 4.6
Insulina a digiuno (μ U/mL)	9 ± 4.9
Colesterolo (mg/dL)	178 ± 25
cHDL (mg/dL)	53 ± 4.4
cLDL (mg/dL)	136 ± 10.4
Trigliceridi (mg/dL)	80 ± 45
HOMA-IR	0,77 ± 0,1
Leptina (ng/ml)	5,0 ± 8,7
Grelina (pg/ml)	550 ± 9
Adiponectina (μ g/ml)	7,6 ± 2

Tabella 1 Risultati dei dosaggi biochimici

Grazie ai dati ottenuti è stato possibile validare algoritmi di calcolo per la valutazione degli indici di Insulino-Resistenza.

Il ruolo delle adipochine nella modulazione del metabolismo lipidico è testimoniato da numerose evidenze di letteratura. Inoltre, la disegolazione di queste proteine secrete dal tessuto adiposo possono contribuire alle complicanze in corso di obesità e della sindrome metabolica A livello applicativo clinico, la valutazione integrata del rischio cardiovascolare e metabolico, in associazione con il profilo lipidico, potrà quindi prevedere anche la considerazione di parametri adipochinici (livelli circolanti e variazioni di espressione dei recettori in linfomonociti circolanti) e della loro integrazione, ad esempio, nel rapporto leptina/adiponectina (Yildiz, et al 2004).

Le ricerche future in questo campo saranno quindi orientate a validare alcune adipochine come potenziali nuovi biomarcatori di rischio dislipidemico e aterosclerotico.

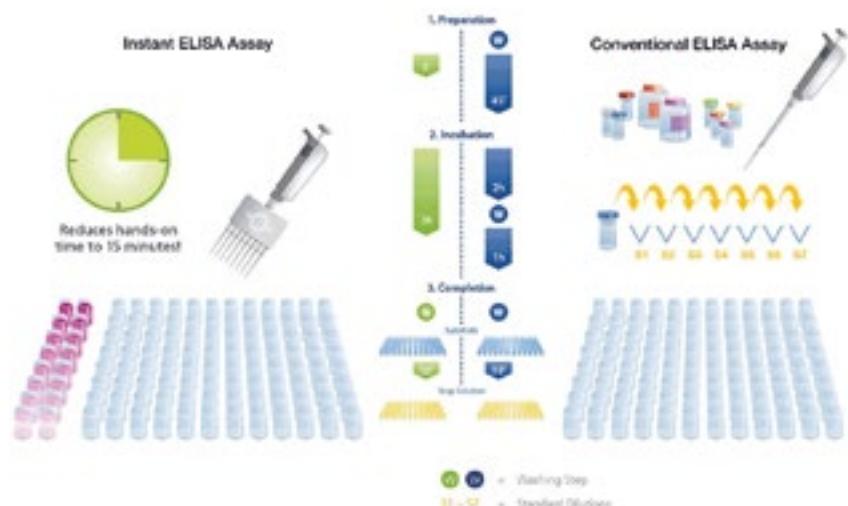


Figura 1 Schematizzazione grafica metodica Elisa

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE

La MeriGen Diagnostic ha sviluppato una metodologia che consente di analizzare il genoma di pazienti affetti da tumori neuroendocrini rari in cerca di particolari polimorfismi/mutazioni definiti CNV, ovvero Copy Number Variants (Retterer et al 2014) predisponenti e/o causative della neoplasia. A tale scopo è stata utilizzata la metodica Array-CGH che consente di individuare: variazioni del numero dei cromosomi, macrodelezioni/macroduplicazioni, microduplicazioni/microdelezioni associate a patologie note in letteratura e "Copy Number Variations" (CNVs) variazioni di DNA di lunghezza maggiori di 1kb che sono presenti in un numero variabile di copie nei genomi umani e che si ritiene siano alla base delle differenze fenotipiche tra gli individui. Il principio della tecnica si basa su una ibridazione competitiva tra due DNA genomici, marcati con fluorocromi diversi, e porzioni di DNA genomico poste su un vetrino (sonde). Le regioni di DNA derivano da un soggetto sano e possono essere: cloni BAC (cromosomi batterici artificiali), PAC (cromosomi artificiali di fago P1) ed oligonucleotidi corrispondenti a specifiche regioni cromosomiche. La risoluzione, da cui dipende la capacità di riuscire ad identificare sbilanciamenti genomici, varia dalle 100-150kb ad 1Mb e dipende dalla dimensione, dalla numerosità delle sonde e dalla loro distanza rispetto al genoma di riferimento. I DNA in competizione sono il "test DNA" derivato dal paziente in esame (liquido amniotico, sangue periferico, etc) ed il "control DNA", cioè un DNA genomico di un soggetto sano; entrambi sono marcati con fluorocromi di diverso colore, ad esempio, la cianina 5 (Cy 5, fluorocromo verde) e la cianina 3 (Cy 3, fluorocromo rosso) rispettivamente. Dopo la fase di marcatura i DNA sono riuniti e ad essi va aggiunto il DNA-cot1, un DNA altamente ripetitivo in modo da saturare le sequenze ripetitive in entrambi i genomi. Tutto il DNA presente in questa miscela viene denaturato e ibridato con le regioni di DNA spottate sul vetrino. Al termine della reazione un apposito scanner analizza i singoli spots presenti sul vetrino quantificano l'intensità di fluorescenza emessa da entrambi i fluorocromi da ogni singolo spot. In condizioni normali il DNA test ed il DNA di controllo saranno presenti in quantità uguali e i due fluorocromi si bilanceranno producendo un terzo colore (giallo). Nel caso in cui il DNA test presenti una duplicazione ci sarà un eccesso di materiale cromosomico rispetto al normale, il colore risultante sarà il verde, se invece presenta una delezione si determinerà un eccesso del DNA normale e il colore emesso sarà rosso. Un apposito software è in grado di elaborare un profilo per ogni cromosoma identificando le eventuali aree di guadagno o perdita di materiale genetico, eventualmente associate a condizioni patologiche (Picard et al, 2005).

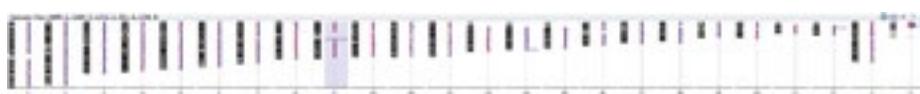


Figura 2 Report Array-cgh riportante tutti i cromosomi (Cytogenomic 5.0 Software)

Nell'ambito del progetto la MeriGen Diagnostic ha inizialmente individuato una popolazione di circa 100 individui definiti sani, per i quali è stato eseguito array-cgh allo scopo di identificare le CNV comunemente presenti nella popolazione. L'analisi dei 100 individui ha permesso di caratterizzare una serie di varianti ricorrenti che sono state tabellate e studiate con il supporto dei database disponibili online. In particolare, la ricerca del significato delle varianti si è compiuta facendo uso del portale <https://www.deciphergenomics.org/>. Dall'approfondimento è emerso che quasi la totalità delle CNV rinvenute nella popolazione sana risulta essere ampiamente diffusa e a significato chiaramente benigno, altresì solo una piccolissima parte delle varianti riscontrate non risulta avere un significato chiaro, vengono infatti contrassegnate come incerti. L'analisi di questa popolazione riferimento ha quindi permesso di identificare un profilo di CNV definito sano raccolto in un database da noi predisposto che faciliterà di molto l'analisi successiva dei campioni dei pazienti affetti da tumore neuroendocrino, consentendo la più semplice individuazione di varianti probabilmente predisponenti. Nell'ambito biomolecolare un altro punto sul quale si è concentrata l'attività del nostro laboratorio è stata la validazione di mutazioni a singolo nucleotide rinvenute nei pazienti affetti mediante metódica NGS, in particolare si è proceduto con la messa a punto del saggio mediante sequenziamento Sanger. Il disegno dei primers è stato fatto servendosi del portale <https://primer3.ut.ee/>, la specificità degli oligonucleotidi così ottenuti è stata confermata consultando invece <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>. I campioni sono stati quindi testati mediante PCR e sequenziamento Sanger. Infine, lo studio degli elettroforeogrammi prodotti ha permesso di validare le varianti oggetto di studio. La MeriGen Diagnostic si propone quindi in seguito alla validazione di questi dati di lavorare all'elaborazione di un pannello in ddPcr che raccolga le varianti a singolo nucleotide più frequenti nella popolazione di pazienti affetti da tumori neuroendocrini e probabilmente predisponenti alla patologia neoplastica. La ddpcr è una innovativa tecnica di quantificazione assoluta dei target, in grado di individuare marcatori rari grazie alla sua elevata sensibilità analitica (Quan et al 2018). La Digital PCR si pone come evoluzione della PCR Quantitativa, metódica che attualmente viene usata in diagnostica ma attraverso la quale non possono essere raggiunti limiti di sensibilità così elevati. La digital PCR pur utilizzando infatti i medesimi reagenti di una Real-time PCR, presenta un importante step aggiuntivo, la ripartizione di uno stesso campione in microreazioni, evento fondamentale nella riduzione di competizione dei target. La quantificazione non richiede impiego di curve di calibrazione oltre ad essere caratterizzata da una rivelazione per fluorescenza in end point. La tecnica pone le sue basi sulla statistica di Poisson, che presuppone una distribuzione casuale delle molecole (microreazioni) abbastanza ampia. In particolare, in determinate condizioni ci si aspetta che in ciascuna ripartizione vi sia la probabilità di trovare un solo target oppure nessuno. In base alle precedenti supposizioni la concentrazione per ciascun campione viene valutata contando le partizioni positive rispetto al numero totale delle partizioni. L'utilizzo futuro di questa metódica nell'ambito della diagnostica di laboratorio potrà consentire

oltre all'individuazione di varianti a singolo nucleotide specificamente associate a tumori neuroendocrini anche una quantificazione dei target stessi ove necessaria.

CONCLUSIONI

La MeriGen Diagnostic è attualmente in fase di valutazione dei campioni di pazienti affetti pervenuti dal Laboratorio di Medicina Molecolare e Genomica dell'Università degli Studi di Salerno sui quali verranno testate le metodiche messe a punto al fine di trarre conclusioni immediatamente traslabilie in diagnostica di laboratorio. Dai dati preliminari emerge che grazie all'applicazioni delle numerose tecniche sopra descritte potrà realizzarsi in modo soddisfacente la valutazione dei processi funzionali del paziente affetto NET affiancata e supportata dalla caratterizzazione molecolare dello stesso.

Immacolata Di Biase, Labella Donato, Viviana Narciso, Altieri Vincenzo, Isabella Mezzanotte, Cristiano Stefano, Maria Pia Poziello, Sebastiano Di Biase

MeriGen Diagnostic & C. Sas. Traversa Michele Pietravalle 11, 80131 Napoli

Referenze

- Fröhbeck G., Catalán V., Rodríguez A. (2018). Adiponectin-leptin ratio: a promising index to estimate adipose tissue dysfunction. Relation with obesity-associated cardiometabolic risk. *Adipocyte*.
- Vendrell J., Montserrat B., Vilarrasa N., Molina A., Gómez J. M., Gutiérrez C., Simón I., Soler J., Richart C. (2004). Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and proinflammatory cytokines: relationships in obesity. *Obesity Research*.
- Yildiz B., Suchard M., Wong M., McCann S., Licinio J. (2004). Alterations in the dynamics of circulating ghrelin, adiponectin, and leptin in human obesity. *PNAS*.
- Picard F., Robin S., Lavielle M., Vaisse C., Daudin J. . (2005). A statistical approach for array CGH data analysis. *BMC Bioinformatics*
- Retterer K., Scuffins J., Schmidt J., Lewis R., Pineda-Alvarez D., Stafford A., Schmidt L., Warren S., Gibellini F., Kondakova A., Blair A., Bale S., Matyakhina L., Meck J., Aradhya S., Haverfield E. Assessing copy number from exome sequencing and exome array CGH based on CNV spectrum in a large clinical cohort. (2014). *Genetics in Medicine*
- Quan P., Sauzade M., Brouzes E. dPCR: A Technology Review. (2018). *Sensors (Basel)*.

Nanoparticelle polimeriche per rilascio mirato e controllato di farmaci per la terapia del cancro

ABSTRACT

Negli ultimi decenni sono state sviluppate nuove nanotecnologie basate su sistemi nano-particellari in grado di controllare e indirizzare il rilascio dei farmaci per il trattamento del cancro. Questi sistemi sono in grado di indirizzare preferenzialmente il farmaco al sito del tumore limitando l'assorbimento da parte delle cellule sane e quindi riducendo gli effetti collaterali.

Tra i diversi tipi di sistemi nanoparticellari di grande interesse, sia industriale che per la ricerca, vi sono quelli a base di nanoparticelle polimeriche biodegradabili ed in particolare la nostra unità di ricerca ha realizzato e valutato le ampie potenzialità di nanoparticelle composte da acido polilattico-co-glicolico (PLGA) ed acido ialuronico (HA). Sono state realizzate nanoparticelle *core-shell* nelle quali il PLGA costituisce la parte interna della nanoparticelle mentre l'HA costituisce lo *shell* esterno.

Tali nanoparticelle sono state prodotte con una tecnica one – step che utilizza la singola emulsione con evaporazione del solvente e rappresentano dispositivi altamente innovativi per il targeting attivo di molecole chemioterapiche. I risultati sono stati raggiunti grazie a nuovi metodi di produzione e caratterizzazione di nanoparticelle. Inoltre, sono stati compiuti importanti progressi verso la comprensione degli effetti delle interazioni delle particelle con sistemi biologici.

INTRODUZIONE

Il tumore (dal latino tumor cioè rigonfiamento) è un accumulo patologico di nuove cellule, che diffondono in maniera incontrollata all'interno di un tessuto. È importante specificare che esistono al mondo due tipi di tumori: il tumore benigno o neoplasia che è un tumore di estensione circoscritta, che non dà metastasi e che non ricresce una volta che viene asportato (ad esempio i nevi o nei sono tumori benigni della pelle); ed il tumore maligno detto cancro che si diffonde nei tessuti circostanti, producendo metastasi e può riprodursi dopo l'asportazione. Attualmente il cancro è la seconda causa di morte nel mondo sviluppato, avendo provocato la morte di circa 6 milioni di persone nel 2000, e secondo il "World Cancer Report" (agenzia internazionale dell'Organizzazione Mondiale della Sanità della ricerca sul cancro) questi dati sono destinati ad aumentare fin anche al 50% con una stima di un valore di 17 milioni di persone affette dal cancro nel 2030.^[1] Tra le terapie attualmente in uso per il trattamento del cancro la chemioterapia riveste un ruolo fondamentale per i tumori non operabili e metastatici e per la prevenzione di recidive. La chemioterapia consiste in un trattamento sistematico che

sfrutta agenti antitumorali per eliminare le cellule cancerogene, tuttavia gli agenti in uso tutt'oggi, non possiedono un *targeting* (bersaglio) specifico per distinguere selettivamente tra le cellule tumorali e quelle normali. Questo è spesso causa di effetti tossici su altri tessuti come la soppressione di midollo osseo, cardiomiopatia e neurotossicità. Tali effetti dovrebbero comportare una riduzione delle sedute di terapia e della quantità nell'uso di farmaci, tuttavia, a causa della non specificità degli agenti antitumorali oggi in uso, la quantità di farmaco che viene iniettata per chemioterapia è sempre in dose maggiore rispetto al necessario, in modo da permettere che almeno una parte del farmaco giunga al sito tumorale senza essere eliminata dall'organismo durante il percorso. Per poter ottenere un'azione di somministrazione di farmaco più mirata, si è pensato quindi di utilizzare "*Drug Delivery Systems (DDS)*", cioè sistemi di rilascio controllato di farmaco, che presentano delle caratteristiche tali, da permettere un giusto apporto di farmaco in tempi prestabiliti, e soprattutto quando progettati opportunamente possono permettere al farmaco di giungere al sito tumorale in maniera selettiva. I sistemi di drug delivery ad oggi sviluppati sono vari e sono distinti in base ai meccanismi di rilascio dei farmaci; esistono sistemi basati su meccanismi di diffusione, di degradazione, di *swelling* (rigonfiamento), sistemi basati sulla risposta a stimoli esterni come variazioni temperatura e pH. Tra tutti i dispositivi, le nanoparticelle che rilasciano il farmaco grazie a meccanismi diffusivi/degradativi sono state ampiamente studiate per il rilascio di agenti chemioterapici [2]. Come sistemi di drug delivery, le nanoparticelle possiedono molti aspetti positivi, tra cui la possibilità di una facile sterilizzazione, e di poter essere funzionalizzate per agire selettivamente sulle cellule tumorali.^[3] Le nanoparticelle polimeriche sono sistemi colloidali di dimensioni inferiori ad 1 μm, e proprio grazie alle loro dimensioni, esse sono i candidati più adatti come sistemi di rilascio controllato e selettivo di farmaco [4]. Le nanoparticelle possono entrare nelle masse tumorali grazie ad un meccanismo di targeting passivo sfruttando il meccanismo di EPR-*Enhanced permeation and retention*. In pratica, masse tumorali posseggono delle caratteristiche aberranti rispetto ai tessuti normali; esse presentano infatti un'elevata angiogenesi e un'ipervascolarizzazione legata al fatto, che essendo in riproduzione continua, hanno bisogno di un numero elevato di nutrienti. Inoltre, la rete vascolare è alterata rispetto al normale così come il drenaggio linfatico, caratteriste che possono essere utilizzate per il rilascio di farmaci. Le nanoparticelle, infatti, grazie alle loro dimensioni sub-cellulari e submicrometriche, riescono a superare il tessuto epiteliale, attraversando i capillari e l'anormale drenaggio linfatico, fino a giungere direttamente sulla cellula tumorale. Quindi, sfruttando tale principio, si può incapsulare nella nanoparticella un farmaco, in modo che questa lo rilasci secondo dinamiche prestabilite. Oltre a sfruttare il meccanismo di EPR (target passivo), le nanoparticelle possono essere incapsulate all'interno delle cellule mediante un meccanismo di targeting attivo. Tale meccanismo sfrutta l'interazione specifica esistente tra recettori di superficie cellulari e ligandi polimerici. Inserendo sulla superficie delle nanoparticelle dei ligandi specifici per determinati recettori presenti sulle cellule tumorali,

si può sfruttare il meccanismo EPR per il passaggio delle nanoparticelle nel sito tumorale e la selettività ligando-recettore per aumentarne l'indice terapeutico. Il meccanismo di targeting antitumorale-bioattivo risulta molto utile per due motivi: in primo luogo perché ci permette di avere un'azione citotossica sulle cellule tumorali durante tutta la fase di crescita del tumore, e in secondo luogo perché ci permette di proteggere le cellule normali dall'azione dei farmaci. Una delle caratteristiche essenziali dei sistemi di rilascio controllato, e quindi delle nanoparticelle, è la loro biodegradabilità e biocompatibilità, ovvero la capacità di degradarsi, e di farlo senza indurre alcun effetto tossico sui tessuti naturali. Tra i polimeri esistenti il più utilizzato in quest'ambito è l'acido poli-lattico-co-glicolico (PLGA), un copolimero biodegradabile, che degrada per idrolisi, liberando acido lattico ed acido glicolico. Questi due residui di degradazione sono altamente biocompatibili, in quanto l'acido lattico e quello glicolico sono normalmente metabolizzati dal corpo attraverso il ciclo di Krebs. Per tali motivi, il PLGA è molto utilizzato come polimero per la realizzazione di sistemi di *drug delivery*. Le nanoparticelle realizzate in PLGA vengono facilmente assorbite dalla membrana plasmatica per pinocitosi di fasi liquide o per endocitosi (fig. 1a).

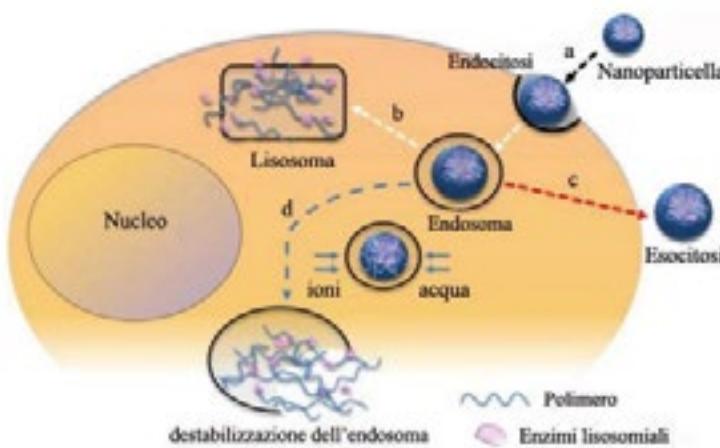


Figura 1 Rappresentazione dell'assorbimento delle nanoparticelle nella cellula.

Una volta all'interno una parte delle nanoparticelle è eliminata dagli enzimi lisosomal presenti (fig. 1b), una parte è eliminata e gettata fuori dalla cellula per esocitosi (fig. 1c), mentre una parte viene degradata liberando il contenuto di farmaco nel citoplasma (fig. 1d). Tuttavia, il corpo riconosce le particelle idrofobiche come estranee. Il sistema del reticoloendoteliale (RES) elimina le particelle idrofobiche presenti nel corpo, e questo crea grossi problemi nell'utilizzo di sistemi di *drug delivery*. Le nanoparticelle di PLGA idrofobiche tendono ad aggregarsi alle opsonine presenti nel sangue, che ne favoriscono la fagocitosi da parte dei macrofagi. Per superare questa limitazione, quindi, è necessario rendere le nanoparticelle di PLGA idrofiliche in modo da non essere

eliminate dal RES. Diversi studi preclinici sono stati realizzati legando chimicamente acido ialuronico (HA) ad agenti citotossici, ottenendo dei composti antitumorali che hanno fornito *in vivo* importanti risultati. Per questo motivo, si è pensato di utilizzare l'acido ialuronico, come shell (rivestimento) delle nanoparticelle per drug delivery. L'HA è un glicosamminoglicano naturale, presente in tutte le matrici extracellulari, nei tessuti connettivi e negli organi di tutti i vertebrati. I motivi che hanno portato alla scelta di questo materiale in ambito di *drug delivery* sono vari e sono legati alle peculiari proprietà chimico-fisiche e strutturali dell'HA, e al suo targeting naturale. Infatti, l'HA è naturalmente riconosciuto dai due recettori di membrana CD-44 e RHAMM che sono sovraespressi sulle cellule tumorali. La capacità di internalizzare l'HA da parte del recettore CD-44, lo rende un candidato ottimale per il rilascio del farmaco. [12-14]

PREPARAZIONE DELLE NANOPARTICELLE

La preparazione delle nanoparticelle può essere effettuata utilizzando diverse tecniche quali ad esempio la dispersione di polimeri performanti per emulsione, la polimerizzazione dei monomeri, la gelificazione ionica. L'emulsione può essere definita come una miscela eterogenea formata da almeno due liquidi tra loro immiscibili, in cui si ha la dispersione di una parte liquida sottoforma di goccioline (detta fase dispersa) nell'altra (detta fase disperdente o continua). A seconda della natura della fase dispersa e di quella continua si possono distinguere due tipi di emulsione: si parla di emulsione *oil-in-water* (O/W) se viene dispersa la fase oleosa sotto forma di goccioline nella fase acquosa; mentre si parla di emulsione *water-in-oil* (W/O) se al contrario viene dispersa la fase acquosa, sotto forma di goccioline, nella fase oleosa. Se poi la fase dispersa rappresenta essa stessa un'emulsione (ad esempio se è stata ottenuta tramite una precedente emulsione) in quel caso possiamo ottenere delle doppie emulsioni (O/W/O o W/O/W). Le emulsioni sono sistemi che una volta ottenuti sono termodinamicamente stabili, ma che tuttavia non si formano spontaneamente. Infatti, essendo i due liquidi immiscibili, per poter ottenere la formazione di goccioline di uno all'interno dell'altro, c'è bisogno di fornire al sistema energia. Quando viene realizzata un'emulsione, vogliamo che da una goccia più grande se ne formano sempre di più piccole, e tale situazione è termodinamicamente sfavorita in quanto l'energia libera del sistema aumenta. Per questo motivo è necessario fornire al sistema energia esterna che ci permetta la realizzazione della suddetta emulsione. Tale energia è sia di tipo meccanico, generata dall'agitazione meccanica, sia di tipo chimico, generata dal contatto tra le particelle. Per abbassare l'energia libera e favorire l'emulsione, solitamente viene utilizzato un tensioattivo (o agente emulsionante) che ha la capacità di stabilizzare l'emulsione, in quanto è in grado di adsorbersi alle superfici ad alta energia, trasformandole in superfici a basso contenuto energetico. In questo modo il tensioattivo si adsorberà alle superfici della parte dispersa, favorendo la loro divisione in goccioline sempre più piccole. Per la realizzazione delle nanoparticelle di PLGA rivestite di HA come tensioattivi sono stati utilizzati i Pluronici, copolimeri a blocchi a base di polietilene-ossido (PEO) polipropilene ossido (PPO). Questi copolimeri

anfifilici oltre a fungere da tensioattivo, hanno permesso di legare in maniera fisica e senza legami chimici l'HA al core di PLGA. La componente idrofila PEO del Pluronico ha interagito con l'HA mentre la parte idrofoba, PPO, con il PLGA, la molecola di Pluronico, dunque, ha funto da ponte tra PLGA e HA (fig 2). Una micrografia ottenuta mediante, microscopia elettronica a trasmissione (TEM), a titolo di esempio di nanoparticelle *core-shell*, composte da HA/PLGA, prodotte mediante il metodo della singola emulsione con evaporazione del solvente è riportato in figura 3.

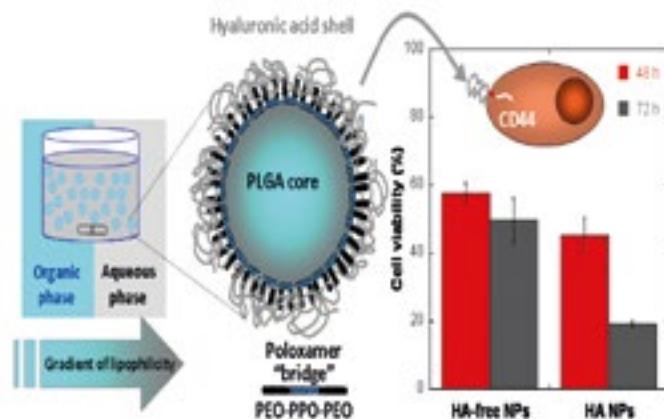


Figura 2 Rappresentazione schematica delle nanoparticelle core-shell composte da HA/PLGA.

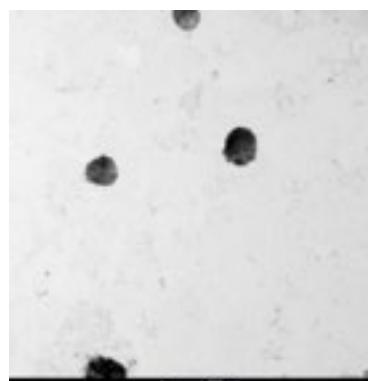


Figura 3 Micrografia TEM delle nanoparticelle composte da HA/PLGA.

Tali nanoparticelle sferiche rappresentano i veicolatori ottimizzati di farmaci chemioterapici e sono state ampiamente testate in vitro dal nostro gruppo. Hanno mostrato un'elevata biocompatibilità e capacità di incapsulare con altra resa agenti chemioterapici utilizzati per la cura di diverse forme di cancro. Hanno inoltre esibito una citotossicità selettiva verso linee cellulari tumorali e maggiore rispetto alla particelle non rivestite con HA (fig.3), indicando una capacità di targeting attivo verso le cellule tumorali.

Assunta Borzacchiello¹, Luigi Nicolais²

¹ - IPCB-CNR, Mostra d'oltremare Pad.20 viale Kennedy 54, 80125 Napoli;

² - Materias srl, Corso N. Protopisani, 50 - 80146 Napoli

Referenze

- B. Stewart, C. P. Wile, "World Cancer Report", pp. 420-445, 2014.
- N. S. Kim GJ, "Targeted cancer nanotherapy", Nanotoday, pp. 28-33, 2005.
- A. Zaffaroni et al, "Drug Delivery System", pp. 15-22, Dec, 1974.
- J. Panyam, et al, "Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue", Article Advanced Drug Delivery Rev., Volume 64, pp. 61-71, 2012.
- W. M. Samy, N. A. Elgindy, "Nanoparticle Delivery of Cancer Drugs", Annual Review of Medicine, Vol. 63, pp. 185-198, Febbraio, 2012.
- A. K. Yadav, A. Agarwal, G. Rai, P. Mishra, S. Jain, A. K. Mishra, H. Agrawal, "Development and characterization of hyaluronic acid decorated PLGA nanoparticles for delivery of 5-fluorouracil", Drug Delivery, pp. 561-572, 2010.
- Borzacchiello A, et al. "Spontaneous arrangement of a tumor targeting hyaluronic acid shell on irinotecan loaded PLGA nanoparticles", Carbohydrate Polymers Volume 140, 20 April 2016, Pages 400-407.
- A. Kumari, et al. "Biodegradable polymeric nanoparticles-based drug delivery systems", Colloids Surf. B Biointerfaces , vol. 75, pp. 1-18, 2010.
- N. Betancourt, et al. "PEGylation strategies for active targeting of PLA/PLGA nanoparticles", J. Biomed. Mater. Res., vol. 91A, pp. 263-276, 2009.
- Y. Yue, et al. "Surface charge affects cellular uptake and intracellular trafficking of chitosan-based nanoparticles", Biomacromolecules, vol. 12, pp. 2440-2446, 2011.
- E. Owens III, et al. "Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles", Int. J. Pharm, vol. 307, pp. 93-102, 2006.
- Wang C, "The overexpression of RHAMM, a hyaluronan-binding protein that regulates ras signalling, correlates with over-expression of mitogen activated protein kinase and is a significant parameter in breast cancer progression", Clinic Cancer Res, vol. 4, pp. 567-76, 1998.
- N. S. G. I. M. L. F. Y. Naor D, "CD44 in cancer", Crit Rev Clin Lab Sci, vol. 39, pp. 527-579, 2002.
- G. U., "CD44: a multitude of isoforms with diverse functions", Curr Topics Microbiol Immunol., vol. 184, pp. 47-63, 1993. Liotti F, Collina F, Pone E, La Sala L, Franco R, Prevete N, Melillo RM (2017). Interleukin-8, but not the Related Chemokine CXCL1, Sustains an Autocrine Circuit Necessary for the Properties and Functions of Thyroid Cancer Stem Cells. Stem Cells. 2017 Jan;35(1):135-146.

Terapia del glioblastoma umano con nanovettori a bersaglio molecolare

ABSTRACT

Il glioblastoma (GBM) rappresenta la più frequente ed aggressiva forma di tumore primario del cervello nella popolazione adulta, caratterizzato da recidive e particolare resistenza terapie anti-tumorali. Pertanto, l'identificazione di nuovi marcatori tumorali e bersagli terapeutici rappresentano obiettivi importanti per migliorare la cura e sopravvivenza di pazienti affetti da GBM. Negli ultimi anni è emerso che la regolazione del turnover delle proteine e la loro regolazione da parte del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) costituisce un meccanismo di controllo essenziale per la crescita e sviluppo di diversi tumori umani aggressivi, tra cui il GBM. Pertanto, il circuito UPS rappresenta un promettente bersaglio terapeutico per la cura del glioblastoma. Grazie al supporto della Regione Campania (progetto FESR-Rare.Plat.Net), abbiamo definito alcune delle tappe essenziali che controllano la crescita e la disseminazione del glioblastoma umano. Abbiamo infatti identificato *praja2* come nuovo marcitore tumorale del glioblastoma. Abbiamo dimostrato che *praja2* è una E3 ubiquitina ligasi e componente dell'UPS che regola la stabilità di proteine coinvolte nella segnalazione intracellulare, nel metabolismo e crescita di crescita delle cellule di GBM. Dati

sperimentali dimostrano che l'inibizione dell'espressione di *praja2* blocca la crescita di cellule GBM in coltura, così come la crescita del tumore in vivo. Abbiamo quindi sviluppato una strategia per il trattamento del GBM basata sulla somministrazione endovenosa di nanoparticelle veicolanti molecole di RNA (siRNA) dirette contro *praja2* che attraversano la barriera ematoencefalica e raggiungono le cellule tumorali, inibendo la crescita del tumore ed aumentando la sopravvivenza degli animali trattati. In sintesi, i risultati ottenuti identificano *praja2* come nuovo marcitore tumorale e bersaglio terapeutico del GBM umano, e delineano una nuova strategia di trasporto per via ematica di molecole inibitorie ad RNA per scopi terapeutici per il GBM.

INTRODUZIONE

Il glioblastoma multiforme (GBM) è il tumore cerebrale più grave e comune che colpisce i soggetti adulti. È una patologia maligna, infiltrante, ad accrescimento espansivo e rapido. Questi aspetti, insieme all'alta angiogenesi, all'eterogeneità cellulare, alla presenza di una specifica popolazione di cellule staminali che sono in grado di proliferare e generare cellule gliali neoplastiche contribuiscono ad una prognosi sfavorevole¹. La sopravvivenza media per questo tipo di tumore è di 14 mesi sia per i pazienti trattati chirurgicamente sia per quelli trattati con radioterapia o chemioterapia, con un tasso di sopravvivenza a 5 anni di circa il 2%²,³. Nonostante numerose siano le varianti istopatologiche del GBM, le

caratteristiche comuni a tutti i tipi di GBM sono il notevole pleomorfismo cellulare e nucleare, la proliferazione microvascolare e la necrosi cellulare. Inoltre, le cellule di GBM possiedono un'elevata capacità di attivare numerosi meccanismi di resistenza (fattori di difesa cellulare, riparazione del DNA) in risposta a trattamenti chemio e radio-terapici, complicando la ricerca di una terapia efficace. L'attuale pratica clinica si affida all'iter terapeutico standard che prevede la resezione chirurgica del tumore ed il trattamento radioterapico associato alla chemioterapia con temozolamide, noto come protocollo Stupp⁴. Nella maggioranza dei casi la terapia non è in grado di controllare completamente il tumore, che, dopo un intervallo di tempo variabile da paziente a paziente, recidiva.

Il GBM è caratterizzato da alterazioni genetiche ed epigenetiche che ne determinano l'invasività, la malignità, il tasso di crescita, e la sensibilità ai chemioterapici. Diversi biomarcatori con valore prognostico e/o predittivo di risposta sono stati studiati nel GBM. Tra le varie alterazioni biomolecolari identificate vanno segnalate quelle a carico di p53, di PI3K, di RB, di CDK4, di MDM2 e dei recettori tirosino-chinasici. Alcuni biomarcatori possono essere clinicamente testati, come la O6-metilguanina DNA metiltransferasi (MGMT), la isocitrato deidrogenasi (IDH), il recettore per il fattore di crescita epidermico (EGFR), il fattore angiogenico VEGF, la fosfatasi PTEN, il gene p16INK4a^{5, 6}. I recenti progressi nelle tecniche di "next-generation sequencing" (NGS) stanno allargando le conoscenze su specifici sottotipi molecolari del GBM e potrebbero portare ad una più approfondita conoscenza dei meccanismi patogenetici alla base di tale neoplasia. Dal punto di vista terapeutico, i trattamenti di riferimento rimangono la chirurgia e la radioterapia, ma in caso di recidiva o di diffusione della malattia le terapie sistemiche ad oggi in uso presentano evidenti limiti: gli unici farmaci utilizzati, con limitato successo, sono la temozolamide e il bevacizumab, anticorpo monoclonale anti-VEGF⁷. Da una parte, pertanto, occorre proseguire nella caratterizzazione molecolare del GBM, dall'altra è necessario identificare nuovi bersagli molecolari per il trattamento di questa neoplasia e nuove modalità di "drug delivery".

Il turnover proteolitico di oncosoppressori ad opera del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) è un meccanismo adottato dalle cellule tumorali per la loro crescita e disseminazione metastatica. Abbiamo dimostrato che la RING E3 ligasi *praja2*, ubiquitina e degrada MOB1, un componente chiave delle chinasi NDR/LATS e un regolatore positivo di una via di soppressione tumorale, la via Hippo. La degradazione di MOB1 attraverso il sistema UPS attenua la cascata mediata da Hippo e sostiene la crescita del glioblastoma^{8, 9}. Considerati i limiti imposti dalla barriera emato-encefalica nel trattamento del GBM ed il ruolo di *praja2* nella biologia del tumore, l'obiettivo del progetto è stato quello di sviluppare nanovettori per la veicolazione di molecole inibitorie per *praja2* in modelli animali di GBM. A tal proposito, sono state progettate e preparate nanoparticelle lipidiche di ultima generazione, definite nanoparticelle autoassemblanti (SANPs), in grado di veicolare molecole di

RNA inibitorie (siRNA) nella specifica sede tumorale, prevenendone la degradazione ad opera di nucleasi presenti nei liquidi biologici¹⁰. Le

SANPs impiegate in questo studio sono state decorate in superficie con molecole di transferrina, proteina quest'ultima in grado di legare recettori presenti sulla membrana di cellule endoteliali della barriera ematoencefalica e di cellule tumorali¹¹.

L'utilizzo di sistemi innovativi di "drug delivery" contribuisce quindi a direzionare i farmaci direttamente nel tessuto tumorale, riducendo al minimo gli effetti tossici nei riguardi dei tessuti sani, contribuendo a migliorare la qualità di vita dei pazienti. Particolare attenzione è stata posta all'impiego di una tecnologia, le nanoparticelle autoassemblanti, trasferibile anche alla produzione delle formulazioni, e dei suoi componenti, su larga scala.

RISULTATI E CONCLUSIONI

Il principale obiettivo del progetto di ricerca è stato quello di caratterizzare il ruolo dell'UPS nel controllo della trasduzione di segnali intracellulari e nella proliferazione di cellule tumorali. Tali studi hanno permesso l'identificazione di componenti dell'UPS, quali stub1 e praja2, come regolatori importanti nei meccanismi di controllo della risposta cellulare ad ormoni e fattori di crescita. Stub1 è una E3 ubiquitina ligasi che controlla la stabilità ed omeostasi di proteine coinvolte nella risposta allo stress cellulare¹². Mutazioni genetiche ereditarie di Stub1 sono state identificate in pazienti con malattie neurologiche ed endocrine¹³. Alterazioni della espressione di Stub1 sono causalmente legate allo sviluppo di diversi tipi di tumori maligni umani, tra cui GBM¹⁴. Nel nostro lavoro, abbiamo dimostrato che stub1 controlla la stabilità ed attività della proteina chinasi A (PKA). La PKA svolge un ruolo fondamentale nella trasduzione di segnali veicolati dal secondo messaggero cAMP e controlla molte delle tappe molecolari coinvolte nel differenziamento, crescita e metabolismo cellulare. Utilizzando modelli di cellule normali e tumorali, nonché modelli animali geneticamente modificati, abbiamo dimostrato che la regolazione di PKA da parte di stub1 costituisce un sistema generale di controllo della trasduzione di segnali cAMP che sottendono alla trascrizione di molti geni cellulari, tra cui quella del proto-oncogene c-fos¹⁵. Pertanto, l'identificazione di stub1 come regolatore dell'azione di ormoni e fattori di crescita in cellule tumorali apre nuove prospettive per l'utilizzo di inibitori selettivi per stub1 per il trattamento dei tumori.

Abbiamo successivamente caratterizzato il ruolo di praja2 nei meccanismi di controllo del differenziamento e crescita di cellule di GBM. A tale scopo, abbiamo innanzitutto effettuato un'analisi di espressione di praja2 nei vari tipi di tumori gliali umani, tra cui quelli a basso grado, quali astrocitoma, e tumori ad alto grado di malignità, tra cui il GBM. I risultati dimostrano che praja2 è molto espresso nei tumori gliali ad alto grado, rispetto ai tumori di basso grado, ed i suoi livelli di espressione inversamente correlano con lo stato mutazionale dell'isocitratideidrogenasi 1/2 (IDH1/2), enzima coinvolto nel metabolismo ossidativo cellulare e frequentemente mutato nei GBM umani. Successivamente, abbiamo studiato i meccanismi di regolazione di praja2 in diversi aspetti della biologia delle cellule tumorali ed abbiamo identificato alcune delle

tappe molecolari regolate da praja2. In particolare, utilizzando diversi modelli cellulari ed animali abbiamo scoperto che praja2 controlla diverse tappe della formazione del ciglio primario. Il ciglio è un organello sensoriale presente in tutte le cellule umane da cui partono segnali di attivazione di vie mitogeniche che regolano la crescita cellulare. Abbiamo dimostrato che il silenziamento genico di praja2 inibisce la formazione del ciglio primario in diversi tipi cellulari, tra cui cellule di glioblastoma, e deregola l'attivazione della principale via di segnalazione del ciglio attivata dal ligando Sonic hedgehog (SHH). Tali studi sono stati confermati utilizzando modelli animali marini (Medaka fish) dove abbiamo ricostruito le tappe molecolari del meccanismo di azione di praja2 essenziali per la regolazione del ciglio primario, crescita cellulare e sviluppo animale. Abbiamo inoltre generato network molecolari mediante analisi di proteomica differenziale in diversi tipi di cellule tumorali, tra cui cellule di glioblastoma, ed identificato i substrati critici del circuito cAMP-UPS coinvolti nel differenziamento e proliferazione cellulare, e per alcuni dei quali abbiamo caratterizzato il ruolo nella biogenesi del ciglio e nella crescita cellulare¹⁶.

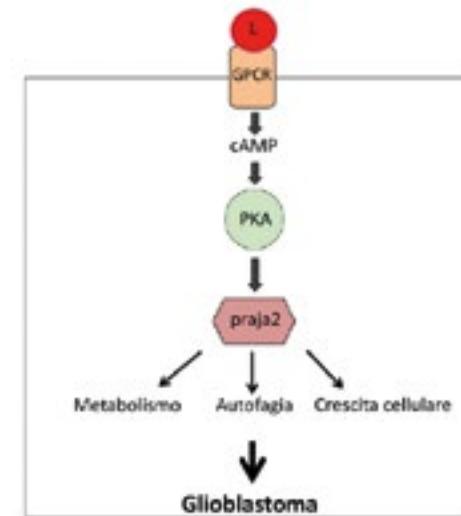


Figura 1 Rappresentazione schematica del circuito di regolazione di praja2. Il legame di un ormone (L) al suo recettore di membrana (GPCR) attiva la via di segnalazione del cAMP e promuove l'azione di praja2 su substrati intracellulari coinvolti nel metabolismo, autofagia e crescita cellulare.

Avendo stabilito il ruolo di praja2 nel controllo del circuito di regolazione della crescita delle cellule di GBM, abbiamo successivamente finalizzato il nostro lavoro alla identificazione di strategie innovative per inibire l'espressione di praja2 in cellule di GBM in fase di crescita ed espansione intracerebrale. A tale scopo abbiamo utilizzato nanoparticelle lipidiche autoassemblanti (selfassembling nanoparticles o SANPs), recentemente sviluppate nei nostri laboratori, in grado di veicolare acidi nucleici, tra cui molecole di RNA a bersaglio molecolare specifico (siRNA), nel contesto del tessuto cerebrale. Le SANPs sono state preparate a partire da liposomi cationici a diversa composizione lipidica, in particolare con diversi lipidi cationici, da soli o in associazione a helper lipid neutri, e associati a due diversi lipidi PEGhiliti. Le SANPs sono state preparate per miscelazione delle molecole di RNA con nanoparticelle di calcio fosfato e

successivamente mescolate con liposomi cationici. Ai liposomi è stata poi coniugata chimicamente la transferrina. Sono state usate sequenze siRNA dirette contro *praja2* oppure sequenze di controllo non-senso (Figura 2).

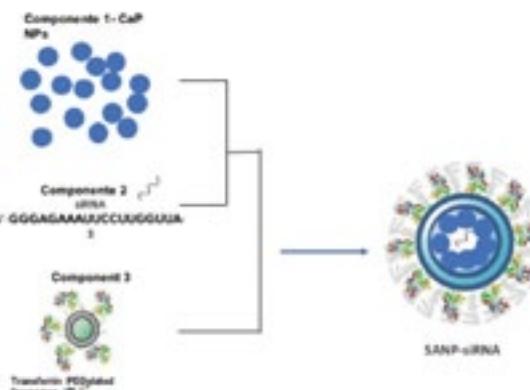


Figura 2
Rappresentazione
schematica di SANPs
contenenti siRNA anti-
praja2.

La prima fase dello studio ha previsto la preparazione e la caratterizzazione delle SANPs contenenti le molecole di RNA. In generale, le SANPs presentano dimensioni omogenee con un indice di polidispersità inferiore a 0.2 e con diametro medio inferiore a 160 nm circa. La carica superficiale delle SANPs è stata determinata attraverso la misura del potenziale Z che è risultato in tutti i casi positivo. Tutte le formulazioni preparate sono state quindi saggiate su cellule di GBM in coltura. Lo studio dell'attività biologica dei siRNA incapsulati nelle SANPs ha consentito di selezionare, tra le formulazioni preparate, quella che, per efficacia biologica e sensibilità, è stata in grado di silenziare in modo drammatico l'espressione di *praja2*. Le analisi del potenziale di crescita di cellule GBM trattate con le diverse formulazioni di SANPs hanno evidenziato una marcata inibizione dell'indice proliferativo di cellule trattate con le SANPs anti-*praja2*.

E' stata poi studiata l'efficacia biologica del siRNA veicolato mediante SANPs in vivo nei modelli murini ortotopici di GBM in cui la crescita del tumore viene indotta mediante infusione intracerebro-ventricolare di cellule GBM^{8, 17}. È opportuno precisare che il GBM è caratterizzato da un aumento della pressione intracranica con conseguente alterazione della permeabilità della barriera ematoencefalica¹⁸. Tale caratteristica di questo tipo di tumore consente il passaggio di particelle di dimensioni colloidali, quali le SANPs. Tuttavia, per facilitare ulteriormente il passaggio attraverso la barriera ematoencefalica, le SANPs sono state rivestite con molecole di transferrina. In tal modo, il legame della transferrina con il suo recettore localizzato sulla membrana delle cellule endoteliali facilita il passaggio attraverso la barriera vascolare cerebrale sfruttando un meccanismo di transcytosi¹⁹. In questo studio, per verificare il passaggio attraverso la barriera ematoencefalica ed il conseguente accumulo delle SANPs nel contesto del tumore, abbiamo incorporato nelle particelle una sonda

fluorescente (rodamina). Le nanoparticelle sono state somministrate nei topi per via endovenosa e successivamente è stata eseguita un'analisi al microscopio a fluorescenza su sezioni di cervello di topi sacrificati a differenti tempi dall'infusione. L'analisi mostra un significativo accumulo di SANPs all'interno della massa tumorale, confermando che le SANPs costituiscono dei vettori idonei per il trasporto di molecole ad efficacia biologica attraverso la barriera ematoencefalica.

Abbiamo, pertanto, analizzato l'efficacia biologica anti-tumorale delle SANPs in vivo. Cellule GBM sono state impiantate nel cervello di topi nudi e dopo una settimana gli animali sono stati suddivisi in due gruppi sperimentali. Un gruppo di animali ha ricevuto un'infusione endovenosa con preparazioni SANPs dirette contro *praja2* mentre il gruppo di controllo ha ricevuto SANPs con molecole di controllo. I trattamenti sono stati eseguiti ogni 48 ore e sono durati due settimane. Alla fine del trattamento, gli animali sono stati sacrificati ed il cervello sottoposto ad analisi istologica e immunoistochimica. L'analisi dei tumori con ematossilina/eosina mostra una popolazione cellulare pleomorfa per volume e morfologia, i nuclei appaiono voluminosi, vescicolari, compatti, ipercromatinici, con nucleolo prominente. Le cellule sono disposte a reciproco contatto in modo disordinato e caotico, ma sono prive di coesione. Analisi di immunoistochimica con anticorpi specifici hanno mostrato bassi livelli di *praja2* nei topi trattati, mentre l'analisi volumetrica dei tumori ha dimostrato che il trattamento con le SANPs anti-*praja2* riduce in modo drammatico il volume del tumore (Figura 3A).

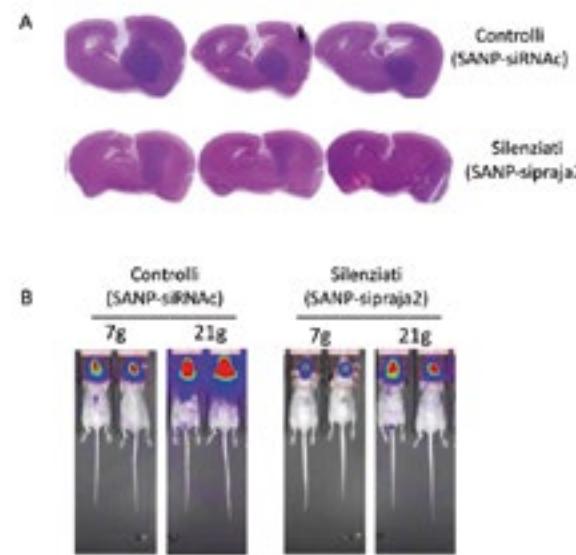


Figura 3 Inibizione della crescita del GBM con nanoparticelle in vivo.
A. Analisi istologica con ematossilina/eosina di cervello di topi affetti da GBM sottoposti a trattamento endovenoso con SANPs di controllo e SANPs anti-*praja2* (SANPs-sipraja2) per 21 giorni. B. Immagini acquisite con IVIS Spectrum dopo 7 giorni e 28 giorni di trattamento con SANPs dei due gruppi di animali trattati con SANPs di controllo oppure SANPs anti-*praja2*.

Successivamente abbiamo studiato in modo dinamico la crescita del tumore in topi vivi utilizzando cellule di glioblastoma contenenti il gene della luciferasi integrato in modo stabile nel loro genoma. L'attività della luciferasi, quindi, rappresenta un indice di crescita della massa tumorale e viene misurata su topi vivi mediante uno strumento di 'Real-Time-

Bioluminescence Imaging'. Il trattamento con le SANPs è stato ripetuto due volte a settimana e l'analisi di bioluminescenza è stata effettuata ogni settimana. I dati confermano che le SANPs con molecole di RNA dirette contro praja2 inducono una marcata riduzione delle dimensioni del tumore (Figura 3B). Analisi di laboratorio eseguite su sangue periferico degli animali trattati con le diverse formulazioni di SANPs non hanno mostrato significative alterazioni dei parametri ematochimici relativi alla funzionalità di diversi organi, tra cui rene, fegato e midollo osso.

L'obiettivo del progetto di ricerca è stato quello di fornire il razionale clinico di sviluppo ed utilizzo di farmaci a bersaglio molecolare diretti contro le vie di trasduzione del segnale cAMP regolate da praja2 mediante l'utilizzo di modelli animali ortotopici di glioblastoma umano (GBM). I risultati ottenuti hanno delineato alcune degli eventi precoci coinvolti nella regolazione di segnali mitogenici indotti dal sistema dell'UPS e caratterizzato da un punto di vista funzionale il ruolo del sistema di ubiquitinazione nel controllo della crescita cellulare. Nel loro insieme, i dati hanno dimostrato che praja2 utilizza circuiti molecolari altamente organizzati all'interno della cellula coinvolti in diversi aspetti della biologia della cellula tumorale, regolando funzioni legate alla segnalazione intracellulare da parte di fattori di crescita ed ormoni, la trascrizione genica ed il metabolismo tumorale. Considerato il ruolo essenziale di praja2 in diversi aspetti della biologia tumorale, abbiamo sviluppato una strategia per inibire praja2 in vivo basata sull'utilizzo di vettori lipidici sistemici in grado di attraversare la barriera ematoencefalica e di veicolare piccole molecole di RNA inibitorie all'interno di tumori cerebrali. I risultati di tale sperimentazione dimostrano che l'approccio utilizzato è efficace nell'inibire in modo drammatico la crescita del GBM in modelli animali ortotopici, aumentano in modo significativo la sopravvivenza degli animali trattati. Tali studi hanno permesso di identificare nuovi marcatori tumorali e bersagli terapeutici del GBM, e di mettere a punto una nuova strategia per veicolare molecole a bersaglio specifico in tumori cerebrali aggressivi, con irilevanti effetti terapeutici.

PROCEDURE Sperimentali

PREPARAZIONE DELLE NANOPARTICELLE LIPIDICHE AUTOASSEMBLANTI (SANPs) A BERSAGLIO SPECIFICO.

Le SANPs prive di siRNA sono state preparate a partire da 2 componenti: le nanoparticelle di calcio/fosfato (CaPNPs) (componente 1), sono state complessate con i liposomi cationici PEGhilati coniugati con transferrina (PL), (componente 3) 1:1 v/v e lasciate reagire a temperatura ambiente per 25 minuti ottenendo SANPs. Ogni formulazione è stata preparata in triplicato. Le formulazioni SANPs-siRNA sono state preparate a partire da 3 componenti: le nanoparticelle di calcio/fosfato (CaPNPs), (componente 1), una soluzione acquosa di siRNA, (componente 2) ed i liposomi cationici PEGhilati coniugati con transferrina (PL), (componente 3). Successivamente, le SANPs-siRNA sono state ottenute mediante il mix dei tre diversi componenti. Brevemente, la soluzione acquosa del siRNA (siRNAC o siRNAPrja2) è stata aggiunta alle CaPNPs, precedentemente

preparate, in rapporto 1:8 v/v. Nel caso della formulazione contenente entrambi i siRNAs sono state utilizzate entrambe le soluzioni acquose in rapporto 1:1 v/v lasciando invariata la concentrazione finale di siRNA. La formulazione è stata miscelata e lasciata reagire a temperatura ambiente per 10 minuti ottenendo le CaP-siRNA NPs. Infine, le CaPsiRNA NPs sono state complessate con i PL, 1: 1 v/v, e lasciate reagire a temperatura ambiente per 25 minuti ottenendo SANPs-siRNA, denominate: SANPs-siRNAC o SANPs-siPrja2. Lo studio ha previsto l'utilizzo di 2 formulazioni, che differiscono per la sequenza di siRNA incapsulata: 1. SANPs-siRNAC (nanoparticelle incapsulanti siRNA non-senso); 2. SANPs-siRNAPrja2 (nanoparticelle incapsulanti siRNA diretti contro la sequenza di mRNA di praja2 umano).

TRATTAMENTI IN VIVO CON SANPs.

La formulazione ha una concentrazione di SANPs (6mg/ml). La quantità iniettata per ciascuna somministrazione è stata di 20 microlitri di formulazione/topo quindi 120 microgrammi di SANPs e 12 microgrammi di siRNA. Le nano formulazioni utilizzate in questo studio sono state precedentemente testate per la loro efficacia e sicurezza in un modello murino xenograft di glioblastoma per un differente target¹¹. La formulazione non ha causato fenomeni di tumorigenicità né effetti collaterali citotossici che hanno determinato sofferenza o morte degli animali trattati. Nella prima fase di esperimenti abbiamo effettuato uno studio per valutare la capacità delle nano formulazioni di attraversare la barriera ematoencefalica in topi CD1 nudi e analizzare la loro biodistribuzione. A tale scopo, topi CD1 nudi sono stati sottoposti ad inoculo stereotassico nello striato sinistro di cellule tumorali di glioblastoma umano U87MG. Una settimana dopo l'inoculo, tempo di attecchimento e crescita delle cellule tumorali, i topi sono stati suddivisi in 2 gruppi: Gruppo I (topi controllo), topi CD1 nudi inoculati con cellule di glioblastoma umano U87MG e trattati (attraverso somministrazione endovenosa nella vena caudale) con nanoparticelle marcate con rodamina e coniugate a siRNA aspecifici (formulazione denominata SANPs-siRNAC); Gruppo II (topi trattati), topi CD1 nudi inoculati con cellule di glioblastoma umano U87MG e trattati con siRNA che blocca Praja2 coniugato a nanoparticelle marcate con rodamina (formulazione denominata SANPs-siRNAPrja2). Dopo la prima settimana di attecchimento del tumore, le nanoparticelle coniugate con rodamina sono state somministrate nella vena caudale. Alla fine dei trattamenti, i cervelli sono stati prelevati e inclusi nell'OCT. Le sezioni cerebrali fresche sono state poi osservate al microscopio a fluorescenza.

MODELLI CELLULARI ED ANIMALI DI GBM.

Le linee cellulari di GBM (U87MG e U87MG-Luc) utilizzate nel nostro studio sono state amplificate e valutate per vitalità, contate e risospese in soluzione fisiologica. Le cellule tumorali sono quindi state inoculate per via intracerebrale. La crescita del tumore è stata monitorata settimanalmente con immagini in tempo reale della bioluminescenza utilizzando la tecnologia IVIS. Quando i valori di bioluminescenza hanno indicato la stabilità della crescita tumorale in due misurazioni

consecutive, i topi sono stati suddivisi in 3 gruppi sperimentali di 12 animali/uno. Tutti gli animali sono stati pesati bisettimanalmente durante il periodo sperimentale. Una perdita di peso corporeo (BWL) $\geq 20\%$ è stata considerata come un segno di sofferenza e punto finale umanitario che richiede il sacrificio dei topi, in accordo con l'approvazione

del veterinario ufficiale e del direttore dello studio. Il BWL è stato determinato, per ciascun gruppo, come segue: percentuale di perdita di peso corporeo (% BWL max) = 100 - (PC medio giorno x/peso medio giorno 1 x 100), dove BWx è il peso corporeo medio al giorno della perdita massima durante il trattamento e BW1 è il BW medio il 1° giorno del periodo sperimentale. La crescita del tumore è stata valutata settimanalmente utilizzando il sistema tecnologico in vivo IVIS Spectrum (PerkinElmer), mediante iniezione intraperitoneale di D-Luciferina. Dopo l'iniezione, i topi sono stati anestetizzati in una camera di induzione con ossigeno ed isofluorano al 2% e le immagini catturate 30 minuti dopo l'iniezione di D-Luciferina per consentire la distribuzione del substrato. Il volume del tumore è stato misurato come radianza media che è il flusso totale di fotoni o radianza (fotoni/secondo dalla superficie) in ogni pixel, sommato o integrato sull'area ROI, in un centimetro quadrato (cm²) del tessuto (fotoni/sec/cm²/sr). La radianza media massima stabilità è stata di 1x10⁸ fotoni/sec/cm²/sr, utilizzata come punto finale per evitare sofferenza animale estrema.

Delle Donne Rossella¹, Rinaldi Laura¹, Roberto Luca², Oliva Maria Antonietta³, Castaldo Salvatore³, Iannucci Rosa¹, Borzacchiello Domenica¹, De Rosa Giuseppe⁴, Campani Virginia⁴, Emanuela Senatore¹, Chiuso Francesco¹, Ambrosino Concetta², Arcella Antonella³ e Feliciello Antonio¹.

1 - Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche Università Federico II, Napoli

2 - Biogem, Ariano Irpino, Avellino

3 - I.R.C.C.S Neuromed, Pozzilli

4 - Dipartimento di Farmacia, Università Federico II, Napoli, Italia.

Referenze

- Ciceroni, C. et al. Type-3 metabotropic glutamate receptors regulate chemoresistance in glioma stem cells, and their levels are inversely related to survival in patients with malignant gliomas. *Cell Death Differ* 20, 396-407 (2013).
- Ohgaki, H. & Kleihues, P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* 109, 93-108 (2005).
- Surawicz, T.S., Davis, F., Freels, S., Laws, E.R. & Menck, H.R. Brain tumor survival: Results from the National Cancer Data Base. *J Neuro-Oncol* 40, 151-160 (1998).
- Stupp, R. & Weber, D.C. The role of radio- and chemotherapy in glioblastoma. *Onkologie* 28, 315-317 (2005).
- Chin, L. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways (vol 455, pg 1061, 2008). *Nature* 494, 506-506 (2013).
- Garofano, L. et al. Pathway-based classification of glioblastoma uncovers a mitochondrial subtype with therapeutic vulnerabilities. *Nat Cancer* 2 (2021).
- Carvalho, B. et al. The role of c-Met and VEGFR2 in glioblastoma resistance to bevacizumab. *Sci Rep- Uk* 11 (2021).
- Lignitto, L. et al. Proteolysis of MOB1 by the ubiquitin ligase praja2 attenuates Hippo signalling and supports glioblastoma growth. *Nat Commun* 4 (2013).
- Song, J.G. et al. Kindlin-2 Inhibits the Hippo Signaling Pathway by Promoting Degradation of MOB1. *Cell Rep* 29, 3664-+ (2019).
- Campani, V. et al. Hybrid lipid self-assembling nanoparticles for brain delivery of microRNA. *Int J Pharmaceut* 588 (2020).
- Salzano, G. et al. Transferrin-Targeted Nanoparticles Containing Zoledronic Acid as a Potential Tool to Inhibit Glioblastoma Growth. *J Biomed Nanotechnol* 12, 811-830 (2016).
- Mylvaganam, S., Earnshaw, R., Heymann, G., Kalia, S.K. & Kalia, L.V. C-terminus of Hsp70 Interacting Protein (CHIP) and Neurodegeneration: Lessons from the Bench and Bedside. *Curr Neuropharmacol* (2020).
- Zhang, S., Hu, Z.W., Mao, C.Y., Shi, C.H. & Xu, Y.M. CHIP as a therapeutic target for neurological diseases. *Cell Death Dis* 11 (2020).
- Xu, T. et al. Carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein (CHIP) contributes to human glioma oncogenesis. *Cancer Sci* 102, 959-966 (2011).
- Rinaldi, L. et al. Feedback inhibition of cAMP effector signaling by a chaperone-assisted ubiquitin system. *Nat Commun* 10 (2019).
- Senatore, E. et al. The TBC1D31/praja2 complex controls primary ciliogenesis through PKA-directed OFD1 ubiquitylation. *Embo J* 40 (2021).
- Rinaldi, L. et al. Mitochondrial AKAP1 supports mTOR pathway and tumor growth. *Cell Death Dis* 8 (2017).
- Hawkins, B.T. & Davis, T.P. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* 57, 173-185 (2005).
- Gabathuler, R. Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases. *Neurobiol Dis* 37, 48-57 (2010).

Studio delle mutazioni geniche in tumori rari attraverso le interazioni tra miRNA e geni target

ABSTRACT

Le mutazioni genetiche possono essere suddivise in base alla capacità di alterare la struttura e funzione delle proteine prodotte (mutazioni patogene, mutazioni di significato clinico sconosciuto, polimorfismi ecc.). In particolare, le mutazioni patogene sono direttamente associate ad un fenotipo clinico. Sempre di più si rafforza l'idea che lo studio delle alterazioni genetiche si debba ampliare alle porzioni non codificant dei geni. L'avvento delle metodologie *high-throughput* e lo sviluppo di applicazioni bioinformatiche hanno permesso di approfondire le conoscenze sui meccanismi regolativi dell'espressione genica e lo studio delle regioni non codificant. Questo studio, inserito nell'ambito delle attività finanziate dal progetto RarePlatNet, è focalizzato sull'utilizzo di particolari regioni non codificant, i miRNA, che hanno la proprietà di interagire con i geni, agendo come oncogeni o soppressori del tumore. In quest'ottica, i miRNA posso essere utilizzati come agenti terapeutici per la regolazione dell'espressione dei geni mutati. Pertanto, è stato messo a punto un algoritmo basato su reti neurali auto-organizzanti, in grado di predire le interazioni tra i miRNA ed i geni target, al fine di individuare un potenziale set di miRNA in grado di bersagliare esclusivamente il gene mutato responsabile della patologia. L'individuazione di tali miRNA consentirebbe di fornire informazioni essenziali per terapie tumorali mirate.

IMPATTO DELLE MUTAZIONI GENICHE NELLE PATOLOGIE TUMORALI

Lo studio delle mutazioni genetiche è utile sia nella diagnosi che nella prognosi, nella prevenzione di patologia, nella selezione dei pazienti a specifiche terapie targeted e nel follow-up. Nella patologia tumorale, mutazioni patogene possono portare all'attivazione costitutiva del gene nel caso in cui esso sia un oncogene, oppure all'inattivazione della funzione, nel caso in cui il gene mutato sia un onco-soppressore. In entrambi i casi, l'alterazione della funzionalità genica porterà alla formazione di una proteina con un'alterata funzione cellulare e dunque ad una deregolazione del pathway molecolare in cui essa è coinvolta, portando ad una alterazione dei normali meccanismi di proliferazione cellulare e di apoptosis.

L'analisi di mutazioni patogene è importante sia nell'ambito dei tumori sporadici, che nei tumori ereditari. Nei primi la caratterizzazione di alterazioni patogenetiche è utilizzata soprattutto al fine di effettuare specifiche *targeted therapies*; nei secondi, è utilizzata per fini predittivi e prognostici.

UTILIZZO DEI MIRNA COME AGENTI TERAPEUTICI PER LA REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE DEI GENI MUTATI

Tra le molecole non codificant i microRNA (miRNA), sembrano essere tra le molecole più promettenti nella biologia dei tumori.

Esse sono piccole molecole di RNA a singolo filamento, lunghe 22-25 nucleotidi (nt) e svolgono un ruolo chiave nella regolazione genica. Il passo più importante nella loro funzione regolatoria è il bersagliamento degli RNA messaggeri (mRNA). Infatti, i miRNA sono responsabili della degradazione o della repressione dei mRNA a livello post-trascrizionale, quando le loro sequenze legano con siti parzialmente complementari. In questo modo, giocano un ruolo chiave nella differenziazione e nella proliferazione cellulare, nell'apoptosi e in molti altri processi fisiologici e patologici. I pattern di espressione dei miRNA sono altamente correlati a specifici stimoli esterni, ed allo stadio di sviluppo del tessuto. Per esempio, nelle patologie cancerogene i livelli di espressione dei miRNA cambiano considerevolmente. Essi possono agire come oncogeni o soppressori del tumore tramite il bersagliamento di diversi tipi di geni, portando rispettivamente ad un'accelerazione o una decrescita dei processi tumorali. Analizzare l'interazione miRNA-mRNA vuol dire comprendere meglio il meccanismo molecolare della condizione patologica a confronto con il normale comportamento cellulare, attraverso gli attori principali che sono le proteine, e soprattutto vuol dire ipotizzare nuove strategie terapeutiche di intervento per fermare i processi maligni (Wotschofsky, 2016).

MODELLO DELL'INTERAZIONE TRA MIRNA E GENE TARGET

I miRNA interagiscono con i loro mRNA target tramite l'accoppiamento di basi nelle regioni 3'-*untranslated* (3'UTR) di sequenze mRNA. Nelle specie animali, un accoppiamento tra basi quasi perfetto è richiesto tra la regione di *seed* del miRNA, cioè i primi 8 nt nell'estremità 5' delle sequenze di mRNA, ed un sito target nel 3'UTR di sequenze del mRNA. La comunità scientifica ha identificato tre regole principali per l'appaiamento di basi miRNA-target tramite analisi sperimentale ed *in-silico* (Filipowicz et al., 2008) che sono: i) l'accoppiamento di basi quasi perfetto e contiguo nelle regioni di *seed* dei miRNA, corrispondenti ai nucleotidi (nt) nelle posizioni da 2 a 8 della regione 5' del miRNA, che enuclea l'associazione miRNA-mRNA. In generale condizioni come i *mismatch* e i *bulges* (bolle) nella regione di *seed* dovrebbero essere evitati perché influiscono pesantemente sulla repressione; ii) che ci deve essere sufficiente complementarità nei confronti della metà del miRNA 3' per stabilire l'interazione. In questa regione *bulges* e *mismatch* sono generalmente permessi e, infine, iii) che la regione centrale del duplex miRNA-mRNA dovrebbe avere *bulges* e *mismatch* per prevenire il taglio endonucleotico del mRNA.

Poiché l'identificazione sperimentale dei target dei miRNA è un compito arduo, l'aiuto dei tool computazionali per la predizione dei target è un valido strumento per investigare le funzioni dei miRNA e guidare i relativi esperimenti di laboratorio. I metodi di machine learning hanno migliorato le performance sia dell'individuazione dei miRNA all'interno del codice genetico, che della predizione dei loro geni target. Questi

approcci tipicamente fanno uso di dati di sequenza (ad esempio, 6-8 nt miRNA binding motifs), strutture secondarie (ad esempio, *stem-loop* usando la modellizzazione termodinamica) e conservazione evolutiva per identificare potenziali candidati, usando algoritmi come *Random Forest* o *Support Vector Machines* (Kim, 2006).

MODELLO DI PREDIZIONE DELLE INTERAZIONI MIRNA-TARGET BASATO SU RETI NEURALI

Nel corso dell'attività è stato progettato un metodo computazionale per la predizione dei target dei miRNA basato sulle reti neurali auto-organizzanti (Self-Organizing Map - SOM). Le reti SOM (Kohonen, 2001) sono reti neurali ampiamente utilizzate per categorizzare dataset di grandi dimensioni tramite la proiezione dei dati in uno spazio a dimensione inferiore, tipicamente in un reticolo bidimensionale di neuroni interconnessi. Ogni neurone della SOM rappresenta un modello di riferimento, corrispondente ad un dominio locale dello spazio di ingresso (Fiannaca, 2013). Usando un apprendimento competitivo, l'algoritmo SOM prova a riprodurre il meccanismo auto-organizzativo delle vie somatosensoriali presenti in alcune aree del cervello. Pertanto, la SOM è molto più di un algoritmo di clustering perché dà una visualizzazione della distribuzione dei pattern nello spazio di ingresso. Quando i pattern di ingresso sono proiettati nella mappa, i cluster possono essere visualizzati e la mappa può essere divisa in aree in cui i pattern di ingresso condividono alcuni valori caratteristici.

DESCRIZIONE DEL METODO COMPUTAZIONALE

Verranno adesso introdotti sia la rappresentazione computazionale delle sequenze utilizzato in questo studio, che il modello di predizione basato sulla SOM. Maggiori dettagli sul modello di predizione e sulla sua efficacia sono riportati in (Fiannaca, 2016). La metodologia messa a punto è composta da quattro step principali. La Figura 1 mostra la pipeline utilizzata, che verrà spiegata in seguito.

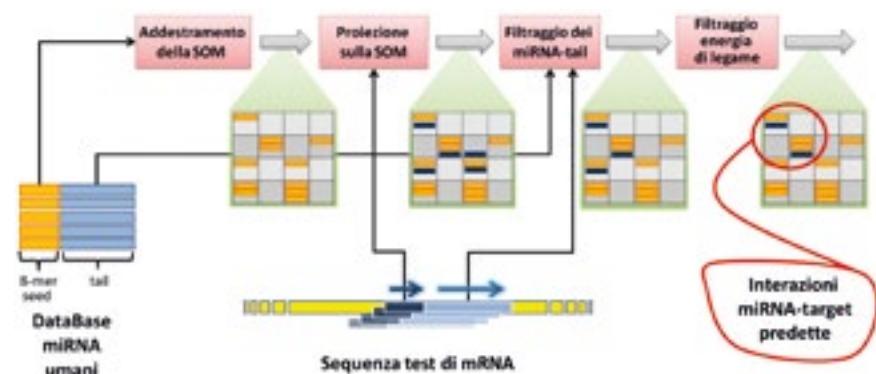


Figura 1 Algoritmo di predizione miRNA-target, basato sulla rete neurale SOM.

RAPPRESENTAZIONE DELLE SEQUENZE GENETICHE

Una delle principali sfide in bioinformatica consiste nel trovare la migliore rappresentazione di sequenze di DNA/RNA. Nell'approccio proposto, abbiamo rappresentato le sequenze di RNA (miRNA e mRNA) tramite una codifica numerica derivata dalle Position Weight Matrices (PWMs) definita in (Hannenhalli, 2005). Una PWM è un modello di rappresentazione comunemente utilizzata nell'analisi di sequenze biologiche, ottenuta calcolando la frequenza di ciascuna specifica base (A, C, G e T oppure U) a ogni posizione di nucleotide nella sequenza.

In particolare, nel nostro metodo, ogni sequenza di RNA è rappresentata con una PMW di $4 \times k$ elementi, dove 4 sono i simboli del nucleotide e k è la lunghezza della sequenza. Ogni colonna j ha una valore fissato secondo il corrispondente nucleotide nella j -esima posizione, con $1 \leq j \leq k$.

La codifica numerica per ogni nucleotide è la seguente:

$$A = [1000]^T, C = [0100]^T, G = [0010]^T, T/U = [0001]^T$$

Per misurare la diversità tra due PWM abbiamo considerato la distanza Euclidea normalizzata, definita come:

$$D(a, b) = \frac{1}{\sqrt{2k}} \sum_{j=1}^k \sqrt{\sum_{b \in \{A,C,G,T\}} (P_{j,h}^1 - P_{j,b}^2)^2}$$

dove P_1 e P_2 sono due PWM, k è la lunghezza delle sequenze e $P_{j,b}$ è il valore nella colonna j con la base b . La distanza varia da 0 (perfetta identità) a 1 (completa dissimilarità).

ADDESTRAMENTO DELLA SOM

Nel primo step, un set di *seed* di miRNA, fissati ad una lunghezza di 8nt, è utilizzato per l'addestramento di una SOM. Abbiamo considerato solo gli 8-mer miRNA *seed* perché è stato dimostrato che la regione di *seed* è principalmente responsabile del legame miRNA target. Ogni neurone è rappresentato da una PWM 4×8 che è inizialmente inizializzata utilizzando valori casuali. Inoltre, i neuroni sono organizzati in un reticolo rettangolare, in cui ogni neurone è connesso ai suoi quattro vicini. Per localizzare la *best matching unit*, si calcola la distanza tra il vettore di ingresso e i pesi di ciascun neurone, secondo la distanza definita sopra. Il risultato di questo step è un set di cluster composti da 8-mer *seed* che appartengono a ciascun miRNA.

PROIEZIONE SULLA SOM

Il secondo step consiste nella proiezione di una sequenza mRNA sulla SOM addestrata. Per questa ragione, abbiamo estratto tutti i frammenti di mRNA lunghi 8-nt attraverso una finestra scorrevole 8-mer con un passo pari a 1. In questo modo, abbiamo ottenuto un set di 4×8 PWM che possono essere proiettati sulla SOM addestrata. Il risultato di questo step, per ogni unità neuronale (cluster), è una lista di coppie (miRNA *seed*,

frammento di mRNA). Ogni cluster può essere considerato come un set preliminare di interazioni miRNA-mRNA predette.

FILTRAGGIO DEI MIRNA-TAIL

In questo step, sono filtrate le interazioni preliminari considerando la rimanente parte di sequenze miRNA, chiamate miRNA_tail. Per ogni coppia (miRNA_seed, frammento di mRNA), abbiamo considerato rispettivamente il miRNA_tail e la sequenza mRNA della stessa lunghezza del miRNA_tail, vicino alla porzione di mRNA proiettati. Successivamente, abbiamo calcolato una misura di dissimilarità basata sulla distanza Euclidea normalizzata tra la rappresentazione PWM di quelle due sequenze e, secondo la regola n.2 del paragrafo "Modello dell'interazione tra miRNA e gene target", abbiamo tenuto solo quelle coppie di interazioni miRNA-mRNA la cui distanza era al di sotto di una certa soglia. Per prendere in considerazione la presenza di possibili bulge tra seed e tail del miRNA, abbiamo considerato nel computo la presenza di un possibile offset di pochi nucleotidi.

FILTRAGGIO ENERGIA DI LEGAME

Nell'ultimo step, abbiamo applicato un'ulteriore operazione di filtraggio alla lista di coppie, basata sulla minima energia libera richiesta per formare il duplex miRNA-MRNA. A questo scopo, abbiamo usato IntaRNA tool (Wright et al., 2014). IntaRNA è in grado di calcolare il valore di energia libera da una coppia di sequenze genomiche considerando due diversi contributi: (1) l'energia libera richiesta per fare l'apertura dei siti di interazione sia nel miRNA sia nel mRNA e (2) l'energia libera di ibridizzazione tra i nucleotidi che interagiscono. La somma di questi due contributi rappresenta il punteggio finale di energia libera: in questo modo, le potenziali interazioni che ottengono un punteggio di energia libera al di sopra di una soglia di riferimento sono rimosse dalla lista di interazioni miRNA-mRNA.

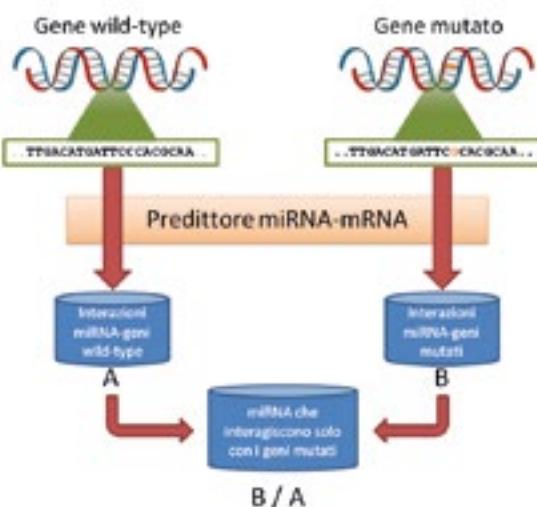


Figura 2 Pipeline per l'identificazione dei miRNA che interagiscono esclusivamente con i geni mutati.

UTILIZZO DEL PREDITTORE PER L'IDENTIFICAZIONE DI NUOVE INTERAZIONI MIRNA-TARGET NEI GENI MUTATI.

Allo scopo di individuare quei miRNA che regolano in maniera selettiva i geni mutati (rispetto ai geni wild-type) è stata definita una pipeline che sfrutta il suddetto predittore di interazioni miRNA-target. La pipeline prodotta è illustrata in figura 2 e prevede l'esecuzione di due run separati del predittore: nel primo verrà utilizzata la sequenza del gene wild-type, mentre nel secondo verranno calcolati i miRNA della sequenza appartenente al gene mutato. La pipeline proposta produrrà dunque due liste di interazioni miRNA-target. Il complemento della seconda lista rispetto alla prima fornirà la lista dei miRNA che interagiscono esclusivamente con i geni mutati.

Il modello proposto può essere testato con una serie di mutazioni di interesse estratte dalla banca dati ClinVar, contenente mutazioni legate a diversi tipi di patologie tumorali.

Fiannaca Antonino¹, La Paglia Laura¹, La Rosa Massimo¹, Urso Alfonso¹, Gargiulo Francesco²

¹ - Istituto di Calcolo e Reti ad Alte Prestazioni (ICAR) del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) Via Ugo La Malfa, 153, 90147 - Palermo

² - Istituto di Calcolo e Reti ad Alte Prestazioni (ICAR) del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Via Pietro Castellino, 111, 80131 - Napoli

Referenze

- Fiannaca A., Di Fatta G., Rizzo R., Urso A. and Gaglio S. (2013) Simulated annealing technique for fast learning of som networks. Neural Comput & Applic., vol.22 (5).
- Fiannaca A., La Rosa M., La Paglia L., Rizzo R. and Urso A. (2016). MiRNATIP: a SOM-based miRNA-target interactions predictor. BMC bioinformatics, vol.17 (11).
- Filipowicz W., Bhattacharyya S.N., Sonenberg N. (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? Nat Rev Genet, vol.9(2).
- Hannenhalli S. and Wang L.S. (2005) Enhanced position weight matrices using mixture models. Bioinformatics, vol.2.
- Kim S.K., Nam J.W., Rhee J.K., Lee W.J. and Zhang B.T. (2006) miTarget: microRNA target gene prediction using a support vector machine. BMC Bioinformatics, vol.7
- Wright P.R., Georg J., Mann M., Sorescu D.A., Richter A.S., Lott S. et al. (2014) CopraRNA and IntaRNA: Predicting small RNA targets, networks and interaction domains. Nucleic Acids Res, vol.42 (W1).

Immunoterapia nel carcinoma midollare della tiroide

ABSTRACT

I carcinomi midollari della tiroide (MTC) derivano dalle cellule C parafollicolari della tiroide che producono calcitonina, e possono manifestarsi sia come malattie sporadiche che ereditarie. In un'ampia frazione di casi sporadici, e praticamente in tutti i casi ereditari di MTC, si riscontrano mutazioni attivanti del proto-oncogene *RET*, che codifica per una tirosino-chinasi recettoriale. Il trattamento degli MTC prevede l'utilizzo di inibitori di tirosino-chinasi (TKI), che purtroppo, nel corso del tempo, inducono farmaco-resistenza. Per questi motivi, sono necessari nuovi approcci terapeutici. Tra le terapie emergenti, gli "inibitori dei checkpoint immunitari" (ICIs) sono risultati molto efficaci in varie neoplasie: si tratta di farmaci in grado di interferire con molecole immunosoppressive note come "checkpoint immunitari" (PD-L1/2) espresse dai tumori. Il blocco di tali molecole ripristina l'immunità antitumorale, che distrugge il tumore. Recentemente, abbiamo dimostrato che l'interleuchina 8 (IL-8) è un mediatore cruciale nel carcinoma tiroideo (TC) di origine follicolare poiché induce proliferazione, invasività, resistenza all'apoptosi e immunosoppressione. Anche in cellule MTC umane, IL-8 è in grado di aumentare il potenziale immunosoppressivo, inducendo un incremento nell'espressione dei checkpoint immunitari. Pertanto, inibitori farmacologici di IL-8, usati singolarmente o anche in combinazione con le terapie convenzionali, potrebbero essere sfruttati per la terapia degli MTC.

I TUMORI NEUROENDOCRINI

I tumori neuroendocrini sono un gruppo eterogeneo, sia per localizzazione che per aggressività, di neoplasie, costituite da cellule neuroendocrine, che fanno parte del Sistema Endocrino Diffuso (DES). Solitamente si presentano come tumori sporadici, ma possono anche far parte di sindromi genetiche e clustering familiari. Essi comprendono carcinoidi gastrointestinali, tumori pancreatici insulari, tumori ipofisari cromofobi, carcinomi midollari della tiroide e feocromocitomi (Basuroy et al., 2016).

Il carcinoma midollare della tiroide (MTC) deriva dalle cellule C della tiroide e si distingue in una forma sporadica e una familiare, rappresentando attualmente il 5% - 10% di tutti i tumori della tiroide. Mutazioni attivanti del proto-oncogene *RET* sono state trovate nel 50% dei casi di carcinomi midollari in forma sporadica e nelle forme familiari, note come MEN 2, sindromi da neoplasia endocrina multipla, le quali sono caratterizzate da MTC e da altre patologie differenti a seconda del sottotipo di sindrome. Esistono 3 tipi di forme familiari di MTC: la MEN2A, la MEN2B e la forma FMTC (MTC familiare). La forma MEN2A è caratterizzata da carcinoma midollare della tiroide, feocromocitoma e iperplasia delle paratiroidi; la forma MEN2B è caratterizzata da carcinoma

midollare della tiroide, feocromocitoma e tumori a livello delle cellule gangliari, mentre la FMTC è caratterizzata soltanto dall'insorgenza dell'MTC di tipo familiare (Brandi et al., 2001).

IMMUNOTERAPIA

È noto che il sistema immunitario svolge un ruolo importante nel rimuovere cellule precancerose o cancerose. Sebbene esso normalmente sia in grado di rimuovere le cellule tumorali dal nostro corpo, in svariati casi i pazienti affetti da cancro mostrano un'immunotolleranza al tumore (Dunn et al., 2004). L'obiettivo dell'immunoterapia è quello di sfruttare la specificità e la memoria a lungo termine della risposta immunitaria adattativa per ottenere una regressione tumorale duratura ed una cura potenziale.

In particolare, più recentemente, grazie ad una migliore comprensione dei meccanismi di regolazione immunitaria, è stata valutata la possibilità di aumentare la risposta immunitaria antitumorale con l'uso di farmaci che inibiscono i cosiddetti "checkpoint immunitari". I checkpoints immunologici sono molecole cruciali nel mantenimento dell'omeostasi immunitaria. Essi modulano la qualità e l'ampiezza di diversi meccanismi effettori sia innati che adattativi in favore della tolleranza immunogenica. Consistono in una serie di recettori e ligandi in grado di stimolare o inibire la responsività delle cellule immunitarie contro patogeni e/o cellule tumorali. Tra questi, in particolare, due checkpoints immunosoppressivi che possono inibire la risposta immune operata dalle cellule T sono il programmed cell death protein-1 (PD-1) e il cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) (Gajewski et al., 2013). PD-1 è normalmente presente sulle cellule immunitarie e quando si lega ai suoi ligandi PD-L1/PD-L2, espressi di frequente sulla superficie delle cellule tumorali, la proliferazione dei linfociti e la produzione di molecole infiammatorie si riducono. CTLA-4 funziona in modo simile, ma i suoi ligandi si chiamano CD80 e CD86. CTLA-4 blocca le cellule T nella fase di attivazione, quando ancora sono nei linfonodi. PD-1, al contrario, regola i linfociti T precedentemente attivati nelle fasi effettive della risposta immunitaria, nei tessuti periferici. Entrambi i recettori immunologici sono diventati, per le loro peculiarità, il bersaglio di numerosi studi nell'ambito della cura del cancro. Le terapie che inibiscono CTLA-4/CD80-86 e/o l'asse PD-1/PD-L1-L2 hanno dimostrato un enorme successo nel trattamento di diversi tipi di cancro (Gajewski et al., 2013).

MTC

Recentemente, in pazienti MTC è stato osservato un significativo aumento dei linfociti FoxP3-positivi (Treg) nel sangue periferico, nei linfonodi e nei tessuti tiroidei, suggerendo anche in questi tumori un possibile meccanismo di immunoevasione (Müller et al., 2010). Inoltre, è stato anche dimostrato che le mutazioni di *RET* sono in grado di indurre l'espressione dell'indolamina 2,3-diossigenasi (IDO-1), un enzima che contribuisce alla tolleranza immunologica producendo un ambiente di tipo immunosoppressivo (Moretti et al., 2016).

Negli ultimi 10 anni, il trattamento degli MTC ha previsto l'utilizzo di

diversi inibitori di tirosino-chinasi (TKI), compresi composti bloccanti RET. Tale terapia prende il nome di terapia a bersaglio molecolare o “targeted therapy”. Nonostante l’efficacia, il trattamento con i TKI presenta molte limitazioni, tra cui la resistenza primaria e secondaria, le tossicità e gli effetti collaterali e la capacità di indurre un effetto citostatico anziché citotossico. Per questi motivi, sorge l’esigenza dello sviluppo di terapie innovative. La combinazione di targeted therapy con altri agenti, inclusa l’immunoterapia, ha mostrato risultati molto promettenti in vari tipi di tumori. Pertanto, è possibile che inibitori di RET, associati agli inibitori dei checkpoint immunitari, possano rappresentare una nuova opzione terapeutica per i pazienti con MTC avanzato e progressivo.

POTENZIALI “TARGET” TERAPEUTICI NEGLI MTC

Studi precedenti condotti nel nostro laboratorio ci hanno consentito di dimostrare che l’interleuchina 8 (IL-8/CXCL8) è un marcitore di aggressività nei tumori tiroidei. L’IL-8 è una citochina chemoattrattante (chemochina) prodotta da vari tipi di cellule infiammatorie in seguito a stimolazione, ed esercita le proprie funzioni biologiche attraverso il legame con i suoi recettori CXCR1 e CXCR2. In particolare, abbiamo dimostrato che l’IL-8 è un fattore paracrino/autocrino cruciale capace di promuovere proliferazione, sopravvivenza, invasività, staminalità e capacità tumorigenica di cellule tumorali derivate da TC di origine follicolare (Visciano et al., 2015; Liotti et al., 2017). Nel TC, queste attività dell’IL-8 possono essere inibite mediante l’utilizzo del Reparixin, un inibitore selettivo dei recettori CXCR1/2 (Liotti et al., 2017).

Più recentemente, abbiamo inoltre dimostrato che l’IL-8 è in grado di aumentare anche le capacità immunosoppressive delle cellule TC, inducendo un aumento nei livelli di espressione dei checkpoints immunitari PD-1, PD-L1, PD-L2. In dettaglio, abbiamo recentemente dimostrato che la sovraespressione o la stimolazione di PD-1 promuove la proliferazione, la migrazione e la capacità tumorigenica in vivo di cellule di TC. Coerentemente, il blocco del recettore PD-1 mediante l’utilizzo di un anticorpo monoclonale, il Nivolumab, attualmente in uso nella terapia in diversi tipi di cancro, riduce drasticamente tali capacità (Liotti et al., 2020). Affinché PD-1 esplichi la propria funzione in cellule TC, abbiamo osservato che risulta fondamentale il legame del recettore con la tirosina-fosfatasi SHP2. L’attività dell’enzima SHP2 è essenziale nell’attivazione della proteina Ras, una piccola proteina G coinvolta nella trasduzione del segnale mitogenico. Il meccanismo d’azione suggerito è che il recettore PD-1 espresso sulla membrana delle cellule di TC, attraverso il suo legame con la proteina SHP2, sia in grado di attivare Ras, che a sua volta accende la via di trasduzione del segnale delle MAPK. L’attivazione delle MAPK si traduce in un aumento della proliferazione, della migrazione e delle capacità tumorigeniche delle cellule TC (Liotti et al., 2020) (Figura 1).

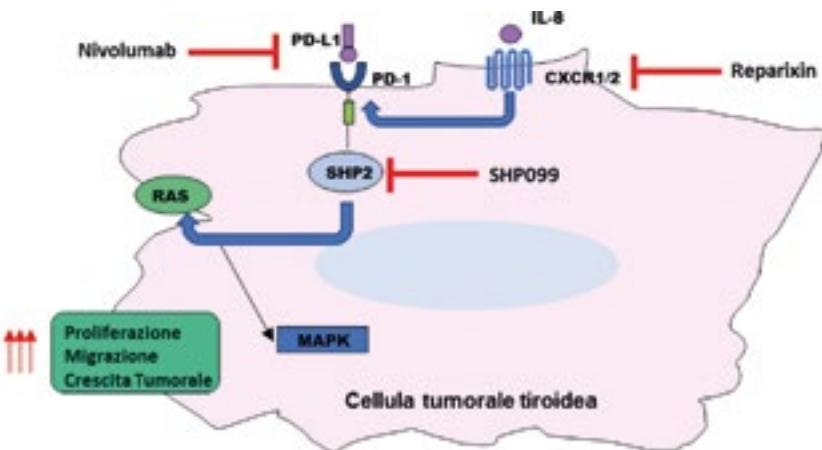


Figura 1 Ruolo del PD-1 nei tumori tiroidei. Potenziali bersagli terapeutici: anti PD-1, Nivolumab; bloccante CXCR1/2, Reparixin; inibitore SHP2, SHP099

Nel contempo, abbiamo dimostrato che anche cellule di MTC esprimono il circuito IL-8/CXCR1-CXCR2 e che l’IL-8 induce un incremento significativo dei checkpoint PD-1, PD-L1, PD-L2 anche in questo sistema cellulare. Coerentemente, il blocco del circuito dell’IL-8 con il Reparixin induce una riduzione significativa dei livelli delle proteine PD-1, PD-L1 e PD-L2 in membrana, suggerendo che l’IL-8 ha un ruolo chiave nella modulazione di questi checkpoint immunitari anche negli MTC. Abbiamo inoltre dimostrato che le cellule di MTC esprimono alti livelli di altre molecole immunomodulatorie (CD80, CD86, B7-H2, B7-H3, B7-H4, CD270, CD70, CD28, CD40, CD40L, ICOS, LAG3, TIM3, TIM1), confermando ulteriormente che anche in questi tumori si crea un ambiente di tipo immunosoppressivo. Questi dati suggeriscono che una migliore comprensione dei circuiti che disregolano il sistema immunitario negli MTC possa offrire nuove opportunità terapeutiche.

Attualmente, il campo dell’immunoterapia è uno dei filoni di ricerca più promettenti per la cura a lungo termine del cancro. Le possibilità di combinazioni sinergiche con trattamenti mirati di radioterapia, chemioterapia e piccole molecole hanno anche mostrato innumerevoli possibilità di personalizzare terapie immuno-oncologiche di precisione. È ipotizzabile pensare per gli MTC ad un trattamento combinato che sfrutti inibitori di RET attualmente in uso, associati agli inibitori dei checkpoint immunitari (ad es. Nivolumab) o agli inibitori di IL-8 (ad es. Reparixin) oppure ad inibitori della fosfatasi SHP2 (ad es. SHP099). Dati promettenti sull’utilizzo di farmaci anti RET combinati con inibitori dei checkpoint immunitari sono riportati attualmente in uno studio di fase 1/2, in cui si sta sperimentando l’utilizzo del Levantinib, un inibitore di RET, combinato con il Pembrolizumab, un farmaco diretto contro PD-1 (Lee et al., 2021).

1 - Istituto per l'Oncologia e l'Endocrinologia Sperimentale "G. Salvatore"

(IEOS), CNR, Napoli, Italia

2 - Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali, Università degli studi di Napoli, "Federico II", Napoli, Italia

3 - Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie mediche, Università degli studi di Napoli, "Federico II", Napoli, Italia

Referenze

Basuroy R, Srirajaskanthan R, Ramage JK (2016). Neuroendocrine Tumors. Gastroenterol Clin North Am. 2016 Sep;45(3):487-507.

Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, Bilezikian JP, Beck-Peccoz P, Bordi C, Conte Devolx B, Falchetti A, Gheri RG, Libroia A, Lips CJ, Lombardi G, Mannelli M, Pacini F, Ponder BA, Raue F, Skogseid B, Tamburrano G, Thakker RV, Thompson NW, Tomassetti P, Tonelli F, Wells SA Jr, Marx SJ (2001). Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. J Clin Endocrinol Metab. 2001 Dec;86(12):5658-71.

Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. Immunity. 2004 Aug;21(2):137-48.

Gajewski TF, Schumacher T (2013). Cancer immunotherapy. Curr Opin Immunol. 2013 Apr;25(2):259-60.

Lee CH, Shah AY, Rasco D, Rao A, Taylor MH, Di Simone C, Hsieh JJ, Pinto A, Shaffer DR, Girones Sarrio R, Cohn AL, Vogelzang NJ, Bilen MA, Gunnestad Ribe S,

Goksel M, Tennøe ØK, Richards D, Sweis RF, Courtright J, Heinrich D, Jain S, Wu J, Schmidt EV, Perini RF, Kubiak P, Okpara CE, Smith AD, Motzer RJ (2021). Lenvatinib plus pembrolizumab in patients with either treatment-naïve or previously treated metastatic renal cell carcinoma (Study 111/KEYNOTE-146): a phase 1b/2 study. Lancet Oncol. 2021 Jun 15:S1470-2045(21)00241-2.

Liotti F, Collina F, Pone E, La Sala L, Franco R, Prevete N, Melillo RM (2017). Interleukin-8, but not the Related Chemokine CXCL1, Sustains an Autocrine Circuit

Necessary for the Properties and Functions of Thyroid Cancer Stem Cells. Stem Cells. 2017 Jan;35(1):135-146.

Liotti F, De Pizzol M, Allegretti M, Prevete N, Melillo RM (2017). Multiple anti-tumor effects of Reparin on thyroid cancer. Oncotarget. 2017 May 30;8(22):35946-35961.

Liotti F, Kumar N, Prevete N, Marotta M, Sorriento D, Ieranò C, Ronchi A, Marino FZ, Moretti S, Colella R, Puxeddu E, Paladino S, Kano Y, Ohh M, Scala S, Melillo RM (2021). PD-1 blockade delays tumor growth by inhibiting an intrinsic SHP2/Ras/MAPK signalling in thyroid cancer cells. J Exp Clin Cancer Res. 2021 Jan 7;40(1):22.

Moretti S, Menicali E, Nucci N, Voce P, Colella R, Melillo RM, Liotti F, Morelli S, Fallarino F, Macchiarulo A, Santoro M, Avenia N, Puxeddu E (2017). Signal Transducer and Activator of Transcription 1 Plays a Pivotal Role in RET/PTC3 Oncogene-induced Expression of Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1. J Biol Chem. 2017 Feb 3;292(5):1785-1797.

Müller S, Poehnert D, Müller JA, Scheumann GW, Koch M, Lück R (2010). Regulatory T cells in peripheral blood, lymph node, and thyroid tissue in patients with medullary thyroid carcinoma. World J Surg. 2010 Jul;34(7):1481-7.

Visciano C, Liotti F, Prevete N, Cali' G, Franco R, Collina F, de Paulis A, Marone G, Santoro M, Melillo RM (2015). Mast cells induce epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell features in human thyroid cancer cells through an IL-8-Akt-Slug pathway. Oncogene. 2015 Oct 1;34(40):5175-86.

Identificazione e caratterizzazione dello scambiatore sodio/calcio NCX2 quale nuovo bersaglio molecolare nello sviluppo e nel controllo farmacologico del glioblastoma umano

ABSTRACT

Il glioblastoma multiforme (GBM) è il tumore cerebrale più frequente ed aggressivo, caratterizzato da un basso indice di sopravvivenza a causa dalla inefficienza delle terapie attualmente disponibili.

A livello molecolare il glioblastoma è caratterizzato da una frequente alterazione dei pathway molecolari che, mediante alcuni fattori trascrizionali, inibiscono anti-oncogeni o iperesprimono pro-oncogeni. Tra i geni che risultano essere silenziati vi è *Slc8a2*, codificante per lo scambiatore neuronale sodio calcio 2 (NCX2), recentemente riconosciuto come un nuovo anti-oncogene per il glioblastoma. L'espressione di questo scambiatore, infatti, è significativamente ridotta soprattutto negli stadi di glioma più avanzati.

L'obiettivo del presente studio è stato quello di individuare i meccanismi genetici ed epigenetici sottostanti il silenziamento di NCX2 con l'obiettivo di trovare una strategia farmacologica per aumentare l'espressione di questo anti-oncogene e quindi ridurre la malignità e la progressione del glioblastoma.

A tale proposito, il nostro gruppo di ricerca ha identificato, clonato ed analizzato il promotore del gene *Slc8a2* individuando, inoltre, i fattori di trascrizione in grado di modificarne l'attività in diverse linee cellulari esprimenti o non esprimenti NCX2. Parallelamente sono stati analizzati le possibili vie trasduzionali che potrebbero essere responsabili del silenziamento di NCX2 nel glioblastoma. Sono stati inoltre progettati e realizzati ed esaminati delle molecole eterocicliche in grado di aumentare l'attività di questo scambiatore.

Collettivamente, i dati ottenuti suggeriscono che il silenziamento dello scambiatore è mediato da un pathway pro-oncogenico, la cui inibizione provoca un aumento dell'espressione e dell'attività di NCX2 rallentando la crescita tumorale. Questi dati fanno presupporre che NCX2 possa esercitare un ruolo come soppressore tumorale nel glioblastoma.

RISULTATI

Il nostro gruppo di ricerca ha identificato una regione promotrice per il gene codificante per NCX2 nella regione intergenica tra *Kptn* e

Slc8a2 nel genoma umano, murino e di ratto (Fig. 1 e 2). L'analisi *in silico* ha rivelato diversi possibili siti di legame per fattori di trascrizione con identità superiore al 75% e conservati nelle specie considerate.

Entrambi i promotori di NCX2 di ratto (S3) e umano (HP) sono stati clonati nel plasmide luciferasi pGL3b ottenendo rispettivamente pGL3b-S3 e pGL3b-HP (Fig. 3). La trasfezione del plasmide pGL3b-S3 o pGL3b-HP ha aumentato l'attività della luciferasi in entrambe le linee cellulari PC12 e SHSY, mentre è stata trovata una piccola ma significativa attività della luciferasi nella linea cellulare U87 rispetto al rispettivo gruppo di controllo transfettato con un plasmide pGL3b vuoto. Entrambi i promotori di NCX2 di ratto e umano hanno mostrato un modello di espressione simile nelle linee cellulari PC12, U87 e SHSY.

Inoltre, sono stati esaminati alcuni fattori trascrizionali a valle di cascate trasduzionali pro-oncogeniche, la cui attività ha mostrato un effetto di inibizione dell'attività del promotore pGL3b-HP e della trascrizione endogena di NCX2 nelle cellule di glioblastoma umane. Inoltre, anche il trattamento con alcuni farmaci antineoplastici che interferiscono con la cascata trasduzionale pro-oncogenica ha aumentato l'attività luciferasica di pGL3b-HP e della trascrizione endogena di NCX2 nelle cellule di glioblastoma (Fig. 4). Questo aumento dell'attività non è stato visto quando si è transfettati fattori trascrizionali a valle del blocco della via trasduzionale (Fig. 4). D'altra parte, sono state identificate anche altri fattori trascrizionali che aumentato i livelli endogeni di espressione di NCX2 in alcune linee cellulari non di glioblastoma.

Anche l'uso di agenti antineoplastici in grado di ridurre lo stato di metilazione è stato in grado di aumentare significativamente l'espressione dell'mRNA endogeno di NCX2 nella linea cellulare U87.

Infine, poiché i risultati hanno mostrato che le U87 esprimono livelli rilevabili di NCX1, abbiamo progettato, sintetizzato e selezionato due composti: uno stimolatore dell'attività di NCX1 e NCX2 ed uno stimolatore selettivo dell'attività di NCX1. I risultati hanno mostrato che queste molecole sono in grado di rallentare la crescita cellulare in maniera concentrazione-dipendente nelle U87, mentre risulta inefficace per le linee cellulari PC12, BHK e SHSY.

DISCUSSIONE

I dati presentati riportano la caratterizzazione del gene promotore umano NCX2 e i determinanti molecolari del suo silenziamento nelle cellule di glioblastoma. Ancora più importante, i risultati ottenuti potrebbero rappresentare la base per nuove strategie terapeutiche volte ad aumentare l'espressione e/o l'attività di NCX2 nel glioblastoma per rallentare la crescita delle cellule tumorali.

La somiglianza dei dati ottenuti dall'analisi dell'espressione di NCX2 nelle line cellulari U87, PC12, SH-SY5Y e BHK ed i dati ottenuti sull'attività luciferasica ha rafforzato l'ipotesi che pGL3b-HP contenga alcuni dei principali meccanismi regolatori presenti nel promotore endogeno NCX2. In particolare, dall'analisi *in silico* del promotore sono emersi diversi possibili siti di legame conservati per diversi fattori di trascrizione, inclusi gli effettori di vie trasduzionali pro-oncogeniche.

Alcuni di questi fattori, infatti, sembrano essere stati determinanti per mantenere il silenziamento di NCX2 nel glioblastoma. Infatti, l'inibizione farmacologica del pathway pro-oncogeno ha ridotto l'inibizione del gene *Slc8a2*, mentre la trasfezione dei fattori trascrizionali a valle del pathway, ha annullato del tutto l'aumento dell'espressione dello scambiatore. Questi dati suggeriscono che questo antiporter rappresenta un bersaglio preferenziale ed importante per alcuni pathway pro-oncogenici. Difatti, la trasfezione di fattori trascrizionali che sono in grado di aumentare l'espressione di NCX2 in altri modelli cellulari o *in vitro*, risultano inefficaci nel glioblastoma. Visti i risultati ottenuti, è ipotizzabile che anche lo stato di metilazione del promotore di NCX2 possa esercitare un ruolo nella refrattarietà del gene alla trasfezione/attività dei fattori trascrizionali che aumentano i livelli dello scambiatore. Inoltre, sono state evidenziate delle piccole, ma significative differenze nella localizzazione delle sequenze consenso per i fattori trascrizionali che li rendono sensibili o insensibili alla metilazione, e questo potrebbe spiegare perché ci sono alcune differenze nella sensibilità del glioblastoma tra cellule di roditori ed umane a fattori trascrizionali ed a farmaci antineoplastici. A sostegno di questa ipotesi, il gene *slc8a2*, che codifica per NCX2, è altamente metilato nei tessuti del glioblastoma rispetto ai tessuti normali (Qu et al. 2010) un meccanismo di repressione trascrizionale degli antioncogeni che si riscontra in diversi tipi di gliomi (Qu et al. 2017). Infatti, il trattamento con antineoplastici che causano demetilazione del DNA ripristina l'espressione dell'mRNA endogeno di NCX2 nelle cellule di glioblastoma. Questi risultati supportano ulteriormente l'idea che esiste un meccanismo di regolazione epigenetica responsabile dello spegnimento di *Slc8a2* e dimostrano ulteriormente che i farmaci antineoplastici aumentano l'espressione del gene NCX2.

Un altro aspetto che merita attenzione è che i farmaci che aumentano direttamente o indirettamente l'espressione/attività di NCX2 hanno mostrato di rallentare la crescita delle cellule di glioblastoma parallelamente alla attività totale di NCX nella linea cellulare U87. Risultati simili sono stati ottenuti con la over-espressione in transiente di NCX1 o NCX2 nelle cellule U87. Per questi motivi è ipotizzabile che il silenziamento di NCX2 rappresenti una tappa fondamentale nella proliferazione e invasività del glioblastoma.

CONCLUSIONI

Complessivamente, questi risultati suggeriscono che ci sono alcuni determinanti molecolari sul promotore di NCX2 controllati dal pathway pro-oncogeni, che attraverso meccanismi genetici ed epigenetici, impediscono l'espressione di NCX2 nel glioblastoma. Inoltre, NCX2 potrebbe rappresentare un gene oncosoppressore il cui incremento di espressione/attività potrebbe rappresentare un'utile strategia farmacologica per ostacolare la crescita cellulare e l'invasività del glioblastoma.

FIGURE

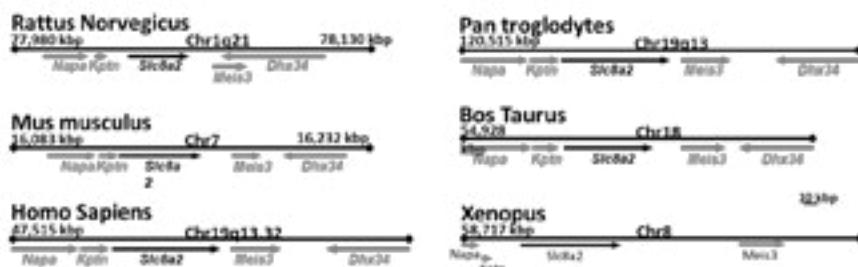


Figura 1 Cluster genico in cui è presente il gene *Slc8a2* codificante per NCX2 nelle diverse specie.

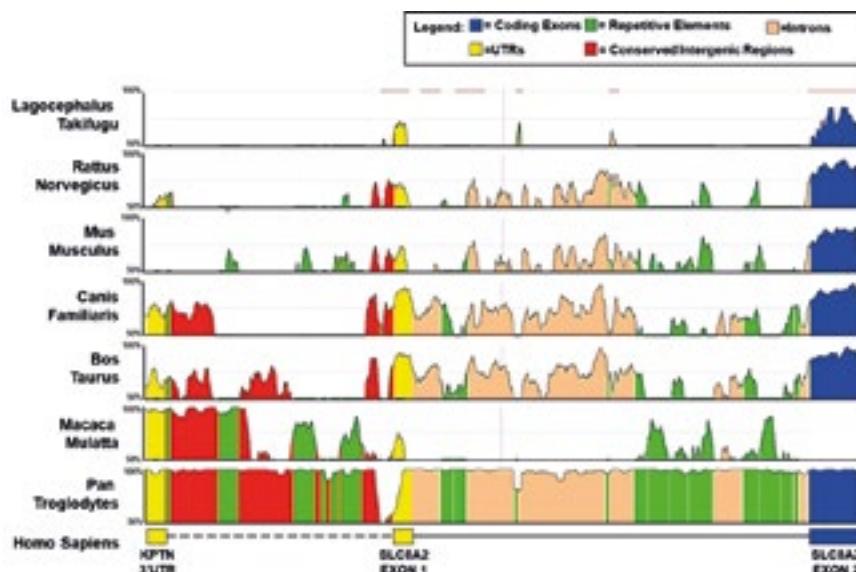


Figura 2 Grado di conservazione tra le specie della regione promotrice del gene *Slc8a2*.

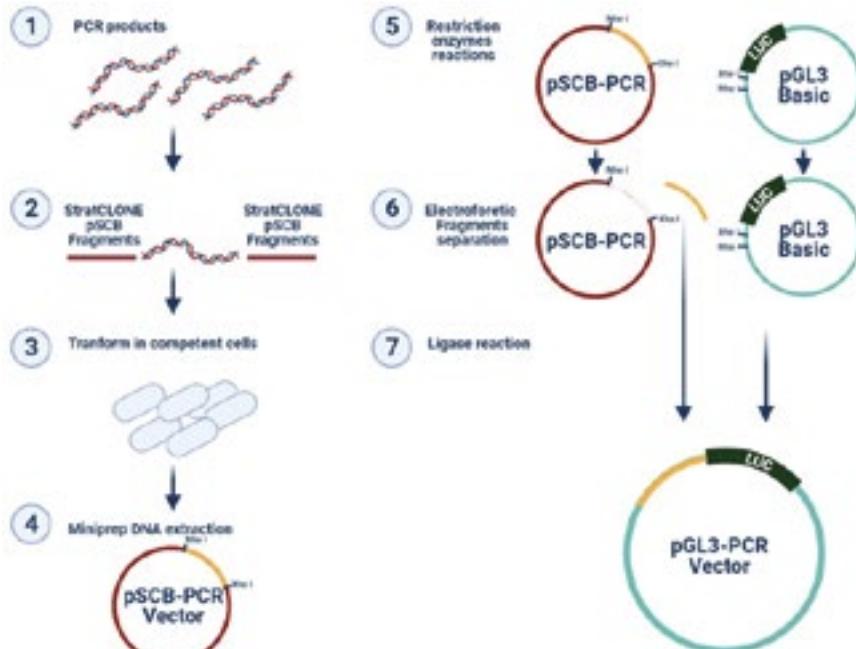


Figura 3 Procedura del clonaggio del promotore di NCX2 nel plasmide luciferasi (pGL3b).

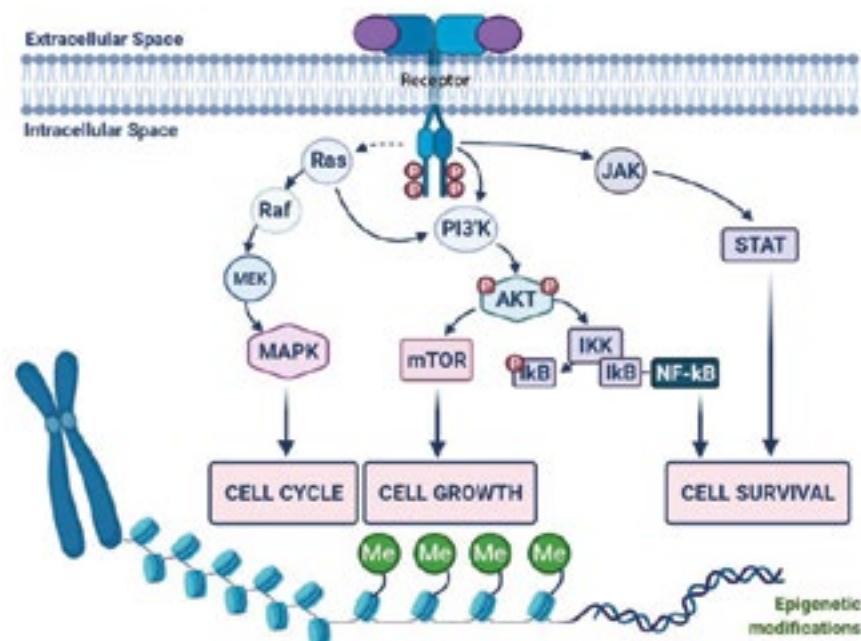


Figura 4 Vie trasduzionali che esercitano un ruolo sulla crescita tumorale del glioblastoma e dell'espressione di NCX2.

*Lucrezia Calabrese¹, Silvia Natale¹, Ferdinando Fiorino²,
Vincenzo Santagada², Elisa Magli², Elisa Perissutti², Lucio
Annunziato³, Pasquale Molinaro¹*

*1 - Divisione di Farmacologia, Dipartimento di Neuroscienze, Università di Napoli Federico II,
via Pansini 5, 80131 Napoli*

*2 - Dipartimento di Farmacia, Università di Napoli “Federico II”, via D. Montesano 49, 80131
Napoli*

3 - IRCCS Fondazione SDN, via Gianturco, Napoli

Caratterizzazione genomica e trascrittomica di tumori neuroendocrini gastro- entero-pancreatici

ABSTRACT

I tumori neuroendocrini (NET) costituiscono un gruppo ampio ed eterogeneo di neoplasie che originano dalle cellule del sistema neuroendocrino. Attualmente, per la diagnosi anatomo-patologica, il dosaggio sierico della cromogranina-A (CgA) rappresenta il miglior marcatore di differenziazione neuroendocrina dei NET. Tuttavia, tale parametro risulta scarsamente significativo a livello diagnostico, prognostico e predittivo, nonché manca della necessaria specificità per individuare in maniera univoca la patologia ed il suo tessuto di origine (Lamberts, Hofland et al. 2001, Ferolla, Faggiano et al. 2008). Trattandosi di neoplasie rare, ad oggi non sono disponibili validi modelli sperimentali. In questo studio, supportato dalla Regione Campania (progetto FESR-Rare.Plat.Net), il partner UNISA-DIPMED si è focalizzato sulla caratterizzazione molecolare dei tumori rari d'interesse attraverso studi integrati di genomica e trascrittomica, al fine di studiarne il profilo genetico e lo stato mutazionale, nonché la de-regolazione dei profili di espressione genica e l'eventuale espressione di specifiche variazioni a livello del trascrittoma. L'obiettivo finale è quello di identificare specifiche mutazioni e biomarcatori coinvolti nell'insorgenza e progressione di queste neoplasie, in modo da facilitarne le diagnosi precoce ed identificare potenziali bersagli farmacologici sfruttabili per la terapia personalizzata.

INTRODUZIONE

I tumori neuroendocrini (NET) rappresentano un ampio gruppo di neoplasie rare che originano dalle cellule del sistema neuroendocrino diffuso. Queste ultime, avendo distribuzione ubiquitaria all'interno dell'organismo, consentono l'insorgenza dei NET in diversi organi, aumentandone di conseguenza la complessità diagnostica. Le forme più frequenti di NET originano dal tratto digerente e respiratorio (Oronsky, Ma et al. 2017) e comprendono i NET dell'ileo, del colon-retto, del pancreas, dello stomaco, del duodeno, dell'appendice, del polmone e del timo. In una porzione di casi, i NET possono originare dal tratto genito-urinario, la cute (merkelomi), la tiroide (carcinoma midollare, CMT), i surreni e i gangli nervosi (feocromocitomi e paragangliomi) (Oronsky, Ma et al. 2017).

Secondo l'ultima classificazione WHO 2010, più dell'80% dei NET sono tumori ben differenziati, ad indice proliferativo basso – intermedio ($Ki67<20$), definiti NET G1 e G2 (Fraenkel, Kim et al. 2012). Tuttavia, all'interno dei NET gastroentero-pancreatici, polmonari e originati in altre sedi, esiste un sottogruppo, a scarsa differenziazione e ad alto indice proliferativo, che comprende i carcinomi neuroendocrini scarsamente

Referenze

- Qu, M., et al. (2010). “Molecular genetic and epigenetic analysis of NCX2/SLC8A2 at 19q13.3 in human gliomas.” *Neuropathol Appl Neurobiol* 36(3): 198-210.

Qu, M., et al. (2017). “The Candidate Tumor Suppressor Gene SLC8A2 Inhibits Invasion, Angiogenesis and Growth of Glioblastoma.” *Mol Cells* 40(10): 761-772.

differenziati ($Ki67 > 20$), i cosiddetti NEC G3 (Travis, Brambilla et al. 2015).

Circa il 10% dei NET è a trasmissione ereditaria ed insorge nell'ambito di sindromi neoplastiche a trasmissione autosomica dominante causate, nella maggior parte dei casi, da mutazioni di geni oncosoppressori come MEN-1, VHL, NF1, TSC, SDH o, in alternativa, del protooncogene RET.

Relativamente ai biomarcatori di malattia, allo stato attuale, la cromogranina-A (CgA) rappresenta il miglior indicatore disponibile in anatomia patologica per attestare la natura neuroendocrina dei NET.

Tuttavia, a causa della mancanza di procedure standardizzate e la scarsa sensibilità che varia dal 60-90%, il suo ruolo diagnostico, prognostico e predittivo di risposta alla terapia appare non sufficientemente adeguato (Lamberts, Hofland et al. 2001, Ferolla, Faggiano et al. 2008). Inoltre, nei NEC G3, la CgA risulta espressa in quantità ridotta rispetto agli altri sottotipi; ciò è principalmente dovuto alla perdita del differenziamento neuroendocrino cellulare (Zatelli, Torta et al. 2007). Nonostante siano considerati tumori rari (l'incidenza si aggira intorno ai 5 casi su 100.000 individui per anno), i NET negli ultimi anni hanno mostrato un sensibile aumento della frequenza di insorgenza sul totale dei tumori diagnosticati. La diagnosi dei NET è generalmente tardiva, poiché i sintomi clinici sono aspecifici e principalmente rappresentati dalla presenza di un nodulo, più o meno silente, che comprime e/o causa un'eccessiva produzione di un particolare ormone, con conseguente sbilanciamento dei livelli circolanti e concomitante sintomatologia.

Per la diagnosi precoce di queste patologie non sono ancora disponibili metodologie validate, e manca inoltre una terapia farmacologica efficace. Ancora, i pazienti affetti da NET differenziati sono spesso costretti a convivere con la malattia per molti anni ed a sottoporsi a terapie continuative complesse, non prive di effetti collaterali. Tutto ciò ha reso urgente la necessità di uno studio mirato per migliorare la tempestività nella diagnosi e la gestione clinica dei pazienti.

METODI E RISULTATI

È stato collezionato un consistente numero di campioni tumorali, comprendente sia carcinomi midollari della tiroide (CMT) che NET gastro-entero-pancreatici (GEP-NET). Questi ultimi includono, a loro volta, sia NET più differenziati e meno aggressivi (G1 e G2) che NET scarsamente differenziati e di alto grado (NEC G3) (Tab. 1).

Per quanto riguarda lo studio sui GEP-NET, qui descritto, l'obiettivo preposto è finalizzato alla caratterizzazione del profilo genomico e trascrittomico della coorte di campioni raccolti, utilizzando metodiche di Next Generation Sequencing (NGS) associate ad analisi bioinformatiche (Fig. 1). Ai fini della caratterizzazione molecolare dei tumori rari in esame, sono stati utilizzati tessuti unicamente tumorali, congelati o fissati in formalina ed inclusi in paraffina (FFPE). Tali tessuti sono stati sottoposti ad estrazione di DNA e RNA in parallelo mediante l'utilizzo di kit commerciali. Gli acidi nucleici così ottenuti sono stati poi sottoposti ad analisi del trascrittoma e di un pannello di 523 geni implicati nella patogenesi di neoplasie note, tra cui quelle neuroendocrine.

GRADO	CAMPIONI (N)	TESSUTO D'ORIGINE
G1	10	Ileo
		Fegato
		Pancreas
		Colon
		Pancreas MEN1
G2	11	Polmone
		Pancreas
		Intestino Tenue
		Duodeno
		Ileo
G3	7	Linfonodo mediastino
		Fegato (MTX)
		Appendice
		Linfonodo ascellare
		Colon

Tabella 1 Campioni GEP-NET utilizzati per l'analisi

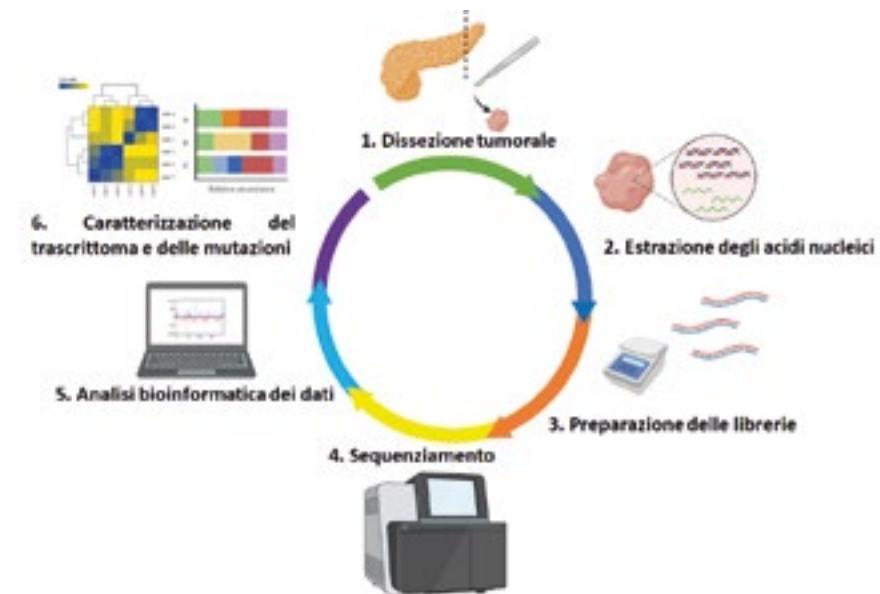


Figura 1 Flusso di lavoro che parte dall'estrazione degli acidi nucleici, prosegue con la preparazione delle librerie e sequenziamento di esse e termina con l'analisi bioinformatica per la caratterizzazione del profilo genomico e trascrittomico dei NET (<https://biorender.com/>)

ANALISI DEL TRASCRITTOMA

In seguito alla valutazione qualitativa dei campioni raccolti, è stato possibile effettuare lo studio del trascrittoma su 26 GEP-NET/NEC (10 G1, 9 G2 e 7 G3) con l'obiettivo di identificare eventuali trascritti di fusione ed il profilo di espressione di geni deregolati in presenza della neoplasia e nei suoi diversi stadi. In mancanza di tessuto sano come controllo, l'analisi differenziale è stata condotta utilizzando l'indice di proliferazione cellulare Ki67, come fatto in altre analisi (Simbolo, Bilotta et al. 2021), così da correlare il cambiamento dell'espressione genica nei tessuti con il grado di aggressività del tumore.

Relativamente ai trascritti di fusione, i dati sono stati analizzati utilizzando 2 tool: StarFusion e Defuse. L'analisi con StarFusion ha portato all'identificazione, in 9 campioni, di 39 trascritti di fusione. Tra questi, 15 eventi di fusione avvengono a livello inter-cromosomale, mentre i restanti avvengono a livello intra-cromosomale. Parallelamente, con il tool Defuse, sono stati identificati, in 13 campioni, 30 trascritti di fusione.

Incrociando i dati ottenuti è risultato comune alle due analisi un solo trascritto di fusione, denominato GDAP1-MIR2052HG (Fig. 2A), identificato in 3 campioni usando il tool Starfusion e in 2 utilizzando Defuse. Dallo studio bibliografico, non sono emerse informazioni riguardanti questo trascritto di fusione. Entrambi i geni coinvolti localizzano sul cromosoma 8. GDAP1 è una proteina della membrana mitocondriale esterna, principalmente espressa nei tessuti nervosi e coinvolta nella sindrome di Charcot-Marie-Tooth (González-Sánchez, Satrústegui et al. 2019). Il lncRNA MIR2052HG, invece, è implicato nel carcinoma mammario e nel fenomeno della resistenza alla terapia con inibitori delle aromatasi, in quanto capace di regolare i livelli del recettore degli estrogeni α (REα) attraverso specifici meccanismi, tra cui l'interazione con EGR1 (Cairns, Ingle et al. 2019). Ulteriori approfondimenti saranno necessari per stabilire l'eventuale significato clinico di questo trascritto.

L'analisi del trascrittoma, inoltre, mostra che sono presenti 716 geni differenzialmente espressi tra NET e NEC (Fig. 2B). Un'analisi funzionale effettuata su questi ultimi (Ingenuity Pathway Analysis, IPA) mostra che tra le funzioni più interessanti che vedono partecipi questi geni compaiono: trasporto molecolare, morte cellulare e sopravvivenza, ciclo cellulare e proliferazione cellulare (Fig. 2C).

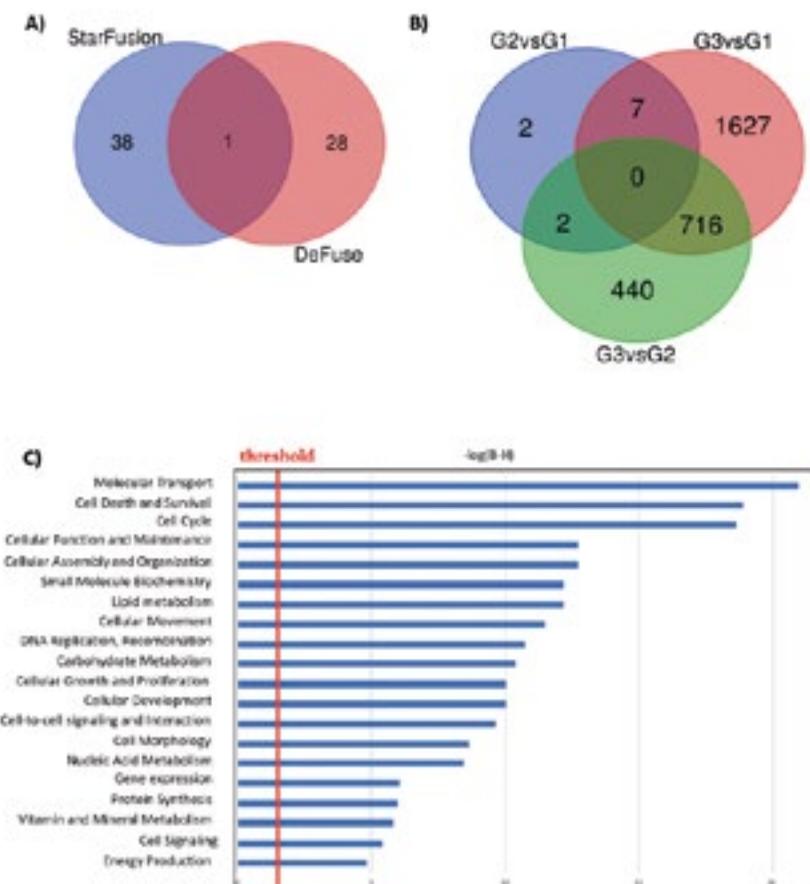


Figura 2

A) Diagramma di Venn dei trascritti di fusione identificati con i tool Starfusion e Defuse
B) Diagramma di Venn dei geni differenzialmente espressi tra i gradi delle neoplasie
C) Analisi delle funzioni dei geni differenzialmente espressi tra NET e NEC

ANALISI DEL PROFILO MUTAZIONALE

L'analisi del profilo mutazionale è stata condotta su 523 geni le cui variazioni sono correlate alle principali patologie tumorali. I campioni analizzati in questo studio sono 28: 10 G1, 11 G2 e 7 G3.

Tra le mutazioni totali identificate ne sono state selezionate 3568. Nel dettaglio, sono state escluse le mutazioni con una frequenza superiore al 5% nei database 1000Genomi e gnomAD, per eliminare le varianti più frequenti nella popolazione generale, le mutazioni che nel database ClinVar, riportante il significato clinico delle varianti genetiche ad oggi identificate, risultano annotate come aventi un significato clinico benigno o verosimilmente benigno, e quelle identificate con una profondità di sequenziamento (depth) inferiore a 150, per una maggiore qualità e per escludere falsi positivi. In figura 3A sono mostrati i 10 geni caratterizzati per essere più frequentemente mutati nei campioni analizzati, tra cui:

MDC1, PREX2 e FAT1. Il 38% dei campioni presenta mutazioni missenso nel gene MDC1 (Mediator of DNA Damage Checkpoint 1) che sono state già descritte in NET pancreatici (Goksu, Ozer et al. 2020). Esso codifica per una proteina necessaria per l'attivazione di alcuni checkpoint del ciclo cellulare ed è inoltre implicato nel reclutamento di ATM nei processi di riparazione dei danni al DNA (Stewart, Wang et al. 2003). Mentre il 35% dei campioni presenta inserzioni in frame nel gene PREX2, di cui è stata precedentemente valutata la presenza nei NEC (Ohmoto, Sato et al. 2021). PREX2 codifica per una proteina coinvolta nella regolazione di PTEN e nell'attivazione della via di PI3K (Stewart, Wang et al. 2003, Rosenfeldt, Vázquez-Prado et al. 2004); ci sono diverse evidenze del coinvolgimento di PREX2 in diversi tipi di cancro, tra cui l'epatocarcinoma (Yang, Yen et al. 2019), ed è stato inoltre proposto come gene driver della carcinogenesi pancreatica (Waddell, Pajic et al. 2015). Il gene FAT1 risulta, invece, mutato nel 27% dei campioni con mutazioni missenso. FAT1 risulta essere coinvolto nei meccanismi di polarizzazione cellulare, migrazione e modulazione dei contatti cellula-cellula (Hu, Zhai et al. 2018).

In seguito all'analisi globale delle mutazioni, la scelta è stata di focalizzarsi prima su quelle comuni in NET e NEC, al fine di indagare, tra esse, la presenza di mutazioni *driver* che potrebbero portare all'insorgenza di tali neoplasie. L'incrocio tra la lista di mutazioni specifiche dei campioni NET e quella dei NEC evidenzia la presenza di 380 mutazioni comuni tra i due gruppi, 837 esclusive dei NET e 529 esclusive dei NEC (Fig. 3B). Le principali funzioni in cui sono coinvolti i geni mutati sono mostrate in Figura 3C.

Oltre alle mutazioni nei singoli geni, attraverso l'analisi bioinformatica è stato possibile valutare il carico mutazionale (Tumor Mutational Burden, TMB), indicante il livello globale di mutazioni presente in un tessuto tumorale e indice di possibile responsività all'immunoterapia (Chan, Yarchoan et al. 2019), e l'instabilità dei microsatelliti (MSI). Mentre l'MSI osservato ha valori di mediana che si mantengono stabili, il TMB presenta un incremento delle sue percentuali all'aumentare del grado delle neoplasie, fino a superare, in alcuni NEC G3, il valore di 10 fissato come soglia oltre la quale un dato tumore potrebbe essere candidato all'immunoterapia (Fig. 3D).

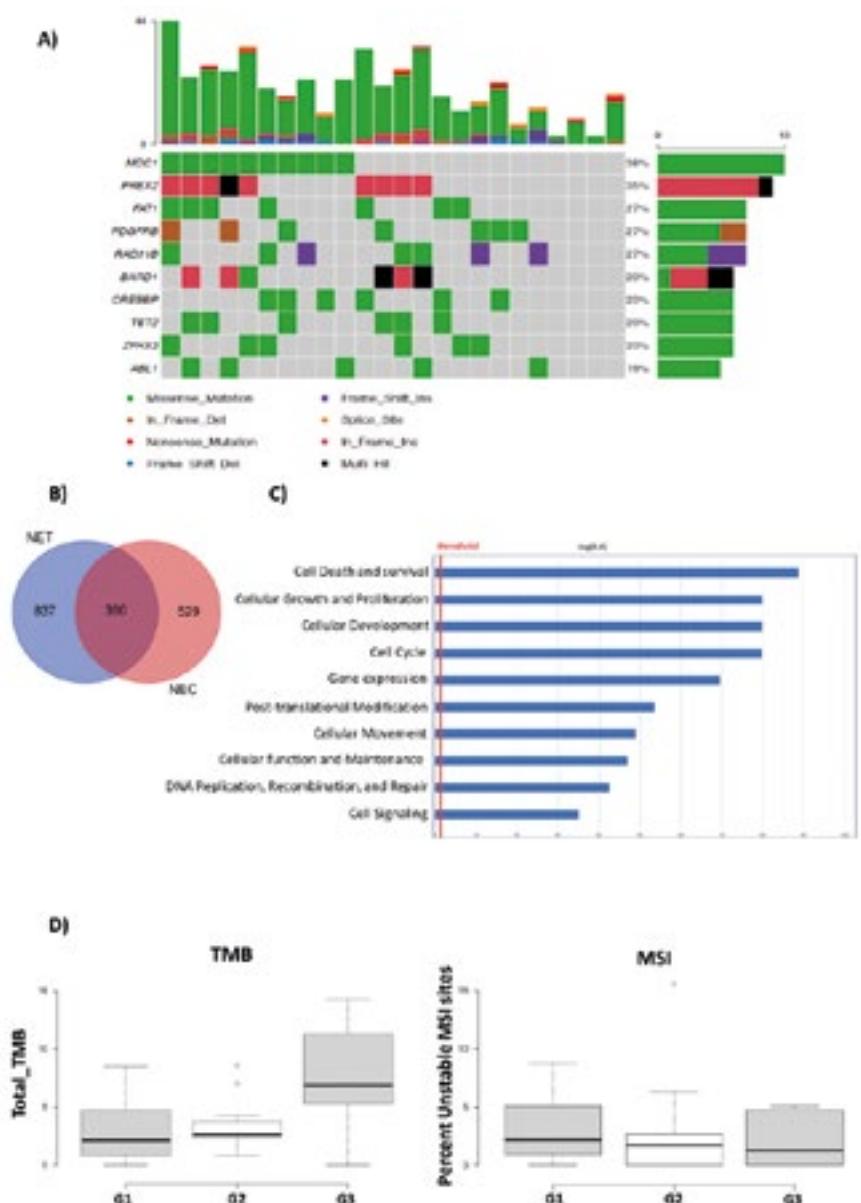


Figura 3

A) Oncoplot dei 10 geni principalmente mutati nei campioni analizzati
B) Diagramma di Venn dei geni mutati comuni tra NET e NEC
C) Analisi delle funzioni dei geni mutati comuni tra NET e NEC
D) Boxplot che rappresentano rispettivamente i livelli di TMB e MSI nei diversi set di campioni

CONCLUSIONI

La caratterizzazione molecolare dei NET, mediante l'applicazione di tecnologie di genomica e trascrittomico, ci ha permesso di definire le alterazioni genetiche che si verificano nei tessuti neoplastici, in generale, e con l'aumentare dell'aggressività del tumore. Una integrazione funzionale dei dati ci permetterà di individuare candidati biomarcatori, utili per migliorare la diagnosi e l'approccio terapeutico attraverso la predizione delle vie di trasduzione maggiormente influenzate e dei farmaci già in commercio che le bersagliano.

Annamaria Salvati, Viola Melone, Valeria Mirici Cappa, Jessica Lamberti, Domenico Memoli, Giovanni Pecoraro, Assunta Sellitto, Giorgio Giurato, Giovanni Nassa, Francesca Rizzo, Alessandro Weisz, Roberta Tarallo

Laboratorio di Medicina Molecolare e Genomica, Dipartimento di Medicina, Chirurgia ed Odontoiatria "Scuola Medica Salernitana", Università di Salerno, 84081 Baronissi (SA), Italia

Referenze

Cairns, J., J. N. Ingle, K. R. Kalari, L. E. Shepherd, M. Kubo, M. P. Goetz, R. M. Weinshilboum and L. Wang (2019). "The lncRNA MIR2052HG regulates ERα levels and aromatase inhibitor resistance through LMTK3 by recruiting EGFR." *Breast Cancer Res* 21(1): 47.

Chan, T. A., M. Yarchoan, E. Jaffee, C. Swanton, S. A. Quezada, A. Stenzinger and S. Peters (2019). "Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: utility for the oncology clinic." *Ann Oncol* 30(1): 44-56.

Ferolla, P., A. Faggiano, G. Mansuetto, N. Avenia, M. G. Cantelmi, P. Giovenali, M. L. Del Basso De Caro, F. Milone, G. Scarpelli, S. Masone, F. Santeusanio, G. Lombardi, G. Angeletti and A. Colao (2008). "The biological characterization of neuroendocrine tumors:

the role of neuroendocrine markers." *J Endocrinol Invest* 31(3): 277-286.

Fraenkel, M., M. K. Kim, A. Faggiano and G. D. Valk (2012). "Epidemiology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 26(6): 691-703.

Goksu, S. Y., M. Ozer, S. M. A. Kazmi, N. N. Sanford, T. A. Aguilera, C. Ahn, D. Hsiehchen, A. Sanjeevaiah, L. Khosama, J. Bleeker, M. Atiq and M. S. Beg (2020). "Distinct Clinical Characteristics in Young-Onset Pancreatic Neuroendocrine Tumor." *Cancers (Basel)* 12(9).

González-Sánchez, P., J. Satrústegui, F. Palau and A. Del Arco (2019). "Calcium Deregulation and Mitochondrial Bioenergetics in GDAP1-Related CMT Disease." *Int J Mol Sci* 20(2).

Hu, X., Y. Zhai, R. Shi, Y. Qian, H. Cui, J. Yang, Y. Bi, T. Yan, Y. Ma, L. Zhang, Y. Liu, G. Li, M. Zhang, Y. Cui, P. Kong and X. Cheng (2018). "FAT1 inhibits cell migration and invasion by affecting cellular mechanical properties in esophageal squamous cell carcinoma." *Oncol Rep* 39(5): 2136-2146.

Lamberts, S. W., L. J. Hofland and F. R. Nobels (2001). "Neuroendocrine tumor markers." *Front Neuroendocrinol* 22(4): 309-339.

Ohmoto, A., Y. Sato, R. Asaka, N. Fukuda, X. Wang, T. Urasaki, N. Hayashi, K. Nakano, M. Yunokawa, M. Ono, J. Tomomatsu, T. Toshiyasu, H. Mitani, K. Takeuchi, S. Mori and S. Takahashi (2021). "Clinicopathological and genomic features in patients with head and neck neuroendocrine carcinoma." *Mod Pathol*.

Oronsky, B., P. C. Ma, D. Morgensztern and C. A. Carter (2017). "Nothing But NET: A Review of Neuroendocrine Tumors and Carcinomas." *Neoplasia* 19(12): 991-1002.

Rosenfeldt, H., J. Vázquez-Prado and J. S. Gutkind (2004). "P-REX2, a novel PI-3-kinase sensitive Rac exchange factor." *FEBS Lett* 572(1-3): 167-171.

Simbolo, M., M. Bilotta, A. Mafficini, C. Luchini, D. Furlan, F. Inzani, G. Petrone, D. Bonvissuto, S. La Rosa, G. Schinzari, A. Bianchi, E. Rossi, R. Menghi, F. Giulante, S. Boccia, A. Scarpa and G. Rindi (2021). "Gene Expression Profiling of Pancreas Neuroendocrine Tumors with Different Ki67-Based Grades." *Cancers (Basel)* 13(9).

Stewart, G. S., B. Wang, C. R. Bignell, A. M. Taylor and S. J. Elledge (2003). "MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint." *Nature* 421(6926): 961-966.

Travis, W. D., E. Brambilla, A. P. Burke, A. Marx and A. G. Nicholson (2015). "Introduction to The 2015 World Health Organization Classification of Tumors of the

Lung, Pleura, Thymus, and Heart." *J Thorac Oncol* 10(9): 1240-1242.

Waddell, N., M. Pajic, A. M. Patch, D. K. Chang, K. S. Kassahn, P. Bailey, A. L. Johns, D. Miller, K. Nones, K. Quek, M. C. Quinn, A. J. Robertson, M. Z. Fadlullah, T. J. Bruxner, A. N. Christ, I. Harliwong, S. Idrisoglu, S. Manning, C. Nourse, E. Nourbakhsh, S. Wani, P. J. Wilson, E. Markham, N. Cloonan, M. J. Anderson, J. L. Fink, O. Holmes, S. H. Kazakoff, C. Leonard, F. Newell, B. Poudel, S. Song, D. Taylor, S. Wood, Q. Xu, J. Wu, M. Pinse, M. J. Cowley, H. C. Lee, M. D. Jones, A. M. Nagrial, J. Humphris, L. A. Chantrill, V. Chin, A. M. Steinmann, A. Mawson, E. S. Humphrey, E. K. Colvin, A. Chou, C. J. Scarlett, A. V. Pinho, M. Giry-Laterriere, I. Rooman, J. S. Samra, J. G. Kench, J. A. Pettitt, N. D. Merrett, C. Toon, K. Epari, N. Q. Nguyen, A. Barbour, N. Zeps, N. B. Jamieson, J. S. Graham, S. P. Niclou, R. Bjerkvig, R. Grützmann, D. Aust, R. H. Hruban, A. Maitra, C. A. Iacobuzio-Donahue, C. L. Wolfgang, R. A. Morgan, R. T. Lawlor, V. Corbo, C. Bassi, M. Falconi, G. Zamboni, G. Tortora, M. A. Temporo, A. J. Gill, J. R. Eshleman, C. Pilarsky, A. Scarpa, E. A. Musgrave, J. V. Pearson, A. V. Biankin, S. M. Grimmond and A. P. C. G. Initiative (2015). "Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer." *Nature* 518(7540): 495-501.

Yang, M. H., C. H. Yen, Y. F. Chen, C. C. Fang, C. H. Li, K. J. Lee, Y. H. Lin, C. H. Weng, T. T. Liu, S. F. Huang, B. T. Teh and Y. A. Chen (2019). "Somatic mutations of PREX2 gene in patients with hepatocellular carcinoma." *Sci Rep* 9(1): 2552.

Zatelli, M. C., M. Torta, A. Leon, M. R. Ambrosio, M. Gion, P. Tomasetti, F. De Braud, G. Delle Fave, L. Dogliotti, E. C. degli Uberti and I. C. W. Group (2007). "Chromogranin A as a marker of neuroendocrine neoplasia: an Italian Multicenter Study." *Endocr Relat Cancer* 14(2): 473-482.

Analisi dei miRNA come possibili biomarcatori per la diagnosi dei tumori neuroendocrini

ABSTRACT

I tumori neuroendocrini (NET) rappresentano un gruppo eterogeneo di neoplasie rare, con caratteristiche biologiche e cliniche diverse. Al momento, gli unici fattori predittivi nella prognosi e nella diagnosi di queste malattie sono rappresentati dal grado della neoplasia, strettamente associato all'indice di proliferazione cellulare Ki67, e dall'espressione alterata della cromogranina A (CgA). Per tale motivo, è prioritaria l'identificazione di metodi innovativi per la diagnosi clinica dei NET. In questo studio, partendo dall'analisi di dati di sequenziamento dei piccoli RNA non codificanti (smallRNA-Seq) prodotti da una coorte di NET, è stato possibile identificare specifici miRNA la cui espressione differenziale corrella con l'aggressività/grado di questi tumori. Gli stessi miRNA identificati, sono stati dosati nel siero di pazienti affetti da NET contro una popolazione controllo, al fine di determinare il loro potenziale diagnostico. Ciò potrebbe rappresentare un potenziale vantaggio nella classificazione istopatologica e nella diagnosi dei NET, apre la strada a nuovi approcci terapeutici personalizzati.

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni si è sempre più diffuso il concetto di biopsia liquida, che prevede la rilevazione di tumori attraverso la ricerca di biomarcatori circolanti in fluidi biologici, come il sangue. Nell'ambito clinico ciò rappresenta un grande vantaggio, fornendo la possibilità di rilevare e caratterizzare i tumori in modo poco invasivo ed altamente riproducibile. Nell'ambito della biopsia liquida, ciò che è importante è identificare combinazioni specifiche di marcatori che segnalano lo stato, l'origine e la progressione di un cancro, in modo da facilitarne la diagnosi e l'approccio terapeutico.

Nel sangue sono presenti diverse molecole e nanoparticelle, come cellule circolanti, piastrine, vescicole extracellulari, mRNA, microRNA, proteine e DNA circolante (cfDNA) (Chen and Zhao 2019).

Per ciò che concerne i nuovi potenziali biomarcatori, i microRNA (miRNA) rappresentano validi candidati. Essi costituiscono una classe di piccoli RNA non codificanti in grado di regolare l'espressione genica a livello post-trascrizionale, inibendo la traduzione di specifici mRNA bersaglio (Berindan-Neagoe, Monroig et al. 2014). L'azione dei miRNA è coinvolta nella regolazione di diversi processi cellulari, tra cui proliferazione, migrazione, apoptosis e differenziamento. È stata inoltre ampiamente documentata in letteratura la loro funzione nella cancerogenesi e nella modulazione dell'aggressività dei tumori (Calin,

Ferracin et al. 2005).

In questo studio ci si è focalizzati sull'identificazione di nuovi biomarcatori per il riconoscimento dei tumori neuroendocrini (NET). Questi rappresentano una classe di neoplasie rare ed eterogenee, che originano dalle cellule del sistema neuroendocrino diffuso (Klöppel 2017). Data la distribuzione ubiquitaria di queste ultime all'interno dell'organismo, i NET possono insorgere in diversi organi, per lo più localizzati nel tratto digerente e respiratorio (Oronsky, Ma et al. 2017).

L'ultima classificazione WHO 2010 definisce che i NET possono essere classificati, in base al grado di differenziamento e all'indice proliferativo (Ki67), in due categorie principali: NET, di grado G1 e G2, ben differenziati ad indice proliferativo basso – intermedio (Ki67<20) e NEC, di grado G3, ad alto indice proliferativo (Ki67>20) (Fraenkel, Kim et al. 2012). Le specifiche caratteristiche di ogni gruppo si riflettono in una prognosi ed in un approccio terapeutico diverso. I NET possono insorgere nell'ambito di sindromi neoplastiche ereditarie che si verificano a causa di mutazioni sia in oncogeni che in oncosoppressori come MEN-1, VHL, NF1, TSC, SDH e RET (Anlauf, Garbrecht et al. 2007).

Attualmente la cromogranina-A (CgA) rappresenta il biomarcatore d'elezione per questo tipo di patologie. Tuttavia, quest'ultima possiede bassa specificità ed univocità nel riconoscimento della sola natura neuroendocrina dei NET (Lamberts, Hofland et al. 2001, Ferolla, Faggiano et al. 2008). Inoltre nei NEC di grado G3, la perdita del differenziamento neuroendocrino si accompagna ad una riduzione dell'espressione di CgA (Zatelli, Torta et al. 2007). Tutto ciò rende necessaria l'identificazione di nuovi marcatori molecolari da aggiungere all'analisi istopatologica per una classificazione più accurata del grado della neoplasia. Ad esempio, è stato osservato che l'espressione di PD-L1, nei NET, aumenta all'aumentare del grado, suggerendone un utilizzo finalizzato sia all'identificazione del grado della neoplasia che alla implementazione di terapie mirate (Cavalcanti, Armentano et al. 2017).

Nel caso dei NET, i dati sull'espressione dei miRNA, sia nel tessuto tumorale che nel plasma/siero dei pazienti, sono davvero limitati e riguardano principalmente i NET pancreatici (Cavalcanti, Galleggiante et al. 2020). Lo scopo di questo studio è stato caratterizzare il profilo di espressione differenziale dei miRNA, nei tessuti tumorali, in correlazione al grado, così da identificarne alcuni specifici, utili a definire una classificazione istopatologica corretta del grado della neoplasia e che possano essere facilmente rilevati anche nel sangue del paziente. Infatti, l'alterata espressione dei miRNA circolanti descritta nei NET (Malczewska, Kidd et al. 2018, Donati, Ciuffi et al. 2020, Galuppini, Censi et al. 2021) aumenta la loro potenziale utilità come biomarcatori nella valutazione della diagnosi, prognosi o risposta al trattamento.

METODI E RISULTATI

I campioni utilizzati per l'analisi comprendono 26 NET gastro-entero-pancreatici (GEP-NET) di alto e basso grado, sia NET di grado G1 e G2, che NEC di grado G3 (Tab. 1).

Lo studio si pone come obiettivo la caratterizzazione dei profili

di espressione dei miRNA all'interno della coorte di campioni raccolti, utilizzando metodiche di Next Generation Sequencing (NGS) associate ad analisi bioinformatiche (Fig. 1).

Grado	Campioni (n)	Tessuto d'origine
G1	11	Ileo
		Fegato
		Pancreas
		Colon
		Pancreas MEN1
G2	9	Polmone
		Pancreas
		Intestino Tenue
		Duodeno
		Ileo
G3	6	Linfonodo mediastino
		Fegato (MTX)
		Appendice
		Linfonodo ascellare
		Colon

Table 1 Campioni utilizzati per l'analisi

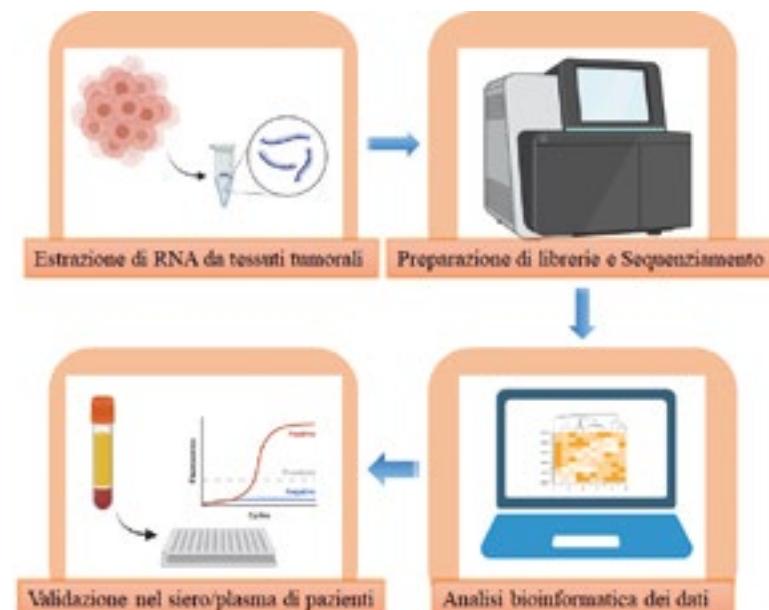


Figura 1 Flusso di lavoro a partire dall'estrazione dell'RNA dai tessuti tumorali, preparazione e sequenziamento delle librerie, analisi bioinformatica dei dati e validazione di miRNA nel siero dei pazienti (<https://biorender.com/>)

ANALISI GLOBALE DELL'ESPRESSIONE DEI MIRNA NEI TESSUTI TUMORALI

La generazione delle librerie di sequenziamento è stata eseguita utilizzando il kit NEXTFLEX Small RNA-Seq Kit v3 della PerkinElmer. L'analisi dei dati di sequenziamento, attraverso l'utilizzo del software iSmart (Panero, Rinaldi et al. 2017), ha portato all'identificazione, considerando un valore di mediana di read counts maggiore di 0, di 718 miRNA in NET G1, 697 in NET G2 e 793 in NEC G3. Di questi, 600 miRNA sono espressi in comune in tutti i tessuti analizzati, indipendentemente dal grado della neoplasia (Fig. 2A). Tra i TOP100 espressi è stato identificato il mir-375, già descritto come potenziale biomarcatore nei NET (Arvidsson, Rehammar et al. 2018). Parallelamente ai tessuti tumorali, è stato effettuato il sequenziamento dell'RNA estratto da un campione di siero derivante da uno stesso paziente con NET pancreatico di grado G2. In quest'ultimo è stata confermata l'espressione di 232 miRNA, rispetto agli 834 rilevati nel tessuto; incrociando le liste, 209 miRNA sono risultati espressi sia nel siero che nel tessuto (Fig. 2B).

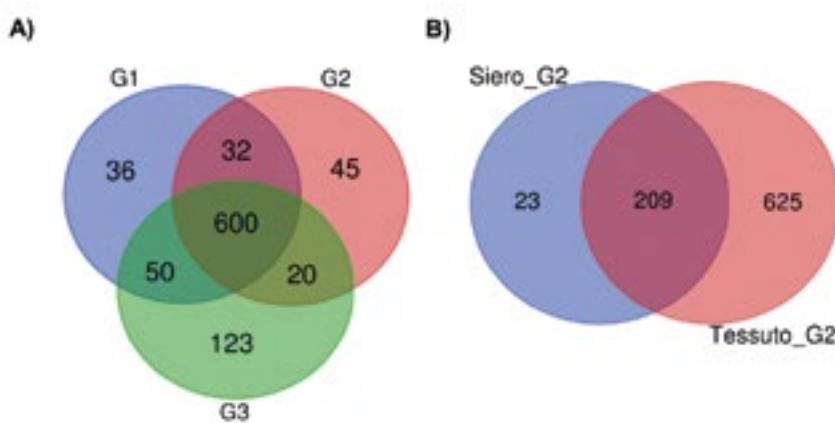
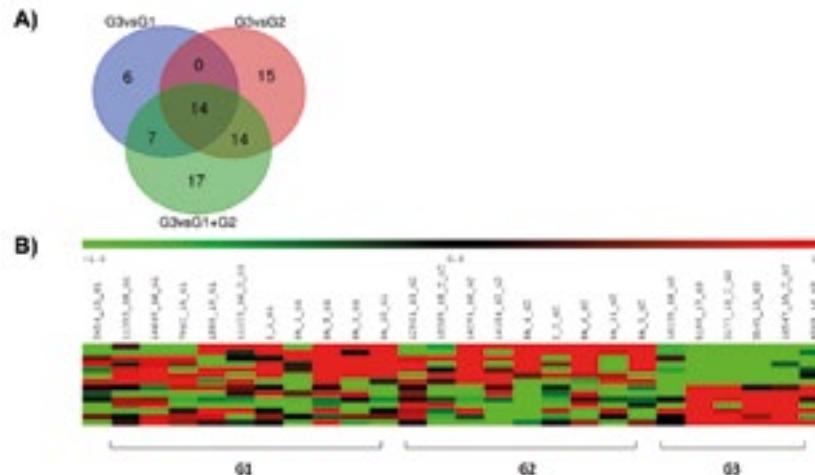


Figura 2
A) Diagramma di Venn dei miRNA identificati nei campioni con diversi gradi
B) Diagramma di Venn dei miRNA espressi nel campione di siero sequenziato e nel tessuto dello stesso paziente

ANALISI DIFFERENZIALE DEI MIRNA BASATA SUL KI67

L'analisi differenziale è stata effettuata in correlazione al diverso grado di differenziazione/aggressività dei tumori presi in esame, dunque in base all'indice di proliferazione cellulare Ki67 come fatto già in altri studi (Cavalcanti, Galleggiante et al. 2020). L'analisi dei dati ha mostrato la presenza di 14 miRNA differenzialmente espressi tra NET e NEC (Fig. 3A). Dei miRNA differenzialmente espressi, 9 risultano up-regolati nei NEC mentre 7 sono up-regolati nei NET (Fig. 3B). Dei 7 miRNA up-regolati nei NET, è stata accertata la presenza di 4 di essi nel campione di siero che è stato sequenziato.



VALIDAZIONE DIAGNOSTICA DEI MIRNA CIRCOLANTI

I miRNA differentemente espressi tra NET e NEC e alcuni presenti tra i top espressi comuni in tutti campioni sono stati scelti per la validazione nel siero di pazienti affetti da tali neoplasie al fine di valutare, quale tra queste molecole, fosse significativamente idonea a discriminare una condizione patologica da una normale. Dei 20 miRNA scelti è stata valutata l'espressione su campioni ematici di pazienti affetti da diverse tipologie di NET (pancreatici sporadici, pancreatici da soggetti con sindrome genetica MEN1 e carcinomi midollari della tiroide) verso una popolazione di soggetti controllo. L'estrazione dei miRNA circolanti, su campioni di siero, è stata condotta complessivamente su una coorte indipendente di 69 soggetti suddivisi in 35 affetti e 34 controllo. Le specifiche neoplasie dei soggetti affetti da NET sono riportate in tabella 2.

L'analisi di espressione, determinata mediante tecniche di RT-qPCR, ha identificato alcuni miRNA circolanti in grado di discriminare, significativamente, la popolazione dei soggetti patologici da quella dei soggetti controllo (Figura 4). In figura 5A, invece, si riporta come la distribuzione, in termine di espressione relativa, dei miRNA significativamente deregolati nei soggetti affetti rispetto alla popolazione di individui sani, possa variare in base al tipo di NET. In figura 5B si riporta per ciascun miRNA il valore di significatività della sua deregolazione in correlazione alla neoplasia.

Paziente (n)	Patologia
22	MEN1
6	CMT
7	pNET

Tabella 2 Caratteristiche patologiche dei pazienti reclutati per l'analisi di espressione dei miRNA circolanti. MEN1: neoplasia endocrina multipla di tipo 1; CMT: carcinoma midolare della tiroide; pNET: tumore neuroendocrino del pancreas.

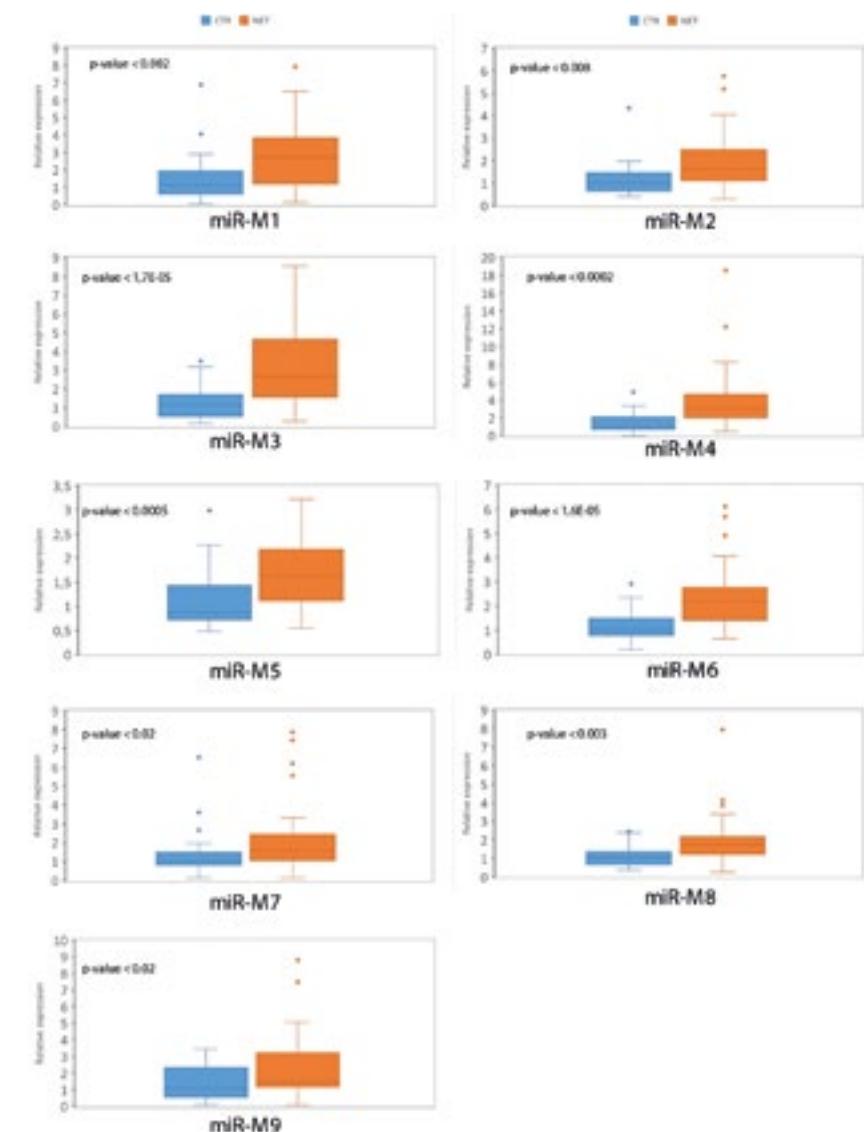
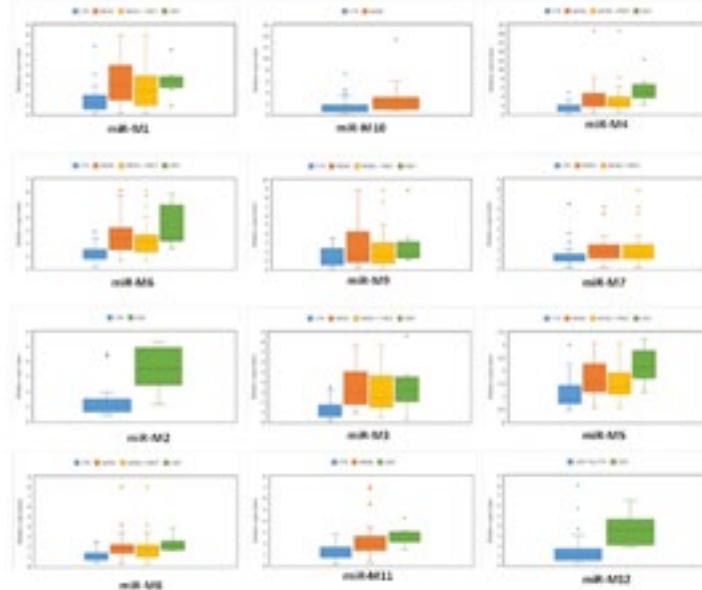


Figura 4 Espressione relativa dei miRNA circolanti, significativamente deregolati ($p\text{-value} \leq 0.05$) tra le due condizioni (sano-malato). CTR: controllo; NET: tumori neuroendocrini.

A)



B)

	p-value		
	MEN1	MEN1+pNET	CMT
miR-M1	0.0012	0.0095	0.0062
miR-M10	0.0347	ns	ns
miR-M2	ns	ns	1.93E-05
miR-M3	6.38E-07	2.60E-05	0.0003
miR-M4	0.0006	0.0013	6.68E-07
miR-M5	0.0016	0.0039	0.0001
miR-M6	7.42E-06	6.99E-05	6.22E-06
miR-M8	0.0027	0.0102	0.0001
miR-M9	0.0101	0.0277	0.0094
miR-M11	0.0008	ns	0.0001
miR-M12	ns	ns	0.006
miR-MT	0.0287	0.0201	ns

Figura 5

A) Distribuzione patologica dei miRNA circolanti significativamente deregolati tra le due condizioni (sano-malato).

B) Significatività in termini di p-value ≤ 0.05 di ciascun miRNA deregolato verso il tipo di NET.

ns: non significativo

CONCLUSIONI

I GEP-NET sono un gruppo eterogeneo di tumori con diversa prognosi e diversa risposta ai trattamenti. Per queste neoplasie la valutazione istopatologica rappresenta un momento cruciale, che necessita un miglioramento della specificità. Attualmente i metodi noti non lo permettono e per questo motivo è necessario trovare nuovi biomarcatori in grado di discriminare la diversa aggressività dei NET. Allo stesso modo, l'identificazione di molecole circolanti in grado di fare diagnosi di NET e di discriminare tra i diversi NET rappresenta ad oggi un "unmet medical needs". I miRNA sono validi candidati per assumere questi compiti in quanto particolarmente stabili nei fluidi biologici (Filipów and Łaczmański

2019). In questo lavoro è stato identificato un pool di miRNA in grado di discriminare i NET dai NEC. Questi miRNA sono stati testati nella loro espressione anche in campioni di siero di soggetti affetti da NET rispetto ad una popolazione di individui sani. I dati ottenuti hanno dimostrato che alcuni di essi sono in grado di discriminare la condizione patologica da quella normale e si distribuiscono nella popolazione dei NET analizzati (MEN1, CMT e pNET) in maniera differente. Inoltre, l'analisi dei dati con un software alternativo, recentemente implementato, permetterà di identificare eventuali altre specie di piccoli RNA da poter monitorare (Geles, Palumbo et al. 2021). Futuri studi verranno effettuati per valutarne l'efficacia in ambito clinico.

Viola Melone¹, Valeria Mirici Cappa¹, Elena Alexandrova¹, Teresa Rocco¹, Giorgio Giurato¹, Roberta Iorio¹, Giovanna Maria Ventola¹, Giovanni Pecoraro¹, Simona Marino¹, Anna Truda¹, Raffaella Mastrocinque¹, Angela Cordella¹, Giovanna Marchese¹, Mariarosaria Incoronato², Marco Salvatore², Maria Ravo¹, Alessandro Weisz¹, Roberta Tarallo¹

¹ - Genomix4Life Srl, Via S. Allende 43/L, 84081 Baronissi (SA), Italia

² - SDN spa, Via Gianturco 113, 80143 Napoli (NA), Italia

Referenze

- Anlauf, M., N. Garbrecht, J. Bauersfeld, A. Schmitt, T. Henopp, P. Komminoth, P. U. Heitz, A. Perren and G. Klöppel (2007). "Hereditary neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system." *Virchows Arch* 451 Suppl 1: S29-38.
- Arvidsson, Y., A. Rehammar, A. Bergström, E. Andersson, G. Altiparmak, C. Swärd, B. Wängberg, E. Kristiansson and O. Nilsson (2018). "miRNA profiling of small intestinal neuroendocrine tumors defines novel molecular subtypes and identifies miR-375 as a biomarker of patient survival." *Mod Pathol* 31(8): 1302-1317.
- Berindan-Neagoe, I., P. e. C. Monroig, B. Pasculli and G. A. Calin (2014). "MicroRNAome genome: a treasure for cancer diagnosis and therapy." *CA Cancer J Clin* 64(5): 311-336.
- Cavalcanti, E., R. Armentano, A. M. Valentini, M. Chieppa and M. L. Caruso (2017). "Role of PD-L1 expression as a biomarker for GEP neuroendocrine neoplasm grading." *Cell Death Dis* 8(8): e3004.
- Cavalcanti, E., V. Galleggiante, S. Coletta, E. Stasi, M. Chieppa, R. Armentano and G. Serino (2020). "Altered miRNAs Expression Correlates With Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors Grades." *Front Oncol* 10: 1187.

Chen, M. and H. Zhao (2019). "Next-generation sequencing in liquid biopsy: cancer screening and early detection." *Hum Genomics* 13(1): 34.

Donati, S., S. Ciuffi, F. Marini, G. Palmini, F. Miglietta, C. Aurilia and M. L. Brandi (2020). "Multiple Endocrine Neoplasia Type 1: The Potential Role of microRNAs in the Management of the Syndrome." *International Journal of Molecular Sciences* 21(20).

Ferolla, P., A. Faggiano, G. Mansueti, N. Avenia, M. G. Cantelmi, P. Giovenali, M. L. Del Basso De Caro, F. Milone, G. Scarpelli, S. Masone, F. Santeusanio, G. Lombardi, G. Angeletti and A. Colao (2008). "The biological characterization of neuroendocrine tumors: the role of neuroendocrine markers." *J Endocrinol Invest* 31(3): 277-286.

Filipów, S. and L. Łaczmański (2019). "Blood Circulating miRNAs as Cancer Biomarkers for Diagnosis and Surgical Treatment Response." *Front Genet* 10: 169.

Fraenkel, M., M. K. Kim, A. Faggiano and G. D. Valk (2012). "Epidemiology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 26(6): 691-703.

Galuppini, F., S. Censi, M. Moro, S. Carraro, M. Sbaraglia, M. Iacobone, M. Fassan, C. Mian and G. Pennelli (2021). "MicroRNAs in Medullary Thyroid Carcinoma: A State of the Art Review of the Regulatory Mechanisms and Future Perspectives." *Cells* 10(4).

Geles, K., D. Palumbo, A. Sellitto, G. Giurato, E. Cianfalone, D. Torella, V. Mirici Cappa,

G. Nassa, R. Tarallo, A. Weisz and F. Rizzo (2021). WIND (Workflow for pIRNAs aNd beyonD): a strategy for in-depth analysis of small RNA-seq data. *F1000Research*.

Klöppel, G. (2017). "Neuroendocrine Neoplasms: Dichotomy, Origin and Classifications." *Visc Med* 33(5): 324-330.

Lamberts, S. W., L. J. Hofland and F. R. Nobels (2001). "Neuroendocrine tumor markers." *Front Neuroendocrinol* 22(4): 309-339.

Malczewska, A., M. Kidd, S. Matar, B. Kos-Kudla and I. M. Modlin (2018). "A Comprehensive Assessment of the Role of miRNAs as Biomarkers in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors." *Neuroendocrinology* 107(1): 73-90.

Oronsky, B., P. C. Ma, D. Morgensztern and C. A. Carter (2017). "Nothing But NET: A Review of Neuroendocrine Tumors and Carcinomas." *Neoplasia* 19(12): 991-1002.

Panero, R., A. Rinaldi, D. Memoli, G. Nassa, M. Ravo, F. Rizzo, R. Tarallo, L. Milanesi, A. Weisz and G. Giurato (2017). "iSmaRT: a toolkit for a comprehensive analysis of small RNA-Seq data." *Bioinformatics* 33(24): 4050.

Zatelli, M. C., M. Torta, A. Leon, M. R. Ambrosio, M. Gion, P. Tomassetti, F. De Braud, G. Delle Fave, L. Dogliotti, E. C. degli Uberti and I. C. W. Group (2007). "Chromogranin A as a marker of neuroendocrine neoplasia: an Italian Multicenter Study." *Endocr Relat Cancer* 14(2): 473-482.

Una Soluzione per la Gestione della Privacy dei Dati Medico/Clinici

ABSTRACT

Nell'ambito della gestione di dati estremamente sensibili, quali ad esempio i risultati dei test clinici derivanti da biopsie tumorali e liquide, emergono diverse problematiche di privacy e sicurezza individuali. I processi di estrazione ed analisi dei dati, finalizzati alla ricerca ed alla disseminazione, prevedono a monte fasi di anonimizzazione, gestione e protezione dei dati sensibili nel rispetto di tutte le normative in materia.

Ma dai casi di studio e dalle pubblicazioni di ricerca emerge chiaramente che non è semplice anonomizzare un ampio insieme di dati personali mantenendo al contempo il contenuto informativo utile per successive attività. Ad esempio, un insieme di dati considerato anonimo potrebbe essere combinato con un altro insieme di dati in maniera tale da consentire l'identificazione di una o più persone.

In questo contributo, inserito nell'ambito delle attività finanziate dal progetto RarePlatNet, verrà fornita al lettore una panoramica degli attuali sistemi di anonimizzazione e sarà presentata una soluzione basata su tecniche allo stato dell'arte.

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni abbiamo assistito ad un aumento esponenziale dei dati clinici e sanitari disponibili in forma elettronica e digitale ma la loro condivisione con il pubblico ed il mondo scientifico non ha proceduto di pari passo. Difatti i dati sanitari, essendo particolarmente delicati a causa del contenuto legato alle informazioni personali di medici e pazienti, non sono subito e facilmente accessibili a causa delle restrizioni sulla privacy imposte dai vari enti regolatori, siano essi nazionali, sovranazionali o internazionali.

Di conseguenza le cosiddette informazioni sanitarie protette (dall'inglese *Protected Health Information*, abbreviato in PHI) devono essere necessariamente sottoposte ad un processo di elaborazione che consenta di (1) identificare le informazioni sensibili contenute quindi (2) classificarle opportunamente a seconda della tipologia a cui essi appartengono (ad esempio nomi di persona, di luoghi oppure organizzazioni, o ancora età o numeri identificativi, e così via) ed infine (3) anonomizzarle: quest'ultimo passaggio, qualora il secondo passo fosse omesso, potrebbe consistere brutalmente nella cancellazione o nell'oscuramento di quanto individuato oppure in maniera più raffinata, sfruttando il secondo passo, sostituendo quanto individuato con un opportuno surrogato e lasciando inalterata la leggibilità e la consultabilità dei testi in questo modo anonomizzati.

Lavorando nel rispetto del concetto di dati personali introdotto dal Regolamento generale sulla protezione dei dati (GDPR, dall'inglese

General Data Protection Regulation) dell’Unione Europea è possibile migliorare e rendere compatibili con gli aspetti normativi tali sistemi di anonimizzazione, in modo da rilasciare velocemente i dati al pubblico cosicché possano essere sfruttati in maniera opportuna come, ad esempio, a fini di ricerca.

PROCESSI DI GESTIONE DELLA PRIVACY

Il processo di gestione della privacy può essere visto in due fasi, una di identificazione e una di anonimizzazione. Una opportuna fase di identificazione e classificazione delle entità di interesse permette di sostituire tali entità con dei surrogati piuttosto che eliminarli, preservando la leggibilità e comprensibilità dei testi, nonché rendendo maggiormente improbabile l’individuazione dei punti in cui tale sostituzione è avvenuta (Vincze, 2014). Pertanto, un buon sistema di anonimizzazione deve essere capace di (1) preservare la leggibilità del testo e (2) mascherare efficacemente i punti in cui è avvenuta una sostituzione attraverso surrogato grazie ad un’efficace classificazione delle entità sensibili alla privacy.

MODELLI DI IDENTIFICAZIONE

I primi modelli di identificazione hanno sfruttato regole artigianali per identificare le entità, risultando semplici da implementare ma meno flessibili sia per quanto riguarda il contesto che i cambiamenti di lingua. Poi sono stati sviluppati sistemi basati sul *Machine Learning* per addestrare un classificatore a riconoscere le entità e classificarle, richiedendo però grandi insiemi di dati etichettati e tempo per effettuare l’ingegneria delle caratteristiche. Recentemente sono stati introdotti i sistemi basati sul *Deep Learning* per eseguire l’etichettatura delle sequenze, quindi identificare e classificare le entità, facendo leva su grandi moli di dati per imparare sia le caratteristiche giuste da usare che la migliore rappresentazione delle parole in uno spazio vettoriale, nota in lingua inglese come *embedding*.

In particolare, la problematica è stata inquadrata da un punto di vista tecnico all’interno dei compiti di Riconoscimento dell’Entità Nominata (dall’inglese *Named Entity Recognition*, abbreviato NER), in cui le entità nominate sono per l’appunto i termini da identificare e classificare correttamente. Gli approcci descritti sono ampiamente documentati da (Meystre, 2010) e (Stubbs, 2015).

MODELLI DI ANONIMIZZAZIONE

I modelli di anonimizzazione hanno come riferimento le seguenti tre criticità: I) individuazione: la possibilità di isolare alcuni o tutti i dati che identificano una persona all’interno dell’insieme di dati; II) correlabilità: la possibilità di correlare almeno due dati concernenti la medesima persona interessata o un gruppo di persone interessate (nella medesima banca dati o in due diverse banche dati). Se si individuano dati correlati come assegnati allo stesso gruppo di persone ma non si è in grado di identificare una persona specifica, vi è protezione da individuazione ma non da correlabilità; III) deduzione: la possibilità di desumere, con un alto grado di probabilità, il valore di un attributo dai valori di un

insieme di altri attributi.

Eliminare tali rischi consente di impedire la reidentificazione con mezzi che potrebbero essere utilizzati dal responsabile del trattamento e da altri. I principali approcci di anonimizzazione sono la randomizzazione e generalizzazione.

La randomizzazione modifica la veridicità dei dati, eliminando la forte correlazione tra dati e persona: le funzioni di randomizzazione introducono informazioni pseudocasuali (rumore) al fine di eliminare (o meglio attenuare) il legame associativo puntuale con la persona a cui si riferiscono.

Le tecniche di randomizzazione più usate: i) Utilizzo del rumore statistico: consiste nel modificare gli attributi contenuti nell’insieme di dati in modo tale da renderli meno accurati, mantenendo nel contempo la distribuzione generale; ii) Permutazione: si basa sul mescolare i valori degli attributi all’interno di una tabella in modo tale che alcuni di essi risultino artificialmente collegati a diverse persone interessate, è utile quando è importante mantenere l’esatta distribuzione di ciascun attributo all’interno dell’insieme di dati; III) Privacy differenziale: consiste nell’affiancare ad un insieme di dati statistico un altro insieme che differisce dal primo al più per un solo elemento, tale che le risposte alla stessa interrogazione su entrambi siano indistinguibili con probabilità prossima a uno.

La generalizzazione consiste nel generalizzare o diluire gli attributi degli individui interessati modificando la rispettiva scala o ordine di grandezza (vale a dire, una regione anziché una città, un mese anziché una settimana). Le tecniche di generalizzazione più comuni sono: la I) *k-anonymity* che si basa sull’idea che esistano tre tipologie di attributi nel record di un utente: gli Identificatori (I), che identificano in modo univoco il proprietario dei dati (come il nome e il cognome o il codice fiscale); i quasi-identificatori (QI), che possono identificare parzialmente un individuo in un dataset (è il caso del sesso o del codice di avviamento postale); gli attributi sensibili (SA), che sono le informazioni private da proteggere di un individuo (come eventuali malattie o il suo salario). Pertanto si definisce la *k-anonymity* come segue: un dataset T soddisfa la proprietà di *k-anonymity* se, per ogni record nel multiset T[QI], esistono almeno altri ($k-1$) record, i cui attributi QI hanno gli stessi valori; la II) *L-diversity*, diversamente dalla *k-anonymity*, richiede che ogni classe di equivalenza (un insieme di record che sono indistinguibili gli uni dagli altri rispetto a certi attributi) abbia i valori ben rappresentati per ogni attributo sensibile del dataset considerato, dunque la *k-anonymity* preserva gli attributi quasi sensibili mentre la *l-diversity* gli attributi sensibili della persona (Aggarwal, 2006); la III) T-Vicinanza che affina la *l-diversity* mirando a creare classi equivalenti che assomigliano alla distribuzione iniziale di attributi ed è utile quando è importante mantenere i dati quanto più possibile prossimi a quelli originali. Alla classe di equivalenza viene imposto un ulteriore vincolo: non solo devono esistere almeno un valore diverse all’interno di ogni classe di equivalenza, ma anche che ogni valore è rappresentato tante volte quante sono necessarie per rispecchiare la distribuzione iniziale di ciascun attributo.

LA SOLUZIONE PROPOSTA

Nella soluzione proposta si è tenuto conto degli aspetti formali e normativi sopra richiamati con l'obiettivo di mantenere un equilibrio tra la garanzia della protezione dei dati e la necessità di condivisione scientifica degli stessi.

Il sistema è in grado di gestire sia dati strutturati che non: in quest'ultimo caso il sistema d'identificazione preposto individua le entità sensibili alla privacy, e.g. le PHI, quindi si procede all'anonymizzazione attraverso un'opportuna cifratura dei dati. Il sistema di identificazione impiegato rientra tra quelli basati sul paradigma del *Deep Learning* come descritto in (Catelli, 2021) ed è stato realizzato attraverso una rete *Bi-Directional Long Short-Term Memory* seguita da una *Conditional Random Field* in breve Bi-LSTM + CRF (Huang, 2015), addestrata attraverso un dataset in lingua italiana. Come mostrato nella Figura 1, le parole in ingresso vengono trasformate in una concatenazione di *embedding* composta da *FastText* e *Flair*. Tale scelta è stata motivata dalla capacità degli *embedding* scelti di catturare informazioni nascoste nel linguaggio, come le analogie o la semantica delle parole, in particolare riescono a tenere conto del contesto in cui si trovano le parole, in modo da gestire meglio quelle rare o mai incontrate prima, le variazioni morfo-sintattiche tipiche del testo scritto a mano e la polisemia.

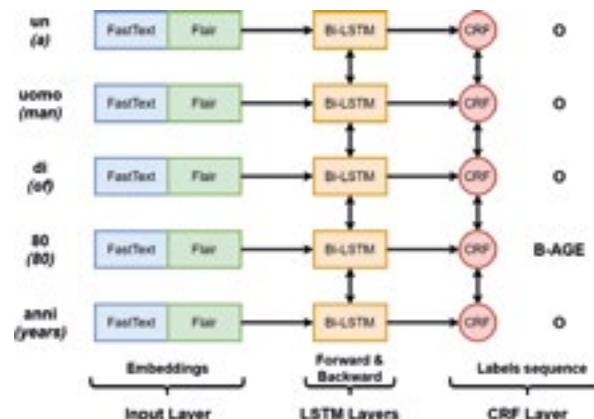


Figura 1 Architettura per l'identificazione delle PHI attraverso una rete neurale Bi-LSTM+CRF, tratta da (Catelli, 2021).

A valle del processo di identificazione delle PHI, il servizio di anonymizzazione permette di garantire la conservazione sicura, tramite la generazione di una chiave il cui unico proprietario è colui che richiede il servizio. Solo tramite la presentazione delle proprie credenziali e della chiave, si potrà avere la restituzione completa ed in chiaro dei dati anonimizzati. L'utente proprietario è anche l'unico che stabilisce, attraverso specifiche regole ed impostazioni fornite al servizio di anonymizzazione, quali informazioni e con quale visibilità (in chiaro, tutti ***, solo iniziali di parola, etc.) gli altri utenti della piattaforma possono usufruire dei dati.

Il servizio è stato progettato per essere usato sia come activity da

un utente di piattaforma che dai servizi di *backend* della stessa ed è stato sviluppato in maniera da ridurre gli impatti sulle performance computazionali.

A livello infrastrutturale, l'integrità e la protezione dei dati da accessi fraudolenti sono garantite attraverso anonymizzazione-crittazione dei dati già a livello di strutture dati (*BLOB Storage*). In dette strutture i dati sono criptati e decriptati con la *AES encryption* a 256 bit e le relative chiavi sono gestite e archiviate in un account *Key Vault* che le forniscono al *BLOB storage on demand* dopo aver verificato l'identità del richiedente. Solo utenti di tipo *system administrator* sono in grado di de-anonymizzare i dati, scongiurando quindi la possibilità di accessi fraudolenti o acquisizione dolosa di backup dei *BLOB*.

A livello operativo, infine, è stato implementato un livello di protezione per dare la possibilità agli utenti di piattaforma, ad esempio, di condividere dei dati per creare esperimenti.

CONCLUSIONI

In questo lavoro è stato presentato un sistema per le gestione delle problematiche di privacy e sicurezza dei dati personali con particolare riferimento a quelli prodotti da risultati dei test clinici derivanti da biopsie tumorali e liquide. In particolare, i processi di estrazione ed analisi dei dati per fini di ricerca e disseminazione sono stati filtrati attraverso procedure precedenti di anonymizzazione, per la gestione e protezione dei dati sensibili nel rispetto delle normative sulla privacy.

I casi di studio e le pubblicazioni in letteratura fanno emergere con chiarezza che la difficoltà con cui gli insiemi di dati personali possono essere resi anonimi è strettamente correlata alla necessità di mantenere intatte le informazioni per un loro successivo riutilizzo, motivo per cui combinare o semplicemente mischiare dati diversi per ridurre le possibilità di una successiva identificazione di uno o più individui è un'operazione da svolgere con cautela, prevedendo la possibilità di recuperare il contenuto informativo corretto di partenza.

In questo contributo, inserito nell'ambito delle attività del progetto RarePlatNet, è stato fornito al lettore una panoramica degli attuali sistemi di anonymizzazione ed è stata presentata una soluzione basata su tecniche allo stato dell'arte.

Rosario Catelli¹, Marco Avellino², Luca Lo Presti³, Vincenzo Borriello⁴, Francesco Gargiulo⁵

¹ - Istituto di Calcolo e Reti ad Alte Prestazioni (ICAR) del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), via Pietro Castellino, 111, Napoli, 80131

² - Sync Lab, Via G. Porzio, CDN is. B8 Napoli 80143

³ - Sync Lab, Via G. Porzio, CDN is. B8 Napoli 80143

⁴ - Technova scarl, Via G. Porzio, CDN is. C2 Napoli 80143,

⁵ - Istituto di Calcolo e Reti ad Alte Prestazioni (ICAR) del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), via Pietro Castellino, 111, Napoli, 80131

Referenze

Aggarwal, G., Panigrahy, R., Feder, T., Thomas, D., Kenthapadi, K., Khuller, S., & Zhu, A. (2010). Achieving anonymity via clustering. ACM Transactions on Algorithms (TALG), 6(3), 1-19.

Catelli, R., Gargiulo, F., Casola, V., De Pietro, G., Fujita, H., & Esposito, M. (2021). A novel covid-19 data set and an effective deep learning approach for the de-identification of Italian medical records. IEEE Access, 9, 19097-19110.

Huang, Z., Xu, W., & Yu, K. (2015). Bidirectional LSTM-CRF models for sequence tagging. arXiv preprint arXiv:1508.01991.

Meystre, S. M., Friedlin, F. J., South, B. R., Shen, S., & Samore, M. H. (2010). Automatic de-identification of textual documents in the electronic health record: a review of recent research. BMC medical research methodology, 10(1), 1-16.

Stubbs, A., Kotfila, C., & Uzuner, Ö. (2015). Automated systems for the de-identification of longitudinal clinical narratives: Overview of 2014 i2b2/UTHealth shared task Track 1. Journal of biomedical informatics, 58, S11-S19.

Vincze, V., & Farkas, R. (2014). De-identification in natural language processing. In 2014 37th International Convention on Information and Communication Technology, Electronics and Microelectronics (MIPRO) (pp. 1300-1303). IEEE.

Realizzazione di un software prototipale a supporto dell'accreditamento UNI EN ISO 2038:2020 “Biobanking - Requisiti generali per il biobanking”

INTRODUZIONE

Uno degli obiettivi del progetto RARE.PLAT.NET è stato la realizzazione di un sistema IT innovativo di supporto alle procedure di accreditamento previste dalla Norma **UNI EN ISO 20387:2020** Biotecnologie - “*Biobanking*” - *Requisiti generali per il “biobanking”*. In questo articolo viene descritta la progettazione e realizzazione di un software dedicato che ha visto in collaborazione due partner di progetto: Neatec SpA e Università Telematica San Raffaele Roma, sede di Acireale, Catania.

La biobanca è una organizzazione che fornisce un servizio di acquisizione, conservazione e altre attività, relative alla analisi e distribuzione di materiale biologico proveniente da entità organiche e utile ai fini della ricerca clinica, delle diagnosi e studi sulla biodiversità e ne gestisce le informazioni ed i relativi dati clinici.

I requisiti da soddisfare per l'accreditamento alla certificazione di “biobanca” sono redatti nella norma **UNI EN ISO 20387:2020** che è destinata a tutti gli operatori delle biobanche che conservano materiale biologico da organismi multicellulari (per esempio esseri umani, animali, funghi) e microorganismi, ai fini di ricerca e sviluppo biotecnologico.

Essa risponde all'esigenza dei settori di ricerca e sviluppo di avere a disposizione materiale biologico in grado di garantire la riproducibilità e la comparabilità dei risultati delle ricerche, assicurando, da parte delle biobanche, l'utilizzo di processi e procedure standard che consentano di tracciare il ciclo di vita dei materiali e dei loro dati.

La norma non si applica alle organizzazioni che trattano materiale biologico a uso terapeutico e destinato alla produzione di alimenti o mangimi, compresi i laboratori di analisi collegati.

Il soddisfacimento dei requisiti non si intende come certificazione della competenza tecnica della biobanca che richiede l'accreditamento o dei suoi sistemi di gestione, ma come valutazione formale della piena conformità alla norma.

L'accreditamento ha durata di anni 4 nell'arco dei quali la biobanca può essere sottoposta a verifiche sul mantenimento della conformità alla norma.

L'esigenza è quindi avere un applicativo che:

- supporti l'organizzazione nella individuazione e raccolta di quanto necessario a dimostrare la conformità ai requisiti della norma, per procedere alla richiesta di accreditamento;
- consenta la gestione e aggiornamento nel tempo dei dati per il mantenimento della conformità ai requisiti e conseguente mantenimento della certificazione.

PROGETTAZIONE DEL SOFTWARE

Per accedere all'accreditamento, la struttura operante deve poter garantire la conformità ai requisiti elencati nella norma **UNI EN ISO 20387:2020 dove sono state** individuate delle specifiche tipologie di requisiti cui ottemperare, raggruppandoli logicamente in:

- Requisiti generali
- Requisiti strutturali
- Requisiti relativi alle risorse
- Requisiti del processo
- Requisiti del sistema di gestione per la qualità

La biobanca deve garantire la conformità a tutti i requisiti indicati nella norma anche mediante la produzione di evidenze; tali evidenze possono variare in funzione del requisito stesso e prevedere:

- Garanzia dell'utilizzo di procedure gestionali e tecniche documentate
 - processi operativi
 - prestazione di servizi
 - verifiche
 - controllo qualità
- Garanzia della presenza di adeguata documentazione
 - mansionari
 - registri (attrezzature, strumentazioni, ...)
 - cataloghi dei materiali
 - note
 - atti

Nella progettazione dell'applicativo è stato previsto l'accesso alle singole funzionalità in funzione del profilo assegnato ai singoli utenti. Sono stati identificati i seguenti profili:

- **Amministratore** - ha accesso alle configurazioni e parametrizzazioni del sistema quali ad esempio creazione delle liste di distribuzione, indicazioni relative agli adempimenti verso terzi;
- **Verificatore** - effettua le verifiche su quanto presente nelle check list e provvede a validare i contenuti relativi al singolo requisito;
- **Operatore** - aggiorna i requisiti contenuti nella check list;
- **Visualizzatore** - Visualizza i contenuti della check list.

DESCRIZIONE DELLE FUNZIONALITÀ

Nell'applicativo che viene qui presentato, i requisiti di conformità alla norma che devono essere soddisfatti, sono proposti agli utenti con un'interfaccia grafica in forma di "check list"; ogni requisito indicato nella norma diventa una voce da analizzare e confermare nella check list proposta.

Tale modalità consente di verificare il completamento di tutte le attività necessarie per attuare il processo di verifica della conformità e avere un rilevamento standardizzato delle evidenze che devono essere prodotte.

Tutti i contenuti che sono necessari a garantire la conformità ai requisiti della norma, quali ad esempio documenti, video, link a procedure e documenti di parti terze, sono caricati nel sistema con tracciatura dell'utente e della data di inserimento e/o successive revisioni.

La revisione effettuata sui documenti viene segnalata con l'invio di notifiche a liste di distribuzione predefinite; sarà inoltre possibile indicare quali documenti, presenti nel sistema, prevedono adempimenti verso terzi e sono quindi oggetto di invio di un alert a liste di distribuzione predefinite.

Con periodicità da definire verrà effettuato un backup dei dati.

DESCRIZIONE DELL'APPlicATIVO

PAGINA INIZIALE

Nella pagina iniziale dell'applicativo è richiesto l'inserimento delle credenziali di accesso:

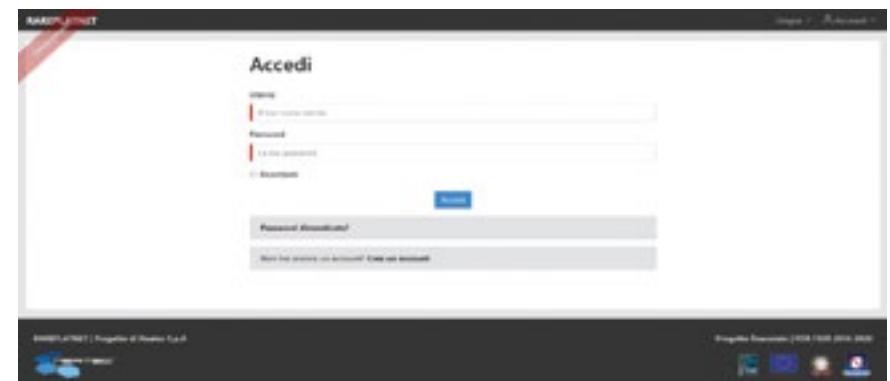


Figura 1 - Login

Le funzionalità dell'applicativo sono rese accessibili agli utenti in base al loro profilo di accesso:



Figura 2 – Menù iniziale

CHECK LIST

Accedendo alla funzionalità di Check List, sarà visualizzata una tabella riepilogativa delle check list presenti nel sistema e relative agli accreditamenti periodici ottenuti:

Checklists						
Breve Accreditamento	Numeri Certificati	Norme di riferimento	Data inizio validità	Data fine validità	Ultimo verificamento	Azioni
Accordo	000000000000	1.00/100/2007	00/00/2000	00/00/2000	00/00/2000	

Figura 3 – Elenco check list

Il menù orizzontale posto nella parte destra della pagina consente l'accesso puntuale alle funzionalità dell'applicativo:

- Check List
- Adempimenti verso terzi
- Configurazione



Figura 4 – Menù orizzontale

Cliccando sulle intestazioni delle colonne è possibile cambiare l'ordinamento proposto per i dati visualizzati:

Checklists						
Breve Accreditamento	Numeri Certificati	Norme di riferimento	Data inizio validità	Data fine validità	Ultimo verificamento	Azioni
Accordo	000000000000	1.00/100/2007	00/00/2000	00/00/2000	00/00/2000	

Figura 6 – ordinamento

Il risultato della ricerca può essere filtrato per uno o più campi presenti nella lista:

Checklists						
Breve Accreditamento	Numeri Certificati	Norme di riferimento	Data inizio validità	Data fine validità	Ultimo verificamento	Azioni
Accordo	000000000000	1.00/100/2007	00/00/2000	00/00/2000	00/00/2000	

Figura 7 – filtri

Il bottone consente di esportare in un foglio Excel il contenuto della lista:

Checklists						
Breve Accreditamento	Numeri Certificati	Norme di riferimento	Data inizio validità	Data fine validità	Ultimo verificamento	Azioni
Accordo	000000000000	1.00/100/2007	00/00/2000	00/00/2000	00/00/2000	

Figura 8 – export in Excel

Le icone riportate nella colonna “Azione” indicano l’operatività possibile sui documenti proposti nella lista:



Figura 9 – azioni

- Icône consente di accedere alla pagina di visualizzazione dei dettagli;
- Icône , consente di scaricare i dati in formato PDF;
- Icône , produce un riepilogo generale di tutti i documenti presenti nel sistema associati alla check list, con evidenza della data di ultima revisione;

Lo stato di avanzamento nella compilazione delle check list è rappresentato da un pallino:

- **Rosso** ad indicare che la CL deve essere compilata;
- **Giallo** ad indicare che la CL è in compilazione/compilata ma deve essere validata;
- **Verde** ad indicare che la CL è valida e tutte le verifiche/voci sono state esaminate.

DETALLO SEZIONI CHECK LIST

Cliccando sull'icône presente nella colonna "Azioni" della check list, verrà proposta la pagina di dettaglio con le verifiche da effettuare.

La norma ha raggruppato logicamente i requisiti cui ottemperare in:

- Requisiti generali
- Requisiti strutturali
- Requisiti relativi alle risorse
- Requisiti del processo
- Requisiti del sistema di gestione per la qualità

ogni raggruppamento logico sopra indicato, verrà proposto in una scheda dedicata, con evidenza del completamento dei contenuti della scheda:

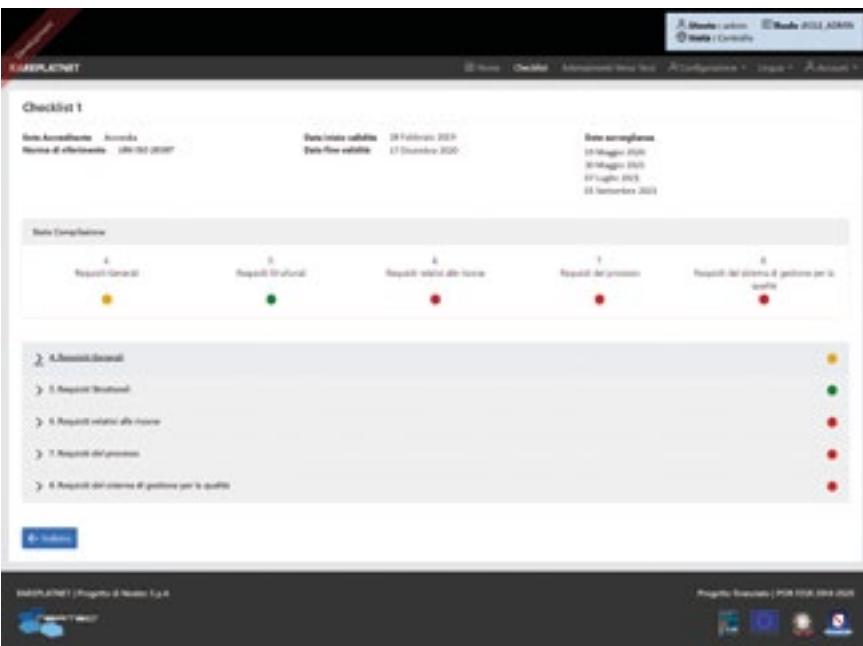


Figura 10 – stato compilazione

Nella pagina saranno visualizzate una sezione, sempre visibile, che evidenzia lo stato di completamento delle verifiche, ed ulteriori sezioni contenenti i requisiti previsti dalla norma distinti per tipologia.

Cliccando su ogni singola sezione, questa viene aperta per mostrare i dati specifici del requisito selezionato:

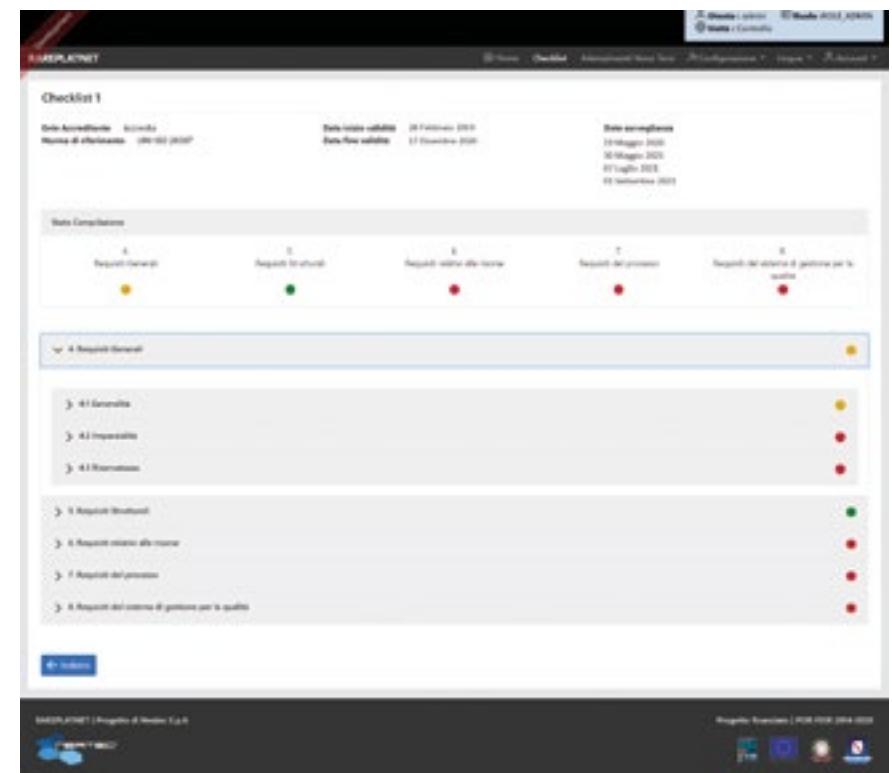


Figura 11 – sezioni

La sezione aperta per la specifica tipologia di requisito propone all'utente l'elenco dei requisiti da soddisfare, con evidenza di data e ora dell'avvenuto caricamento:

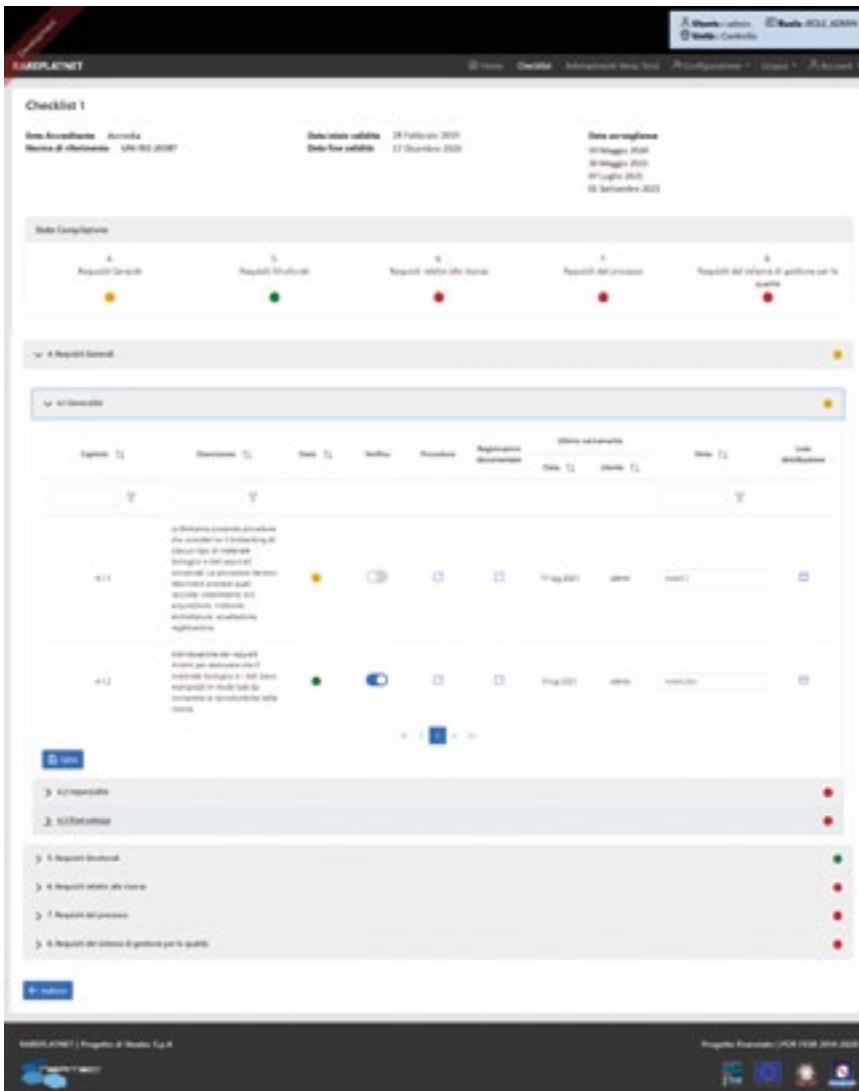


Figura 12 – dettaglio sezione

Lo stato di avanzamento nella compilazione dei singoli requisiti è rappresentato da un pallino:

- **Rosso** ad indicare che la compilazione del requisito è incompleta;
- **Giallo** ad indicare che il requisito è stato compilato ma deve essere validato;
- **Verde** ad indicare che il requisito è stato validato.

→ PROCEDURE

Le procedure possono essere costituite da documenti, video, referenze ai link di procedere o sistemi, note.

Cliccando sull’icona presente nella colonna “Procedure” del singolo requisito, viene presentata una pagina per le procedure associate al requisito in lavorazione:

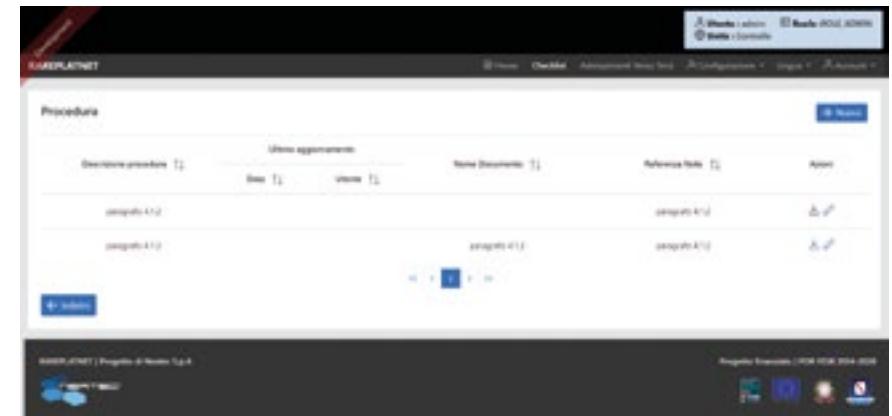


Figura 13 – procedure

Cliccando il bottone è possibile procedere all’inserimento dei dati di una nuova procedura:

- descrizione della procedura
- eventuale indirizzo a procedure o documenti esterni
- note

Figura 13 – Inserimento procedura

La selezione del pulsante , presenta una finestra per il caricamento di documenti di varia tipologia; l’utente seleziona dal proprio file system il file da caricare:

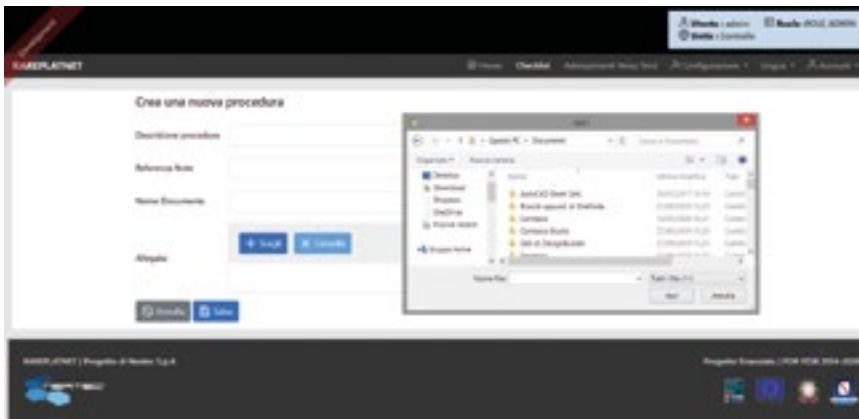


Figura 14 – procedure scegli file

E successivamente conferma il caricamento o annulla l'operazione:

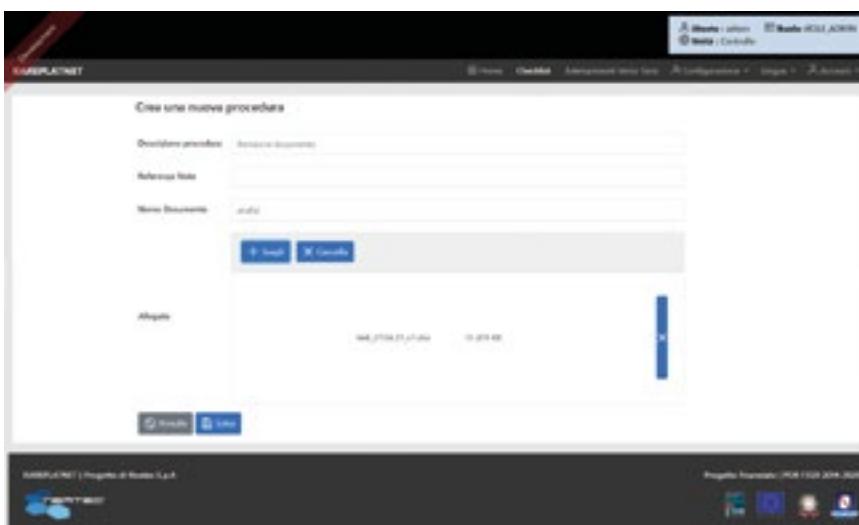


Figura 15 – procedure carica file

Confermata l'operazione la nuova evidenza viene inserita nella lista e associata al requisito in lavorazione:

Procedure	Ultimo aggiornamento	Motivo Documento	Reference Note	Azione
paragrafo A1.1	08/08/2018 10:10:00	paragrafo A1.1	paragrafo A1.1	
paragrafo A1.2	08/08/2018 10:10:00	paragrafo A1.2	paragrafo A1.2	
Nessuna documentazione		analisi		

Figura 16 – procedure

L'icona consente di accedere ai dettagli delle singole righe per aggiornarne i contenuti; è possibile aggiornare la versione di un documento allegato, se i nomi dei files corrispondono.

Gli aggiornamenti effettuati vengono notificati a liste di distribuzione predefinite.

REGISTRAZIONI DOCUMENTATE

Le registrazioni documentate possono essere costituite da documenti di parti terze, video, referenze a link di procedure o sistemi, note.

Cliccando sull'icona presente nella colonna "Registrazioni documentate" del singolo requisito, viene presentata una finestra per la gestione delle evidenze da produrre per il soddisfacimento del requisito stesso.

L'iter di associazione viene operata con le stesse modalità già descritte per il paragrafo precedente, relativo alle procedure.

LISTE DISTRIBUZIONE

Le liste di distribuzione sono l'elenco degli utenti del sistema ai quali si deve inoltrare in automatico una notifica in caso vengano aggiornati i dati di uno specifico requisito.

Cliccando sull'icona presente nella colonna "Liste distribuzione" del singolo requisito, il sistema diversifica la pagina proposta in base al profilo di accesso:

per il profilo di accesso di operatore, si apre una nuova pagina che mostra l'elenco dei destinatari della notifica:

Figura 17 – lista di distribuzione visualizza

per il profilo di accesso di amministratore, si apre una nuova pagina che consente di creare ed aggiornare una lista di distribuzione:

Figura 18 – lista di distribuzione aggiorna

VALIDAZIONE

I contenuti inseriti per i singoli requisiti dagli operatori devono essere verificati e confermati da parte di una funzione preposta cui è stato assegnato il profilo utente validatore.

Accedendo al dettaglio della check list, al profilo di validatore viene visualizzata la colonna aggiuntiva “Verifica”:

Figura 21 – validazione

Il validatore esamina i contenuti inseriti per i requisiti aggiornati dagli operatori e identificati dal pallino giallo nella colonna “Stato” e li convalida; il requisito passa in uno stato di validato ed il pallino nella colonna “Stato” diventa verde.

DETTAGLIO CERTIFICATO

Cliccando sull’icona presente nella colonna “Certificato” del singolo requisito, se selezionabile, il sistema visualizza una pagina con i dati identificativi del certificato:



Figura 19 –certificato dettagli

VERIFICHE ISPETTIVE

L’istituto accreditato è soggetto periodicamente a visite di sorveglianza; cliccando sull’icona presente nella colonna “Verifiche ispettive” del singolo requisito, viene aperta una finestra con l’elenco delle visite ispettive ricevute e la possibilità di inserirne di nuove:

Verifiche ispettive					
Data Visita/Ispezione	Dipartimento di Ispezione	Descrizione	Data Visita	Albero/Comitato riferimento	Azioni
10 mag 2021	Accred	IRCCS ISTITUTO SUPERSTRE	10/05/2021	DA	
20 mag 2021	Accred		10/05/2021	DA	

Figura 20 – verifiche ispettive elenco

Selezionando l’icona sulla riga di interesse sarà possibile gestire i dati relativi alla verifica selezionata.

ADEMPIMENTI VERSO TERZI

Alcuni documenti caricati nel sistema potrebbero essere oggetto di adempimenti verso terzi.

Per tali documenti occorre notificare un alert a liste di distribuzione predefinite perché provvedano alla scadenza ad effettuare le azioni necessarie.

Accedendo alla funzionalità di Adempimenti verso terzi, sarà visualizzata una tabella riepilogativa di tutti i documenti presenti nel sistema:

Adempimenti		Documenti		Distribuzione		Informazioni		Distribuzione adempimento		Data		Periodicità		Data Distribuzione	
analisi 1	Analisi generale	01/05/2021													
analisi 2	Analisi controlli	10/05/2021													
analisi 3	Analisi protocollo	Controlli													
analisi 4	Analisi monitoraggio	Controlli													

Figura 22 – adempimenti verso terzi

L’utente seleziona dall’elenco di sinistra il documento soggetto ad adempimenti ed indica:

- descrizione adempimento, ossia il tipo di attività da espletare per il documento;
- data adempimento, la data in cui l’alert deve essere notificato
- periodicità di invio dell’alert, nel caso in cui si tratti di una attività ricorsiva;
- i soggetti cui notificare l’alert della scadenza dell’adempimento, mediante la creazione di una lista di distribuzione dedicata.

Nel caso in cui il documento oggetto di adempimenti venga aggiornato nel sistema, tale operazione viene notificata oltre che alla lista di distribuzione identificata per il requisito di riferimento, anche

alla lista di distribuzione identificata per gli adempimenti verso terzi.

In conclusione, il prototipo qui presentato rappresenta uno dei prodotti innovativi realizzati all’interno del progetto RARE.PLAT.NET di grande ausilio per la gestione dell’accreditamento delle biobanche di ricerca.

Alessandro Rullo¹, Elena Rubinacci¹, Patrizia Ferroni^{2,3}, Fiorella Guadagni^{2,3}

¹ - Neatec SpA, Via Campi Flegrei, 34, 80078 Pozzuoli, Napoli

² - Biobanca Interistituzionale Multidisciplinare BioBIM, IRCCS San Raffaele Roma, Via di Val Cannuta, 247

³ - Dipartimento di Scienze Umane e Promozione della Qualità della Vita, Università Telematica san Raffaele Roma, Via di Val Cannuta 247, Roma e Corso Umberto, 209, 95024 Acireale CT

Una pipeline bioinformatica innovativa per lo studio delle patologie oncologiche basata sull'analisi di reti multiple

ABSTRACT

L'era della “**Targeted therapy**” è arrivata. Considerando che i sistemi biologici sono intrinsecamente complessi e che la nostra conoscenza su come le cellule tumorali crescono e proliferano è limitata, lo sviluppo delle terapie mirate richiede una comprensione del sistema molto più approfondita per identificare nuovi drug-targets e per capire come le modifiche delle molecole e la trasduzione del flusso dei segnali biologici guidano la malattia. Lo scopo del lavoro è stato quello di definire una pipeline bioinformatica innovativa: “multiple networks analysis” (Dotolo S. et al., 2021), incentrata sullo studio delle reti biologiche, come strategia promettente per silenziare i mediatori specifici che sono responsabili dell'alterazione delle reti, cercando di apportare dei miglioramenti non solo nel campo della diagnostica oncologica, ma anche nel trattamento dei pazienti, offrendo al clinico un quadro più ampio di terapie a disposizione che potrebbero essere adottate per ogni singolo caso specifico, soprattutto se vi sono più mutazioni coinvolte nella malattia.

INTRODUZIONE

Lo scopo principale della medicina personalizzata è identificare nuovi *target* (genici-proteici) coinvolti nel tumore, che possano essere usati per la predizione e la realizzazione di nuove molecole farmacologiche, in quanto i tumori non sono causati dalle alterazioni genetiche di un singolo target, ma derivano da interazioni complesse presenti tra più target molecolari. La *Targeted Therapy* è stata ideata per interferire con specifiche molecole target coinvolte nello sviluppo, nella crescita e nella progressione tumorale (Yan L. et al, 2011). Ciò ha permesso di investigare più in dettaglio i meccanismi del controllo (soggetto sano) e i meccanismi innescati nel soggetto malato, per valutare le interazioni complesse e integrare tali informazioni con quelle ottenute dalla malattia e dalle analisi cliniche oltre che da quelle “omiche”. Generando dei modelli basati sulle “*biological-molecular networks*” (Barabási A.L. et al, 2011), è possibile esplorare queste reti, per rivelare i meccanismi non ancora noti ma comunque importanti nella comprensione della patogenesi tumorale (Tong H. et al, 2018). Per sviluppare delle strategie migliori per il trattamento terapeutico è importante determinare quali siano i fattori che giocano un ruolo chiave nell'alterazione della rete. Le terapie basate sulle reti per il trattamento dei tumori umani potrebbero avere promettenti applicazioni biologico-cliniche, poiché l'analisi delle reti e l'identificazione di nuovi *hub* potrebbero aiutare i ricercatori e il medico a trovare nuovi *drug-target*, da usare come marcatori diagnostici per

individuare gli stadi precoci della malattia (Oates C.J and Mukherjee S. 2012) e potrebbero aiutare il clinico a capire come inquadrare il paziente e quale potrebbe essere la terapia più idonea per il singolo paziente (Li P., Fu Y. and Wang Y. 2015). Le informazioni ricavate da questi modelli sono estremamente utili nel caso in cui si debbano identificare nuovi trattamenti per tumori molto rari, come potrebbero essere i Tumori Neuroendocrini (NET) (Lamberts S.W. et al, 2001). Questi sono tumori rari dove il più delle volte non vi sono farmaci adeguati al trattamento dei pazienti affetti, perché sono implicati dei meccanismi molecolari particolari ancora non del tutto risolti (Basuroy R. et al, 2016). In questi casi, quello che si vuole fare è facilitare lo sviluppo di nuove terapie basate su un'interpretazione e un uso diverso delle reti biologiche per aiutare e migliorare le strategie che sono alla base della medicina personalizzata.

METODI E RISULTATI

Abbiamo messo a punto una pipeline bioinformatica denominata “*multiple networks analysis*” e l'abbiamo applicata inizialmente ai dati mutazionali di una coorte di pazienti affetti da cancro colorettale, i cui dettagli sono stati riportati nell'articolo di Dotolo S. et al., 2021, pubblicato su *Briefings in Bioinformatics*. Tale procedura è stata poi applicata allo studio dei NET. La pipeline sviluppata è caratterizzata da una serie di passaggi (**Fig. 1**) che ci permettono di capire non solo come cambia il profilo molecolare del tumore in presenza di una o più mutazioni, ma anche come cambia la terapia farmacologica per il singolo paziente. Tutti i passi sono stati realizzati e analizzati mediante la piattaforma di *Cytoscape v3.7 Core* (e i suoi *plugin*) (Bauer-Mehren A. 2013).

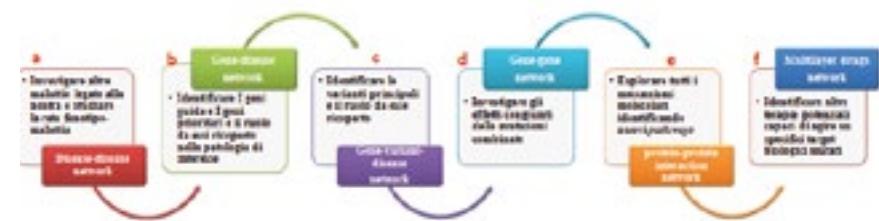


Figura 1 Multilayer network-based workflow

Lo studio è stato condotto su tre tipi di NET (Glioblastoma Multiforme “GBM”, Carcinoma Midollare della Tiroide “CMT” e il tumore Gastro-entero-pancreatico “GEP-NET”) e i dati mutazionali sono stati estrapolati dalle basi di dati pubbliche. Per motivi di spazio, qui riportiamo solo i risultati dei GEP-NET. Sono state analizzate solo le mutazioni patogeniche con significato clinico. Lo studio comparato delle mutazioni combinate e di quelle singole è fondamentale, poiché è possibile analizzare l'effetto congiunto derivato dalla presenza di due (o più) mutazioni; permettendoci anche di identificare altri meccanismi molecolari e trovare nuove potenziali terapie farmacologiche, capaci di bloccare o ridurre la crescita

tumorale. La *disease-disease network* (**step a della Fig. 1**), è stata costruita per ottenere una mappa che ci permettesse di identificare le altre malattie correlate direttamente/indirettamente alla nostra, delineando il processo di sviluppo e progressione del tumore e cercando di spiegare anche i sintomi secondari che un paziente potrebbe sviluppare nel tempo (Jianhua L. et al, 2016) (**Fig. 2**).

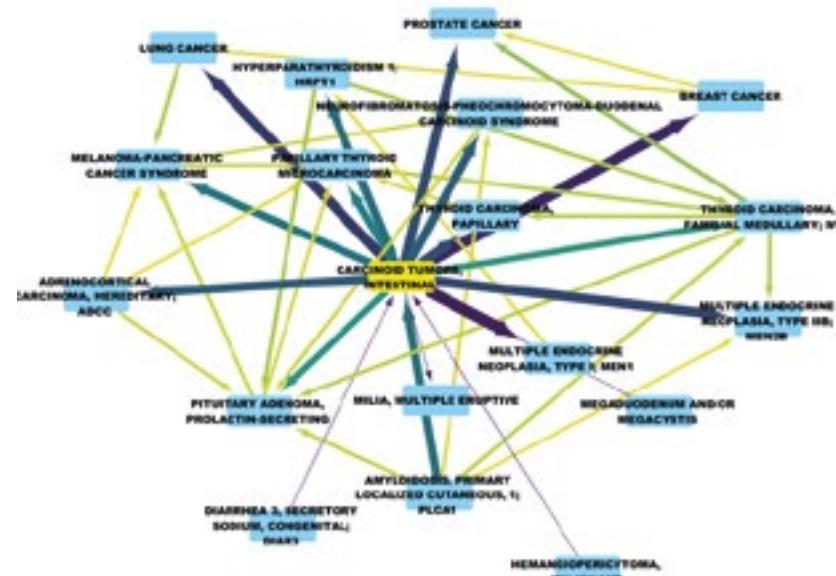


Figura 2 Disease-disease network

I risultati hanno dimostrato e confermato che vi sono diverse malattie a carattere infiammatorio e precanceroso a livello intestinale legate a questa patologia. Questa informazione è stata utile sia per l'identificazione dei geni guida e dei geni prioritari (**step b della Fig. 1**) che delle varianti patogeniche principalmente coinvolte nei GEP-NET (**step c della Fig. 1**). Ciò ci ha permesso di realizzare le successive reti di interazione tra i geni e tra le proteine, come mostrato negli **step d-e della Fig. 1**. È stato possibile investigare come il loro profilo molecolare fosse diverso in presenza di una mutazione doppia, dovuto al coinvolgimento indiretto di alcuni meccanismi molecolari che non vi sono nel caso della mutazione singola (**Tab. 1**).

MUTAZIONE SINGOLA E DOPPIA	TOP RANKED GENI GUIDA E PRIORITARI	EDGE BETWEENNESS	MECCANISMI MOLECOLARI
EGFR all mutations	EGFR	2.65	Signaling ERBBs, Signaling EGFR/GRB2, cell growth, cell differentiation, motility, invasion and angiogenesis pathways, development biology pathways
	MAP2K7	4.97	
	HRAS	4.28	
	PDGFRB	5.63	
	PIK3CA	3.46	
	AKT1	3.52	
	ERBB2	3.41	
	IGF1R	3.86	
	ERBB4	4.30	
	KRAS	3.20	
	ERBB3	3.74	
RET all mutations	RET	9.23	Signaling to ERKs/ MAPKs, FGFR1/2/3 signaling, cellular growth, cell proliferation and motility, cell survival
	HRAS	7.07	
	EGFR	9.36	
	NF1	13.76	
	MEN1	10.46	
	NTRK1	4.79	
	KDR	8.40	
	CHGA	18.30	
	CUX1	11.33	
RET-EGFR	RET	3.19	Survival signaling pathway, cell growth, invasion and angiogenesis pathways, development biology pathways
	EGFR	2.57	
	PIK3CA	2.62	
	ALK	3.27	
	GNA11	2.33	
	KRAS	2.93	
	ERBB2	2.57	
	HRAS	2.90	
	NRAS	2.82	

Tabella 1 Top ranked dei geni prioritari e dei geni guida con i loro meccanismi molecolari ed il calcolo del parametro EdgeBetweenness (indicativo della forza e del livello di significatività biologica delle interazioni presenti all'interno della rete)

In questo modo sono stati estrapolati i meccanismi molecolari principalmente coinvolti che ci hanno permesso di identificare le principali terapie utilizzate. Il risultato innovativo sta nel fatto che la rete generata partendo dalla mutazione doppia coinvolge geni e meccanismi molecolari che sono in parte diversi dalle reti generate dalle mutazioni singole. Questo fa sì che anche le terapie adottate per singolo paziente possano essere diverse, attraverso la realizzazione della *multilayer drugs network*, come mostrata nello **step f della Fig. 1**. Questa è stata ottenuta combinando i risultati delle fasi precedenti (Boccaletti S. et al, 2014). Come risultato otteniamo una serie di trattamenti farmacologici già approvati o ancora in fase di sperimentazione clinica personalizzati per il singolo paziente, cercando di abbassare il più possibile gli effetti collaterali, gli effetti

avversi e le controindicazioni delle terapie singole e combinate per singolo paziente. In questo caso specifico i trattamenti suggeriti approvati dalla FDA sono il Cabozantinib e il Motesanib (suggeriti solo nelle singole mutazioni del gene RET) e il Vandetanib (che sono indicati in entrambe le singole mutazioni), mentre quelli suggeriti ancora in Fase III della sperimentazione clinica sono il Selpercatinib e il Pralsertinib (che troviamo solo nelle singole mutazioni del gene RET).

CONCLUSIONI

Con la nostra pipeline è possibile analizzare mutazioni singole/doppie/multiple, con l'intento di valutare quali siano gli effetti congiunti derivati dalla presenza di una o più mutazioni nel singolo paziente. Questo ci ha permesso di delineare un modello di sviluppo e progressione del tumore più complesso e completo, che tenesse conto dell'evoluzione clonale del tumore, per cercare di identificare dei trattamenti farmacologici adatti per le diverse fasi di progressione della malattia. È stato visto che in presenza di mutazioni diverse in pazienti affetti dalla stessa malattia, si possono avere reti simili ma anche reti molto dissimili tra loro, mentre in coloro che hanno la stessa malattia e la stessa mutazione si ritrovano le stesse reti e lo stesso comportamento molecolare. Questo ci aiuta a raggruppare i pazienti in modo da valutare chi può ricevere una determinata terapia e chi invece non può riceverla perché non ha determinate caratteristiche e quindi dovrà accedere ad altre terapie più o meno convenzionali. La pipeline può essere usata in entrambi i sensi (dal gene alla terapia e viceversa), in funzione di quali siano i dati da cui partiamo e gli obiettivi che vogliamo raggiungere. In più, si può applicare a differenti tipi di malattia, apportando le giuste modifiche in base ai dati a disposizione. I risultati che si possono ottenere mediante questo tipo di analisi devono essere sempre confermati e validati anche a livello preclinico e clinico.

*Serena Dotolo^{1,3}, Anna Marabotti², Angelo Facchiano³
e Roberto Tagliaferri^{1,*}*

¹ - NeuRone Lab, Dept. of Management & Innovation Systems (DISA-MIS), University of Salerno, Italy

² - Dept. of Chemistry and Biology "A. Zambelli" (DCB), University of Salerno, Italy

³ - Institute of Food Science, Italian National Research Council (ISA-CNR), Avellino (Italy)

Ringraziamenti

This work was supported by ELIXIR IT research infrastructure project, by the project "RARE. PLAT.NET", CUP B63D18000380007 and SURF 17061BP000000012. The authors would like to thank the R&D Department of Kelyon S.r.l. and its Director, Stefano Tagliaferri.

Referenze

- Barabási A.L., Gulbahce N., et al. Network medicine: a network-based approach to human disease. *Nat Rev Genet.* 2011;12(1):56-68.
- Basu Roy R, Srirajaskanthan R, Ramage JK. Neuroendocrine Tumors. *Gastroenterol Clin North Am.* 2016 Sep;45(3):487-507.
- Bauer-Mehren A. Integration of genomic information with biological networks using Cytoscape. *Methods Mol Biol.* 2013;1021:37-61.
- Boccaletti S., Bianconi G., et al. The structure and dynamics of multilayer networks. *Physics Report* 544, (1) (2014), 1-122.
- Dotolo S, Marabotti A, Rachiglio AM, Esposito Abate R, Benedetto M, Ciardiello F, De Luca A, Normanno N, Facchiano A, Tagliaferri R. A multiple network-based bioinformatics pipeline for the study of molecular mechanisms in oncological diseases for personalized medicine. *Brief Bioinform.* 2021 May 28:bbab180.
- Jianhua L, Xiaoyan L, et al. A Comprehensive Evaluation of Disease Phenotype Networks for Gene Prioritization. *PLoS One.* 2016; 11(7): e0159457.
- Lamberts SW, Hofland LJ, Nobels FR. Neuroendocrine tumor markers. *Front Neuroendocrinol.* 2001 Oct;22(4):309-39.
- Li P, Fu Y, and Wang Y. Network based approach to drug discovery: a mini review. *Mini Rev Med Chem.* 2015;15(8):687-95
- Oates C.J. and Mukherjee S. Network Inference and Biological Dynamics. *The Annals of Applied Statistics* 2012, Vol. 6, No. 3, 1209–1235
- Tong H., Qian W., et al. Analyzing of Molecular Networks for Human Diseases and Drug Discovery. *Curr Top Med Chem.* 2018; 18(12): 1007–1014.
- Yan, L., Rosen, N., & Arteaga, C. (2011). Targeted cancer therapies. *Chinese journal of cancer*, 30(1), 1–4. <https://doi.org/10.5732/cjc.010.10553>

Una procedura per l'estrazione del gene-gene mutation network core per reti di mutazione genica

ABSTRACT

Lo studio del confronto tra grafi riveste un ruolo di fondamentale importanza per molti settori scientifici e in differenti ambiti applicativi. Infatti, a seconda del contesto specifico, sono state definite varie misure di similarità/dissimilarità in grado di quantificare il confronto tra grafi e compararne le proprietà strutturali.

Il presente studio propone una metodologia in grado di definire ed estrarre un sottografo formato dall'insieme delle relazioni maggiormente ricorrenti tra i nodi appartenenti ad un set di reti (*network core*).

Nell'ambito del progetto RARE.PLAT.NET, lo studio si è concentrato sull'applicazione di tale metodologia alle *gene-gene mutation network* di tumori neuroendocrini. In tali reti, che possono essere rappresentate mediante un grafo direzionato, i nodi rappresentano i geni e la direzione del legame tra coppie di geni dipende dai *signaling pathways* e dai meccanismi molecolari che vengono attivati.

Per ciascuna patologia oncologica analizzata la metodologia ha consentito di estrarre il *network core*, formato dai legami maggiormente rappresentati in tutte le reti di geni, definito *gene-gene mutation network core*, che ha permesso di individuare specifiche sequenze geniche tipiche della patologia oggetto di analisi.

INTRODUZIONE

Il confronto tra grafi è uno dei più importanti e più affrontati problemi nello studio dei sistemi complessi che possono essere rappresentati sottoforma di rete. Tale tema è stato ampiamente affrontato in letteratura e in differenti ambiti disciplinari - dalla biologia, all'ingegneria, all'analisi dei dati - ponendo particolare attenzione, da un lato, alle misure in grado di quantificare la divergenza tra coppie di grafi, grazie alla definizione di misure di similarità/dissimilarità e, dall'altro, agli algoritmi di *matching* tra grafi volti all'individuazione ed estrazione dei sottografi comuni (Koutra et al., 2011). Il presente studio si è concentrato sul confronto tra grafi nelle diverse applicazioni che possono essere individuate in ambito biologico. In tale ambito, il confronto tra grafi è di rilevante interesse per il ricercatore al fine di evidenziare la presenza di strutture comuni tra differenti reti biologiche. La struttura di una rete biologica è data, in generale, dalla rappresentazione di un set di nodi, ossia le componenti biologiche (quali, ad esempio geni, proteine, molecole, malattie, farmaci) e un insieme di legami che ne evidenziano le relazioni. In particolare, le reti di geni sono qui rappresentate mediante un grafo direzionato, in cui i nodi del grafo rappresentano i geni e il legame è definito a partire

dall'azione regolatoria tra geni diversi.

In linea con gli obiettivi del progetto RARE.PLAT.NET¹¹ per lo studio dei tumori rari Neuroendocrini (NET), tale contributo presenta una strategia di analisi definita per il matching tra grafi e la sua applicazione all'insieme delle reti di geni ottenute per le patologie oggetto di analisi. Nello specifico, si tratta di diverse reti definite a partire dalla mutazione di un singolo gene e la cui struttura si differenzia per la presenza di un diverso numero di geni e di legami che si presume siano, almeno in parte, indotti dalla patologia.

In generale, i genomi del cancro possiedono un gran numero di mutazioni, tra cui mutazioni somatiche e variazioni del numero di copie (CNV). Tra queste, alcune mutazioni che contribuiscono alla progressione del cancro dallo stato normale a quello maligno sono chiamate mutazioni *driver*, e quelle che si accumulano nelle cellule ma non contribuiscono allo sviluppo del cancro sono chiamate *passenger* (Greenman et al., 2007; Stratton, Campbell e Futre, 2009). Pertanto, distinguere le mutazioni *driver* funzionali, i driver o i moduli centrali dai *passenger* casuali si ritiene sia un passo cruciale nella comprensione dei meccanismi molecolari della carcinogenesi, che può aiutare ulteriormente nella diagnosi efficace, nel trattamento e nella prognosi dei pazienti con cancro.

Generalmente, l'obiettivo è quello di rilevare i singoli geni driver che causano i tumori. Un approccio standard per questo scopo è quello di identificare le mutazioni ricorrenti in una grande coorte di pazienti con cancro. Tuttavia, è riconosciuto che l'ampia eterogeneità mutazionale dei genomi del cancro (Jones et al., 2008) rende questo tipo di metodo a volte inefficace perché i pazienti anche dello stesso tipo di tumore possono presentare diverse mutazioni *driver*.

Dal punto di vista empirico, tale problematica si traduce, prevalentemente, nell'individuazione dei sottografi che siano contenuti, per intero o parzialmente, in un altro grafo. La procedura di seguito presentata per le reti di geni mutate a partire da una specifica patologia tumorale consente di individuare l'insieme delle relazioni maggiormente ricorrenti in tali reti. Questo insieme di relazioni è qui definito *gene-gene mutation network core*. Esso è formato dal sottografo più rappresentato (in termini di frequenza di apparizione) in tutte le reti di mutazione geniche. Essendo questi legami specifici delle mutazioni, si suppone che la loro presenza caratterizzi la patologia in esame.

PROCEDURA PER L'ESTRAZIONE DEL *NETWORK CORE*

La procedura proposta è stata implementata in ambiente *R* (R Core Team, 2021), utilizzando il package *igraph* (Csardi e Nepusz, 2006).

Di seguito viene illustrato lo schema qualitativo della procedura.

Sia $\overline{N} \{N_1, N_2, \dots, N_m\}$ $\overline{N} \{N_1, N_2, \dots, N_m\}$ un insieme di m reti oggetto di analisi. Ogni rete \overline{N}_i è definita dal grafo direzionato $\overline{G}_i(V_i, E_i); i = 1, \dots, m$; $\overline{G}_i(V_i, E_i); i = 1, \dots, m$; dove V_i è l'insieme dei vertici ed E_i è l'insieme dei legami (archi) per ogni grafo.

¹¹ Piattaforme tecnologiche di ricerca collaborativa per la lotta alle patologie oncologiche azione 1.2.2 dal titolo "Innovazioni diagnostiche e terapeutiche per tumori neuroendocrini per il glioblastoma – RARE.PLAT.NET."

Per ciascuna coppia di reti $\{N_i, N_j; i \neq j; \{i, j\} = 1, \dots, m\}$ $\{N_i, N_j; i \neq j; \{i, j\} = 1, \dots, m\}$ richiamiamo:

- L'unione di $\overline{G_i G_i}$ e $\overline{G_j G_j}$, come il grafo formato dai vertici appartenenti o a $\overline{G_i G_i}$ o a $\overline{G_j G_j}$ e dagli archi incidenti ad essi: $\overline{G_i} \cup \overline{G_j} = (V_i \cup V_j, E_i \cup E_j)$ $\overline{G_i} \cup \overline{G_j} = (V_i \cup V_j, E_i \cup E_j)$
- L'intersezione di $\overline{G_i G_i}$ e $\overline{G_j G_j}$, come il grafo formato dai vertici appartenenti sia a $\overline{G_i G_i}$ sia a $\overline{G_j G_j}$ e dagli archi incidenti ad essi: $\overline{G_i} \cap \overline{G_j} = (V_i \cap V_j, E_i \cap E_j)$ $\overline{G_i} \cap \overline{G_j} = (V_i \cap V_j, E_i \cap E_j)$.

Si presentano i passi della procedura:

1. Generazione dei $K = \frac{m(m-1)}{2}$ $K = \frac{m(m-1)}{2}$ grafi I_k I_k ottenuti come intersezione tra tutte le coppie di grafi $\overline{G_i} e \overline{G_j}, \overline{G_i} e \overline{G_j}$.
2. Generazione del grafo $\overline{U_g} = \bigcup_{k=1}^K I_k$ $\overline{U_g} = \bigcup_{k=1}^K I_k$ ottenuto come unione dei K K grafi intersezione I_k I_k .
3. Calcolo del peso di ciascun legame (arco): per il grafo $\overline{U_g} \overline{U_g}$ si calcola la “profondità” \overline{d} \overline{d} (*depth*) di ciascun legame, ottenuta come numero di occorrenze del legame nelle K K intersezioni, per ciascuna coppia di vertici presenti nel grafo unione. Quindi, il *depth* è il numero di volte in cui una stessa coppia di nodi presenta un legame nelle K K reti intersezione. La Figura 1 mostra un semplice esempio di calcolo del *depth*.
4. Il grafo direzionato pesato definisce il *network core* $\overline{U_g(V, E, d)}$ $\overline{U_g(V, E, d)}$ tale che il *depth* $d: E \subset (V \times V) \rightarrow \mathbb{N}$ $d: E \subset (V \times V) \rightarrow \mathbb{N}$.

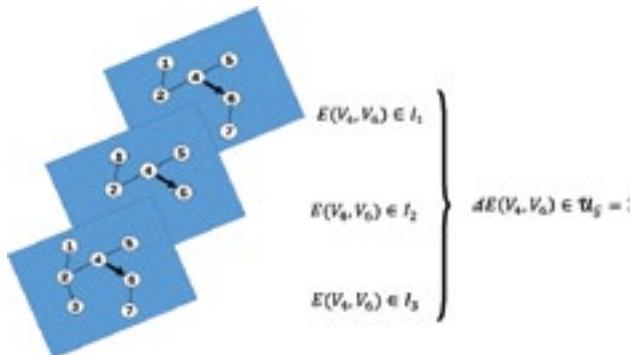


Figura 1 – Esempio di calcolo del *depth* \overline{d} \overline{d} per la relazione tra due vertici (4 e 6) in tre ipotetiche reti intersezione.

APPLICAZIONE DELLA PROCEDURA DI ESTRAZIONE DEL NETWORK CORE ALLE RETI DI GENI DEI TUMORI NEUROENDOCRINI

Tale procedura è stata specificata, nell'ambito del progetto RARE. PLAT.NET, per le reti definite a partire da genetic mutation data at single gene level. Per i NET oggetto di analisi, le reti, definite a partire dalla mutazione di un singolo gene, sono state estratte in ambiente Cytoscape (Shannon et al., 2003).

Per le patologie tumorali la procedura di analisi proposta si traduce nell'individuazione del grafo $\overline{U_g} \overline{U_g}$, ottenuto dell'unione di tutte le reti intersezione tra coppie di reti di geni a mutazione singola. Nello specifico,

il grafo $\overline{U_g} \overline{U_g}$ rappresenta il *gene-gene mutation network core*, in quanto raggruppa i geni comuni a tutte le reti di mutazione considerate.

Complessivamente, sono stati considerati tre dataset definiti dall'estrazione di 12 reti a mutazione singola per i tumori del tratto gastro-entero-pancreatici – GEP; di 19 reti per il glioblastoma – GBM; di 22 reti per il carcinoma midollare della tiroide – CMT.

Di seguito viene presentata l'applicazione della procedura ai dati disponibili per le reti a mutazione singola presenti nel dataset realizzato per il GEP. La Tabella 1 mostra una sintesi delle 12 reti mutate $(N_{GEP}) (N_{GEP})$, in termini di numero di nodi, numero di legami osservati per ciascuna rete, e valore della densità. La densità misura il grado di connettività globale di una rete. Esso è definito come rapporto tra il numero di legami osservati in un grafo e il numero massimo possibile di legami che, per i grafi orientati è pari a $v(v-1)$. Il valore della densità assume valori compresi tra 0, in caso di grafo vuoto, e 1, in caso di grafo completo. Si noti che questi valori riproducono delle densità mediamente elevate (comprese tra il 16.3% e 42.4%) per reti biologiche (Pavlopoulos et al., 2011).

GEP-NET_GENE-GENE MUTATED NET...	NUMERO DI NODI	NUMERO DI LEGAMI	DENSITÀ
BRAF	19	145	0.424
CDKN2A	20	138	0.363
EGFR	25	190	0.317
FGFR1	15	57	0.271
H3F3A	10	37	0.411
HRAS	16	84	0.350
MEN1	18	50	0.163
NKX2	19	93	0.272
NOTCH1	20	143	0.376
PIK3CA	20	148	0.389
RET	25	123	0.205
TP53	18	103	0.337

Tabella 1 Sintesi dell'insieme delle reti di geni mutate osservate per il GEP.

A partire dall'intersezione tra tutte le coppie delle 12 reti che compongono il set $\overline{N_{GEP}} \overline{N_{GEP}}$, si perviene alla generazione del *gene-gene mutation network core* per il GEP - $\overline{U_{GEP}} \overline{U_{GEP}}$ che è composto da 34 geni connessi da 171 legami pesati dall'indice di profondità \overline{d} \overline{d} , e una densità pari a 0.152. La Figura 2 mostra il grafo direzionato e pesato $\overline{U_{GEP}} \overline{U_{GEP}}$, dove la dimensione dei nodi è in funzione del numero complessivo di legami (*degree*), mentre lo spessore dei legami dipende dal valore calcolato del *depth* \overline{d} \overline{d} e, quindi, dal numero di occorrenze dei legami tra le coppie

di geni. Dall'analisi dell'insieme delle reti del GEP qui esposta, i 34 geni tipici delle mutazioni presenti nel core sono: MITF, NRAS, CDKN2A, NF1, HRAS, CCND1, PTEN, TP53, MC1R, PIK3CA, EGFR, MAP2K7, AKT1, GNAQ, CDK4, CDKN2C, MDM2, RET, SYP, KRAS, KIT, KRT5, ERBB4, KMT2D, ATRX, GNA11, SDHB, CHGA, MEN1, TMEM127, SDHD, DAXX, CALCA, SMAD4.

I legami che connettono tali geni si presentano con un'intensità differente nel grafo unione, come evidenziato dal calcolo dell'indice *depth*. Quelli più ricorrenti riguardano un sottogruppo di geni e, nello specifico: RET, PIK3CA, TP53, PTEN, HRAS, NF1, NRAS, CDKN2A. Tali geni presentano anche i valori più elevati degli indici di centralità rispetto al grado (numero di legami totali - *degree*, numero di legami in entrata - *indegree* e numero di legami in uscita - *outdegree*) riportati in Tabella 2.

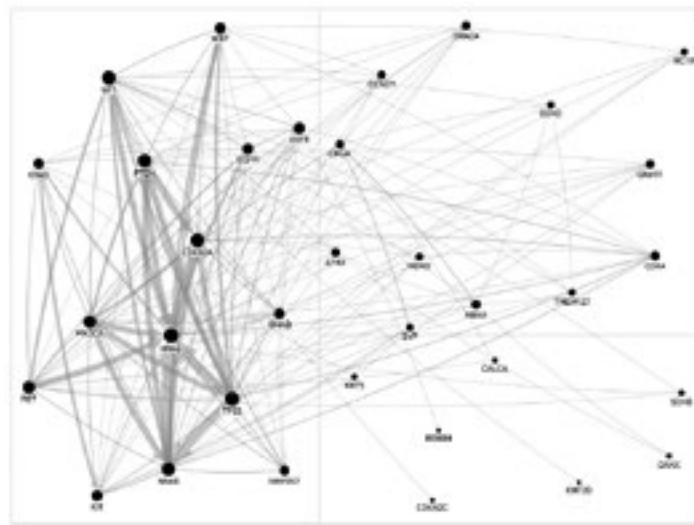


Figura 2. Grafo unione delle intersezioni tra coppie di reti a mutazione singola (GEP). La dimensione dei nodi dipende dal degree, lo spessore dei legami è proporzionale al depth.

	DEGREE	INDEGREE	OUTDEGREE
HRAS	23	20	3
TP53	22	7	15
NF1	21	12	9
CDKN2A	21	19	2
NRAS	20	14	6
PTEN	20	15	5
PIK3CA	17	3	14
RET	17	10	7

Tabella 2 Misure del degree per il gene-gene mutation network core

CONCLUSIONI

La procedura mostrata in questo contributo mira a definire un sottografo formato dai nodi aventi legami maggiormente ricorrenti in un insieme di reti.

Dai risultati della procedura applicata al set di reti a mutazione singola dei tumori del tratto gastro-entero-pancreatici – GEP, è stato generato il *gene-gene mutation network core*, ossia il sottografo che si presume presenti legami specifici delle mutazioni e, quindi, la presenza di tali geni potrebbe caratterizzare la patologia oggetto di analisi.

Giuseppe Giordano¹, Ilaria Primerano¹, Pierluigi Ritrovato²

¹ - Dipartimento di Studi Politici e Sociali, Università degli Studi di Salerno

² - Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione ed Elettrica e Matematica Applicata, Università degli Studi di Salerno

Referenze

- Csardi G. and Nepusz T. (2006). The igraph software package for complex network research. *InterJournal Complex Systems*, 1695.
- Greenman C., Stephens P., Smith, R. et al. (2007). Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*, 446, 153–158.
- Jones S. et al. (2008). Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science*, 321, 1801–1806.
- Koutra, D., Parikh, A., Ramdas, A., and Xiang, J. (2011). Algorithms for graph similarity and subgraph matching. In Proc. Ecol. Inference Conf (Vol. 17).
- Shannon P., Markiel A., Ozier O., Baliga N.S., Wang J.T., Ramage D., Amin N., Schwikowski B., and Ideker T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*, 13(11), 2498-2504.
- Stratton M.R., Campbell P.J., Futreal P.A. (2009). The cancer genome. *Nature*, 458: 719-724.
- Pavlopoulos G.A., Secrier M., Moschopoulos C.N. et al. (2011). Using graph theory to analyze biological networks. *BioData Mining*, 4, 10.
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Gli strumenti a supporto dell'Innovazione nei Tumori Neuroendocrini (NET) e nei tumori rari

ABSTRACT

I tumori Neuroendocrini (NET) colpiscono un numero ampio di organi: dal polmone ai bronchi, dall'intestino al retto, dal pancreas alle ghiandole surrenali.

Si tratta di neoplasie rare, a bassa incidenza, ma ad alta prevalenza perché i pazienti convivono molti anni con la malattia. I NET rappresentano meno dello 0,5 per cento di tutti i tumori maligni ed in Italia si registrano 4-5 nuovi casi ogni 100.000 abitanti.

In questo ambito, negli ultimi anni, si sta verificando un lento ma incrementale aumento di incidenza anche dei tumori cerebrali, come il glioblastoma soprattutto negli over 65 con circa 4 casi per 100.000 abitanti nel nostro Paese.

Oggi non esiste una strategia di prevenzione, e la ricerca di base volta alla comprensione dei meccanismi molecolari, la diagnostica avanzata e le terapie innovative restano le uniche strade, ancora non completamente esplorate per cercare di arrestare l'insorgenza e la progressione di malattia.

L'innovazione è la chiave di volta della ricerca traslazionale, un connubio capace di condurre verso diagnosi precoci più accurate e trattamenti più efficaci: la diagnostica avanzata supportata dalla caratterizzazione genetica indirizza la medicina di precisione e con la conoscenza di base si sviluppano nuovi farmaci.

L'eccellenza della ricerca scientifica, il network che integra competenze e know how, la protezione brevettuale che garantisce la tutela delle innovazioni, la designazione di "farmaco innovativo", i fondi stanziati ad hoc per questa classe di farmaci ad alto valore etico e il fondo nazionale AIFA 5%, rappresentano una buona cassetta degli attrezzi per supportare l'innovazione.

Il progetto Rare PlatNet si delinea come una best practice di notevole interesse per la sua rilevanza scientifica e divulgativa attraverso la realizzazione di una piattaforma tecnologica, un ecosistema che mette in relazione conoscenze multidisciplinari e strumenti innovativi nell'ambito della lotta alle patologie oncologiche rare.

RICERCA SCIENTIFICA, L'IMPORTANZA DELLA COLLABORAZIONE E DEL NETWORK

La ricerca scientifica consente a un Paese di essere competitivo nel "mercato" globale della conoscenza, di stare al passo con i Paesi più avanzati e di garantire il benessere della popolazione. Il trasferimento tecnologico e la valorizzazione dei risultati della ricerca applicata hanno un ruolo determinante nelle moderne dinamiche di sviluppo dei sistemi

economici e sociali.

Fare ricerca, soprattutto in ambito scientifico, richiede una sinergia di competenze integrate, che permettono di generare nuove conoscenze e tecnologie in grado di alimentare un ecosistema dell'innovazione.

Le "competenze" indicano la capacità degli individui di collaborare e combinare, in modo efficace e responsabile, i diversi elementi delle conoscenze e delle abilità che possiedono, mirando ad un obiettivo comune. Dalla reciprocità dello scambio si consolidano i fili della rete, del network, il cui valore spesso cambia le sorti della scienza, offrendo soluzioni innovative e "out of the box".

L'innovazione e il progresso non nascono esclusivamente dall'operato di singole menti geniali, ma possono essere il frutto di un'attività di "import-export" di conoscenze, di interazioni virtuose e creative basate sul dialogo e l'ascolto tra saperi diversi.

I vantaggi della cooperazione sono molteplici: ampliare gli scopi e le prospettive delle ricerche scientifiche, condividere risorse, ottimizzare i processi abbattendo le barriere organizzative e normative, controllare gli effetti della distorsione (bias) della ricerca, abbreviare il time to market, divulgare velocemente la conoscenza.

Quest'ultimo processo è ulteriormente avvantaggiato dallo sviluppo di internet e delle tecnologie ICT che hanno permesso un libero accesso ai contenuti scientifici, ai dati delle sperimentazioni e alle nuove metodiche diagnostiche.

La piena fruibilità dei dati migliora la qualità della ricerca spostando la frontiera della conoscenza e sostiene in modo significativo il trasferimento tecnologico e l'innovazione, elementi fondamentali per lo sviluppo delle soluzioni innovative a supporto del benessere della comunità.

Il dialogo e l'interazione all'interno della comunità scientifica assume un ruolo chiave perché è grazie al confronto che emergono nuovi punti di vista e prospettive di ricerca arricchite da una molteplicità di sguardi e approcci disciplinari.

I benefici sociali connessi allo sviluppo dei progetti basati su "Piattaforme e Infrastrutture" sono molto rilevanti e incidono direttamente sulla filiera della sanità pubblica, attraverso l'immissione di innovazioni importanti, sia nella diagnosi che nella terapia delle patologie oncologiche per l'innalzamento del tasso di sopravvivenza e del livello della qualità della vita dei cittadini/pazienti. Tali benefici si concretizzano anche nella riduzione dei costi dovuti all'incremento della velocità e precisione di diagnosi e la possibilità di innalzare l'efficacia dei trattamenti attraverso un uso efficiente dei dispositivi, protocolli e farmaci che saranno immessi nel sistema.

In questo contesto, il progetto Rare.Plat.Net ha creato una rete di collaborazione regionale integrando specialisti con competenze diverse che hanno incrementato la conoscenza nell'ambito delle patologie rare rappresentate dai tumori neuroendocrini e glioblastoma, e hanno affrontato aspetti non solo prettamente tecnici ma anche normativi e tecnologici.

A livello nazionale ed internazionale sono numerose le iniziative

di collaborazione tra esperti in materia che insieme cercano di dare risposta alle esigenze dei pazienti: le associazioni più rappresentative in questo ambito sono NET Team, ENETS (European Neuroendocrin Tumor society), ASCO, IART (Italian Association Rare Tumor).

Il network, inoltre, assume un ruolo rilevante di know how sharing con il trasferimento della conoscenza ai pazienti e l'armonizzazione delle differenze territoriali rispetto all'accesso alle nuove terapie. Anche in questo caso i gruppi di associazioni di pazienti, sempre più coinvolti nel processo di innovazione, guidano con le proprie esigenze lo sviluppo di nuove soluzioni in ambito clinico e diagnostico e permettono la diffusione di informazioni importanti che riguardano le sperimentazioni cliniche e i centri coinvolti.

LA PROTEZIONE BREVETTUALE E IL LIVELLO DI SPECIALIZZAZIONE REGIONALE SULLE TEMATICHE DI RARE.PLAT.NET

L'innovazione rappresenta uno dei motori principali di sviluppo di una società, di una comunità, di un Paese. Dal punto di vista del diritto, si sostanzia nell'invenzione intesa come la soluzione tecnica di un problema, il cui alto valore immateriale assume una connotazione non solo economica, ma soprattutto etica.

La tutela della proprietà intellettuale è un importante asset strategico che svolge un ruolo fondamentale nell'incremento della competitività riconoscendo all'inventore il diritto esclusivo di implementarla, produrla, venderla. Il brevetto è uno strumento di innovazione che incentiva e stimola il progresso poiché attraverso la pubblicazione e divulgazione delle specifiche dell'invenzione, tutti gli esperti nel campo possono usarle come elementi costitutivi per scoperte future e concorrenti.

La produzione scientifica, soprattutto in ambito accademico, supporta l'innovazione che spesso concretizza le proprie conoscenze in pubblicazioni o brevetti che possono essere conferiti in un processo tecnologico a spin-off, startup o corporate. Il livello di specializzazione della produzione scientifica indica il peso del know how prodotto in quella specifica regione rispetto ad un contesto nazionale o internazionale.

Per analizzare il livello di specializzazione regionale rispetto alle tecnologie sviluppate nel progetto Rare.Plat.net e contestualizzarne a livello nazionale ed internazionale la produzione scientifica, è stata condotta un'analisi su Scopus (www.scopus.com), valutando i parametri bibliometrici e la produzione scientifica.

Scopus (Elsevier) è un database corposo che copre diversi ambiti scientifici dalle scienze della salute, della vita, alla fisica alle scienze sociali che permette un'analisi dei trend scientifici.

Il primo step dell'analisi SCOPUS ha previsto la costruzione di una query contenente delle key words che identificassero i temi e le tecnologie contenute nel progetto Rare.Plat.Net, di cui se ne riportano alcune a titolo d'esempio: endocrine tumors, hypothalamus, adrenals, blood, biomarkers, patient, diseases, thyroid and parathyroid, glioblastoma, radioimmunological techniques, monoclonal antibodies, surgical, bioptic, genomic, epigenomic, selective, targeting, drug delivery, pharmaceutical formulation. La query ha permesso di interrogare il sistema e capire

quanta produzione scientifica fosse stata prodotta e da quali attori (ricercatori, università, istituzioni di ricerca, etc.)

La ricerca ha restituito 12.046 documenti, di cui 1.091 da ricercatori italiani afferenti principalmente agli Atenei di Roma e Milano. In Regione Campania, le Università di Napoli, Salerno e Benevento hanno prodotto 109 papers. Utilizzando la produzione scientifica su scala nazionale come baseline, è stato possibile ricavare un indice di specializzazione della Regione Campania pari a 1,50, superiore alla media Nazionale.

A livello mondiale la produzione scientifica inizia negli anni '70, il maggior contributo viene dato dagli Stati Uniti con un programma di finanziamento tra i più ambiziosi nella storia della ricerca promosso dal National Cancer Institute. Dopo una inflessione, nel 1985 il numero delle pubblicazioni in riferimento ai temi del progetto tornano a crescere, grazie anche a numerose iniziative basate su finanziamenti pubblici a supporto della ricerca sul cancro (fig.1 e fig.2).

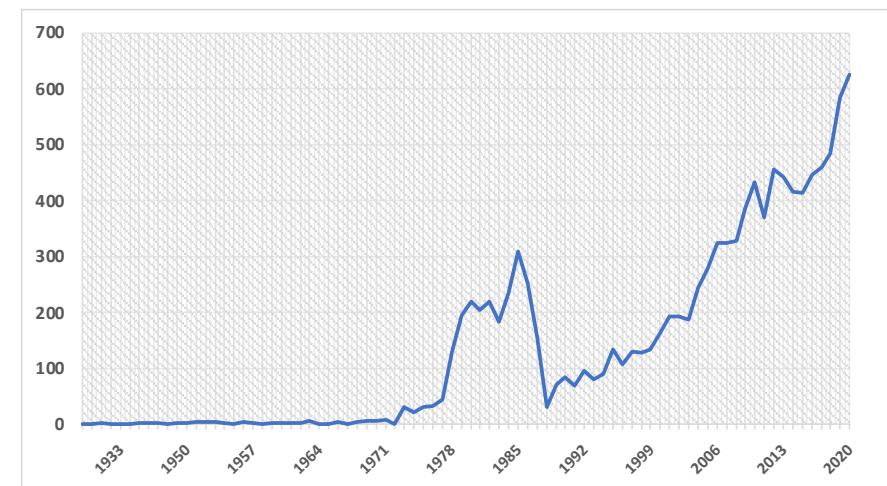


fig.1: Numero di pubblicazioni mondiale per anno sui temi del progetto Rare.Plat.Net



fig.2: Numero di pubblicazioni suddivise per soggetti finanziatori (funding sponsors)

La ricerca scientifica nel settore dei tumori oggetto di studio nel progetto europeo Rare.Plat.Net è finanziata prevalentemente da istituzioni inglesi, americane e cinesi.

Al decimo posto troviamo la Commissione Europea con i programmi quadro e soltanto al 17° posto un'associazione Italiana, l'AIRC (fig.2).

L'Italia è al terzo posto nel mondo per numero di pubblicazioni sui temi della query, nonostante i finanziamenti ricevuti siano più esigui rispetto alla media americana ed europea, indicativo dell'elevata qualità della ricerca italiana (fig.3)

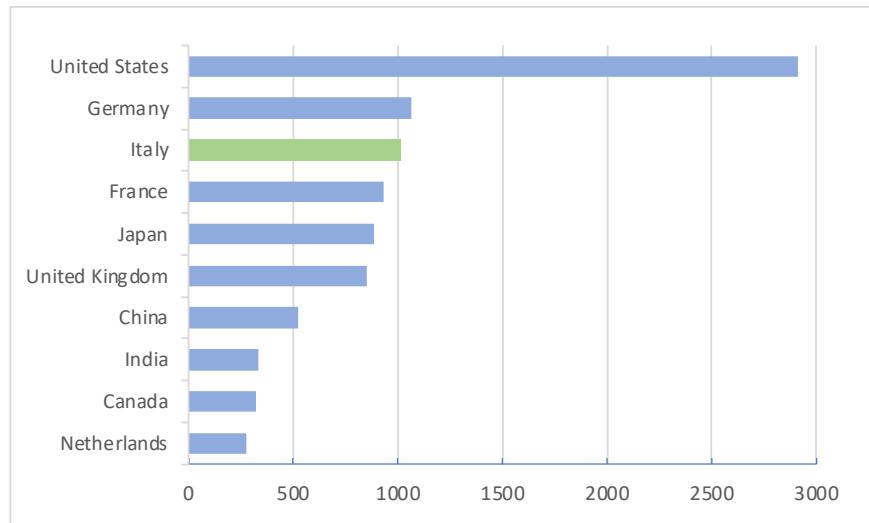


fig.3: produzione scientifica per Paese

In linea con la produzione scientifica, anche il numero di domande di brevetto è cresciuto esponenzialmente negli ultimi anni (fig.4).

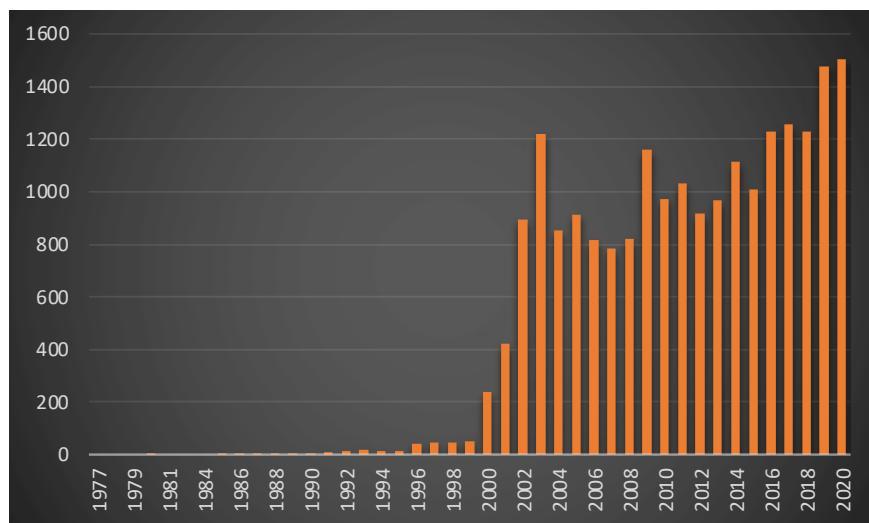


fig.4: Numero di domande di brevetto nel mondo dal 1977 ad oggi

DESIGNAZIONE DI FARMACO INNOVATIVO E I FONDI ISTITUITI A SOSTEGNO DI QUESTA CLASSE DI FARMACI

“Nuovo” non è sempre sinonimo di “innovativo”. L’agenzia italiana del farmaco, l’AIFA con la determina n. 1535/2017 ha stabilito i criteri per l’attribuzione del requisito di innovatività ai farmaci oncologici e non oncologici, fondamentali per il rimborso degli stessi a valere su due fondi *ad hoc* da 500 milioni di euro ciascuno, istituiti per farmaci innovativi e oncologici innovativi con la legge di Bilancio del 2017.

I criteri di attribuzione dell’innovatività hanno come obiettivo” [...] *quello di garantire, armonizzandolo sul territorio nazionale, un rapido accesso a farmaci che possiedono un chiaro valore terapeutico aggiunto rispetto alle alternative disponibili, e dall’altro quello di incentivare lo sviluppo di farmaci che offrano sostanziali benefici terapeutici per i pazienti”.*

Tale affermazione sottende due aspetti delicati, il primo riguarda il tema dell’uguaglianza nell’accesso a terapie sempre più promettenti. È noto che alcuni sistemi regionali fanno registrare ritardi ingiustificati e limitazioni nell’accesso alle cure. Infatti, nel caso dei nuovi farmaci utilizzati in patologie sempre più complesse e diffuse, questo potrebbe diventare un forte elemento di diseguaglianza in sanità generando una classificazione tra pazienti basata su ragioni territoriali e/o su diagnosi e trattamenti. Tenuto conto dell’imminente disponibilità di nuovi medicinali ad alto costo, molti dei quali impiegati proprio in ambito oncologico, questo rischio è di solare evidenza.

Il secondo aspetto, oggetto di dibattito nella comunità scientifica, è legato alla natura e agli effetti premianti del “*sistema dei fondi vincolati*”, che incentivano lo sviluppo di farmaci il cui plus valore è rappresentato dal beneficio clinico che il paziente riceve.

La definizione di innovatività consente al farmaco di essere inserito nel fondo dei farmaci innovativi beneficiando di un vantaggio economico nella rimborsabilità e il pronto inserimento nei Prontuari Regionali.

L’aggettivo “innovativo”, quindi, assume una connotazione cruciale in termini di rimborso, accesso al farmaco e aspettative cliniche e pertanto la sua definizione necessita di un rigore scientifico.

Il modello di valutazione scelto dall’AIFA, prevede un approccio multidimensionale e tiene conto di tre elementi: il bisogno terapeutico, ovvero la risposta alle esigenze terapeutiche di una popolazione di pazienti (*unmet medical need*); il valore terapeutico aggiunto, rappresentato dall’entità del beneficio clinico (maggiore o minor efficacia) apportato dal nuovo farmaco rispetto alle alternative disponibili, se esistenti; ed infine la qualità e la fondatezza delle analisi e delle prove scientifiche a supporto della richiesta di riconoscimento di innovatività.

A seguito della valutazione congiunta di questi tre parametri, verrà formulato il giudizio di innovatività.

Potranno essere considerati innovativi i farmaci ai quali siano stati riconosciuti, in relazione alle singole indicazioni, un bisogno terapeutico e un valore terapeutico aggiunto entrambi di livello “massimo” o “importante”, ed una qualità delle prove “alta”. L’innovatività non potrà

essere riconosciuta, invece, in presenza di un bisogno terapeutico e/o di un valore terapeutico aggiunto giudicati come “scarso” o “assente”, oppure di una qualità delle prove di livello “bassa” o “molto bassa”.

Una deroga a questa classificazione sarà applicata ai farmaci destinati a patologie rare. Per tali farmaci, infatti, dato l'esiguo numero di pazienti che caratterizzano queste patologie, è riconosciuta la difficoltà oggettiva a condurre studi clinici (inadeguata potenza statistica). Pertanto, in presenza di un elevato bisogno terapeutico e di forti indicazioni di un beneficio terapeutico aggiunto, sarà possibile attribuire l'innovatività anche sulla base di prove di qualità “Bassa”.

Un esempio è rappresentato dal lutezio - ^{177}Lu - oxodotreotide (Lutathera), il primo radiofarmaco approvato in Europa e in Italia per i NETs, sviluppato da Advanced Accelerator Applications (AAA – Novartis Company). Esso ha guadagnato lo status di farmaco innovativo nel trattamento già in prima linea dei tumori neuroendocrini del tratto gastro-entero-pancreatico (NET-GEP).

Nel 2017 sono stati istituiti due fondi aggiuntivi alla spesa farmaceutica da 500 milioni di euro ciascuno, nati per sostenere le terapie erogate con i farmaci innovativi oncologici e non oncologici. Tali fondi vengono confermati attraverso la legge di bilancio e sono destinati a quei farmaci che possiedono il requisito di innovatività terapeutica piena o condizionata.

Ogni anno l'elenco di questi farmaci viene rivisto per garantire il rispetto dei criteri di innovatività concessi e la lista è pubblicata sul sito dell'AIFA. Grazie a questo strumento i prodotti innovativi sono resi immediatamente disponibili agli assistiti nonostante l'elevato costo.

Un ulteriore aiuto finanziario a sostegno delle patologie rare è il Fondo Nazionale “AIFA” -Fondo 5%. La Legge 326/2003 ha previsto la costituzione di un Fondo nazionale presso AIFA per l'impiego di farmaci orfani per il trattamento di malattie rare e di farmaci che rappresentano una speranza di terapia, in attesa della commercializzazione, per particolari e gravi patologie.

Il Fondo è costituito dal 50% del contributo che le aziende farmaceutiche versano su base annuale ad AIFA. Tale contributo è corrispondente al 5% delle spese annuali per attività di promozione che le aziende farmaceutiche destinano ai medici.

Anche questo strumento è a favore dell'accessibilità di trattamenti ad alto costo per bisogni terapeutici importanti, consentendo l'accesso a farmaci non ancora commercializzati e garantendone la sostenibilità economica.

Ridurre il “time to market” per questi nuovi farmaci rappresenta una sfida per la comunità, non solo scientifica.

Progetti virtuosi come la piattaforma RarePlatNET, grazie alla quale le competenze in vari settori si integrano e implementano la conoscenza getta le basi per un razionale che possa condurre a nuove chance terapeutiche e/o diagnostiche ed implementare la catena del valore, ampliando il processo di diffusione dei risultati e della conoscenza di frontiera.

Annunziata Cummaro, Maria Emilia Mercurio, Valentina Battista, Aniello Cammarano, Caterina Meglio

Materias srl, Corso N. Protopisani, 50 - 80146 Napoli

Referenze

AIRC www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/guida-ai-tumori/tumori-neuroendocrini

OMAR www.osservatoriomalattierare.it/i-tumori-rari/glioblastoma/14375-glioblastoma-accertata-l-esposizione-a-radiazioni-ionizzanti-come-fattore-di-rischio-408

Progetti di ricerca e innovazione in ambito oncologico regione Campania programmazione unitaria 2021 febbraio

www.europa.regionecampania.it/wp-content/uploads/2021/06/Ricerca_Oncologico_FEB2021.pdf

SCOPUS www.scopus.com/

Eckhouse S, Lewison G, Sullivan R. Trends in the global funding and activity of cancer research. Mol Oncol. 2008;2(1):20-32. doi:10.1016/j.molonc.2008.03.007

Fondo per il concorso al rimborso alle regioni per l'acquisto dei medicinali innovativi e

Fondo per il concorso al rimborso alle regioni per l'acquisto dei medicinali innovativi oncologici”; legge 11 dicembre 2016, n. 232 - Bilancio di previsione dello Stato per l'anno finanziario 2017 e bilancio pluriennale per il triennio 2017-2019 (16G00242) (GU Serie Generale n.297 del 21-12-2016 - Suppl. Ordinario n. 57), articolo 1, commi co. 397-408

Determina AIFA n. 1535/2017 del 31 marzo 2017, aggiornata dalla Determina 1535/201725 del 12 settembre 2017)

Gori et al. Differences in the availability of new anti-cancer drugs for Italian patients treated in different regions. Results of analysis conducted by the Italian Society of Medical Oncology (AIOM)- 2010

AIFA <https://www.aifa.gov.it/farmaci-innovativi>

Fondo Nazionale “AIFA” - Fondo 5% www.aifa.gov.it/-/aifa-riapre-l-accesso-al-fondo-5

The project

Rare.Plat.Net – Diagnostic and therapeutic innovations for neuroendocrine and endocrine tumors and for glioblastoma through an integrated technological platform of clinical, genomic, ICT, pharmacological and pharmaceutical skills

This project uses advanced methods and techniques as well as new developing molecules for early diagnosis, analysis of recurrence and tailored treatments, to improve long-term response and reduce toxicity in all types of the listed endocrine rare tumors.

The general objective of the project is to improve the clinical management of patients with rare neoplasms such as aggressive hypothalamus-pituitary tumors, adrenal cortical carcinomas, NETs and glioblastomas.

Partners: BioCam S.c.ar.l. Ca.Re.BioS Srl, CNR (IEOS, ICAR), EHealthNet Genomix4Life Srl Laboratorio Cesare Pandolfi & C Sas, Materias Srl, Neatec SpA, S.D.N. SpA, SoftLab SpA, Sync Lab S.r.l, Tecnova S.c.ar.l., Università Telematica San Raffaele Università degli Studi di Napoli Federico II, Università degli Studi di Salerno

The project is co-financed by the European Union, the Italian State and the Campania Region, as part of the POR Campania FESR 2014-2020

The best effect of any book is that it excites the reader to self activity.

Thomas Carlyle

Materias thanks all the authors
for their valuable contributions.

*Copying or other reproduction
of all or part of this book without
the prior written consent of the
copyright owner is prohibited.*

CONTENTS

Rare.Plat.Net project: the importance of multidisciplinary management in research and clinical management of patients with rare endocrine tumors	119
Biochemical and biomolecular characterization of neuroendocrine tumors	124
Polymer nanoparticles for targeted and controlled release of drugs for cancer therapy	130
Therapy of glioblastoma with molecularly targeted nanovectors	136
Study of gene mutations in rare tumors through interactions between miRNA and target genes	146
Immunotherapy in medullary thyroid cancer	152
Identification and characterization of the NCX2 sodium/calcium exchanger as a new molecular target in the development and pharmacological control of human glioblastoma	157
Genomic and transcriptomic characterization of gastro-entero-pancreatic neuroendocrine tumors	163
MiRNA analysis as possible biomarkers for the diagnosis of neuroendocrine tumors	172
A Solution for Medical/Clinical Data Privacy Management	181
Creation of a prototype software to support UNI EN ISO 2038: 2020 accreditation “Biobanking - General requirements for biobanking”	186
An innovative multiple network-based bioinformatics pipeline for the study of oncological diseases	200
A procedure for the extraction of the gene-gene mutation network core for gene mutation networks	206
Innovation tools in Neuroendocrine Tumors (NETs) and Rare Cancers	212

PREFACE

Prof. Luigi Nicolais

«But surpassing all stupendous inventions, what sublimity of mind was his who dreamed of finding means to communicate his deepest thoughts to any other person, though distant by mighty intervals of place and time! Of talking with those who are in India; of speaking to those who are not yet born and will not be born for a thousand or ten thousand years; and with what facility, by the different arrangements of twenty characters upon a page.»

Galileo Galilei, *Dialogue concerning the two chief world systems* (1632)

On 12 March 1610 Galileo Galilei published the *Sidereus Nuncius* in Venice at the small printing house of Tommaso Baglioni. A work that marks a turning point in the history of science and opens the doors to modern science, characterized by three fundamental moments: observing, interpreting, communicating. Observation arises from the gaze towards nature, from which the story derives.

The interpretation pushes Galileo to search for a meaning to lead to a common, explainable and scalable model. Finally, the scientist feels a new need, that is communicating and sharing their discoveries with all those who have "eyes in their heads and brains", so that they belong to all of humanity.

It is precisely from here, from the communication of knowledge, that the strength of a new science is hidden, based on public and shared knowledge, completing that process defined as "breaking down the paradigm of secrecy", which represents one of the cornerstones of the "scientific revolution".

The *Sidereus Nuncius* inaugurates, in all its main components and in all its main relationships, that

system that today we call "science communication", a science capable of growing because the contributions of each individual researcher are added to generate widespread knowledge, a unique collective and public enterprise. Thus, the "scientific community" was born in the seventeenth century, whose purpose is the creation - among its members - of a rational consensus of opinion on the facts of nature.

In the age of knowledge, science enters everyday life, permeates our society, infiltrates the meshes of politics, economic logic, cultural debate, becomes an arena of choices and discussions in which all citizens are called to take an active part. In a new contract between science and society, researchers are called upon to explain the meaning and usefulness of the studies they intend to carry out, and their spaces must therefore be negotiated, and to negotiate it is necessary to communicate, which means knowing each other and talking. Scientific research projects create value and have a significant social impact, but often encounter great difficulties in being known and shared by society and stakeholders, making technology transfer difficult and therefore the practical application of the results obtained.

The research project, Rare Plat Net in the field of rare oncological diseases, has a strong impact on civil society, as it addresses an issue with a strong social impact.

For these reasons, the research conducted by the distinguished research groups within the project and the results obtained must be widely disseminated even among "non-experts".

Materias, in collaboration with the lead partner Biocam srl, presents this volume in order to facilitate the dissemination of research results and how they can be applied. A mission capable of fueling scientific and professional reflection on clinical practices, on evidence of effectiveness, as well as on techniques and methods of evaluation and intervention, in order to implement operational models increasingly based on the integration of knowledge and skills. The contributions collected meet the criteria of scientific and informative rigor in consonance with the vision and mission of the project. Knowledge, therefore, is a public good and everyone has the right, each in their own role and with their own skills, to co-participate in the choices of science policy. Because - as Francis Bacon has written - science is not an appropriable good, it must not be for the benefit of this or that, but it is a common good: it must be for the benefit of all humanity.

Rare.Plat.Net project: the importance of multidisciplinary management in research and clinical management of patients with rare endocrine tumors

ABSTRACT

Rare endocrine tumors such as neuroendocrine tumors, hypothalamus-pituitary tumors and adrenocortical carcinoma represent a challenge for scientific research and clinical management as heterogeneous diseases that require a specific commitment to diagnostic complexities, variable clinical course and difficulties in the therapeutic choice. The integrated collaboration of specialists from different areas, able to tackle the disease globally, is crucial in order to improve the treatment path and patient survival. These objectives are the basis of the project "Diagnostic and therapeutic innovations for neuroendocrine and endocrine tumors and for glioblastoma through an integrated technological platform of clinical, genomic, ICT, pharmacological and pharmaceutical skills" RARE.PLAT.NET which saw the commitment and the collaboration of experts in various research fields and contributed to creating a collaborative network for the continuation of studies in this area.

ENDOCRINE TUMORS RARE

Rare tumors account for 24% of all new cancer diagnoses and affect approximately 900,000 people in Italy (Gatta 2017). Rare endocrine tumors include neuroendocrine tumors (NETs), hypothalamic-pituitary tumors and adrenocortical carcinoma (CCS). For these pathologies, sufficiently advanced and reliable methodologies are not yet available for an early diagnosis, which allows to effectively improve the prognosis and quickly identify any relapses. Furthermore, from a therapeutic point of view, although the panorama has expanded somewhat in recent years, the choice of different therapies and their sequence are widely debated.

The RARE.PLAT.NET project was conceived with the aim of improving the clinical management of patients affected by these pathologies, through the development of new methods, technologies, procedures, and molecules for the early diagnosis of initial and relapse of the disease, for the definition of precise tumor categories with different prognosis, for the prediction of response to more targeted and effective and less toxic therapies, able to be active both on the well differentiated forms with indolent growth and in the more aggressive poorly differentiated ones. This project has

been conducted within the ENETS (European Neuroendocrine Tumor Society) Center of Excellence of European reference for neuroendocrine tumors, together with the ENDO ERN (European Reference Network on Rare Endocrine Conditions) Network for the recruitment and follow-up of patients with rare endocrine tumors.

RARE NEUROENDOCRINE TUMORS

Epidemiological estimates indicate that the incidence of these neoplasms is constantly increasing.

In particular, patients with differentiated NETs are often forced to live with the disease for many years and carry out complex chronic therapies that are not without side effects. NETs are rare cancers that originate from the widespread neuroendocrine system. The cells of the neuroendocrine system have an ubiquitous distribution within the body. More frequently the forms of NET originate from the digestive tract and also from the respiratory tract. Other less frequent sites of origin of NETs are the genitourinary tract, the skin (merkelomas), the thyroid gland (medullary carcinoma), the adrenal glands and the nerve ganglia (pheochromocytomas and paragangliomas). The overall incidence of NETs is gradually increasing, estimated at about 5 new cases per 100,000 per year (Dasari 2017). Although in most cases these are sporadic pathologies, about 10% of NETs are inherited, arising in the context of hereditary neoplastic syndromes more often autosomal dominant with mutations of tumor suppressor genes such as MEN-1, VHL, NF1, TSC, SDH and the protooncogene RET.

The anatomo-pathological classifications have changed in recent years trying to combine the best tissue and ultrastructural characterization with a possible correlation with prognosis. The degree of proliferation of neoplastic cells, expressed through the assessment of the mitotic index or Ki-67, is one of the most important parameters in the classification of NETs as it directly correlates with the prognosis. The mitotic index expresses the ratio between the number of proliferating cells and the total number of cells within a neoplasm.

Ki-67 is an antigen expressed by cells during the active phase of the cell cycle (G1-M), identified using the monoclonal antibody MIB-1, used as a discriminating factor in the distinction of low or high potential malignant lesions.

NETs are more frequently well-differentiated tumors with a low-intermediate proliferative index. Lung NETs follow a different classification based on the presence of necrosis and mitosis. For all NETs, there is a subgroup with low differentiation and high proliferative index, which includes poorly differentiated neuroendocrine carcinomas. In particular, the differentiated NETs are characterized by a long natural history of disease, even in the case of the presence of metastatic lesions and this determines the need to carry out chronic, multiple, and also in association therapies, complex and not without side effects (Faggiano 2017).

In fact, NETs frequently present with metastases already at diagnosis, mainly to the liver. As far as disease biomarkers are concerned, chromogranin-A is currently the best tissue neuroendocrine marker, while

its diagnostic, prognostic and predictive role as a circulating marker is scarce.

Hypothalamic-pituitary tumors are extremely rare neoplasms, and the epidemiological and mortality characteristics are sometimes not yet fully known. Hypothalamic-pituitary tumors include biologically aggressive and non-secreting neoplasms, pituitary carcinomas, atypical adenomas, craniopharyngiomas, germ cell tumors, chordomas, gliomas and meningiomas. Some of these neoplasms show a tendency to local invasion, resistance to treatment and rapid relapse with a high mitotic index. Carcinomas of the pituitary gland can cause distant metastases and the prognosis is poor since these tumors often recur after radical surgery with poor response to radiotherapy and chemotherapy (Colao 2010).

Among the therapeutic options in addition to chemotherapy with temozolamide, pasireotide, a ligand of somatostatin receptors that potentially suppresses hormone secretion in primary cultures of pituitary cancer and could represent a promising therapy also for hypothalamic-pituitary neoplasms with aggressive behavior and malignant. Furthermore, the mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor, everolimus, has been shown to inhibit cell proliferation in primary cultures of pituitary neoplasms, reducing cell growth and promoting apoptosis and therefore, could represent a promising therapeutic option (Pivonello 2018), similarly to anti-angiogenic therapy.

Adrenocortical carcinoma (CCS) is one of the most aggressive solid cancers, as evidenced by a metastatic survival of less than 15%. It has an incidence of about 1-2 new cases per million per year, with an increased frequency during childhood and the fourth-fifth decade of life. Surgery remains the only treatment option, but only for patients who are diagnosed early, while treatment options for patients with advanced disease remain limited. Therefore, new therapeutic approaches are needed for this type of pathology (Fassnacht 2011).

ENROLLMENT AND MULTIDISCIPLINARY ACTIVITIES

The recruitment of patients affected by the tumors under study has been the basis of all the project activities. In particular, all patients who have come to observation with suspected neuroendocrine tumor, aggressive hypothalamic-pituitary tumor or adrenal cortical carcinoma afferent both on an outpatient basis and in hospital have been subjected to clinical, biochemical and instrumental diagnostic investigations.

Patients with rare neuroendocrine tumors both sporadic and part of inherited neoplastic endocrine and neuroendocrine syndromes have been included. Anamnestic, clinical, biochemical, and radiological instrumental data, both morphological and functional, have been collected for a correct clinical-pathological classification of the patients and histological confirmation has been obtained.

The recruitment included the collection and evaluation of anthropometric clinical parameters, as well as those relating to the pathology under study such as tumor size and radiological characteristics, evaluation of response parameters to therapy (survival) and toxicity (adverse events, quality of life), together with the evaluation of

anatomopathological parameters (histotype, site, stage, degree of differentiation, proliferative indices, immunohistochemical markers, in vivo expression of somatostatin and dopamine receptors) for the elaboration of clinical, biochemical and radiological (morpho-functional) programs follow-up.

The follow-up setting for the enrolled patients took place in a dedicated setting and according to criteria of clinical, radiological and histological aggression of the tumor. At the same time, family genetic screening in hereditary endocrine and neuroendocrine neoplastic syndromes has been started.

Biological samples (blood and serum) have been also collected, as well as surgical tissue samples of rare endocrine neoplasms. A protocol has been created, proposed and approved by the ethics committee for the creation of a biorepository relating to rare cancers of interest. A database has been also used for sharing data with project partners. The samples have been processed with hematoxylin-eosin staining, histochemical and immunohistochemical stains, ultrastructural investigations and reported according to the most recent classification criteria. The therapies practiced have been recorded to define therapeutic combinations and sequences and variations in terms of efficacy and / or toxicity.

As regards instrumental investigations, functional studies have been started with new tracers such as DOPA, to identify the possibility of early diagnosis of relapse and to identify small lesions. The database has been used for sharing the data with the project partners.

The clinical-pathological data of patients with various rare endocrine tumors have been placed in shared databases to identify data analysis and correlation algorithms, based on the integration of machine learning, pattern recognition and computational intelligence techniques to be activated on computing infrastructures with latest generation processors also for the identification of diagnostic and prognostic biomarkers of rare tumors of interest.

Furthermore, for the purpose of analyzing blood and tissue samples, the analyses envisaged for the correlation of the clinical-pathological data with the molecular data made available by the basic research units have been started with the aim of improving the prognostic definition and therapeutic strategy.

Potential molecular and morpho-functional markers for early diagnosis are currently under study.

Following the validation of specific predictors of response to therapy, specific molecular target therapies are being developed, aimed at the characteristic mutated pathway in collaboration with the project partners. A study has been also published in which the role of epigenetics in the diagnostic and therapeutic field for NETs has been analyzed (Colao 2020).

In conclusion, the increase in the incidence and need for oncological treatments for rare endocrine neoplasms stimulate the search for new diagnostic strategies, molecular analysis, and innovative drugs.

For these reasons it is essential the collaboration not only of specialists from different medical areas, including endocrinologists, radiologists, pathologists, nuclear doctors, oncologists, surgeons, gastroenterologists,

professionals related to basic research such as biologists, geneticists, biotechnologists, but also engineers for data processing and the development of technologies capable of giving a concrete change to the research and treatment of these neoplasms.

Roberta Modica and Claudia Pivonello¹, Maria Laura Del Basso De Caro², Paolo Cappabianca³, Annamaria Colao^{1,4}.

¹ - Department of Clinical Medicine and Surgery, Federico II University of Naples.

² - Department of Advanced Biomedical Sciences, Federico II University of Naples.

³ - Department of Neuroscience and Reproductive and Odontostomatological Sciences, Federico II University of Naples.

⁴ - Holder of the Unesco Chair for Health Education and Sustainable Development, Federico II University of Naples.

References

Colao A, de Nigris F, Modica R, Napoli C. Clinical Epigenetics of Neuroendocrine Tumors: The Road Ahead. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 Dec 15;11:604341. doi: 10.3389/fendo.2020.604341. PMID: 33384663; PMCID: PMC7770585.

Colao A, Ochoa AS, Auriemma RS, Faggiano A, Pivonello R, Lombardi G. Pituitary carcinomas. *Front Horm Res*. 2010;38:94-108. doi: 10.1159/000318499. Epub 2010 Jul 5. PMID: 20616500.

Dasari A, Shen C, Halperin D, Zhao B, Zhou S, Xu Y, Shih T, Yao JC. Trends in the Incidence, Prevalence, and Survival Outcomes in Patients With Neuroendocrine Tumors in the United States. *JAMA Oncol*. 2017 Oct 1;3(10):1335-1342. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.0589. PMID: 28448665; PMCID: PMC5824320.

Faggiano A, Lo Calzo F, Pizza G, Modica R, Colao A. The safety of available treatments options for neuroendocrine tumors. *Expert Opin Drug Saf*. 2017 Oct;16(10):1149-1161. doi: 10.1080/14740338.2017.1354984. Epub 2017 Jul 20. PMID: 28705090.

Fassnacht M, Libé R, Kroiss M, Allolio B. Adrenocortical carcinoma: a clinician's update. *Nat Rev Endocrinol*. 2011 Jun;7(6):323-35. doi: 10.1038/nrendo.2010.235. Epub 2011 Mar 8. PMID: 21386792.

Gatta G, Capoccia R, Botta L, Mallone S, De Angelis R, Ardanaz E, Comber H, Dimitrova N, Leinonen MK, Siepling S, van der Zwan JM, Van Eycken L, Visser O, Žakelj MP, Anderson LA, Bella F, Kaire I, Otter R, Stiller CA, Trama A; RARECAREnet working group. Burden and centralised treatment in Europe of rare tumours: results of RARECAREnet-a population-based study. *Lancet Oncol*. 2017 Aug;18(8):1022-1039. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30445-X. Epub 2017 Jul 4. Erratum in: *Lancet Oncol*. 2017 Aug;18(8):e433. PMID: 28687376.

Pivonello C, Patalano R, Solari D, Auriemma RS, Frio F, Vitulli F, Grasso LFS, Di Cera M, De Martino MC, Cavallo LM, Cappabianca P, Colao A, Pivonello R. Effect of combined treatment with a pan-PI3K inhibitor or an isoform-specific PI3K inhibitor and everolimus on cell proliferation in GH-secreting pituitary tumour in an experimental setting. *Endocrine*. 2018 Dec;62(3):663-680. doi: 10.1007/s12020-018-1677-2. Epub 2018 Jul 31. PMID: 30066286.

Biochemical and biomolecular characterization of neuroendocrine tumors

ABSTRACT

As part of the development of new diagnostic technologies aimed at the diagnosis and therapy of tumors, MeriGen Diagnostic has defined a series of assays to provide applied support for the evaluation of the patient's functional processes and for the molecular characterization of the disease. In particular, as part of the study of the influence of diabetes, insulin resistance and obesity on tumors, the dosages of the following hormones were selected and validated: Ghrelin; Adiponectin, Leptin, GH, IGF-1, IGFBP3, GLP-1. The molecular biology sector of the MeriGen Diagnostic Laboratory has been involved in the development of a system for the molecular characterization of patients with rare neuroendocrine tumors. Specifically, we have prepared a methodology to define their CNV (Copy Number Variants) (Retterer et al 2014) in patients with cancer to identify the predisposing and/or causative parameters. Finally, validations of mutation assays in Sanger and/or Digital PCR and the applications in perspective on patients affected by neuroendocrine tumors are reported.

EVALUATION OF THE PATIENT'S FUNCTIONAL PROCESSES

The hormones Leptin, Adiponectin, Grelin, GLP-1 and IGFBP3, were detected and quantified by ELISA or RIA technology. Adipocytes are the major source of leptin and circulating levels closely correlate with fat mass. The primary role of leptin is the control of appetite and the regulation of hypothalamic endocrine function. Adiponectin levels are inversely related to obesity and insulin resistance. It has an anti-atherogenic and anti-inflammatory action. Ghrelin has horizing properties, i.e., it increases the search and intake of food, and decreases energy consumption by reducing physical activity. High levels of ghrelin are therefore related to an increase in body weight, especially as regards fat mass (Vendrell et al, 2004). Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) is a hormone produced by the intestine that stimulates the secretion of insulin and inhibits the secretion of glucagon by the pancreas.

Its release occurs after the meal, or when the blood sugar rises due to the carbohydrates introduced with food. IGFBP3, also called enterostaminin, is a hormone capable of controlling the growth and development of stem cells in the intestine. Defects in the production of this hormone can cause problems with malabsorption, diarrhea, growth retardation associated with abnormal bowel development. Growth hormone (GH), or somatotropic hormone, is a protein produced by the somatotropic cells of the anterior pituitary gland secreted in a pulsatile way, especially in the first hours of sleep. GH controls the production of somatomedins (IGF-1) by peripheral tissues, especially in the liver. IGF-1 plays a very important role in the growth processes of the child and

maintains its anabolic effects even in adulthood. IGF-1 has insulin-like activity and promotes cell proliferation and differentiation, especially at the cartilage and muscle level.

In addition to causing an increase in appetite, glucose oxidation and lipogenesis, ghrelin also stimulates the secretion of GH. In contrast to ghrelin, GH promotes lipolysis, glucose production and insulin secretion. Both ghrelin and GH are suppressed by the intake of nutrients, especially glucose. Despite these widely described effects, the role of the GH hormone in the regulation of ghrelin is not yet fully understood. It has been found that conditions such as obesity and metabolic syndrome are characterized by an increase in circulating leptin in parallel with a decrease in adiponectin. Consequently, the adiponectin/leptin ratio could be used as a marker to assess adipose tissue dysfunction (Frühbeck et al, 2018).

In particular, during the development of the project the serum levels of leptin and ghrelin were measured by radioimmunoassay technique (Radio Immuno Assay, RIA), those of adiponectin by ELISA technique. The ELISA test is based on the use of antibodies labeled with an enzyme (generally peroxidase), so that the resulting conjugates have both immunological and enzymatic activity. Having one of the components (antigen or antibody) adhered to the plate, the antigen-antibody reaction is immobilized and therefore can easily be highlighted with the addition of the substrate which, reacting with the enzyme, will produce a color that is visible and quantifiable with the spectrophotometer.

The assay is quantitative thanks to a calibration curve with standards of known concentration. The RIA technique is used to assay any immunogenic compound available in pure and radioactively labelable form. It has a high sensitivity (pg/mL order), high specificity, high precision. The key elements of the assay are: the antibody (Ab, class IgG) specific for the antigen to be determined (Ag), the sample containing the Ag and the radioactively labeled Ag (Ag^*) in pure form (usually Iodine-125 is used in the marking). Also, with this technique the quantization takes place by interpolating the data obtained with a calibration line. The dosages of IGF1 and GH were carried out by means of an automatic Liaison® chemiluminescence analyzer. Samples of volunteers were analyzed healthy for the validation of the following commercial kits available: Meridian Healthcare, DRG Instruments GmbH, Labor Diagnostika nord gmbh, Bio Vendor. For human adiponectin the kits used showed an average sensitivity of 1 ng/ml and a range between 1 and 200 ng/ml. For ghrelin the RIA kits used showed an average sensitivity of 100 pg/ml with a range between 100 and 10,000 pg/ml. For leptin the same technique was used with a detection limit of 0.5 ng/ml. The analyzed population is made up of healthy volunteers, of both sexes. For greater completeness of the data, parameters useful for evaluating the general clinical picture were analyzed.

PARAMETER	AVERAGE CONCENTRATION ± D.S.
Fasting blood glucose (mg/dL)	88 ± 4.6
Fasting insulin (μ U/mL)	9 ± 4.9
Colesterolo (mg/dL)	178 ± 25
cHDL (mg/dL)	53 ± 4.4
cLDL (mg/dL)	136 ± 10.4
Triglycerides (mg/dL)	80 ± 45
HOMA-IR	0,77 ± 0,1
Leptin (ng/ml)	5,0 ± 8,7
Ghrelin (pg/ml)	550 ± 9
Adiponectin (μ g/ml)	7,6 ± 2

Table 1 Results of biochemical assays

Thanks to the data obtained, it has been possible to validate calculation algorithms for the evaluation of the insulin resistance indices.

The role of adipokines in the modulation of lipid metabolism is testified by numerous evidences in the literature. Furthermore, the dysregulation of these proteins secreted by adipose tissue can contribute to the complications of obesity and the metabolic syndrome. At a clinical application level, the integrated evaluation of cardiovascular and metabolic risk, in association with the lipid profile, can therefore also include consideration of adipokine parameters (circulating levels and variations in the expression of receptors in circulating lymphomonocytes) and their integration, for example, in the leptin/adiponectin ratio (Yildiz, et al 2004).

Future research in this field will therefore be aimed at validating some adipokines as potential new biomarkers of dyslipidemic and atherosclerotic risk.

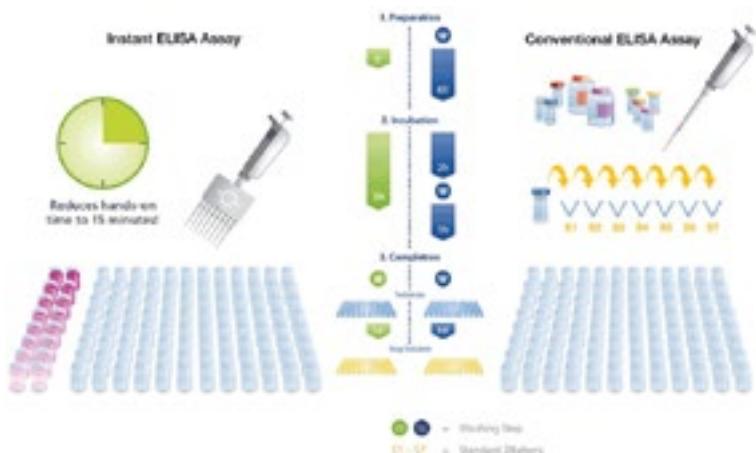


Figure 1 Elisa methodical graphic scheme

MOLECULAR CHARACTERIZATION

MeriGen Diagnostic has developed a methodology that allows to analyze the genome of patients suffering from rare neuroendocrine tumors in search of particular polymorphisms/mutations defined as CNV, or Copy Number Variants (Retterer et al 2014) predisposing and/or causative of the neoplasm. For this purpose, the Array-CGH method was used which allows to identify: variations in the number of chromosomes, macro-deletions/macroduplications, microduplications/microdeletions associated with diseases known in the literature and “Copy Number Variations” (CNVs) DNA variations of greater length of 1kb which are present in a variable number of copies in human genomes and which are believed to underlie the phenotypic differences between individuals. The principle of the technique is based on a competitive hybridization between two genomic DNAs, labeled with different fluorochromes, and portions of genomic DNA placed on a slide (probes).

The DNA regions derive from a healthy subject and can be: BAC clones (artificial bacterial chromosomes), PAC (artificial phage P1 chromosomes) and oligonucleotides corresponding to specific chromosomal regions. The resolution, on which the ability to identify genomic imbalances depends, varies from 100-150kb to 1Mb and depends on the size, number of probes and their distance from the reference genome. The competing DNAs are the “DNA test” derived from the patient under examination (amniotic fluid, peripheral blood, etc.) and the “control DNA”, i.e., a genomic DNA of a healthy subject; both are labeled with different colored fluorochromes, for example, cyanine 5 (Cy 5, green fluorochrome) and cyanine 3 (Cy 3, red fluorochrome) respectively. After the labeling step the DNAs are reunited and DNA-cot1 is added to them, a highly repetitive DNA in order to saturate the repetitive sequences in both genomes.

All the DNA present in this mixture is denatured and hybridized with the DNA regions spotted on the slide. At the end of the reaction, a special scanner analyzes the individual spots on the slide and quantifies the intensity of fluorescence emitted by both fluorochromes from each single spot. Under normal conditions the DNA test and the control DNA will be present in equal quantities and the two fluorochromes will balance to produce a third color (yellow). In the event that the DNA test shows a duplication there will be an excess of chromosomal material compared to normal, the resulting color will be green, if instead it has a deletion, an excess of normal DNA will be determined and the emitted color will be red. A special software is able to elaborate a profile for each chromosome identifying any areas of gain or loss of genetic material, possibly associated with pathological conditions (Picard et al, 2005).

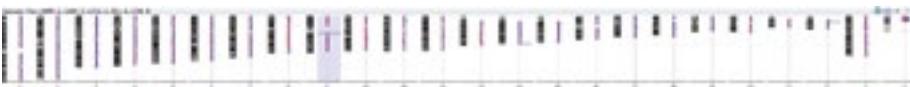


Figure 2 Array-cgh report showing all chromosomes (Cytogenomic 5.0 Software)

As part of the project, MeriGen Diagnostic initially identified a population of about 100 individuals defined as healthy, for which array-

cgh was performed in order to identify the CNVs commonly present in the population. The analysis of 100 individuals made it possible to characterize a series of recurring variants that were tabulated and studied with the support of databases available online. In particular, the search for the meaning of the variants was carried out using the portal <https://www.deciphergenomics.org/>. From the in-depth study, it emerged that almost all of the CNVs found in the healthy population are widely diffused and with a clearly benign meaning, also only a very small part of the variants found do not have a clear meaning, they are in fact marked as uncertain. The analysis of this reference population has therefore made it possible to identify a defined healthy CNV profile collected in a database prepared by us which will greatly facilitate the subsequent analysis of the samples of patients with neuroendocrine tumor, allowing the simplest identification of variants probably predisposing.

In the biomolecular field, another point on which the activity of our laboratory has concentrated was the validation of single nucleotide mutations found in affected patients using the NGS method, in particular we proceeded with the development of the assay by Sanger sequencing. The design of the primers has been done using the portal <https://primer3.ut.ee/>, the specificity of the oligonucleotides thus obtained, has been confirmed by consulting <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr> instead. The samples have been then tested by PCR and Sanger sequencing. Finally, the study of the electropherograms produced has allowed to validate the variants under study. MeriGen Diagnostic therefore proposes, following the validation of these data, to work on the development of a ddPcr panel that collects the single nucleotide variants most frequent in the population of patients suffering from neuroendocrine tumors and probably predisposing to neoplastic disease. The ddpcr is an innovative technique of absolute quantification of targets, able to identify rare markers thanks to its high analytical sensitivity (Quan et al 2018).

Digital PCR is an evolution of Quantitative PCR, a method that is currently used in diagnostics but through which such high sensitivity limits cannot be reached. Digital PCR, while in fact using the same reagents as a Real-time PCR, presents an important additional step, the division of the same sample into micro-reactions, a fundamental event in the reduction of target competition. The quantification does not require the use of calibration curves as well as being characterized by an endpoint fluorescence detection. The technique is based on the Poisson statistic, which assumes a fairly large random distribution of the molecules (micro-reactions). In particular, under certain conditions it is expected that in each division there is the probability of finding only one target or none. Based on the previous assumptions, the concentration for each sample is evaluated by counting the positive partitions with respect to the total number of partitions. The future use of this method in the context of laboratory diagnostics will allow, in addition to the identification of single nucleotide variants specifically associated with neuroendocrine tumors, also a quantification of the targets themselves where necessary.

CONCLUSIONS

MeriGen Diagnostic is currently in the evaluation phase of affected patient samples received from the Laboratory of Molecular Medicine and Genomics of the University of Salerno on which the methods developed will be tested to draw conclusions that can be immediately translated into laboratory diagnostics. From the preliminary data it emerges that thanks to the application of the numerous techniques described above, the evaluation of the functional processes of the NET affected patient can be satisfactorily achieved, supported and supported by the molecular characterization of the same.

Immacolata Di Biase, Labella Donato, Viviana Narciso, Altieri Vincenzo, Isabella Mezzanotte, Cristiano Stefano, Poziello Maria Pia, Sebastiano Di Biase

MeriGen Diagnostic & C. Sas. Traversa Michele Pietravalle 11, 80131 Naples

References

- Frühbeck G., Catalán V., Rodríguez A. (2018). Adiponectin-leptin ratio: a promising index to estimate adipose tissue dysfunction. Relation with obesity-associated cardiometabolic risk. *Adipocyte*.
- Vendrell J., Montserrat B., Vilarrasa N., Molina A., Gómez J. M., Gutiérrez C., Simón I., Soler J., Richart C. (2004). Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and proinflammatory cytokines: relationships in obesity. *Obesity Research*.
- Yildiz B., Suchard M., Wong M., McCann S., Licinio J. (2004). Alterations in the dynamics of circulating ghrelin, adiponectin, and leptin in human obesity. *PNAS*.
- Picard F., Robin S., Lavielle M., Vaisse C., Daudin J. . (2005). A statistical approach for array CGH data analysis. *BMC Bioinformatics*
- Retterer K., Scuffins J., Schmidt J., Lewis R., Pineda-Alvarez D., Stafford A., Schmidt L., Warren S., Gibellini F., Kondakova A., Blair A., Bale S., Matyakhina L., Meck J., Aradhya S., Haverfield E. Assessing copy number from exome sequencing and exome array CGH based on CNV spectrum in a large clinical cohort. (2014). *Genetics in Medicin*
- Quan P., Sauzade M., Brouzes E. dPCR: A Technology Review. (2018). *Sensors (Basel)*.

Polymer nanoparticles for targeted and controlled release of drugs for cancer therapy

ABSTRACT

In recent decades, new nanotechnologies have been developed based on nano-particle systems capable of controlling and directing the release of drugs for the treatment of cancer. These systems can preferentially address the drug to the tumor site by limiting absorption by healthy cells and thus reducing side effects.

Among the different types of nanoparticulate systems of great interest, both industrial and for research, there are those based on biodegradable polymeric nanoparticles and in particular our research unit has realized and evaluated the wide potential of nanoparticles composed of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and hyaluronic acid (HA). Core-shell nanoparticles were created, in which the PLGA constitutes the internal part of the nanoparticles while the HA constitutes the external shell.

These nanoparticles were produced with a one-step technique that uses the single emulsion with evaporation of the solvent and represent highly innovative devices for the active targeting of chemotherapy molecules. The results were achieved thanks to new methods of production and characterization of nanoparticles. In addition, important progress has been made towards understanding the effects of particle interactions with biological systems.

INTRODUCTION

Tumor (from the Latin tumor meaning “swelling”) is a pathological accumulation of new cells, which spread uncontrollably within a tissue. It is important to specify that there are two types of tumors in the world: the benign tumor or neoplasm which is a tumor of limited extension, which does not metastasize, and which does not regrow once it is removed (for example nevi or moles are benign skin tumors); and the malignant tumor called cancer that spreads into surrounding tissues, producing metastases and can reproduce after removal. Cancer is currently the second leading cause of death in the developed world, having caused the deaths of about 6 million people in 2000, and according to the “World Cancer Report” (the international agency of the World Health Organization for cancer research) these data are set to increase by as much as 50% with an estimated 17 million people with cancer in 2030. [1] Among the therapies currently in use for the treatment of cancer, chemotherapy plays a fundamental role for inoperable and metastatic tumors and for the prevention of relapses. Chemotherapy consists of a systemic treatment that uses anticancer agents to eliminate cancer cells, however the agents in use today do not have a specific targeting (target) to selectively distinguish between cancer cells

and normal ones. This often results in toxic effects on other tissues such as bone marrow suppression, cardiomyopathy, and neurotoxicity.

These effects should lead to a reduction in therapy sessions and in the amount of drug use, however, due to the non-specificity of the anticancer agents in use today, the amount of drug that is injected for chemotherapy is always in a higher dose than necessary, to allow at least a part of the drug to reach the tumor site without being eliminated from the body during the journey.

In order to obtain a more targeted drug administration action, it has been therefore decided to use “Drug Delivery Systems (DDS)”, that is controlled drug release systems, which have characteristics in order to allow a correct supply of drug in predetermined times, and especially when suitably designed, can allow the drug to reach the tumor site selectively.

The drug delivery systems developed to date are various and are distinguished on the basis of drug delivery mechanisms; there are systems based on diffusion, degradation, swelling mechanisms, systems based on the response to external stimuli such as temperature and pH variations. Among all devices, the nanoparticles that release the drug through diffusive/degradative mechanisms have been extensively studied for the release of chemotherapeutic agents [2].

As drug delivery systems, nanoparticles have many positive aspects, including the possibility of easy sterilization, and of being functionalized to act selectively on cancer cells. [3] Polymer nanoparticles are colloidal systems with dimensions smaller than 1 μm, and thanks to their size, they are the most suitable candidates as controlled and selective drug release systems [4]. Nanoparticles can enter tumor masses thanks to a passive targeting mechanism by exploiting the EPR-Enhanced permeation and retention mechanism.

In practice, tumor masses possess aberrant characteristics compared to normal tissues; in fact, they have a high angiogenesis and hypervascularization linked to the fact that, being in continuous reproduction, they need many nutrients. Furthermore, the vascular network is altered compared to normal as well as the lymphatic drainage, characteristics that can be used for the delivery of drugs.

In fact, the nanoparticles, thanks to their sub-cellular and submicrometric dimensions, are able to overcome the epithelial tissue, crossing the capillaries and the abnormal lymphatic drainage, until they reach the tumor cell directly. Therefore, by exploiting this principle, a drug can be encapsulated in the nanoparticle, so that this releases it according to pre-established dynamics. In addition to exploiting the EPR (passive target) mechanism, the nanoparticles can be encapsulated within the cells by means of an active targeting mechanism.

This mechanism exploits the specific interaction existing between cell surface receptors and polymeric ligands. By inserting specific ligands on the surface of the nanoparticles for certain receptors present on tumor cells, it is possible to exploit the EPR mechanism for the passage of the nanoparticles into the tumor site and the ligand-receptor selectivity to increase the therapeutic index. The antitumor-bioactive targeting mechanism is very useful for two reasons: firstly, because it allows us to

have a cytotoxic action on tumor cells during the entire growth phase of the tumor, and secondly because it allows us to protect normal cells from the action of drugs.

One of the essential characteristics of controlled release systems, and therefore of nanoparticles, is their biodegradability and biocompatibility, or the ability to degrade, and to do so without inducing any toxic effect on natural tissues. Among the existing polymers, the most used in this area is poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA), a biodegradable copolymer, which degrades by hydrolysis, releasing lactic acid and glycolic acid. These two degradation residues are highly biocompatible, as lactic and glycolic acid are normally metabolized by the body through the Krebs cycle. For these reasons, PLGA is widely used as a polymer for the realization of drug delivery systems. The nanoparticles made of PLGA are easily absorbed by the plasma membrane by pinocytosis of liquid phases or by endocytosis (Fig. 1a).

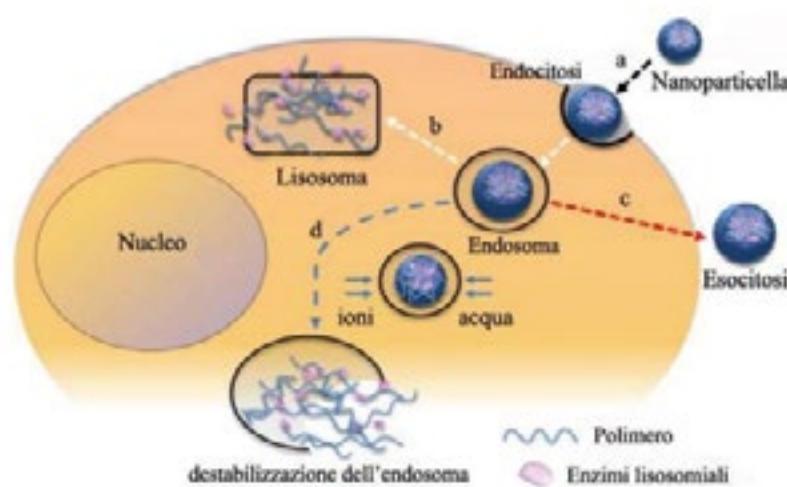


Figure 1 Representation of the absorption of nanoparticles in the cell.

Once inside a part of the nanoparticles is eliminated by the present lysosomal enzymes (fig.1b), a part is eliminated and thrown out of the cell by exocytosis (fig.1c), while a part is degraded releasing the drug content in the cytoplasm (fig.1d). However, the body recognizes hydrophobic particles as foreign. The reticuloendothelial system (RES) eliminates the hydrophobic particles present in the body, and this creates major problems in the use of drug delivery systems. The hydrophobic PLGA nanoparticles tend to aggregate to the opsonins present in the blood, which favor their phagocytosis by macrophages. To overcome this limitation, therefore, it is necessary to make the PLGA nanoparticles hydrophilic so as not to be eliminated by the RES. Several preclinical studies have been carried out by chemically binding hyaluronic acid (HA) to cytotoxic agents, obtaining antitumor compounds that have provided important results *in vivo*. For

this reason, it was decided to use hyaluronic acid as a shell (coating) of the nanoparticles for drug delivery.

HA is a natural glycosaminoglycan, present in all extracellular matrices, connective tissues and organs of all vertebrates. The reasons that led to the choice of this material in the field of drug delivery are various and related to the peculiar chemical-physical and structural properties of HA, and its natural targeting. In fact, HA is naturally recognized by the two membrane receptors CD-44 and RHAMM which are overexpressed on cancer cells. The ability to internalize HA by the CD-44 receptor makes it an optimal candidate for drug release. [12-14]

PREPARATION OF THE NANOPARTICLES

The preparation of the nanoparticles can be carried out using different techniques such as the dispersion of performing polymers by emulsion, the polymerization of the monomers, the ionic gelation. The emulsion can be defined as a heterogeneous mixture formed by at least two immiscible liquids, in which one liquid part is dispersed in the form of droplets (called dispersed phase) in the other (called dispersing or continuous phase). Depending on the nature of the dispersed and continuous phases, two types of emulsion can be distinguished: we speak of oil-in-water (O/W) emulsion if the oily phase is dispersed in the form of droplets in the aqueous phase; while we speak of water-in-oil (W/O) emulsion if on the contrary the aqueous phase is dispersed, in the form of droplets, in the oily phase. If then the dispersed phase itself represents an emulsion (for example if it was obtained through a previous emulsion) in that case, we can obtain double emulsions (O/W/O or W/O/W).

Emulsions are systems which, once obtained, are thermodynamically stable, but that nevertheless do not form spontaneously. In fact, since the two liquids are immiscible, to obtain the formation of droplets of one inside the other, it is necessary to supply the system with energy. When an emulsion is made, we want smaller and smaller ones to form from a larger drop, and this situation is thermodynamically disadvantaged as the free energy of the system increases. For this reason, it is necessary to supply the system with external energy that allows us to create the aforementioned emulsion. This energy is both mechanical, generated by mechanical agitation, and chemical, generated by contact between the particles. To lower the free energy and favor the emulsion, a surfactant (or emulsifying agent) is usually used which can stabilize the emulsion, as it is able to adsorb to high-energy surfaces, transforming them into low-energy surfaces. energy content.

In this way the surfactant will adsorb to the surfaces of the dispersed part, favoring their division into smaller and smaller droplets. Pluronics, polyethylene-oxide (PEO) polypropylene oxide (PPO) - based block copolymers, were used as surfactants for the realization of the HA-coated PLGA nanoparticles. These amphiphilic copolymers, in addition to acting as a surfactant, have allowed the HA to be physically bonded to the PLGA core without chemical bonds. The hydrophilic component PEO of the Pluronic interacted with the HA while the hydrophobic part, PPO, with the PLGA, the Pluronic molecule therefore acted as a bridge

between PLGA and HA (fig 2). A micrograph obtained by transmission electron microscopy (TEM), as an example of core-shell nanoparticles, composed of HA/PLGA, produced by the method of the single emulsion with evaporation of the solvent is shown in figure 3.

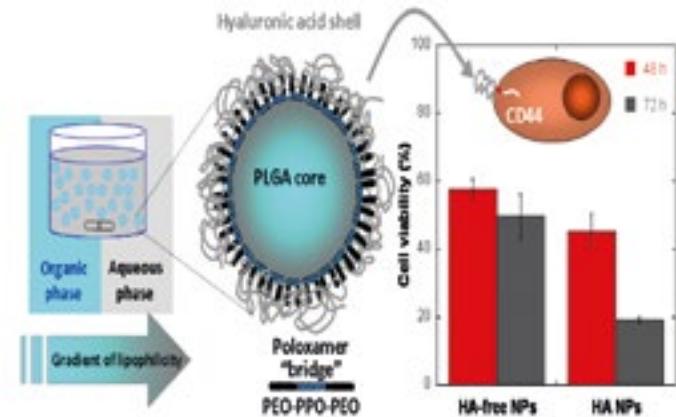


Figure 2 Schematic representation of core-shell nanoparticles composed of HA/PLGA.

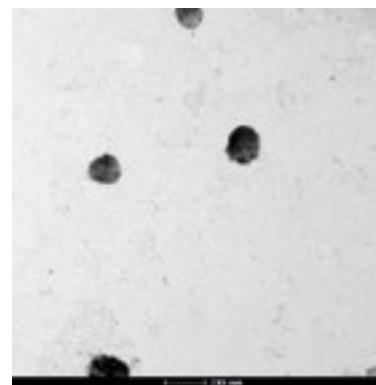


Figure 3 TEM micrograph of the nanoparticles composed of HA/PLGA.

These spherical nanoparticles represent the optimized carriers of chemotherapy drugs and have been extensively tested in vitro by our group. They showed a high biocompatibility and ability to encapsulate chemotherapeutic agents used for the treatment of various forms of cancer with other yields. They also exhibited selective cytotoxicity towards tumor cell lines and greater than non-HA-coated particles (Fig. 3), indicating an ability to actively target tumor cells.

Assunta Borzacchiello¹, Luigi Nicolais²

¹ - IPCB-CNR, Mostra d'oltremare Pad.20 viale Kennedy 54, 80125 Napoli

² - Materias srl, Corso N. Protopisani, 50 - 80146 Napoli

References

- B. Stewart, C. P. Wile, "World Cancer Report", pp. 420-445, 2014.
- N. S. Kim GJ, "Targeted cancer nanotherapy", Nanotoday, pp. 28-33, 2005.
- A. Zaffaroni et al, "Drug Delivery System", pp. 15-22, Dec, 1974.
- J. Panyam, et al, "Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue", Article Advanced Drug Delivery Rev., Volume 64, pp. 61-71, 2012.
- W. M. Samy, N. A. Elgindy, "Nanoparticle Delivery of Cancer Drugs", Annual Review of Medicine, Vol. 63, pp. 185-198, Febbraio, 2012.
- A. K. Yadav, A. Agarwal, G. Rai, P. Mishra, S. Jain, A. K. Mishra, H. Agrawal, "Development and characterization of hyaluronic acid decorated PLGA nanoparticles for delivery of 5-fluorouracil", Drug Delivery, pp. 561-572, 2010.
- Borzacchiello A, et al. "Spontaneous arrangement of a tumor targeting hyaluronic acid shell on irinotecan loaded PLGA nanoparticles", Carbohydrate Polymers Volume 140, 20 April 2016, Pages 400-407.
- A. Kumari, et al. "Biodegradable polymeric nanoparticles-based drug delivery systems", Colloids Surf. B Biointerfaces, vol. 75, pp. 1-18, 2010.
- N. Betancourt, et al. "PEGylation strategies for active targeting of PLA/PLGA nanoparticles", J. Biomed. Mater. Res., vol. 91A, pp. 263-276, 2009.
- Y. Yue, et al. "Surface charge affects cellular uptake and intracellular trafficking of chitosan-based nanoparticles", Biomacromolecules, vol. 12, pp. 2440-2446, 2011.
- E. Owens III, et al. "Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles", Int. J. Pharm., vol. 307, pp. 93-102, 2006.
- Wang C, "The overexpression of RHAMM, a hyaluronan-binding protein that regulates ras signalling, correlates with over-expression of mitogen activated protein kinase and is a significant parameter in breast cancer progression", Clinic Cancer Res, vol. 4, pp. 567-76, 1998.
- N. S. G. I. M. L. F. Y. Naor D, "CD44 in cancer", Crit Rev Clin Lab Sci, vol. 39, pp. 527-579, 2002.
- G. U., "CD44: a multitude of isoforms with diverse functions", Curr Topics Microbiol Immunol., vol. 184, pp. 47-63, 1993. Liotti F, Collina F, Pone E, La Sala L, Franco R, Prevete N, Melillo RM (2017). Interleukin-8, but not the Related Chemokine CXCL1, Sustains an Autocrine Circuit Necessary for the Properties and Functions of Thyroid Cancer Stem Cells. Stem Cells. 2017 Jan;35(1):135-146.

Therapy of glioblastoma with molecularly targeted nanovectors

ABSTRACT

Glioblastoma (GBM) is the most frequent and aggressive form of primary brain tumors in the adult population, characterized by relapses and particular resistance to the anti-tumor therapies. Therefore, the identification of new tumor markers and therapeutic targets represent an important goal for improving the care and survival of patients with GBM. In recent years it has emerged that the regulation of protein turnover and their regulation from the ubiquitin-proteasome system (UPS) constitutes an essential control mechanism for growth and development of several aggressive human cancers, including GBM. Therefore, the UPS circuit represents a promising therapeutic target for the treatment of glioblastoma. Thanks to the support of the Campania Region (FESR-Rare.Plat.Net project), we have defined some of the stage essentials that control the growth and dissemination of human glioblastoma. We have identified *praja2* as a new tumor marker of glioblastoma. We have shown that *praja2* is an E3 ubiquitin ligase and a component of the UPS that regulates the stability of proteins involved in intracellular signaling, growth in metabolism and growth of GBM cells. Data experiments show that inhibition of *praja2* expression blocks the growth of GBM cells in culture, as well as the growth of tumor *in vivo*. We have therefore developed a strategy for the GBM treatment based on intravenous administration of carrier nanoparticles, RNA (siRNA) molecules, direct against *praja2* that cross the blood brain barrier and they reach cancer cells, inhibiting tumor growth and increasing survival of treated animals. In summary, the results obtained identify *praja2* as a new tumor marker and therapeutic target of human GBM, and outline a new blood transport strategy of RNA inhibitory molecules for therapeutic purposes for GBM.

INTRODUCTION

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most severe and common brain tumor affecting adult subjects. It is a malignant and infiltrating pathology, with an expansive and rapid growth. These aspects, together with high angiogenesis, cell heterogeneity, the presence of a specific stem cell population that are able to proliferate and generate neoplastic glial cells contribute to a poor prognosis¹. The median survival for this type of cancer is 14 months both for surgically treated and for radiotherapy patients or chemotherapy, with a 5-year survival rate of around 2% ^{2,3}. Despite being numerous the histopathological variants of the GBM, the characteristics common to all types of GBM are the remarkable cellular and nuclear pleomorphism, microvascular proliferation and cell necrosis. Furthermore, the GBM cells have a high ability to activate numerous resistance mechanisms (factors cell defense, DNA repair) in response to

chemo and radio therapy treatments, complicating the search for effective therapy. Current clinical practice relies on the therapeutic process standard which provides for the surgical resection of the tumor and the radiotherapy treatment associated with chemotherapy with temozolamide, known as the Stupp⁴ protocol. In most cases, therapy is unable to fully control the tumor, which, after a variable interval time from patient to patient, recur.

GBM is characterized by genetic and epigenetic alterations that cause its invasiveness, malignancy, growth rate, and sensitivity to chemotherapy. Several biomarkers with prognostic and/or predictive value of response were studied in the GBM. Among the various alterations biomolecular identified, those involving p53, PI3K, RB, CDK4, MDM2 should be reported and tyrosine kinase receptors. Some biomarkers can be clinically tested, such as O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT), isocitrate dehydrogenase (IDH), the receptor for epidermal growth factor (EGFR), the angiogenic factor VEGF, the phosphatase PTEN, the p16INK4a gene. Recent advances in “next-generation sequencing” (NGS) techniques are expanding knowledge on specific molecular subtypes of GBM and could lead to a more in-depth knowledge of the pathogenetic mechanisms underlying this neoplasm. From the point of view therapeutic, the reference treatments remain surgery and radiotherapy, but in case of relapse or the spread of the disease, the systemic therapies currently in use have obvious limits: the only ones the drugs used, with limited success, are temozolamide and bevacizumab, an antibody monoclonal anti-VEGF⁷. On the one hand, therefore, it is necessary to continue with the molecular characterization structure of the GBM, on the other hand it is necessary to identify new molecular targets for the treatment of this neoplasm and new methods of “drug delivery”.

The proteolytic turnover of tumor suppressors by the ubiquitin-proteasome system (UPS) it is a mechanism adopted by cancer cells for their growth and metastatic dissemination. We have shown that the RING E3 ligase *praja2*, ubiquitin and degrades MOB1, a component key of NDR/LATS kinases and a positive regulator of a tumor suppression pathway, the pathway Hippo. The degradation of MOB1 through the UPS system attenuates the Hippo e-mediated cascade supports the growth of glioblastoma^{8,9}. Considering the limits imposed by the blood-brain barrier in the treatment of GBM and the role of *praja2* in tumor biology, the goal of the project was to develop nanocarriers for the delivery of inhibitory molecules for *praja2* in models GBM animals. In this regard, the latest lipid nanoparticles have been designed and prepared generation, defined as self-assembling nanoparticles (SANPs), capable of carrying molecules of Inhibitory RNA (siRNA) in the specific tumor site, preventing its degradation by nucleases present in biological fluids¹⁰. The SANPs used in this study were decorated in surface with transferrin molecules, the latter protein capable of binding receptors present on the endothelial cell membrane of the blood-brain barrier and tumor cells¹¹.

The use of innovative drug delivery systems therefore contributes to directing drugs directly into the tumor tissue, minimizing the toxic effects on healthy tissues, helping to improve patients' quality of life.

Particular attention was paid to the use of a technology, self-assembling nanoparticles, which can also be transferred to production of formulations, and its components, on a large scale.

RESULTS AND CONCLUSIONS

The main objective of the research project was to characterize the role of the UPS in the control of the transduction of intracellular signals and in the proliferation of tumor cells. Such studies have allowed the identification of UPS components, such as stub1 and praja2, as important regulators in the mechanisms of control of the cellular response to hormones and growth factors. Stub1 is an E3 ubiquitin ligase that controls the stability and homeostasis of proteins involved in the response to cellular stress¹². Hereditary genetic mutations of Stub1 have been identified in patients with neurological and endocrine diseases¹³. Alterations in the expression of Stub1 are causally linked to the development of various types of human malignancies, including GBM¹⁴. In our work, we have shown that stub1 controls the stability and activity of protein kinase A (PKA). The PKA carries out a fundamental role in the transduction of signals carried by the second messenger cAMP and it controls many of the molecular steps involved in differentiation, growth and metabolism of cells. Using normal and tumor cell models as well as genetically engineered animal models modified, we have shown that the regulation of PKA by stub1 constitutes a system general control of the transduction of cAMP signals that underlie the transcription of many genes cellular, including that of the proto-oncogene c-fos¹⁵. Therefore, the identification of stub1 as regulator of the action of hormones and growth factors in cancer cells opens up new perspectives for the use of selective inhibitors for stub1 for the treatment of tumors.

We subsequently characterized the role of praja2 in the control mechanisms of differentiation and growth of GBM cells. To do this, we first carried out an analysis of praja2 expression in various types of human glial tumors, including low-grade ones, such as astrocytoma, and highly malignant tumors, including GBM. The results show that praja2 is highly expressed in high-grade glial tumors, compared to low-grade tumors, and its levels of expression inversely correlate with the mutational state of isocitrate dehydrogenase 1/2 (IDH1 / 2), an enzyme involved in cellular oxidative metabolism and frequently mutated in GBMs humans. Next, we studied the regulatory mechanisms of praja2 in different aspects of cancer cell biology and we have identified some of the regulated molecular steps from praja2. In particular, using different cellular and animal models we found that praja2 controls several stages of the formation of the primary edge. The eyelash is a sensory organelle present in all human cells from which activation signals of mitogenic pathways that regulate cell growth. We have shown that praja2 gene silencing inhibits the formation of the primary eyelash in different cell types, including glioblastoma cells, and deregulates activation of the main eyelash signaling pathway activated by the Sonic hedgehog (SHH) ligand. Such studies were confirmed using marine animal models (Medaka fish) where we reconstructed the

molecular steps of the praja2 mechanism of action essential for primary eyelash regulation, cell growth and animal development. We also generated molecular networks by analysis of differential proteomics in different types of cancer cells, including glioblastoma cells, and identified the critical substrates of the cAMP-UPS circuit involved in differentiation and proliferation of cells, and for some of which we have characterized the role in the biogenesis of the eyelash and in the cell growth¹⁶.

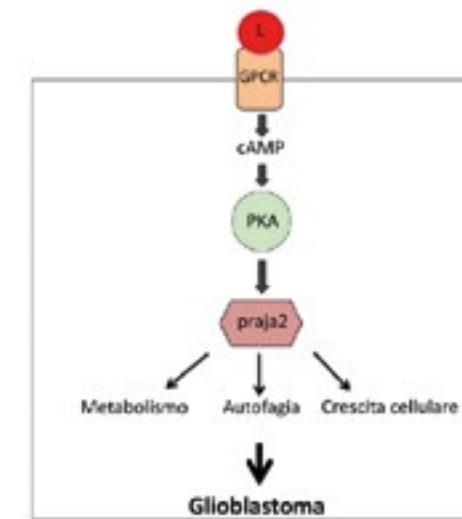


Figure 1 Schematic representation of the circuit of regulation of praja2. The binding of a hormone (L) at its membrane receptor (GPCR) activates the cAMP signaling and promotes the action of praja2 on intracellular substrates involved in metabolism, autophagy and cell growth.

Having established the role of praja2 in controlling the growth regulation loop GBM cells, we subsequently finalized our work to identify innovative strategies to inhibit the expression of praja2 in GBM cells in the growth and expansion phase intracerebral. For this purpose we used self-assembling lipid nanoparticles (SANPs), recently developed in our laboratories, able to carry nucleic acids, including molecularly targeted RNA (siRNA) molecules, in context of brain tissue. SANPs were prepared starting from cationic liposomes with different lipid composition, in particular with different cationic lipids, alone or in association with helper neutral lipids, and associated with two different PEGylated lipids. SANPs were prepared by mixing RNA molecules with calcium phosphate nanoparticles and subsequently mixed with liposomes cationic. Transferrin was then chemically conjugated to the liposomes. Sequences were used siRNAs directed against praja2 or nonsense control sequences (Figure 2).

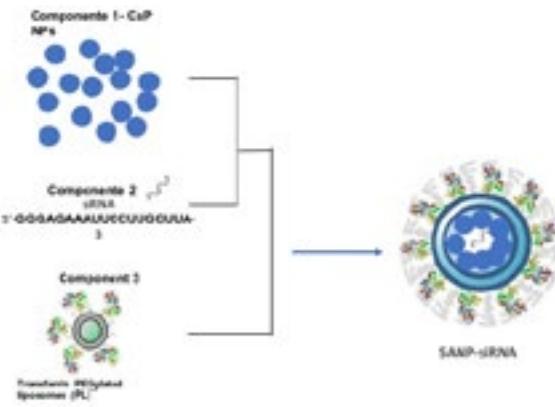


Figure 2 Schematic representation of SANPs containing siRNA anti-praja2.

The first phase of the study involved the preparation and characterization of SANPs containing RNA molecules. In general, SANPs are homogeneous in size with a poly-dispersity index lower than 0.2 and with an average diameter lower than about 160 nm. The charge surface of SANPs was determined by measuring the Z potential that resulted in all cases positive. All the prepared formulations were then tested on GBM cells in culture. The study of the biological activity of siRNA encapsulated in SANPs has allowed select, among the prepared formulations, the one that, for biological effectiveness and sensitivity, has been able to dramatically silence the expression of praja2. Growth potential analyzes of GBM cells treated with the different formulations of SANPs showed a marked inhibition of the proliferative index of cells treated with anti-praja2 SANPs.

The biological efficacy of the siRNA delivered by SANPs *in vivo* was then studied in orthotopic mouse models of GBM in which tumor growth is induced by intracerebral-ventricular infusion of GBM cells^{8,17}. It should be noted that GBM is characterized by an increase in intracranial pressure with consequent alteration of the permeability of the barrier blood brain¹⁸. This characteristic of this type of tumor allows the passage of particles of colloidal dimensions, such as SANPs. However, to further facilitate the passage through the blood-brain barrier, SANPs were coated with transferrin molecules. In this way, the binding of transferrin with its receptor located on the membrane of endothelial cells facilitates the passage through the cerebral vascular barrier by exploiting a mechanism of transcytosis¹⁹. In this study, to verify the passage through the blood brain barrier and the resulting in the accumulation of SANPs in the context of the tumor, we incorporated into the particles a fluorescent probe (rhodamine). The nanoparticles were administered to the mice by route intravenous and subsequently a fluorescence microscope analysis was performed on sections of brain of mice sacrificed at different times after infusion. The analysis shows a significant accumulation of SANPs within the tumor mass, confirming that SANPs are good suitable vectors for the transport of biologically effective molecules across the blood brain barrier.

We therefore analyzed the biological anti-tumor efficacy of SANPs *in vivo*. GBM cells were implanted in the brains of nude mice and after one week the animals were split into two experimental groups. A group of animals received an intravenous infusion with preparations SANPs directed against praja2 while the control group received SANPs with molecules of check. The treatments were performed every 48 hours and lasted two weeks. At the end of treatment, the animals were sacrificed and the brain subjected to histological analysis e immunohistochemistry. Analysis of tumors with hematoxylin/eosin shows a cell population pleomorphic by volume and morphology, the nuclei appear voluminous, vesicular, compact, hyperchromatin, with prominent nucleolus. The cells are arranged in mutual contact so messy and chaotic, but they lack cohesion. Immuno-histochemical analysis with antibodies specific tests showed low levels of praja2 in the treated mice, while the volumetric analysis of the tumors demonstrated that treatment with anti-praja2 SANPs dramatically reduces the volume of tumor (Figure 3A).

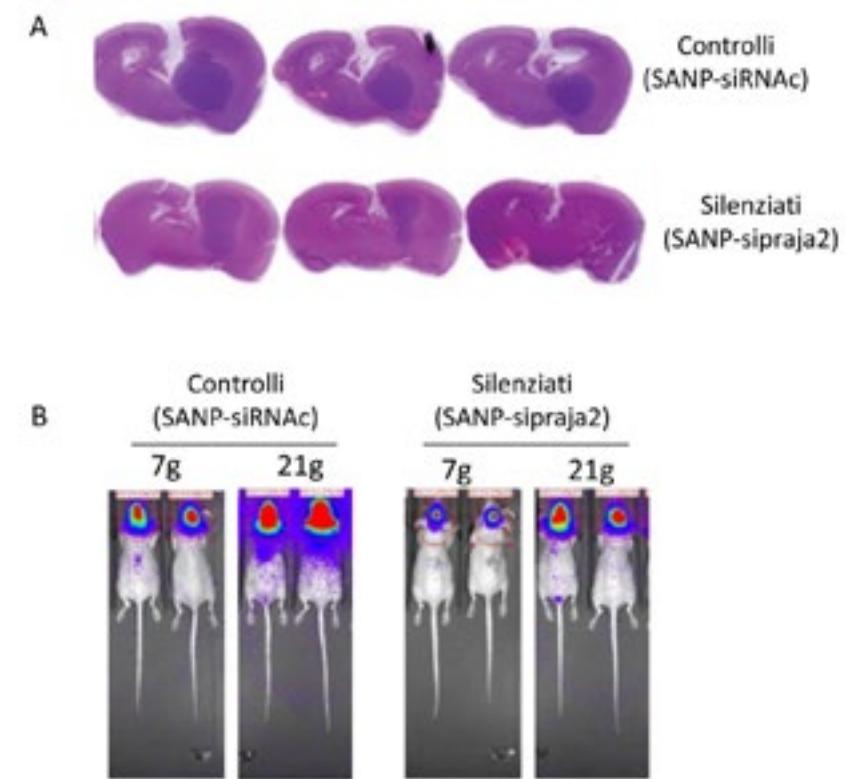


Figure 3 Inhibition of the GBM growth with nanoparticles *in vivo*. A. Histological analysis with hematoxylin/eosin of brain of affected mice GBM undergoing treatment intravenous with SANPs of control and anti-praja SANPs2 (SANPs-sipraja2) for 21 days. B. Captured images with IVIS Spectrum after 7 days and 28 days of treatment with SANPs of the two groups of

treated animals with control SANPs or SANPs anti-praja2.

We then dynamically studied tumor growth in live mice using glioblastoma cells containing the luciferase gene stably integrated into their genome. The activity of luciferase, therefore, represents a growth index of the tumor mass and it was measured on live mice using a ‘Real-Time-Bioluminescence Imaging’ instrument. The treatment with SANPs was repeated twice a week and the bioluminescence analysis was carried out every week. The data confirm that SANPs with RNA molecules directed against praja2 induce a marked reduction in tumor size (Figure 3B). Laboratory analysis performed on peripheral blood of animals treated with the different formulations of SANPs have not showed significant alterations in the hematochemical parameters related to the functionality of several organs, including kidney, liver, and bone marrow.

The goal of the research project was to provide the clinical rationale for development and use of molecularly targeted drugs directed against the cAMP signaling pathways regulated by praja2 using orthotopic animal models of human glioblastoma (GBM). The obtained results have delineated some of the early events involved in the regulation of mitogenic signals induced by the UPS system and characterized from a functional point of view the role of ubiquitination system in the control of cell growth. Taken together, the data have demonstrated that praja2 uses highly organized molecular circuits within the cell involved in different aspects of cancer cell biology, regulating functions related to intracellular signaling by growth factors and hormones, gene transcription and the tumor metabolism. Considered the essential role of praja2 in different aspects of biology tumor, we have developed a strategy to inhibit praja2 in vivo based on the use of vectors systemic lipids able to cross the blood brain barrier and carry small molecules of inhibitory RNA within brain tumors. The results of this experimentation show that the approach used is effective in dramatically inhibiting the growth of GBM in models orthotopic animals, significantly increase the survival of treated animals. Such studies made it possible to identify new tumor markers and therapeutic targets of GBM, and to put a new strategy to deliver specific target molecules in the aggressive brain tumors, with irrelevant therapeutic effects.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

PREPARATION OF SELF-ASSEMBLING LIPID NANOPARTICLES (SANPs) WITH SPECIFIC TARGET.

The SiRNA-free SANPs were prepared from 2 components: nanoparticles of calcium/phosphate (CaPNPs) (component 1), have been complexed with the cationic PEGylated liposomes conjugated with transferrin (PL), (component 3) 1: 1 v/v and let react at room temperature to 25 minutes getting SANPs. Each formulation was prepared in triplicate. The formulations SANPs-siRNA were prepared from 3 components: calcium/phosphate nanoparticles (CaPNPs), (component 1), an aqueous solution of siRNA, (component 2) and cationic liposomes PEGhylates conjugated

with transferrin (PL), (component 3). Subsequently, the SANPs-siRNAs are been obtained by mixing the three different components. Briefly, the aqueous solution of the siRNA (siRNAC or siRNAPrja2) was added to the previously prepared CaPNPs in 1: 8 v/v ratio. In the case of the formulation containing both siRNAs were used both aqueous solutions in the ratio 1: 1 v/v leaving unchanged the final concentration of siRNA. The formulation was mixed and allowed to react at room temperature for 10 minutes obtaining the CaP-siRNA NPs. Finally, the CaPsiRNA NPs were complexed with the PL, 1: 1 v/v, e let it react at room temperature for 25 minutes to obtain SANPs-siRNA, called: SANPs-siRNAC or SANPs-siPrja2. The study involved the use of 2 formulations, which differ in their encapsulated siRNA sequence: 1. SANPs-siRNAC (encapsulating nanoparticles non-sense siRNA); 2. SANPs-siRNAPrja2 (siRNA encapsulating nanoparticles directed against human praja2 mRNA sequence)

IN VIVO TREATMENTS WITH SANPs.

The formulation has a concentration of SANPs (6mg/ml). There amount injected for each administration was 20 μ l of formulation/mouse then 120 micrograms of SANPs and 12 micrograms of siRNA. The nano formulations used in this study were previously tested for their efficacy and safety in a mouse model xenograft of glioblastoma for a different target¹¹. The formulation did not cause phenomena of tumorigenicity or cytotoxic side effects that resulted in animal suffering or death, treated. In the first phase of experiments we carried out a study to evaluate the ability of nano formulations to cross the blood-brain barrier in naked CD1 mice and analyze the biodistribution. For this purpose, naked CD1 mice were subjected to stereotaxic inoculation in the left striatum of U87MG human glioblastoma tumor cells. A week after the inoculation, engraftment time and tumor cell growth, the mice were divided into 2 groups: Group I (control mice), naked CD1 mice inoculated with U87MG human glioblastoma cells and treated (via intravenous administration in the caudal vein) with nanoparticles labeled with 11 rhodamine and conjugated to non-specific siRNAs (formulation called SANPs-siRNAC); Group II (treated mice), naked CD1 mice inoculated with human glioblastoma U87MG cells and treated with siRNA which blocks Praja2 conjugated to rhodamine-labeled nanoparticles (formulation named SANPs-siRNAPrja2). After the first week of tumor engraftment, the nanoparticles conjugated with rhodamine were administered into the tail vein. At the end of the treatments, the brains were collected and included in the OCT. The fresh brain sections were then observed under the fluorescence microscope.

CELLULAR AND ANIMAL MODELS OF GBM.

The GBM cell lines (U87MG and U87MG-Luc) used in our study they were amplified and evaluated for their viability, and then counted and resuspended in solution physiological. The tumor cells were then inoculated intracerebral. The growth of the tumor was monitored weekly with real-time bioluminescence images using IVIS technology. When the bioluminescence values indicated the stability of the tumor growth

in two consecutive measurements, the mice were divided into 3 groups experiments of 12 animals/one. All animals were weighed biweekly during the period experimental. A loss of body weight (BWL) $\geq 20\%$ was considered as a sign of suffering and humanitarian end point that requires the sacrifice of mice, in accordance with the approval the official veterinarian and the study director. The BWL was determined, for each group, as follows: percentage of body weight loss (% BWL max) = 100 - (average CP day x/weight average day 1 x 100), where BWx is the average body weight per day of maximum loss during the treatment and BW1 is the mean BW on the 1st day of the experimental period. The growth of the tumor was evaluated weekly using the IVIS Spectrum in vivo technology system (PerkinElmer), by intraperitoneal injection of D-Luciferine. After the injection, the mice were anesthetized in an induction chamber with oxygen and isofluorane at 2% and the images captured 30 minutes after D-Luciferin injection to allow the substrate distribution. The volume of the tumor was measured as mean radiance which is the total flux of photons or radiance (photons/second from the surface) in each pixel, added or integrated on the ROI area, in a square centimeter (cm^2) of the tissue (photons/sec/ cm^2/sr). The maximum mean radiance established was 1×10^8 photons/sec/ cm^2/sr , used as an end point to avoid extreme animal suffering.

Delle Donne Rossella¹, Rinaldi Laura¹, Roberto Luca², Oliva Maria Antonietta³, Castaldo Salvatore³, Iannucci Rosa¹, Borzacchiello Domenica¹, De Rosa Giuseppe⁴, Campani Virginia⁴, Emanuela Senatore¹, Chiuso Francesco¹, Ambrosino Concetta², Arcella Antonella³ and Feliciello Antonio¹.

1 - Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnology of Federico II University, Naples;

2 - Biogem, Ariano Irpino, Avellino;

3 - I.R.C.C.S Neuromed, Pozzilli;

4 - Department of Pharmacy, Federico II University, Naples, Italy.

References

- Ciceroni, C. et al. Type-3 metabotropic glutamate receptors regulate chemoresistance in glioma stem cells, and their levels are inversely related to survival in patients with malignant gliomas. *Cell Death Differ* 20, 396-407 (2013).
- Ohgaki, H. & Kleihues, P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* 109, 93-108 (2005).
- Surawicz, T.S., Davis, F., Freels, S., Laws, E.R. & Menck, H.R. Brain tumor survival: Results from the National Cancer Data Base. *J Neuro-Oncol* 40, 151-160 (1998).
- Stupp, R. & Weber, D.C. The role of radio- and chemotherapy in glioblastoma. *Oncologie* 28, 315-317 (2005).
- Chin, L. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways (vol 455, pg 1061, 2008). *Nature* 494, 506-506 (2013).
- Garofano, L. et al. Pathway-based classification of glioblastoma uncovers a mitochondrial subtype with therapeutic vulnerabilities. *Nat Cancer* 2 (2021).
- Carvalho, B. et al. The role of c-Met and VEGFR2 in glioblastoma resistance to bevacizumab. *Sci Rep* 11 (2021).
- Lignitto, L. et al. Proteolysis of MOB1 by the ubiquitin ligase praja2 attenuates Hippo signalling and supports glioblastoma growth. *Nat Commun* 4 (2013).
- Song, J.G. et al. Kindlin-2 Inhibits the Hippo Signaling Pathway by Promoting Degradation of MOB1. *Cell Rep* 29, 3664-+ (2019).
- Campani, V. et al. Hybrid lipid self-assembling nanoparticles for brain delivery of microRNA. *Int J Pharmaceut* 588 (2020).
- Salzano, G. et al. Transferrin-Targeted Nanoparticles Containing Zoledronic Acid as a Potential Tool to Inhibit Glioblastoma Growth. *J Biomed Nanotechnol* 12, 811-830 (2016).
- Mylvaganam, S., Earnshaw, R., Heymann, G., Kalia, S.K. & Kalia, L.V. C-terminus of Hsp70 Interacting Protein (CHIP) and Neurodegeneration: Lessons from the Bench and Bedside. *Curr Neuropharmacol* (2020).
- Zhang, S., Hu, Z.W., Mao, C.Y., Shi, C.H. & Xu, Y.M. CHIP as a therapeutic target for neurological diseases. *Cell Death Dis* 11 (2020).
- Xu, T. et al. Carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein (CHIP) contributes to human glioma oncogenesis. *Cancer Sci* 102, 959-966 (2011).
- Rinaldi, L. et al. Feedback inhibition of cAMP effector signaling by a chaperone-assisted ubiquitin system. *Nat Commun* 10 (2019).
- Senatore, E. et al. The TBC1D31/praja2 complex controls primary ciliogenesis through PKA-directed OFD1 ubiquitylation. *Embo J* 40 (2021).
- Rinaldi, L. et al. Mitochondrial AKAP1 supports mTOR pathway and tumor growth. *Cell Death Dis* 8 (2017).
- Hawkins, B.T. & Davis, T.P. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* 57, 173-185 (2005).
- Gabathuler, R. Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases. *Neurobiol Dis* 37, 48-57 (2010).

Study of gene mutations in rare tumors through interactions between miRNA and target genes

ABSTRACT

Gene mutations can be classified according to their ability to alter the proteins' structure and function of the produced (pathogenic mutations, mutations of unknown clinical significance, polymorphisms, etc.). In particular, pathogenic mutations are directly associated with a clinical phenotype. The idea that the study of gene alterations should be extended to the non-coding portions of genes is increasingly strengthened. The advent of high-throughput methodologies and the development of bioinformatics applications have made it possible to deepen the knowledge on the regulatory mechanisms of gene expression and the study of non-coding regions. This study, included in the activities funded by the RarePlatNet project, is focused on the use of non-coding regions, miRNAs, which have the property of interacting with genes, acting as oncogenes or tumor suppressors. In this perspective, miRNAs can be used as therapeutic agents for the regulation of the expression of mutated genes. Therefore, an algorithm based on self-organizing neural networks was developed, capable of predicting the interactions between miRNAs and target genes, to identify a potential set of miRNAs capable of targeting exclusively the mutated gene responsible for the pathology. The identification of such miRNAs would allow to provide essential information for targeted tumor therapies.

IMPACT OF GENE MUTATIONS IN TUMOR PATHOLOGIES

The study of gene mutations is useful both in diagnosis and prognosis, in the prevention of pathology, in the selection of patients for specific targeted therapies and in the follow-up. In tumor pathology, pathogenic mutations can lead to the constitutive activation of the gene if it is an oncogene, or to the inactivation of function, if the mutated gene is a tumor suppressor. In both cases, the alteration of gene functionality will lead to the formation of a protein with an altered cellular function and therefore to a deregulation of the molecular pathway in which it is involved, leading to an alteration of the normal mechanisms of cell proliferation and apoptosis. The analysis of pathogenic mutations is important both in the context of sporadic cancers and in hereditary cancers. In the former, the characterization of pathogenetic alterations is used above all to carry out specific targeted therapies; in the latter, it is used for predictive and prognostic purposes.

USE OF MIRNAS AS THERAPEUTIC AGENTS FOR THE REGULATION OF THE EXPRESSION OF MUTATED GENES

Among the non-coding molecules microRNAs (miRNAs) appear to be among the most promising molecules in cancer biology.

They are small single-stranded RNA molecules, 22-25 nucleotides (nt) long and play a key role in gene regulation. The most important step in their regulatory function is the targeting of messenger RNAs (mRNAs). Indeed, miRNAs are responsible for the degradation or repression of mRNAs at the post-transcriptional level, when their sequences bind with partially complementary sites. In this way, they play a key role in cell differentiation and proliferation, in apoptosis and in many other physiological and pathological processes. The miRNA expression patterns are highly correlated to specific external stimuli, and to the developmental stage of the tissue. For example, miRNA expression levels change considerably in cancerous diseases. They can act as oncogenes or tumor suppressors by targeting different types of genes, leading respectively to an acceleration or decrease of tumor processes. Analyzing the miRNA-mRNA interaction means better understanding the molecular mechanism of the pathological condition in comparison with normal cellular behavior, through the main actors which are proteins, and above all it means hypothesizing new therapeutic intervention strategies to stop malignant processes (Wotschofsky, 2016).

MODEL OF THE INTERACTION BETWEEN MIRNA AND TARGET GENE

MiRNAs interact with their target mRNAs through base pairing in the 3'-untranslated regions (3'UTR) of mRNA sequences. In animal species, an almost perfect base coupling is required between the miRNA seed region, i.e. the first 8 nt in the 5' end of the mRNA sequences, and a target site in the 3' UTR of mRNA sequences. The scientific community has identified three main rules for miRNA-target base pairing by experimental and in-silico analysis (Filipowicz et al., 2008) which are: i) near perfect and contiguous base pairing in seed regions miRNAs, corresponding to the nucleotides (nt) in positions 2 to 8 of the 5' region of the miRNA, which enucleates the miRNA-mRNA association. In general, conditions such as mismatches and bulges in the seed region should be avoided as they heavily affect repression; ii) that there must be sufficient complementarity towards the half of the miRNA 3' to establish the interaction. In this region bulges and mismatches are generally allowed and finally iii) that the central region of the miRNA-mRNA duplex should have bulges and mismatches to prevent endonucleotic cleavage of the mRNA.

Since the experimental identification of miRNA targets is a difficult task, the help of computational tools for target prediction is a valuable tool for investigating the functions of miRNAs and guiding the related laboratory experiments. Machine learning methods have improved the performance of both the identification of miRNAs within the genetic code and the prediction of their target genes. These approaches typically make use of sequence data (e.g., 6-8 nt miRNA binding motifs), secondary structures (e.g., stem-loops using thermodynamic modeling), and evolutionary conservation to identify potential candidates, using

algorithms such as Random Forest or Support Vector Machines (Kim, 2006).

PREDICTION MODEL OF miRNA-TARGET INTERACTIONS BASED ON NEURAL NETWORKS

During the activity a computational method was designed for the prediction of miRNA targets based on self-organizing neural networks (Self-Organizing Map - SOM). SOM networks (Kohonen, 2001) are neural networks widely used to categorize large datasets by projecting data into a smaller-dimensional space, typically into a two-dimensional lattice of interconnected neurons. Each neuron of the SOM represents a reference model, corresponding to a local domain of the entrance space (Fiannaca, 2013). Using competitive learning, the SOM algorithm tries to reproduce the self-organizing mechanism of the somatosensory pathways present in some areas of the brain. Therefore, the SOM is much more than a clustering algorithm because it gives a visualization of the distribution of the patterns in the input space. When the input patterns are projected into the map, clusters can be visualized, and the map can be divided into areas where the input patterns share some characteristic values.

DESCRIPTION OF THE COMPUTATIONAL METHOD

Both the computational representation of the sequences used in this study and the prediction model based on SOM will now be introduced. More details on the prediction model and its effectiveness are reported in (Fiannaca, 2016). The methodology developed consists of four main steps. Figure 1 shows the pipeline used, which will be explained later.

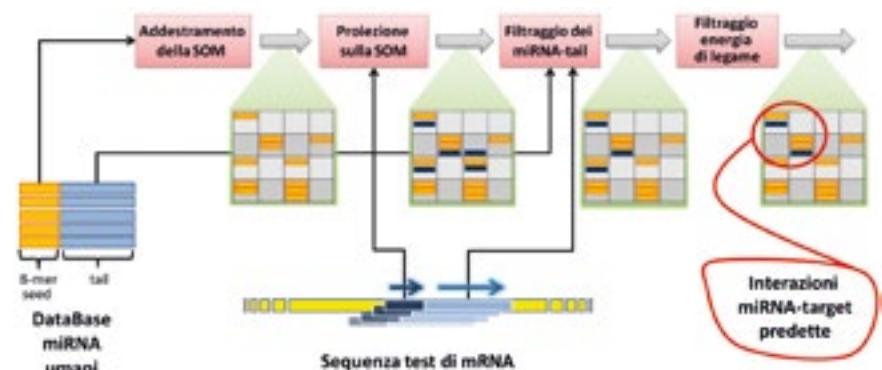


Figure 1 miRNA-target prediction algorithm, based on the SOM neural network.

REPRESENTATION OF GENETIC SEQUENCES

One of the main challenges in bioinformatics is finding the best representation of DNA / RNA sequences. In the proposed approach, we represented the RNA sequences (miRNA and mRNA) by means of a numerical encoding derived from the Position Weight Matrices (PWMs) defined in (Hannenhalli, 2005). A PWM is a representation model commonly used in the analysis of biological

sequences, obtained by calculating the frequency of each specific base (A, C, G and T or U) at each nucleotide position in the sequence. In our method, each RNA sequence is represented with a PWM of $4 \times k$ elements, where 4 are the symbols of the nucleotide and k is the length of the sequence. Each column j has a fixed value according to the corresponding nucleotide in the j -th position, with $1 \leq j \leq k$.

The numerical coding for each nucleotide is as follows:

$$A = [1000]^t, C = [0100]^t, G = [0010]^t, T/U = [0001]^t$$

To measure the differences between two PWMs we considered the normalized Euclidean distance, defined as:

$$D(a, b) = \frac{1}{\sqrt{2k}} \sum_{j=1}^k \sqrt{\sum_{b \in \{A,C,G,T\}} (P_{j,h}^1 - P_{j,b}^2)^2}$$

where P^1 and P^2 are two PWMs, k is the length of the sequences and P_j, b is the value in column j with the base b . The distance varies from 0 (perfect identity) to 1 (complete dissimilarity).

SOM TRAINING

In the first step, a set of miRNA seeds, fixed at a length of 8nt, is used for the training of a SOM. We only considered 8-mer miRNA seeds because the seed region was shown to be primarily responsible for target miRNA binding. Each neuron is represented by a 4×8 PWM which is initially initialized using random values. Furthermore, the neurons are organized in a rectangular lattice, in which each neuron is connected to its four neighbors. To locate the best matching unit, the distance between the input vector and the weight of each neuron is calculated, according to the distance defined above. The result of this step is a set of clusters composed of 8-mer seeds that belong to each miRNA.

PROJECTION ON THE SOM

The second step consists in the projection of an mRNA sequence on the trained SOM. For this reason, we extracted all 8-nt long mRNA fragments through an 8-mer sliding window with a pitch of 1. In this way, we obtained a set of 4×8 PWMs that can be projected onto the trained SOM. The result of this step, for each neuronal unit (cluster), is a list of pairs (miRNA seed, mRNA fragment). Each cluster can be considered as a preliminary set of predicted miRNA-mRNA interactions.

miRNA-TAIL FILTERING

In this step, the preliminary interactions are filtered considering the remaining part of miRNA sequences, called miRNA_tail. For each pair (miRNA_seed, mRNA fragment), we considered the miRNA_tail and mRNA sequence of the same length as the miRNA_tail, respectively, close to the screened mRNA portion, respectively. Subsequently, we calculated a dissimilarity measure based on the normalized Euclidean distance between the PWM representation of those two sequences and, according to rule 2 of the paragraph "Model of the interaction between miRNA and

"target gene", we kept only those pairs of interactions miRNA-mRNA whose distance was below a certain threshold. To take into consideration the presence of possible bulges between the seed and tail of the miRNA, we have considered in the calculation the presence of a possible offset of a few nucleotides.

BINDING ENERGY FILTERING

In the last step, we applied a further filtering operation to the list of pairs, based on the minimum free energy required to form the miRNA-MRNA duplex. For this purpose, we used IntaRNA tool (Wright et al., 2014). IntaRNA can calculate the free energy value from a pair of genomic sequences considering two different contributions: (1) the free energy required to open the interaction sites in both the miRNA and the mRNA and (2) the free energy of hybridization between interacting nucleotides. The sum of these two contributions represents the final free energy score: in this way, potential interactions that achieve a free energy score above a reference threshold are removed from the list of miRNA-mRNA interactions.

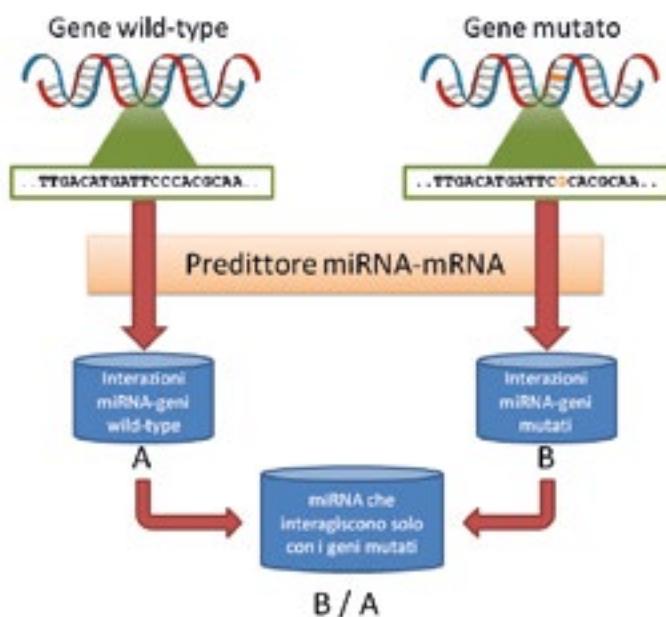


Figure 2 Pipeline for the identification of miRNAs that interact exclusively with mutated genes.

USE OF THE PREDICTOR FOR THE IDENTIFICATION OF NEW MIRNA-TARGET INTERACTIONS IN MUTATED GENES.

In order to identify those miRNAs that selectively regulate mutated genes (with respect to wild-type genes), a pipeline has been defined that exploits the aforementioned predictor of miRNA-target interactions. The pipeline produced is illustrated in Figure 2 and involves the execution of two separate runs of the predictor: in the first the sequence of the wild-

type gene will be used, while in the second the miRNAs of the sequence belonging to the mutated gene will be calculated. The proposed pipeline will therefore produce two lists of miRNA-target interactions. The complement of the second list with respect to the first will provide the list of miRNAs that interact exclusively with the mutated genes.

The proposed model can be tested with a series of mutations of interest extracted from the ClinVar database, containing mutations linked to different types of tumor pathologies.

Fiannaca Antonino¹, La Paglia Laura¹, La Rosa Massimo¹, Urso Alfonso¹, Gargiulo Francesco²

¹ - Istituto di Calcolo e Reti ad Alte Prestazioni (ICAR) del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) Via Ugo La Malfa, 153, 90147 - Palermo

² - Istituto di Calcolo e Reti ad Alte Prestazioni (ICAR) del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Via Pietro Castellino, 111, 80131 - Napoli

References

- Fiannaca A., Di Fatta G., Rizzo R., Urso A. and Gaglio S. (2013) Simulated annealing technique for fast learning of som networks. *Neural Comput & Applic.*, vol.22 (5).
- Fiannaca A., La Rosa M., La Paglia L., Rizzo R. and Urso A. (2016). MiRNATIP: a SOM-based miRNA-target interactions predictor. *BMC bioinformatics*, vol.17 (11).
- Filipowicz W., Bhattacharyya S.N., Sonenberg N. (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*, vol.9(2).
- Hannenhalli S. and Wang L.S. (2005) Enhanced position weight matrices using mixture models. *Bioinformatics*, vol.2
- Kim S.K., Nam J.W., Rhee J.K., Lee W.J. and Zhang B.T. (2006) miTarget: microRNA target gene prediction using a support vector machine. *BMC Bioinformatics*, vol.7
- Kohonen T. (2001). Self-Organizing Maps. Berlin Heidelberg: Springer.
- Wotschofsky Z., Gummlich L., Liep J., Stephan C., Kilic E., Jung K., Billaud J.N., Meyer H.A. (2016). Integrated microRNA and mRNA Signature Associated with the Transition from the Locally Confined to the Metastasized Clear Cell Renal Cell Carcinoma Exemplified by miR-146-5p. *PLoS ONE*, vol.11(2).
- Wright P.R., Georg J., Mann M., Sorescu D.A., Richter A.S., Lott S. et al. (2014) CopraRNA and IntaRNA: Predicting small RNA targets, networks and interaction domains. *Nucleic Acids Res*, vol.42 (W1).

Immunotherapy in medullary thyroid cancer

ABSTRACT

Medullary thyroid carcinomas (MTCs) arise from the parafollicular C cells of the thyroid that produce calcitonin and can manifest as both sporadic and inherited diseases. In a large fraction of sporadic cases, and practically in all hereditary cases of MTC, are found activating mutations of the proto-oncogene RET, which encodes a receptor tyrosine kinase. The treatment of MTC involves the use of tyrosine kinase inhibitors (TKI), which unfortunately, over time, induce drug resistance. For these reasons, new therapeutic approaches are needed. Among the emerging therapies, "immune checkpoint inhibitors" (ICIs) have been found to be very effective in various neoplasms: these are drugs capable of interfering with immunosuppressive molecules known as "immune checkpoints" (PD-L1/2) expressed by tumors. Blocking these molecules restores antitumor immunity, which destroys the tumor. Recently, we have shown that interleukin 8 (IL-8) is a crucial mediator in thyroid cancer (TC) of follicular origin as it induces proliferation, invasiveness, resistance to apoptosis and immunosuppression. Even in human MTC cells, IL-8 is able to increase the immunosuppressive potential, inducing an increase in the expression of immune checkpoints. Therefore, pharmacological inhibitors of IL-8, used alone or also in combination with conventional therapies, could be exploited for the therapy of MTC.

NEUROENDOCRINE TUMORS

Neuroendocrine tumors are a heterogeneous group, both in terms of localization and aggressiveness, of neoplasms, consisting of neuroendocrine cells, which are part of the Diffuse Endocrine System (DES). They usually are present as sporadic cancers, but they can also be part of family genetic and clustering syndromes. They include gastrointestinal carcinoids, islet pancreatic tumors, chromophobie pituitary tumors, medullary thyroid carcinomas and pheochromocytomas (Basuroy et al., 2016).

Medullary thyroid carcinoma (MTC) arises from thyroid C cells and is distinguished in a sporadic and a familial form, currently accounting for 5% - 10% of all thyroid cancers. Activating mutations of the RET proto-oncogene have been found in 50% of cases of medullary carcinomas in sporadic form and in familial forms, known as MEN 2, multiple endocrine neoplasia syndromes, which are characterized by MTC and other different pathologies depending on the syndrome subtype. There are 3 types of familiar forms of MTC: MEN2A, MEN2B and FMTC (familial MTC). The MEN2A form is characterized by medullary thyroid carcinoma, pheochromocytoma and parathyroid hyperplasia; the MEN2B form is characterized by medullary thyroid carcinoma, pheochromocytoma and tumors at the level of ganglion cells, while FMTC is characterized only by the onset of familial MTC (Brandi et al., 2001).

IMMUNOTHERAPY

The immune system is known to play an important role in removing precancerous or cancerous cells. Although, it is normally able to remove cancer cells from our body, in several cases cancer patients show tumor immunotolerance (Dunn et al., 2004). The goal of immunotherapy is to exploit the specificity and long-term memory of the adaptive immune response to achieve lasting tumor regression and potential cure. More recently, thanks to a better recognition of immune regulation systems, the possibility of increasing the antitumor immune response with the use of drugs that inhibit the so-called "immune checkpoint" has been evaluated. Immunological checkpoints are crucial molecules in maintaining immune homeostasis. They modulate the quality and breadth of various both innate and adaptive effector mechanisms in favor of immunogenic tolerance. They consist of a series of receptors and ligands capable of stimulating or inhibiting the responsiveness of immune cells against pathogens and/or cancer cells. Among these, in particular, two immunosuppressive checkpoints that can inhibit the immune response operated by T cells are the programmed cell death protein-1 (PD-1) and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) (Gajewski et al., 2013). PD-1 is normally present on immune cells and when it binds to its PD-L1/PD-L2 ligands, which are frequently expressed on the surface of tumor cells, lymphocyte proliferation and the production of inflammatory molecules are reduced. CTLA-4 works in a similar way, its ligands are called CD80 and CD86. CTLA-4 blocks T cells from being activated when they are still in the lymph nodes. PD-1, on the other hand, regulates previously activated T lymphocytes in the effector phases of the immune response, in peripheral tissues. Due to their peculiarities, both immunological receptors have become the target of numerous studies in the field of cancer treatment. Therapies that inhibit CTLA-4/CD80-86 and/or the PD-1/PD-L1-L2 axis have shown tremendous success in treating several types of cancer (Gajewski et al., 2013).

MTC

Recently, a significant increase in FoxP3-positive lymphocytes (Treg) in peripheral blood, lymph nodes and thyroid tissues has been observed in MTC patients, suggesting a possible mechanism of immuno-evasion (Müller et al., 2010). Furthermore, it has also been shown that RET mutations are able to induce the expression of indolamine 2,3-dioxygenase (IDO-1), an enzyme that contributes to immunological tolerance by producing an immunosuppressive type environment (Moretti et al., 2016).

Over the past 10 years, the treatment of TCM has involved the use of various tyrosine kinase (TKI) inhibitors, including RET blocking compounds. This therapy is called molecular target therapy or "targeted therapy". Despite its effectiveness, treatment with TKIs has many limitations, including primary and secondary resistance, toxicities and side effects and the ability to induce a cytostatic rather than cytotoxic effect. For these reasons, the need arises for the development of innovative therapies. The combination of targeted therapy with other agents, including immunotherapy, has shown very promising results in various

types of cancers. Therefore, it is possible that RET inhibitors, combined with immune checkpoint inhibitors, may represent a new therapeutic option for patients with advanced and progressive MTC.

POTENTIAL THERAPEUTIC TARGETS IN MTC

Previous studies conducted in our laboratory have allowed us to demonstrate that interleukin 8 (IL-8/CXCL8) is an aggressive marker in thyroid tumors. IL-8 is a chemoattractant cytokine (chemokine) produced by various types of inflammatory cells upon stimulation and exerts its biological functions through binding to its CXCR1 and CXCR2 receptors. In particular, we have shown that IL-8 is a crucial paracrine/autocrine factor capable of promoting proliferation, survival, invasiveness, stemness and tumorigenic capacity of tumor cells derived from TC of follicular origin (Visciano et al., 2015; Liotti et al. al., 2017). In TC, IL-8 activities can be inhibited by using Reparixin, a selective inhibitor of CXCR1/2 receptors (Liotti et al., 2017).

More recently, we have also shown that IL-8 is also able to increase the immunosuppressive capacity of TC cells, inducing an increase in the expression levels of the immune checkpoints PD-1, PD-L1, PD-L2. In detail, we have recently shown that the overexpression or stimulation of PD-1 promotes the proliferation, migration and tumorigenic capacity of TC cells *in vivo*. Consistently, the blocking of the PD-1 receptor by a monoclonal antibody, Nivolumab, currently in use in therapy in various types of cancer, drastically reduces these abilities (Liotti et al., 2020). In order that PD-1 performs its function in TC cells, we have observed that the binding of the receptor with the SHP2 tyrosine-phosphatase is fundamental. The activity of the SHP2 enzyme is essential in the activation of the Ras protein, a small G protein involved in the transduction of the mitogenic signal. The suggested mechanism of action is that the PD-1 receptor expressed on the membrane of TC cells, through its binding to the SHP2 protein, is able to activate Ras, which in turn activates the MAPK signaling pathway. The activation of MAPKs results in an increase in the proliferation, migration and tumorigenic capacity of TC cells (Liotti et al., 2020) (Figure 1).

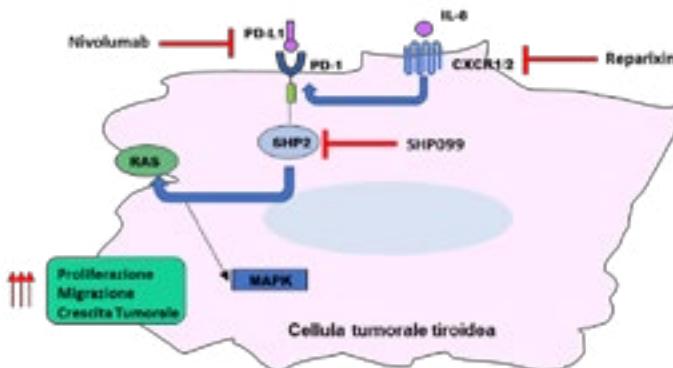


Figura 1 Role of PD-1 in thyroid tumors. Potential therapeutic targets: anti PD-1, Nivolumab; CXCR1 / 2 blocker, Reparixin; SHP2 inhibitor, SHP099

At the same time, we have shown that MTC cells also express the IL-8/CXCR1-CXCR2 circuit and that IL-8 induces a significant increase in PD-1, PD-L1, PD-L2 checkpoints also in this cell system. Consistently, the blocking of the IL-8 circuit with the Reparixin induces a significant reduction in the levels of proteins PD-1, PD-L1 and PD-L2 in the membrane, suggesting that IL-8 plays a key role in the modulation of these immune checkpoints also in MTC. We have also shown that MTC cells express high levels of other immunomodulatory molecules (CD80, CD86, B7-H2, B7-H3, B7-H4, CD270, CD70, CD28, CD40, CD40L, ICOS, LAG3, TIM3, TIM1), further confirming that an immunosuppressive environment is also created in these tumors. These data suggest that a better understanding of the circuits that dysregulate the immune system in MTC may offer new therapeutic opportunities.

Currently, the field of immunotherapy is one of the most promising research fields for the long-term cure of cancer. The possibilities of synergistic combinations with targeted radiotherapy, chemotherapy and small molecule treatments have also shown countless possibilities to customize precision immuno-oncological therapies. It is conceivable for MTCs, to think about getting a combined treatment that uses RET inhibitors currently already in use, associated with immune checkpoint inhibitors (e.g., Nivolumab) or IL-8 inhibitors (e.g., Reparixin) or with SHP2 phosphatase inhibitors. (e.g., SHP099). Promising data on the use of anti-RET drugs combined with immune checkpoint inhibitors are currently reported in a phase 1/2 study, in which the use of Levantinib, a RET inhibitor, combined with Pembrolizumab, a drug directed against PD-1 (Lee et al., 2021).

Federica Liotti¹, Nella Prevete^{1,2}, Rosa Marina Melillo^{1,3}

¹ - Institute for Experimental Oncology and Endocrinology "G. Salvatore" (IEOS), CNR, Naples, Italy

² - Department of Translational Medical Sciences, University of Naples, "Federico II", Naples, Italy

³ - Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnology, University of Naples, "Federico II", Naples, Italy

Identification and characterization of the NCX2 sodium/calcium exchanger as a new molecular target in the development and pharmacological control of human glioblastoma

References

- Basuroy R, Srirajaskanthan R, Ramage JK (2016). Neuroendocrine Tumors. Gastroenterol Clin North Am. 2016 Sep;45(3):487-507.
- Brandi ML, Gagel RF, Angelis A, Bilezikian JP, Beck-Peccoz P, Bordi C, Conte Devolx B, Falchetti A, Gheri RG, Libroia A, Lips CJ, Lombardi G, Mannelli M, Pacini F, Ponder BA, Raue F, Skogseid B, Tamburrano G, Thakker RV, Thompson NW, Tomassetti P, Tonelli F, Wells SA Jr, Marx SJ (2001). Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. J Clin Endocrinol Metab. 2001 Dec;86(12):5658-71.
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. Immunity. 2004 Aug;21(2):137-48.
- Gajewski TF, Schumacher T (2013). Cancer immunotherapy. Curr Opin Immunol. 2013 Apr;25(2):259-60.
- Lee CH, Shah AY, Rasco D, Rao A, Taylor MH, Di Simone C, Hsieh JJ, Pinto A, Shaffer DR, Girones Sarrio R, Cohn AL, Vogelzang NJ, Bilen MA, Gunnestad Ribe S, Goksel M, Tennøe ØK, Richards D, Sweis RF, Courtright J, Heinrich D, Jain S, Wu J, Schmidt EV, Perini RF, Kubiak P, Okpara CE, Smith AD, Motzer RJ (2021). Lenvatinib plus pembrolizumab in patients with either treatment-naïve or previously treated metastatic renal cell carcinoma (Study 111/KEYNOTE-146): a phase 1b/2 study. Lancet Oncol. 2021 Jun 15:S1470-2045(21)00241-2.
- Liotti F, Collina F, Pone E, La Sala L, Franco R, Prevete N, Melillo RM (2017). Interleukin-8, but not the Related Chemokine CXCL1, Sustains an Autocrine Circuit Necessary for the Properties and Functions of Thyroid Cancer Stem Cells. Stem Cells. 2017 Jan;35(1):135-146.
- Liotti F, De Pizzol M, Allegretti M, Prevete N, Melillo RM (2017). Multiple anti-tumor effects of Reparinixin on thyroid cancer. Oncotarget. 2017 May 30;8(22):35946-35961.
- Liotti F, Kumar N, Prevete N, Marotta M, Sorriento D, Ieranò C, Ronchi A, Marino FZ, Moretti S, Colella R, Puxeddu E, Paladino S, Kano Y, Ohh M, Scala S, Melillo RM (2021). PD-1 blockade delays tumor growth by inhibiting an intrinsic SHP2/Ras/MAPK signalling in thyroid cancer cells. J Exp Clin Cancer Res. 2021 Jan 7;40(1):22.
- Moretti S, Menicali E, Nucci N, Voce P, Colella R, Melillo RM, Liotti F, Morelli S, Fallarino F, Macchiarulo A, Santoro M, Avenia N, Puxeddu E (2017). Signal Transducer and Activator of Transcription 1 Plays a Pivotal Role in RET/PTC3 Oncogene-induced Expression of Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1. J Biol Chem. 2017 Feb 3;292(5):1785-1797.
- Müller S, Poehnert D, Müller JA, Scheumann GW, Koch M, Lück R (2010). Regulatory T cells in peripheral blood, lymph node, and thyroid tissue in patients with medullary thyroid carcinoma. World J Surg. 2010 Jul;34(7):1481-7.
- Visciano C, Liotti F, Prevete N, Cali' G, Franco R, Collina F, de Paulis A, Marone G, Santoro M, Melillo RM (2015). Mast cells induce epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell features in human thyroid cancer cells through an IL-8-Akt-Slug pathway. Oncogene. 2015 Oct 1;34(40):5175-86.

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most frequent and aggressive brain tumor, characterized by a low survival rate due to the inefficiency of the actual available therapies.

At a molecular level, glioblastoma is characterized by a frequent alteration of the molecular pathways that, through some transcriptional factors, inhibit anti-oncogenes or overexpress pro-oncogenes. Among the genes that are found to be silenced there is *Slc8a2*, encoding the sodium calcium 2 neuronal exchanger (NCX2), recently recognized as a new anti-oncogene for glioblastoma. The expression of this exchanger, in fact, is especially reduced in the most advanced stages of glioma.

The aim of the present study was to identify the genetic and epigenetic mechanisms underlying the silencing of NCX2 with the intent of finding a pharmacological strategy to increase the expression of this anti-oncogene and thus reduce malignancy and progression of glioblastoma.

In this regard, our research group has identified, cloned and analyzed the promoter of the *Slc8a2* gene, also identifying the transcription factors able to modify its activity in different cell lines expressing or not expressing NCX2. Furthermore, the potential transduction pathways that could be responsible for the silencing of NCX2 in glioblastoma were analyzed. In addition, heterocyclic molecules capable of exchanging activity have been designed, synthesized and examined.

Collectively, the data obtained suggest that the silencing of the exchanger is mediated by a pro-oncogenic pathway, the inhibition of which causes an increase in the expression and activity of NCX2 slowing tumor growth. These data suggest that NCX2 may play a role as a tumor suppressor in glioblastoma.

RESULTS

Our research group identified a promoter region for the gene coding for NCX2 in the intergenic region between *Kptn* and *Slc8a2* in the human, murine and rat genomes (Fig. 1 and 2). The *in silico* analysis revealed several possible binding sites for transcription factors with an identity greater than 75% and conserved in the species considered.

Both rat (S3) and human (HP) NCX2 promoters were cloned into the luciferase plasmid pGL3b yielding pGL3b-S3 and pGL3b-HP, respectively (Fig. 3). Transfection of the pGL3b-S3 or pGL3b-HP plasmid increased the luciferase activity in both PC12 and SHSY cell lines, while a small but significant luciferase activity was found in the U87 cell line compared to the respective control group transfected with an empty pGL3b plasmid. Both rat and human NCX2 promoters showed a similar expression pattern in PC12, U87 and SHSY cell lines.

In addition, some transcription factors downstream of pro-oncogenic transduction cascades were examined, the activity of which showed an effect of inhibition of the activity of the pGL3b-HP promoter and of the endogenous transcription of NCX2 in human glioblastoma cells. Furthermore, treatment with some antineoplastic drugs that interferes with the pro-oncogenic transduction cascade also increased the luciferase activity of pGL3b-HP and endogenous NCX2 transcription in glioblastoma cells (Fig. 4). This activity increase was not observed when transcription factors downstream of the block of the transduction pathway were transfected (Fig. 4). On the other hand, other transcriptional factors have also been identified that increased the endogenous levels of NCX2 expression in some non-glioblastoma cell lines.

The use of antineoplastic agents able to reduce the methylation state significantly increase the expression of the endogenous mRNA of NCX2 in the U87 cell line.

Finally, since the results showed that U87s express detectable levels of NCX1, we designed, synthesized and selected two compounds: a stimulator of NCX1 and NCX2 activity and a selective stimulator of NCX1 activity. The results showed that these molecules are able to slow down cell growth in a concentration-dependent manner in U87, while it is ineffective for the PC12, BHK and SH-SY cell lines.

DISCUSSION

The data presented report the characterization of the NCX2 human promoter gene and the molecular determinants of its silencing in glioblastoma cells. More importantly, the obtained results could represent the basis for new therapeutic strategies aimed at increasing the expression and/or activity of NCX2 in glioblastoma to slow the growth of tumor cells.

The similarity of the data obtained from the analysis of NCX2 expression in the cell lines U87, PC12, SH-SY5Y and BHK and the data obtained on luciferase activity strengthened the hypothesis that pGL3b-HP contains some of the main regulatory mechanisms present in the NCX2 endogenous promoter. In particular, several possible conserved binding sites for different transcription factors, including effectors of pro-oncogenic transduction pathways, emerged from the *in silico* analysis of the promoter. Indeed, some of these factors appear to have been instrumental in maintaining NCX2 silencing in glioblastoma. In fact, the pharmacological inhibition of the pro-oncogenic pathway reduced the inhibition of the Slc8a2 gene, while the transfection of transcription factors downstream of the pathway completely canceled the increase in the expression of the exchanger. These data suggest that this antiporter

represents a preferred and important target for some pro-oncogenic pathways. In fact, the transfection of transcription factors that are able to increase the expression of NCX2 in other cellular models or *in vitro*, are ineffective in glioblastoma. Given the results obtained, it is conceivable that the methylation state of the NCX2 promoter may also play a role in the refractoriness of the gene to the transfection / activity of transcription factors that increase the levels of the exchanger. In addition, small but significant differences in the localization of consensus sequences for transcription factors that make them sensitive or insensitive to methylation were found, and this may explain why there are some differences in glioblastoma sensitivity between rodent and human cells to factors. transcriptional and antineoplastic drugs. In support of this hypothesis, the slc8a2 gene, which codes for NCX2, is highly methylated in glioblastoma tissues compared to normal tissues (Qu et al. 2010) a mechanism of transcriptional repression of antioncogenes found in several types of gliomas (Qu et al. 2017). Indeed, treatment with anti-neoplastic drugs that cause DNA demethylation restores the expression of endogenous NCX2 mRNA in glioblastoma cells. These results further support the idea that there is an epigenetic regulatory mechanism responsible for the shutdown of Slc8a2 and further demonstrate that antineoplastic drugs increase NCX2 gene expression.

Another aspect that deserves attention is that drugs that directly or indirectly increase the expression / activity of NCX2 have been shown to slow the growth of glioblastoma cells in parallel with the total activity of NCX in the U87 cell line. Similar results were obtained with transient over-expression of NCX1 or NCX2 in U87 cells. For these reasons it is conceivable that NCX2 silencing represents a fundamental step in the proliferation and invasiveness of glioblastoma.

CONCLUSION

Overall, these results suggest that there are some molecular determinants on the NCX2 promoter controlled by the pro-oncogenic pathway, which through genetic and epigenetic mechanisms prevent NCX2 expression in glioblastoma. Furthermore, NCX2 could represent a tumor suppressor gene whose expression / activity increase could represent a useful pharmacological strategy to hinder cell growth and invasiveness of glioblastoma.

FIGURE



Figure 1 Gene cluster in which the *Slc8a2* gene encoding NCX2 is present in the different species.

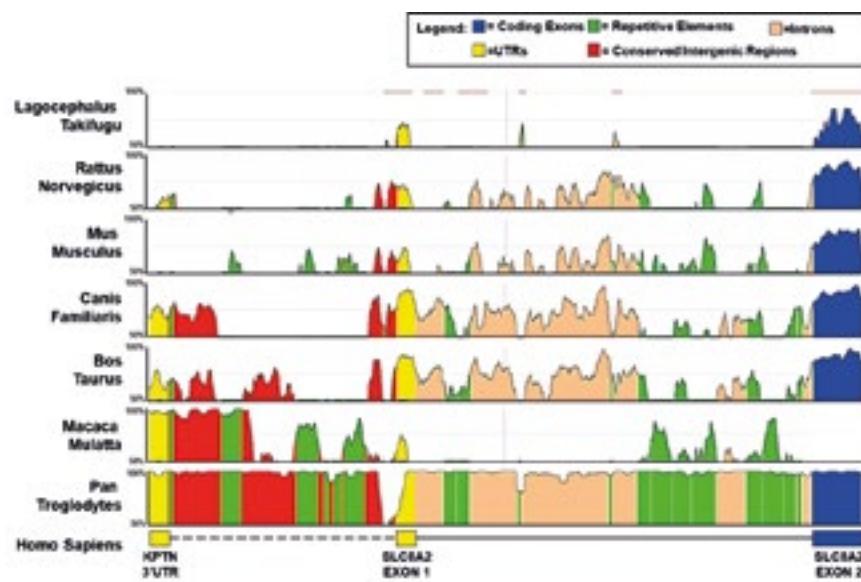


Figure 2 Degree of conservation between species of the promoter region of the *Slc8a2* gene.

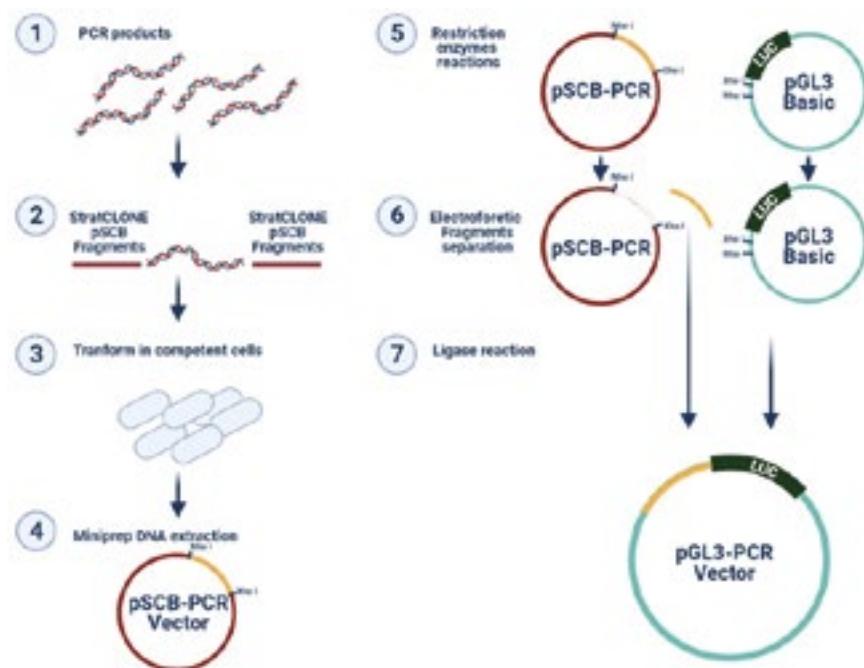


Figure 3 Cloning procedure of the NCX2 promoter into the luciferase plasmid (*pGL3b*).

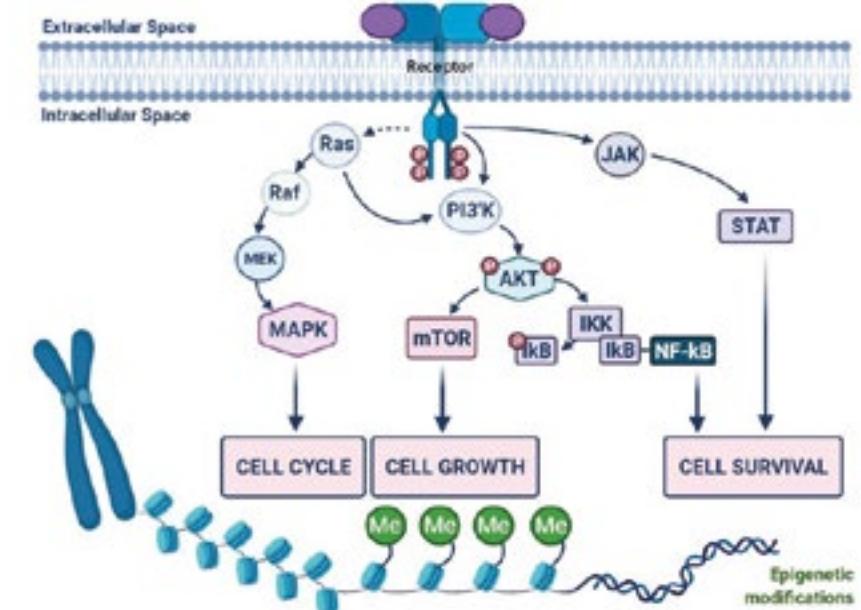


Figure 4 Transductional pathways that play a role on glioblastoma tumor growth and NCX2 expression.

*Lucrezia Calabrese¹, Silvia Natale¹, Ferdinando Fiorino²,
Vincenzo Santagada², Elisa Magli², Elisa Perissutti², Lucio
Annunziato³, Pasquale Molinaro^{1*}*

*1 - Division of Pharmacology, Department of Neuroscience, University of Naples "Federico II",
via Pansini 5, 80131 Napoli*

*2 - Division of Pharmacology, University of Naples "Federico II", via D. Montesano 49, 80131
Naples*

3 - IRCCS Fondazione SDN, via Gianturco, Naples

Genomic and transcriptomic characterization of gastro-entero-pancreatic neuroendocrine tumors

ABSTRACT

Neuroendocrine tumors (NETs) constitute a large and heterogeneous group of neoplasms that originate from cells of the neuroendocrine system. Currently, for the anatomopathological diagnosis, the serum chromogranin-A (CgA) assay represents the best marker of neuroendocrine differentiation of NETs. However, this parameter is poorly significant at a diagnostic, prognostic and predictive level, as well as lacks the necessary specificity to uniquely identify the pathology and its tissue of origin (Lamberts, Hofland et al. 2001, Ferolla, Faggiano et al. 2008). Since these are rare neoplasms, valid experimental models are not available to date.

In this study, supported by the Campania Region (FESR-Rare.Plat. Net project), the UNISA-DIPMED partner focused on the molecular characterization of rare tumors of interest through integrated genomics and transcriptomics studies, to study their profile genetic and mutational status, as well as the de-regulation of gene expression profiles and the possible expression of specific variations at the transcriptome level. The ultimate goal is to identify specific mutations and biomarkers involved in the onset and progression of these neoplasms, in order to facilitate early diagnosis and identify potential drug targets that can be exploited for personalized therapy.

INTRODUCTION

Neuroendocrine tumors (NETs) represent a large group of rare malignancies that arise from cells of the diffuse neuroendocrine system. The latter, having ubiquitous distribution within the body, allow the onset of NETs in different organs, consequently increasing the diagnostic complexity. The most frequent forms of NET originate from the digestive and respiratory tract (Oronsky, Ma et al. 2017) and include NETs of the ileum, colorectal, pancreas, stomach, duodenum, appendix, lung and thymus. In a portion of cases, NETs can originate from the genitourinary tract, skin (merkelomas), thyroid gland (medullary carcinoma, CMT), adrenal glands and nerve ganglia (pheochromocytomas and paragangliomas) (Oronsky, Ma et al. 2017).

According to the latest WHO 2010 classification, more than 80% of NETs are well differentiated tumors, with a low - intermediate proliferative index ($Ki67 < 20$), defined as NET G1 and G2 (Fraenkel, Kim et al. 2012). However, within the gastroentero-pancreatic, pulmonary and other sites originating NETs, there is a subgroup, with poor differentiation and with a high proliferative index, which includes poorly differentiated neuroendocrine carcinomas ($Ki67 > 20$), the so-called NEC G3 (Travis ,

References

Qu, M., et al. (2010). "Molecular genetic and epigenetic analysis of NCX2/SLC8A2 at 19q13.3 in human gliomas." *Neuropathol Appl Neurobiol* 36(3): 198-210.

Qu, M., et al. (2017). "The Candidate Tumor Suppressor Gene SLC8A2 Inhibits Invasion, Angiogenesis and Growth of Glioblastoma." *Mol Cells* 40(10): 761-772.

Brambilla et al. 2015).

About 10% of NETs are inherited and arise in the context of autosomal dominantly inherited neoplastic syndromes caused, in most cases, by mutations of tumor suppressor genes such as MEN-1, VHL, NF1, TSC, SDH or, in alternative, of the protooncogene RET.

Regarding disease biomarkers, at present, chromogranin-A (CgA) represents the best indicator available in pathological anatomy to attest to the neuroendocrine nature of NETs.

However, due to the lack of standardized procedures and the low sensitivity ranging from 60-90%, its diagnostic, prognostic and predictive role of response to therapy appears to be insufficiently adequate (Lamberts, Hofland et al. 2001, Ferolla, Faggiano et al. al. 2008). Furthermore, in the NEC G3, the CgA is expressed in reduced quantities

compared to other subtypes; this is mainly due to the loss of cellular neuroendocrine differentiation (Zatelli, Torta et al. 2007). Despite being considered rare cancers (the incidence is around 5 cases per 100,000 individuals per year), NETs in recent years have shown a significant increase in the frequency of occurrence of the total number of cancers diagnosed. Diagnosis of NETs is generally late, since the clinical symptoms are non-specific and mainly represented by the presence of a nodule, more or less silent, which compresses and/or causes excessive production of a particular hormone, with consequent imbalance of circulating and concomitant symptomatology.

For the early diagnosis of these pathologies, validated methodologies are not yet available, and there is also a lack of effective pharmacological therapy. Furthermore, patients with differentiated NETs are often forced to live with the disease for many years and to undergo complex continuous therapies, not without side effects. All this made urgent the need for a targeted study to improve the timeliness of diagnosis and clinical management of patients.

METHODS AND RESULTS

A substantial number of tumor samples was collected, including both medullary thyroid carcinomas (CMT) and gastro-entero-pancreatic NET (GEP-NET). The latter include, in turn, both more differentiated and less aggressive NETs (G1 and G2) and poorly differentiated and high-grade NETs (NEC G3) (Table 1).

Grade	Samples (n)	Fabric of origin
		Ileus
		Liver
G1	10	Pancreas
		Colon
		Pancreas MEN1
		Lung
G2	11	Pancreas
		Small intestine
		Duodenum
		Ileus
		Mediastinal lymph node
		Liver (MTX)
G3	7	Appendix
		Axillary lymph node
		Colon

Table 1 GEP-NET samples used for the analysis

As regards the study on GEP-NETs, described here, the aim is to characterize the genomic and transcriptomic profile of the cohort of collected samples, using Next Generation Sequencing (NGS) methods associated with bioinformatics analyzes (Fig. 1). For the molecular characterization of the rare tumors under examination, only tumor-like tissues, frozen or formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) were used. These tissues were subjected to DNA and RNA extraction in parallel using commercial kits. The nucleic acids thus obtained were then subjected to analysis of the transcriptome and of a panel of 523 genes involved in the pathogenesis of known neoplasms, including neuroendocrine ones.

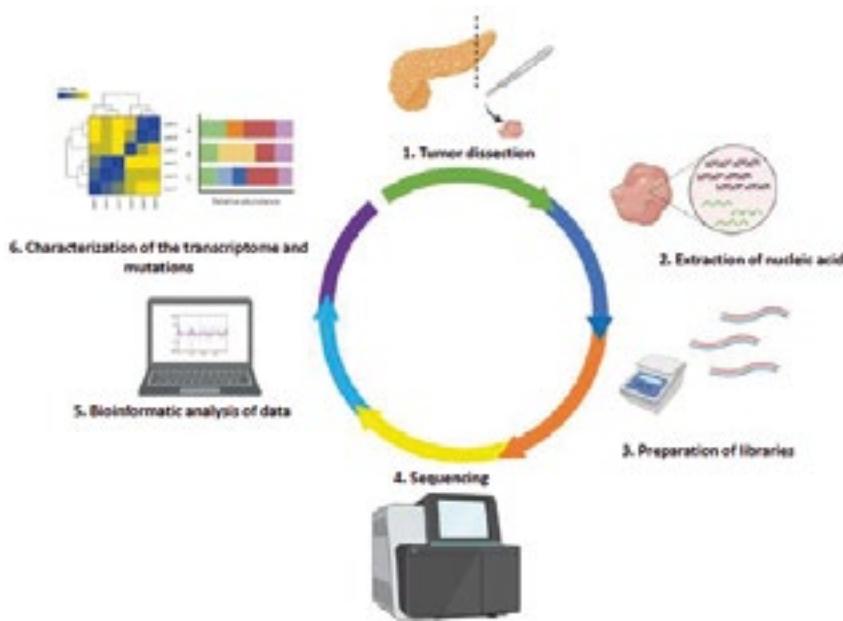


Figure 1 Workflow that starts from the extraction of nucleic acids, continues with the preparation of the libraries and their sequencing and ends with the bioinformatic analysis for the characterization of the genomic and transcriptomic profile of the NETs (<https://biorender.com/>)

TRANSCRIPTOME ANALYSIS

Following the qualitative evaluation of the collected samples, it has been possible to carry out the study of the transcriptome on 26 GEP-NET/NEC (10 G1, 9 G2 and 7 G3) with the aim of identifying any fusion transcripts and the expression profile of genes deregulated in the presence of cancer and in its various stages. In the absence of healthy tissue as a control, the differential analysis has been conducted using the cell proliferation index Ki67, as done in other analyzes (Symbol, Bilotta et al. 2021), so as to correlate the change in gene expression in the tissues with the degree of aggressiveness of the tumor.

Regarding the fusion transcripts, the data have been analyzed using 2 tools: StarFusion and Defuse. The analysis with StarFusion have led to the identification, in 9 samples, of 39 fusion transcripts. Among these, 15 fusion events occur at the inter-chromosomal level, while the rest occurs at the intra-chromosomal level. In parallel, with the Defuse tool, 30 fusion transcripts have been identified in 13 samples.

Crossing the data obtained, only one fusion transcript, called GDAP1-MIR2052HG (Fig. 2A), has been found common to the two analyzes, identified in 3 samples using the Starfusion tool and in 2 using Defuse. From the literature study, no information emerged regarding this fusion transcript. Both involved genes localize to chromosome 8. GDAP1 is an outer mitochondrial membrane protein, mainly expressed in nerve tissues and involved in Charcot-Marie-Tooth syndrome (González-Sánchez,

Satrústegui et al. 2019). The lncRNA MIR2052HG, on the other hand, is implicated in breast cancer and in the phenomenon of resistance to aromatase inhibitor therapy, as it can regulate the levels of the estrogen receptor α (REα) through specific mechanisms, including the interaction with EGR1 (Cairns, Ingle et al. 2019). Further investigation will be necessary to establish the possible clinical significance of this transcript.

Furthermore, the analysis of the transcriptome shows that there are 716 genes differentially expressed between NET and NEC (Fig. 2B). A functional analysis carried out on the latter (Ingenuity Pathway Analysis, IPA) shows that among the most interesting functions involving these genes are: molecular transport, cell death and survival, cell cycle and cell proliferation (Fig.2C).

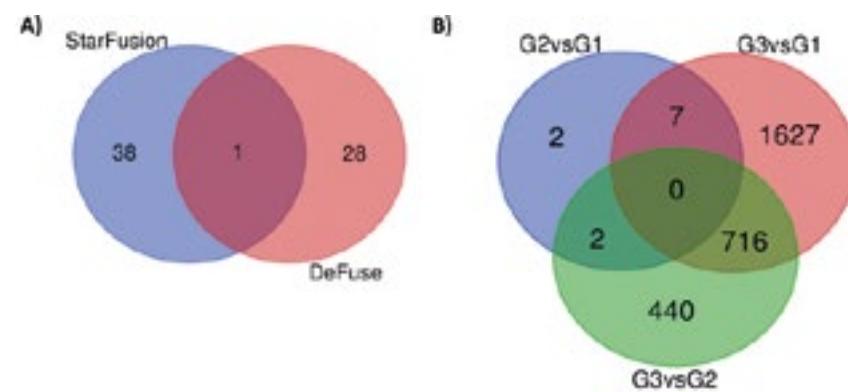


Figure 2
A) Venn diagram of fusion transcripts identified with the Starfusion and Defuse tools
B) Venn diagram of genes differentially expressed between degrees of neoplasms
C) Analysis of the functions of genes differentially expressed between NET and NEC

MUTATIONAL PROFILE ANALYSIS

The analysis of the mutational profile has been conducted on 523 genes whose variations are related to the main tumor pathologies. The samples analysed in this study are 28: 10 G1, 11 G2 and 7 G3.

Among the total mutations identified, 3568 have been selected. In detail, mutations with a frequency greater than 5% in the 1000Genomes and gnomAD databases have been excluded, to eliminate the most frequent variants in the general population, the mutations that in the ClinVar database, reporting the clinical significance of the gene variants identified to date, are noted as having benign or likely benign clinical significance, and those identified with a sequencing depth less than 150, for higher quality and to rule out false positives.

Figure 3A shows the 10 genes characterized to be most frequently mutated in the analysed samples, including: MDC1, PREX2 and FAT1. 38% of the samples have missense mutations in the MDC1 gene (Mediator of DNA Damage Checkpoint 1) that have already been described in pancreatic NETs (Goksu, Ozer et al. 2020). It encodes a protein necessary for the activation of some cell cycle checkpoints and is also involved in the recruitment of ATMs in DNA damage repair processes (Stewart, Wang et al. 2003).

While 35% of the samples have insertions in frames in the PREX2 gene, the presence of which has previously been evaluated in NECs (Ohmoto, Sato et al. 2021). PREX2 encodes a protein involved in the regulation of PTEN and in the activation of the PI3K pathway (Stewart, Wang et al. 2003, Rosenfeldt, Vázquez-Prado et al. 2004); there are several evidence of the involvement of PREX2 in different types of cancer, including hepatocellular carcinoma (Yang, Yen et al. 2019), and it has also been proposed as a driver gene for pancreatic carcinogenesis (Waddell, Pajic et al. 2015).

The FAT1 gene, instead, appears mutated in 27% of the samples with missense mutations. FAT1 appears to be involved in the mechanisms of cell polarization, migration and modulation of cell-cell contacts (Hu, Zhai et al. 2018). Following the global analysis of the mutations, the choice has been to focus first on the common ones in NET and NEC, to investigate, among them, the presence of driver mutations that could lead to the onset of such neoplasms. The cross between the list of specific mutations of the NET samples and that of the NECs highlights the presence of 380 mutations common between the two groups, 837 exclusives to NETs and 529 exclusive to NECs (Fig. 3B). The main functions in which the mutated genes are involved are shown in Figure 3.

In addition to mutations in single genes, through bioinformatics analysis it has been possible to evaluate the mutational burden (Tumor Mutational Burden, TMB), indicating the global level of mutations present in a tumor tissue and index of possible responsiveness to immunotherapy (Chan, Yarchoan et al. 2019), and microsatellite instability (MSI). While the observed MSI has median values that remain stable, the TMB shows an increase in its percentages as the degree of neoplasms increases, up to exceeding, in some NEC G3, the value of 10 set as a threshold beyond

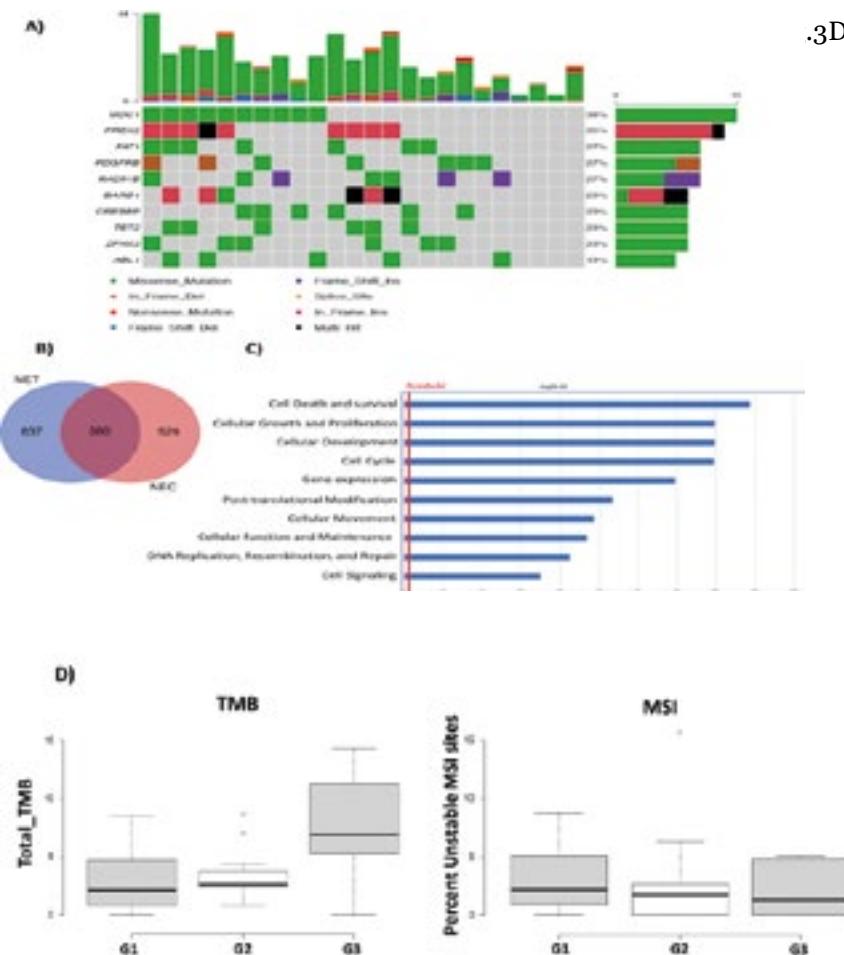


Figure 3

A) Oncoplot of the 10 mainly mutated genes in the analyzed samples
B) Venn diagram of common mutated genes between NET and NEC
C) Analysis of the functions of common mutated genes between NET and NEC D) Boxplot representing respectively the levels of TMB and MSI in the different sample sets

CONCLUSIONS

The molecular characterization of NETs, through the application of genomics and transcriptomics technologies, has allowed us to define the gene alterations that occur in neoplastic tissues, in general, and with the increasing aggressiveness of the tumor. A functional integration of the data will allow us to identify biomarker candidates, useful for improving the diagnosis and the therapeutic approach by predicting the most affected transduction pathways and the drugs already on the market that target them.

Annamaria Salvati, Viola Melone, Valeria Mirici Cappa, Jessica Lamberti, Domenico Memoli, Giovanni Pecoraro, Assunta Sellitto, Giorgio Giurato, Giovanni Nassa, Francesca Rizzo, Alessandro Weisz, Roberta Tarallo

Molecular and Genomic Medicine Laboratory, Department of Medicine, Surgery and Dentistry "Scuola Medica Salernitana", University of Salerno, 84081 Baronissi (SA), Italy

Acknowledgements

This study was supported by ELIXIR IT and the Campania Region with the "RARE.PLAT.NET" project, CUP B63D18000380007, progr. POC R&I 2014-2020; 'Innovative doctorates with industrial characterization' XXXV Cycle (Scholarship DOT1328517, CUP D52G19000580006 of V.M.), progr. PON R&I 2014-2020; 'Innovative doctorates with industrial characterization' XXXIV Cycle (Scholarship DOT13C5393, CUP F61G18000210006 of V. M. C.).

References

- Cairns, J., J. N. Ingle, K. R. Kalari, L. E. Shepherd, M. Kubo, M. P. Goetz, R. M. Weinshilboum and L. Wang (2019). "The lncRNA MIR2052HG regulates ERα levels and aromatase inhibitor resistance through LMTK3 by recruiting EGR1." *Breast Cancer Res* 21(1): 47.
- Chan, T. A., M. Yarchoan, E. Jaffee, C. Swanton, S. A. Quezada, A. Stenzinger and S. Peters (2019). "Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: utility for the oncology clinic." *Ann Oncol* 30(1): 44-56.
- Ferolla, P., A. Faggiano, G. Mansueto, N. Avenia, M. G. Cantelmi, P. Giovenali, M. L. Del Basso De Caro, F. Milone, G. Scarpelli, S. Masone, F. Santeusanio, G. Lombardi, G. Angeletti and A. Colao (2008). "The biological characterization of neuroendocrine tumors: the role of neuroendocrine markers." *J Endocrinol Invest* 31(3): 277-286.
- Fraenkel, M., M. K. Kim, A. Faggiano and G. D. Valk (2012). "Epidemiology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 26(6): 691-703.
- Goksu, S. Y., M. Ozer, S. M. A. Kazmi, N. N. Sanford, T. A. Aguilera, C. Ahn, D. Ohmoto, A., Y. Sato, R. Asaka, N. Fukuda, X. Wang, T. Urasaki, N. Hayashi, K. Nakano, M. Yunokawa, M. Ono, J. Tomomatsu, T. Toshiyasu, H. Mitani, K. Takeuchi, S. Mori and S. Takahashi (2021). "Clinicopathological and genomic features in patients with head and neck neuroendocrine carcinoma." *Mod Pathol.*
- Hsiehchen, A. Sanjeevaiah, L. Khosama, J. Bleeker, M. Atiq and M. S. Beg (2020). "Distinct Clinical Characteristics in Young-Onset Pancreatic Neuroendocrine Tumor." *Cancers (Basel)* 12(9).
- González-Sánchez, P., J. Satrústegui, F. Palau and A. Del Arco (2019). "Calcium Dereulation and Mitochondrial Bioenergetics in GDAP1-Related CMT Disease." *Int J Mol Sci* 20(2).
- Hu, X., Y. Zhai, R. Shi, Y. Qian, H. Cui, J. Yang, Y. Bi, T. Yan, Y. Ma, L. Zhang, Y. Liu, G. Li, M. Zhang, Y. Cui, P. Kong and X. Cheng (2018). "FAT1 inhibits cell migration and invasion by affecting cellular mechanical properties in esophageal squamous cell carcinoma." *Oncol Rep* 39(5): 2136-2146.
- Lamberts, S. W., L. J. Hofland and F. R. Nobels (2001). "Neuroendocrine tumor markers." *Front Neuroendocrinol* 22(4): 309-339.
- Oronsky, B., P. C. Ma, D. Morgensztern and C. A. Carter (2017). "Nothing But NET: A Review of Neuroendocrine Tumors and Carcinomas." *Neoplasia* 19(12): 991-1002.
- Rosenfeldt, H., J. Vázquez-Prado and J. S. Gutkind (2004). "P-REX2, a novel PI-3- kinase sensitive Rac exchange factor." *FEBS Lett* 572(1-3): 167-171.
- Simbolo, M., M. Bilotta, A. Mafficini, C. Luchini, D. Furlan, F. Inzani, G. Petrone, D. Bonvissuto, S. La Rosa, G. Schinzari, A. Bianchi, E. Rossi, R. Menghi, F. Giulante, S. Boccia, A. Scarpa and G. Rindi (2021). "Gene Expression Profiling of Pancreas Neuroendocrine Tumors with Different Ki67-Based Grades." *Cancers (Basel)* 13(9).
- Stewart, G. S., B. Wang, C. R. Bignell, A. M. Taylor and S. J. Elledge (2003). "MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint." *Nature* 421(6926): 961- 966.
- Travis, W. D., E. Brambilla, A. P. Burke, A. Marx and A. G. Nicholson (2015). "Introduction to The 2015 World Health Organization Classification of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus, and Heart." *J Thorac Oncol* 10(9): 1240-1242.
- Waddell, N., M. Pajic, A. M. Patch, D. K. Chang, K. S. Kassahn, P. Bailey, A. L. Johns, D. Miller, K. Nones, K. Quek, M. C. Quinn, A. J. Robertson, M. Z. Fadlullah, T. J. Bruxner, A. N. Christ, I. Harliwong, S. Idrisoglu, S. Manning, C. Nourse, E. Nourbakhsh, S. Wani, P. J. Wilson, E. Markham, N. Cloonan, M. J. Anderson, J. L. Fink, O. Holmes, S. H. Kazakoff, C. Leonard, F. Newell, B. Poudel, S. Song, D. Taylor, S. Wood, Q. Xu, J. Wu, M. Pines, M. J. Cowley, H. C. Lee, M. D. Jones, A. M. Nagrial, J. Humphris, L. A. Chantrill, V. Chin, A. M. Steinmann, A. Mawson, E. S. Humphrey, E. K. Colvin, A. Chou, C. J. Scarlett, A. V. Pinho, M. Giry-Laterriere, I. Rooman, J. S. Samra, J. G. Kench, J. A. Pettitt, N. D. Merrett, C. Toon, K. Epari, N. Q. Nguyen, A. Barbour, N. Zeps, N. B. Jamieson, J. S. Graham, S. P. Niclou, R. Bjerkvig, R. Grützmann, D. Aust, R. H. Hruban, A. Maitra, C. A. Iacobuzio-Donahue, C. L. Wolfgang, R. A. Morgan, R. T. Lawlor, V. Corbo, C. Bassi, M. Falconi, G. Zamboni, G. Tortora, M. A. Tempero, A. J. Gill, J. R. Eshleman, C. Pilarsky, A. Scarpa, E. A. Musgrove, J. V. Pearson, A. V. Biankin, S. M. Grimmond and A. P. C. G. Initiative (2015). "Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer." *Nature* 518(7540): 495-501.
- Yang, M. H., C. H. Yen, Y. F. Chen, C. C. Fang, C. H. Li, K. J. Lee, Y. H. Lin, C. H. Weng, T. T. Liu, S. F. Huang, B. T. Teh and Y. A. Chen (2019). "Somatic mutations of PREX2 gene in patients with hepatocellular carcinoma." *Sci Rep* 9(1): 2552.
- Zatelli, M. C., M. Torta, A. Leon, M. R. Ambrosio, M. Gion, P. Tomasetti, F. De Braud, G. Delle Fave, L. Dogliotti, E. C. degli Uberti and I. C. W. Group (2007). "Chromogranin A as a marker of neuroendocrine neoplasia: an Italian Multicenter Study." *Endocr Relat Cancer* 14(2): 473-482.

MiRNA analysis as possible biomarkers for the diagnosis of neuroendocrine tumors

ABSTRACT

Neuroendocrine tumors (NETs) represent a heterogeneous group of rare neoplasms, with different biological and clinical characteristics. Currently, the only predictive factors in the prognosis and diagnosis of these diseases are represented by the degree of neoplasm, closely associated with the cell proliferation index Ki67, and by the altered expression of chromogranin A (CgA). For this reason, the identification of innovative methods for the clinical diagnosis of NETs is a priority. In this study, starting from the analysis of sequencing data of small non-coding RNAs (smallRNA-Seq) produced by a NET cohort, it was possible to identify specific miRNAs whose differential expression correlates with the aggressiveness / grade of these tumors. The same miRNAs identified were assayed in the serum of NET patients against a control population, to determine their diagnostic potential. This could represent a potential advantage in histopathological classification and diagnosis of NETs, paving the way for new personalized therapeutic approaches.

INTRODUCTION

In recent years, the concept of liquid biopsy has become increasingly widespread, which involves the detection of tumors through the search for biomarkers circulating in biological fluids, such as blood. In the clinical setting, this represents a great advantage, providing the ability to detect and characterize tumors in a minimally invasive and highly reproducible way. In the context of liquid biopsy, what is important is to identify specific combinations of markers that signal the state, origin, and progression of a cancer, to facilitate its diagnosis and therapeutic approach.

There are several molecules and nanoparticles in the blood, such as circulating cells, platelets, extracellular vesicles, mRNA, microRNA, proteins and circulating DNA (cfDNA) (Chen and Zhao 2019).

As for the new potential biomarkers, microRNAs (miRNAs) are good candidates. They constitute a class of small non-coding RNAs capable of regulating gene expression at the post-transcriptional level, inhibiting the translation of specific target mRNAs (Berindan-Neagoe, Monroig et al. 2014). The action of miRNAs is involved in the regulation of various cellular processes, including proliferation, migration, apoptosis, and differentiation. Their function in the carcinogenesis and modulation of the aggressiveness of tumors has also been widely documented in the literature (Calin, Ferracin et al. 2005).

This study focused on the identification of new biomarkers for the recognition of neuroendocrine tumors (NETs). These represent a class of rare and heterogeneous neoplasms, which originate from cells of the diffuse neuroendocrine system (Klöppel 2017). Given the ubiquitous

distribution of the latter within the body, NETs can arise in different organs, mostly located in the digestive and respiratory tract (Oronsky, Ma et al. 2017).

The latest WHO 2010 classification defines that NETs can be classified, based on the degree of differentiation and the proliferative index (Ki67), in two main categories: NET, of degree G1 and G2, well differentiated with low - intermediate proliferative index (Ki67 <20) and NEC, grade G3, with high proliferative index (Ki67 > 20) (Fraenkel, Kim et al. 2012). The specific characteristics of each group are reflected in a different prognosis and therapeutic approach. NETs can arise in the context of hereditary neoplastic syndromes that occur due to mutations both in oncogenes and in tumor suppressors such as MEN-1, VHL, NF1, TSC, SDH and RET (Anlauf, Garbrecht et al. 2007).

Currently chromogranin-A (CgA) is the biomarker of choice for this type of pathology. However, the latter has low specificity and uniqueness in the recognition of the neuroendocrine nature of NETs alone (Lamberts, Hofland et al. 2001, Ferolla, Faggiano et al. 2008). Furthermore, in NEC grade G3, the loss of neuroendocrine differentiation is accompanied by a reduction in the expression of CgA (Zatelli, Torta et al. 2007). All this makes it necessary to identify new molecular markers to be added to the histopathological analysis for a more accurate classification of the degree of the neoplasm. For example, it has been observed that the expression of PD-L1, in NETs, increases with increasing grade, suggesting its use aimed both at identifying the degree of neoplasm and at implementing targeted therapies (Cavalcanti, Armentano et al. 2017).

In the case of NETs, the data on miRNA expression, both in tumor tissue and in plasma / serum of patients, are very limited and mainly concern pancreatic NETs (Cavalcanti, Galleggiante et al. 2020). The purpose of this study was to characterize the differential expression profile of miRNAs, in tumor tissues, in correlation to the grade, so as to identify some specific ones, useful for defining a correct histopathological classification of the grade of the neoplasm and which can be easily detected even in patient's blood. In fact, the altered expression of circulating miRNAs described in NETs (Malczewska, Kidd et al. 2018, Donati, Ciuffi et al. 2020, Galuppini, Censi et al. 2021) increases their potential usefulness as biomarkers in the evaluation of diagnosis, prognosis. or response to treatment.

METHODS AND RESULTS

The samples used for the analysis include 26 high- and low-grade gastro-entero-pancreatic NETs (GEP-NETs), both G1 and G2 grade NETs, and G3 grade NECs (Table 1).

The study aims to characterize the miRNA expression profiles within the cohort of collected samples, using Next Generation Sequencing (NGS) methods associated with bioinformatics analyzes (Fig. 1).

GRADE	SAMPLES (N)	TISSUE OF ORIGIN
G1	11	Ileus
		Liver
		Pancreas
		Colon
		Pancreas MEN1
G2	9	Lung
		Pancreas
		Small intestine
		Duodenum
		Ileus
G3	6	Mediastinal lymph node
		Liver (MTX)
		Appendix
		Axillary lymph node
		Colon

Tab. 1 Samples used for the analysis

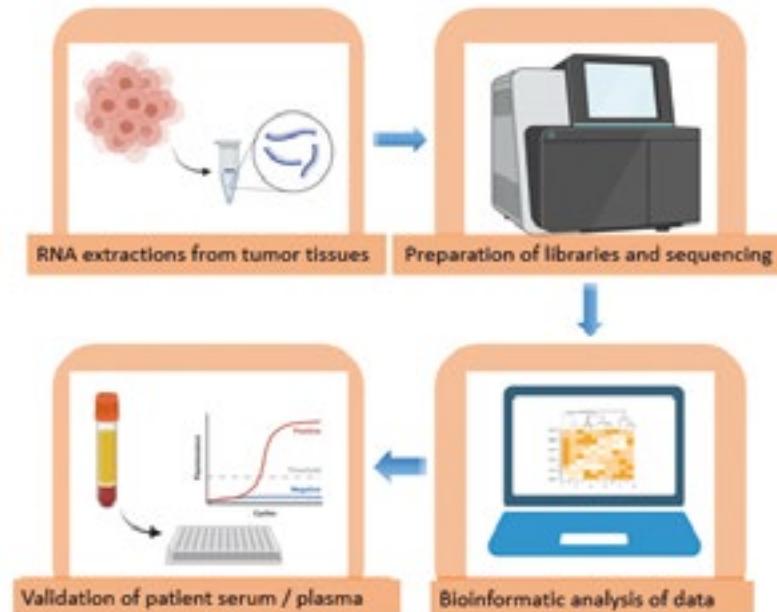


Figure 1 Workflow starting from the extraction of RNA from tumor tissues, preparation, and sequencing of libraries, bioinformatic analysis of data and validation of miRNA in patient serum (<https://biorender.com/>)

GLOBAL ANALYSIS OF MIRNA EXPRESSION IN TUMOR TISSUES

Generation of the sequencing libraries was performed using the PerkinElmer NEXTFLEX Small RNA-Seq Kit v3 kit. The analysis of the sequencing data, through the use of the iSmart software (Panero, Rinaldi et al. 2017), led to the identification, considering a median read counts value greater than 0, of 718 miRNA in NET G1, 697 in NET G2 and 793 in NEC G3. Of these, 600 miRNAs are expressed in common in all tissues analyzed, regardless of the grade of neoplasm (Fig. 2A). Among the TOP100 expressed, mir-375 was identified, already described as a potential biomarker in NETs (Arvidsson, Rehammar et al. 2018). In parallel with the tumor tissues, the sequencing of the RNA extracted from a serum sample from the same patient with pancreatic NET of grade G2 was carried out. In the latter, the expression of 232 miRNA was confirmed, compared to the 834 detected in the tissue; crossing the lists, 209 miRNAs were expressed both in serum and in tissue (Fig. 2B).

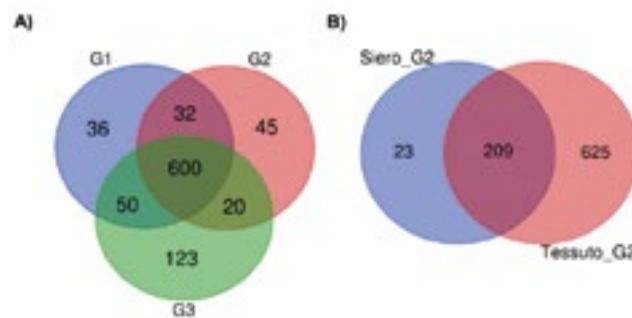


Figure 2

A) Venn diagram of miRNAs identified in samples with different grades
B) Venn diagram of miRNAs expressed in the sequenced serum sample and in the tissue of the same patient

DIFFERENTIAL ANALYSIS OF MIRNAS BASED ON KI67

The differential analysis was carried out in correlation with the different degree of differentiation / aggressiveness of the tumors examined, therefore based on the cell proliferation index Ki67 as already done in other studies (Cavalcanti, Galleggiante et al. 2020). Data analysis showed the presence of 14 miRNAs differentially expressed between NET and NEC (Fig. 3A). Of the differentially expressed miRNAs, 9 are up-regulated in NECs while 7 are up-regulated in NETs (Fig. 3B). Of the 7 miRNAs upregulated in the NETs, 4 of them were found to be present in the serum sample that was sequenced.

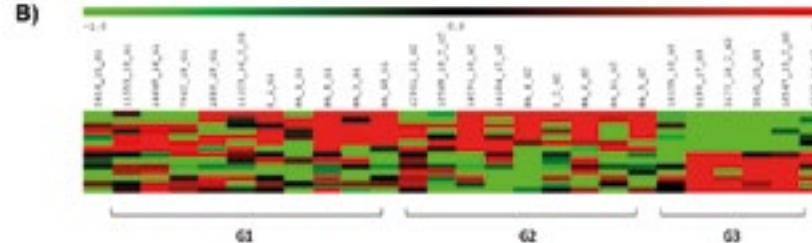
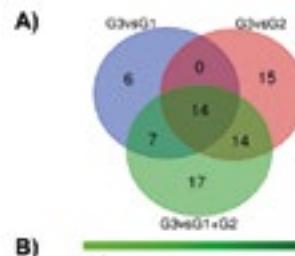


Figure 3

A) Venn diagram of differentially expressed miRNAs
B) Heatmap of expression levels (represented as \log_2 of expression levels, centered on zero) of miRNAs differentially expressed between grades

DIAGNOSTIC VALIDATION OF CIRCULATING MIRNAS

The miRNAs differently expressed between NET and NEC and some present among the top expressed common in all samples were chosen for validation in the serum of patients affected by these neoplasms to evaluate, which of these molecules, was significantly suitable for discriminating a condition pathological from a normal one. Of the 20 miRNAs selected, the expression on blood samples of patients suffering from different types of NETs (sporadic pancreatic, pancreatic from subjects with genetic MEN1 syndrome and medullary thyroid carcinomas) was evaluated towards a population of control subjects. The extraction of circulating miRNAs on serum samples was conducted on a total of an independent cohort of 69 subjects divided into 35 affected and 34 controls. The specific neoplasms of subjects affected by NET are shown in table 2.

The expression analysis, determined using RT-qPCR techniques, identified some circulating miRNAs capable of significantly discriminating the population of pathological subjects from that of control subjects (Figure 4). Figure 5A, on the other hand, shows how the distribution, in terms of relative expression, of miRNAs significantly deregulated in affected subjects compared to the population of healthy individuals, can vary according to the type of NET. Figure 5B shows the significance value of its deregulation in correlation to the neoplasm for each miRNA.

PATIENT (N)	PATHOLOGY
22	MEN1
6	CMT
7	pNET

Table 2 Pathological characteristics of patients recruited for the expression analysis of circulating miRNAs. MEN1: multiple endocrine neoplasia type 1; CMT: medullary thyroid carcinoma; pNET: neuroendocrine tumor of the pancreas.

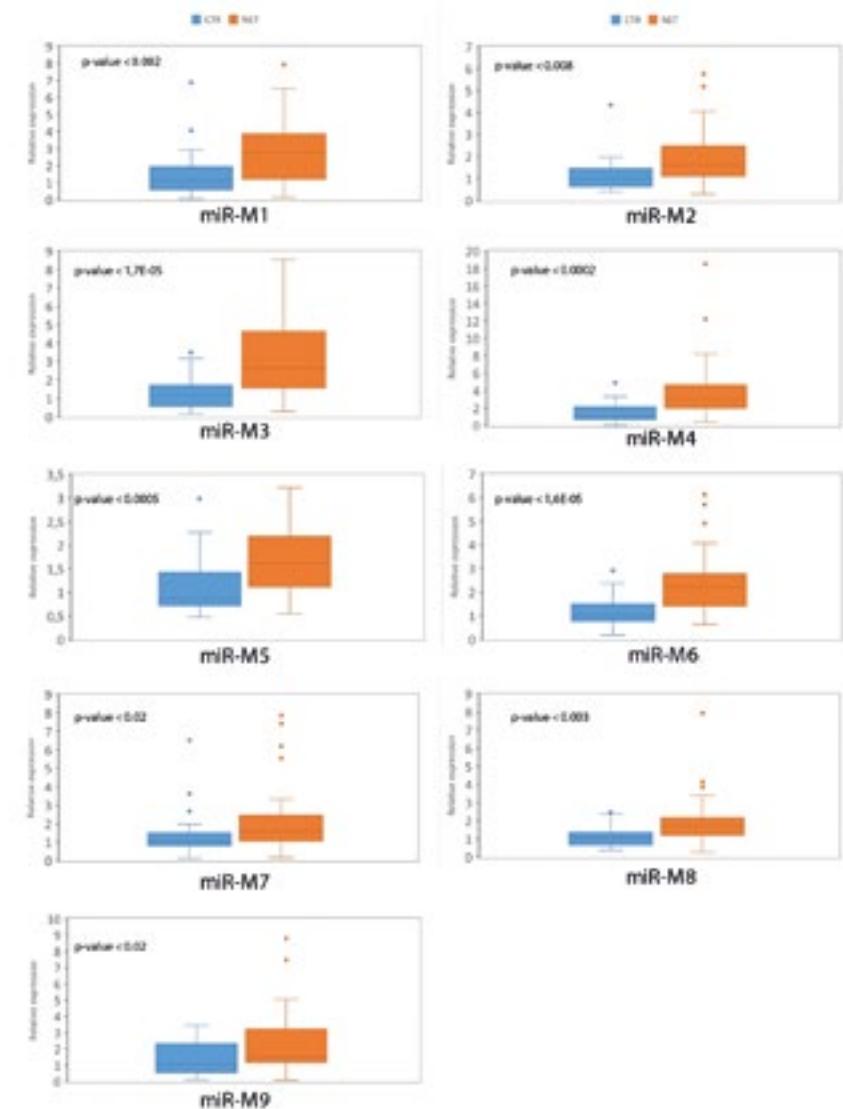
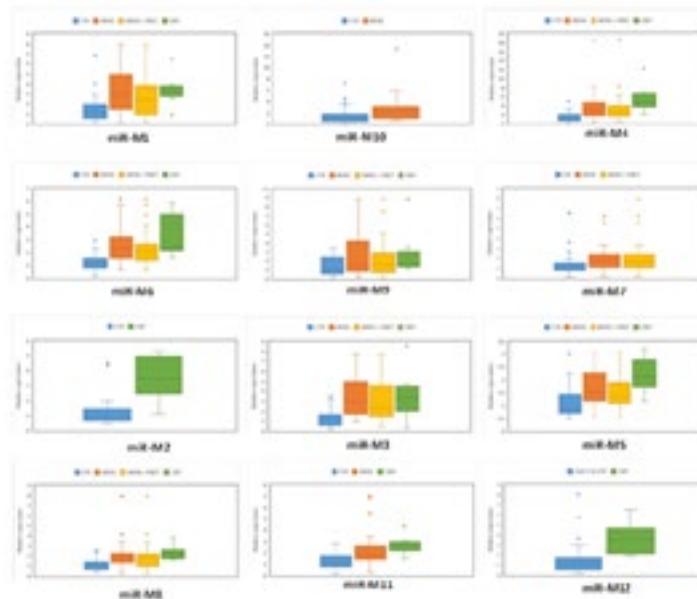


Figure 4 Relative expression of circulating miRNAs significantly deregulated ($p\text{-value} \leq 0.05$) between the two conditions (healthy-sick). CTR: control; NET: neuroendocrine tumors.

A)



B)

	p-value		
	MEN1	MEN1+pNET	CMT
miR-M1	0.0012	0.0055	0.0062
miR-M10	0.0347	ns	ns
miR-M2	ns	ns	1.93E-05
miR-M3	6.34E-07	2.60E-05	0.0003
miR-M4	0.0006	0.0013	6.68E-07
miR-M5	0.0016	0.0039	0.0001
miR-M6	7.42E-06	6.99E-05	6.22E-06
miR-M8	0.0027	0.0102	0.0001
miR-M9	0.0101	0.0277	0.0234
miR-M11	0.0008	ns	0.0001
miR-M12	ns	ns	0.0006
miR-M13	0.0287	0.0201	ns

Figure 5

A) Pathological distribution of significantly deregulated circulating miRNAs between the two conditions (healthy-sick)

B) Significance in terms of p-value ≤ 0.05 of each miRNA deregulated towards the type of NET.

ns: not significant

CONCLUSIONS

GEP-NETs are a heterogeneous group of tumors with different prognoses and different responses to treatments. For these neoplasms the histopathological evaluation represents a crucial moment, which requires an improvement of the specificity. Currently known methods do not allow it and for this reason it is necessary to find new biomarkers capable of discriminating the different aggressiveness of NETs. Similarly, the identification of circulating molecules capable of diagnosing NETs and discriminating between the different NETs today represents an “unmet medical need”. MiRNAs are good candidates to take on these tasks as they are particularly stable in biological fluids (Filipów and Łaczmański 2019). In this work, a pool of miRNAs able to discriminate NETs from

NECs was identified. These miRNAs were also tested for their expression in serum samples from subjects affected by NET compared to a population of healthy individuals. The data obtained showed that some of them can discriminate the pathological condition from the normal one and are distributed in the population of the NETs analysed (MEN1, CMT and pNET) in a different way. Furthermore, the data analysis with an alternative software, recently implemented, will allow to identify any other species of small ANNs that can be monitored (Geles, Palumbo et al. 2021). Future studies will be carried out to validate its effectiveness in the clinical setting.

Viola Melone¹, Valeria Mirici Cappa¹, Elena Alexandrova¹, Teresa Rocco¹, Giorgio Giurato¹, Roberta Iorio¹, Giovanna Maria Ventola¹, Giovanni Pecoraro¹, Simona Marino¹, Anna Truda¹, Raffaella Mastrocinque¹, Angela Cordella¹, Giovanna Marchese¹, Mariarosaria Incoronato², Marco Salvatore², Maria Ravo¹, Alessandro Weisz¹, Roberta Tarallo¹

1 - Genomix4Life Srl, Via S. Allende 43/L, 84081 Baronissi (SA), Italy

2 - SDN spa, Via Gianturco 113, 80143 Napoli (NA), Italy

Acknowledgements

This Project was supported by the Campania Region with the “RARE.PLAT.NET” project, CUP B63D18000380007, progr. POC R&I 2014-2020 ‘Innovative PhDs with industrial characterization’ XXXV Cycle (Scholarship DOT1328517, CUP D52G19000580006 of V. M.), progr. PON R&I 2014-2020 ‘Innovative PhDs with industrial characterization’ XXXIV Cycle (Scholarship DOT13C5393, CUP F61G18000210006 by V. M. C.).

References

- Anlauf, M., N. Garbrecht, J. Bauersfeld, A. Schmitt, T. Henopp, P. Komminoth, P. U. Heitz, A. Perren and G. Klöppel (2007). “Hereditary neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system.” Virchows Arch 451 Suppl 1: S29-38.
- Arvidsson, Y., A. Rehammar, A. Bergström, E. Andersson, G. Altıparmak, C. Swärd, B. Wängberg, E. Kristiansson and O. Nilsson (2018). “miRNA profiling of small intestinal neuroendocrine tumors defines novel molecular subtypes and identifies miR-375 as a biomarker of patient survival.” Mod Pathol 31(8): 1302-1317.
- Berindan-Neagoe, I., P. e. C. Monroig, B. Pascullo and G. A. Calin (2014). “MicroRNAome genome: a treasure for cancer diagnosis and therapy.” CA Cancer J Clin 64(5): 311-336.
- Calin, G. A., M. Ferracin, A. Cimmino, G. Di Leva, M. Shimizu, S. E. Wojcik, M. V. Iorio, R. Visone, N. I. Sever, M. Fabbri, R. Iuliano, T. Palumbo, F. Pichiorri, C. Roldo, R. Garzon, C. Sevignani, L. Rassenti, H. Alder, S. Volinia, C. G. Liu, T. J. Kipps, M. Negrini and C. M. Croce (2005). “A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia.” N Engl J Med 353(17): 1793-1801.
- Cavalcanti, E., R. Armentano, A. M.

Valentini, M. Chieppa and M. L. Caruso (2017). "Role of PD-L1 expression as a biomarker for GEP neuroendocrine neoplasm grading." *Cell Death Dis* 8(8): e3004.

Cavalcanti, E., V. Galleggiante, S. Coletta, E. Stasi, M. Chieppa, R. Armentano and G. Serino (2020). "Altered miRNAs Expression Correlates With Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors Grades." *Front Oncol* 10: 1187.

Chen, M. and H. Zhao (2019). "Next-generation sequencing in liquid biopsy: cancer screening and early detection." *Hum Genomics* 13(1): 34.

Donati, S., S. Ciuffi, F. Marini, G. Palmini, F. Miglietta, C. Aurilia and M. L. Brandi (2020). "Multiple Endocrine Neoplasia Type 1: The Potential Role of microRNAs in the Management of the Syndrome." *International Journal of Molecular Sciences* 21(20).

Ferolla, P., A. Faggiano, G. Mansueti, N. Avenia, M. G. Cantelmi, P. Giovenali, M. L. Del Basso De Caro, F. Milone, G. Scarpelli, S. Masone, F. Santeusanio, G. Lombardi, G. Angeletti and A. Colao (2008). "The biological characterization of neuroendocrine tumors: the role of neuroendocrine markers." *J Endocrinol Invest* 31(3): 277-286.

Filipów, S. and Ł. Łaczmański (2019). "Blood Circulating miRNAs as Cancer Biomarkers for Diagnosis and Surgical Treatment Response." *Front Genet* 10: 169.

Fraenkel, M., M. K. Kim, A. Faggiano and G. D. Valk (2012). "Epidemiology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 26(6): 691-703.

Galuppini, F., S. Censi, M. Moro, S. Carraro, M. Sbaraglia, M. Iacobone, M. Fassan, C. Mian and G. Pennelli (2021). "MicroRNAs in

Medullary Thyroid Carcinoma: A State of the Art Review of the Regulatory Mechanisms and Future Perspectives." *Cells* 10(4).

Geles, K., D. Palumbo, A. Sellitto, G. Giurato, E. Cianflone, D. Torella, V. Mirici Cappa, G. Nassa, R. Tarallo, A. Weisz and F. Rizzo (2021). WIND (Workflow for pIRNAs aND beyonD): a strategy for in-depth analysis of small RNA-seq data. *F1000Research*.

Klöppel, G. (2017). "Neuroendocrine Neoplasms: Dichotomy, Origin and Classifications." *Visc Med* 33(5): 324-330.

Lamberts, S. W., L. J. Hofland and F. R. Nobels (2001). "Neuroendocrine tumor markers." *Front Neuroendocrinol* 22(4): 309-339.

Malczewska, A., M. Kidd, S. Matar, B. Kos-Kudla and I. M. Modlin (2018). "A Comprehensive Assessment of the Role of miRNAs as Biomarkers in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors." *Neuroendocrinology* 107(1): 73-90.

Oronsky, B., P. C. Ma, D. Morgensztern and C. A. Carter (2017). "Nothing But NET: A Review of Neuroendocrine Tumors and Carcinomas." *Neoplasia* 19(12): 991-1002.

Panero, R., A. Rinaldi, D. Memoli, G. Nassa, M. Ravo, F. Rizzo, R. Tarallo, L. Milanesi, A. Weisz and G. Giurato (2017). "iSmaRT: a toolkit for a comprehensive analysis of small RNA-Seq data." *Bioinformatics* 33(24): 4050.

Zatelli, M. C., M. Torta, A. Leon, M. R. Ambrosio, M. Gion, P. Tomassetti, F. De Braud, G. Delle Fave, L. Dogliotti, E. C. degli Uberti and I. C. W. Group (2007). "Chromogranin A as a marker of neuroendocrine neoplasia: an Italian Multicenter Study." *Endocr Relat Cancer* 14(2): 473-482.

A Solution for Medical/Clinical Data Privacy Management

ABSTRACT

In the area of extremely sensitive data management, such as the results of clinical tests resulting from tumor and liquid biopsies, various individual privacy and security issues arise. The processes of data extraction and analysis, focus on the research and on dissemination, provide upstream phases of anonymization, management and protection of sensitive data in compliance with all relevant regulations. From the case studies and research publications it clearly emerges that it is not easy to anonymize a large set of personal data maintaining the information useful for subsequent activities. For example, a set of data considered anonymous could be combined with another set of data in such a way as to allow the identification of one or more people.

In this contribution, included in the activities funded by the RarePlatNet project, an overview of the current anonymization systems will be provided and a solution based on state-of-the-art techniques will be presented.

INTRODUCTION

In recent years, we have witnessed an exponential increase in clinical and health data available in electronic and digital form but their sharing with the public and the scientific world has not proceeded hand in hand. In fact, health data, being particularly delicate due to the content linked to the personal information of doctors and patients, are not immediately and easily accessible due to the privacy restrictions imposed by the various regulatory authorities, national, supranational or international.

Consequently, the Protected Health Information (PHI) must necessarily be subjected to a drafting process that allows to (1) identify the sensitive information and then (2) classify it appropriately according to its typology (for example names of persons, places or organizations, or even age or identification numbers, and so on) and finally (3) anonymize. This last step, if the second step is omitted, could brutally consist in deleting either in the obscuration of identified information. Further in a more appropriate way, in the second step, the identified information could be replaced with a suitable substitute, thus leaving the legibility and consultation of the text in an anonymized form.

In compliance with the concept of personal data introduced by the General Data Protection Regulation (GDPR, from the English General Data Protection Regulation) of the European Union, it is possible to improve and make these anonymization systems compatible with the regulatory aspects. In this way, the data can be released quickly to the public and exploited in an appropriate manner such as for research purposes.

PROCESSES OF PRIVACY MANAGEMENT

The privacy management process can be seen in two phases, one of identification and one of anonymization. An appropriate phase of identification and classification of the entities of interest makes it possible to replace these entities with surrogates rather than eliminate them, preserving the legibility and comprehensibility of the texts, as well as making it more unlikely the identification of the points where such replacement took place (Vincze, 2014). Therefore, a good anonymization system must be capable of (1) preserving the readability of the text and (2) effectively masking the points in which a substitution by surrogate has occurred thanks to an effective classification of privacy-sensitive entities.

IDENTIFICATION MODELS

The first identification models exploited craft laws to identify entities, resulting simple to implement but less flexible both in terms of context and language changes. Then *Machine Learning*-based systems are developed to train a classifier to recognize and classify entities, while requiring large sets of tagged data and time to perform feature engineering. Deep Learning-based systems have recently been introduced to perform sequence labeling, then identify and classify entities, leveraging large amounts of data to learn both the right features to use and the best representation of words in a vector space, known as *embedding*.

In particular, the problem has been assigned to Recognition of the Named Entity (NER), these named entities are precisely the terms to be identify and classify. The approaches described are extensively documented by (Meystre, 2010) and (Stubbs, 2015).

ANONYMIZATION MODELS

The anonymization models have three critical issues: i) identification: the possibility of isolating some or all of the data that identify a person within the data set; ii) correlation: the possibility of correlating at least two data concerning the same or a group of data subjects (in the same or in two different databases). If related data is identified as assigned to the same group of people but cannot identify a specific person, there is protection from detection but not from correlativity; iii) deduction: the possibility of inferring, with a high degree of probability, the value of an attribute from the values of a set of other attributes.

Eliminating these risks prevents the re-identification by means that could be used by the controller and others. The main anonymization approaches are randomization and generalization.

Randomization modifies the veracity of the data, eliminating the strong correlation between data and person: the randomization functions introduce pseudorandom information (noise) in order to eliminate (or rather attenuate) the precise associative link with the person to whom they refer.

The most used randomization techniques: i) Use of statistical noise: consists in modifying the attributes contained in the data set in such a way as to make them less accurate, while maintaining the general distribution; ii) Permutation: it is based on mixing the values of the attributes within

a table in such a way that some of them are artificially linked to different interested persons, it is useful when it is important to maintain the exact distribution of each attribute within the data set; iii) Differential privacy: this consists in placing a set of statistical data alongside another set that differs from the first to a single element, such that the answers to the same question on both are indistinguishable with a probability close to one.

Generalization consists of generalizing or diluting the attributes of the individuals concerned by changing their scale or order of magnitude (i.e., a region rather than a city, a month rather than a week). The most common generalization techniques are: i) k-anonymity which is based on the idea that there are three types of attributes in a user's record: the Identifiers (I), which uniquely identify the owner of the data (such as the name and surname or tax code); quasi-identifiers (QI), which can partially identify an individual in a dataset (this is the case of gender or zip code); sensitive attributes (SA), which are the private information to be protected by an individual (such as any illnesses or his salary). Therefore the k-anonymity is defined as follows: a dataset T satisfies the property of k-anonymity if, for each record in the multiset T [QI], there are at least other (k-1) records, whose attributes QI have the same values ; ii) L-diversity, unlike k-anonymity, requires that each equivalence class (a set of records that are indistinguishable from each other with respect to certain attributes) has the values well represented for each sensitive attribute of the considered dataset, therefore k-anonymity preserves the quasi-sensitive attributes while l-diversity the sensitive attributes of the person (Aggarwal, 2006); iii) T-Vicinity which refines l-diversity aiming to create equivalent classes that resemble the initial distribution of attributes and is useful when it is important to keep the data as close as possible to the original ones. An additional constraint is imposed on the equivalence class: not only must there be at least one different value within each equivalence class, but also that each value is represented as many times as necessary to reflect the initial distribution of each attribute.

PROPOSED SOLUTION

In the proposed solution, the formal and regulatory aspects referred to above are considered with the aim of maintaining a balance between the guarantee of data protection and the need for scientific sharing of the same.

The system is able to manage both structured and non-structured data: in the latter case the identification system in charge identifies the entities sensitive to privacy, e.g. the PHI, then anonymization is carried out through appropriate data encryption. The identification system used falls within those based on the Deep Learning paradigm as described in (Catelli, 2021) and is implemented through a Bi-Directional Long Short-Term Memory network followed by a Conditional Random Field in short Bi-LSTM + CRF (Huang, 2015), trained through an Italian language dataset. As shown in Figure 1, the input words are transformed into an embedding concatenation consisting of FastText and Flair. This choice is motivated by the ability of the chosen embedding to capture information hidden in the language, such as analogies or the semantics

of words, in particular they are able to take into account the context in which the words are found, in order to better manage those that are rare or never encountered before, the morpho-syntactic variations typical of handwritten text and polysemy.

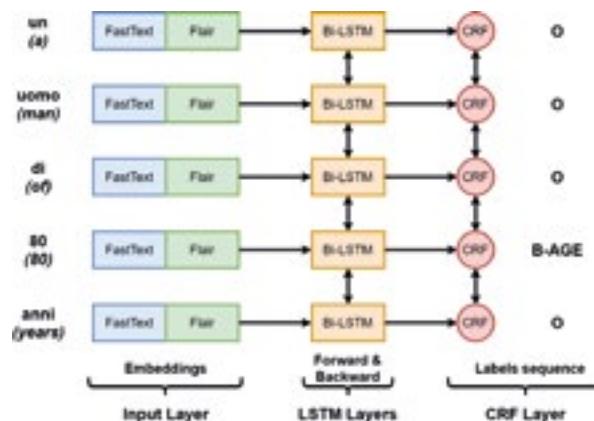


Figure 1 Architecture for PHI identification through a Bi-LSTM + CRF neural network, taken from (Catelli, 2021).

Downstream of the PHI identification process, the anonymization service makes it possible to guarantee safe storage, by generating a key whose sole owner is the one who requests the service. Only through the presentation of your credentials and the key, you will be able to have the complete and clear return of the anonymized data. The owner is also the only one who establishes, through specific rules and settings provided to the anonymization service, which information and with what visibility (in clear text, all ***, only initials of words, etc.) the other users can take advantage of the platform.

At an infrastructural level, the integrity and protection of data from fraudulent access are guaranteed through anonymization-encryption of data already at the level of data structures (BLOB Storage). In these structures, the data is encrypted and decrypted with 256-bit AES encryption and the related keys are managed and stored in a Key Vault account that provide them to the storage blob on demand after verifying the identity of the applicant. Only system administrator users are able to de-anonymize the data, thus avoiding the possibility of fraudulent access or malicious acquisition of BLOB backups.

Finally, at the operational level, a protection level has been implemented to give platform users the possibility, for example, to share data to create experiments.

CONCLUSIONS

In this work, a system for managing privacy and security issues of personal data is presented with particular reference to those produced by clinical test results deriving from tumor and liquid biopsies. In particular, the data extraction and analysis processes for research and dissemination

purposes have been filtered through previous anonymization procedures, for the management and protection of sensitive data in compliance with privacy regulations.

Case studies and literature publications make it clear that the difficulty with which sets of personal data can be made anonymous is closely related to the need to keep the information intact for subsequent reuse, which is why combining or simply mixing different data to reduce the possibility of a subsequent identification of one or more individuals is an operation to be carried out with caution, providing for the possibility of recovering the correct starting information content.

In this contribution, included in the activities of the RarePlatNet project, it is provided an overview of the current anonymization systems and a solution based on state-of-the-art techniques is presented.

Rosario Catelli¹, Marco Avellino², Luca Lo Presti³, Vincenzo Borriello⁴, Francesco Gargiulo⁵,

¹ - Istituto di Calcolo e Reti ad Alte Prestazioni (ICAR) del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), via Pietro Castellino, 111, Napoli, 80131

² - Sync Lab, Via G. Porzio, CDN is. B8 Napoli 80143

³ - Sync Lab, Via G. Porzio, CDN is. B8 Napoli 80143

⁴ - Technova srl, Via G. Porzio, CDN is. C2 Napoli 80143,

⁵ - Istituto di Calcolo e Reti ad Alte Prestazioni (ICAR) del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), via Pietro Castellino, 111, Napoli

Bibliography

- Aggarwal, G., Panigrahy, R., Feder, T., Thomas, D., Kenthapadi, K., Khuller, S., & Zhu, A. (2010). Achieving anonymity via clustering. ACM Transactions on Algorithms (TALG), 6(3), 1-19.
- Stubbs, A., Kotfila, C., & Uzuner, Ö. (2015). Automated systems for the de-identification of longitudinal clinical narratives: Overview of 2014 i2b2/UTHealth shared task Track 1. Journal of biomedical informatics, 58, S11-S19.
- Catelli, R., Gargiulo, F., Casola, V., De Pietro, G., Fujita, H., & Esposito, M. (2021). A novel covid-19 data set and an effective deep learning approach for the de-identification of italian medical records. IEEE Access, 9, 19097-19110.
- Huang, Z., Xu, W., & Yu, K. (2015). Bidirectional LSTM-CRF models for sequence tagging. arXiv preprint arXiv:1508.01991.
- Meystre, S. M., Friedlin, F. J., South, B. R., Shen, S., & Samore, M. H. (2010).
- Vincze, V., & Farkas, R. (2014). De-identification in natural language processing. In 2014 37th International Convention on Information and Communication Technology, Electronics and Microelectronics (MIPRO) (pp. 1300-1303). IEEE.

Creation of a prototype software to support UNI EN ISO 2038: 2020 accreditation “Biobanking - General requirements for biobanking”

INTRODUCTION

One of the objectives of the RARE.PLAT.NET project has been the creation of an innovative IT system to support the accreditation procedures envisaged by the UNI EN ISO 20387: 2020 Standard Biotechnologies - “Biobanking” - General requirements for “biobanking”. This article describes the design and implementation of a dedicated software that involved two project partners in collaboration: Neatec SpA and San Raffaele University of Rome, Acireale, Catania.

The biobank is an organization that provides a service of acquisition, conservation and other activities, related to the analysis and distribution of biological material from organic entities and useful for the purposes of clinical research, diagnoses and studies on biodiversity and manages the information and related clinical data.

The requirements to be met for accreditation for “biobank” certification are drawn up in the UNI EN ISO 20387: 2020 standard which is intended for all operators of biobanks that store biological material from multicellular organisms (for example humans, animals, fungi) and microorganisms, for biotechnological research and development purposes.

It responds to the need of the research and development sectors to have biological material available that can guarantee the reproducibility and comparability of research results, ensuring, by biobanks, the use of standard processes and procedures that make it possible to trace the life cycle of materials and their data.

The standard does not apply to organizations that handle biological material for therapeutic use and intended for the production of food or feed, including related analysis laboratories.

The fulfillment of the requirements is not intended as a certification of the technical competence of the biobank that requires accreditation or its management systems, but as a formal assessment of full compliance with the standard. The accreditation has a duration of 4 years during which the biobank can be subjected to checks on maintaining compliance with the standard. The need is therefore to have an application that:

- supports the organization in identifying and collecting what is necessary to demonstrate compliance with the requirements of the standard, to proceed with the request for accreditation.
- allows the management and updating of data over time to maintain compliance with the requirements and consequent maintenance of the certification.

SOFTWARE DESIGN

To access accreditation, the operating structure must be able to ensure compliance with the requirements listed in the UNI EN ISO 20387: 2020 standard where specific types of requirements to be met have been identified, logically grouping them into:

- General requirements
- Structural requirements
- Resource requirements
- Process requirements
- Quality management system requirements

The biobank must guarantee compliance with all the requirements indicated in the standard also by producing evidence; such evidence may vary according to the requirement itself and include:

- Guarantee of the use of documented management and technical procedures
 - operational processes
 - provision of services
 - verifications
 - quality control
- Guarantee of the presence of adequate documentation
 - job descriptions
 - records (equipment, instruments, ...)
 - material catalogs
 - notes
 - acts

In the design of the application, access to individual features has been provided according to the profile assigned to individual users. The following profiles have been identified:

- Administrator
 - has access to system configurations and parameterizations such as, for example, creation of distribution lists, indications relating to third party obligations.
- Verifier
 - carries out checks on what is present in the checklists and validates the contents relating to the individual requirement.
- Operator
 - updates the requirements contained in the checklist.
- Viewer
 - Views the content of the checklist.

DESCRIPTION OF THE FEATURES

In the application presented here, the compliance requirements that must be met are proposed to users with a graphical interface in the form of a “check list”; each requirement indicated in the standard becomes an item to be analyzed and confirmed in the proposed checklist.

This modality allows to verify the completion of all the activities

necessary to implement the conformity verification process and to have a standardized survey of the evidence that must be produced.

All the contents that are necessary to ensure compliance with the requirements of the standard, such as for example documents, videos, links to procedures and documents of third parties, are loaded into the system with tracking of the user and of the date of insertion and / or subsequent revisions.

The revision carried out on the documents is signaled by sending notifications to predefined distribution lists; it will also be possible to indicate which documents, present in the system, require third parties to fulfil obligations and are therefore subject to the sending of an alert to predefined distribution lists.

The data will be backed up at intervals to be defined.

APPLICATION'S DESCRIPTION

INITIAL PAGE

The entry of login credentials is required on the initial page of the application:

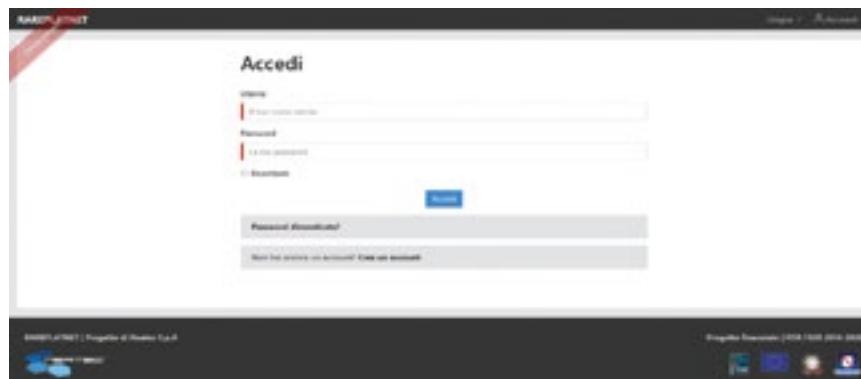


Fig. 1 – Login

The application features are made accessible to users based on their access profile:



Fig. 2 – Initial Menu

CHECK LIST

By accessing the Check List function, a summary table of the check lists present in the system and relating to the periodic accreditations obtained will be displayed:

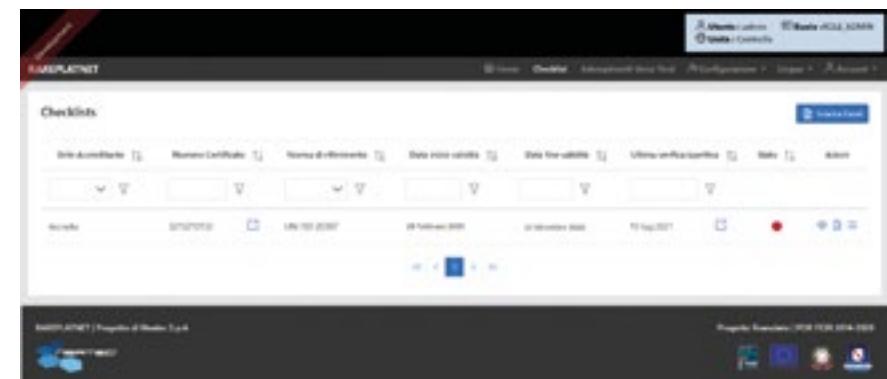


Fig. 3 – Checklist list

The horizontal menu on the right side of the page allows timely access to the application features:

- Check List
- Third party obligations
- Configuration



Fig. 4 – Horizontal Menu

By clicking on the column headers, you can change the order proposed for the displayed data:

Checklists							
Ente Accreditatore	Numeri certificati	Numeri di riferimento	Data riconosciuta	Data fine validità	Ultimo verifica specifica	Info	Azioni
Ente Accreditatore	Numeri certificati	Numeri di riferimento	Data riconosciuta	Data fine validità	Ultimo verifica specifica	Info	Azioni

Fig. 5 – sorting

The search result can be filtered for one or more fields in the list:

Checklists							
Ente Accreditatore	Numeri certificati	Numeri di riferimento	Data riconosciuta	Data fine validità	Ultimo verifica specifica	Info	Azioni
Ente Accreditatore	Numeri certificati	Numeri di riferimento	Data riconosciuta	Data fine validità	Ultimo verifica specifica	Info	Azioni

Fig. 6 – filters

The button  allows you to export the contents of the list to an Excel sheet:

Checklists							
Ente Accreditatore	Numeri certificati	Numeri di riferimento	Data riconosciuta	Data fine validità	Ultimo verifica specifica	Info	Azioni
Ente Accreditatore	Numeri certificati	Numeri di riferimento	Data riconosciuta	Data fine validità	Ultimo verifica specifica	Info	Azioni

Fig. 7 – export in Excel

The icons shown in the “Actions” column indicate the possible operation on the documents proposed in the list:



Fig. 8 – actions

Icon  allows you to access the details view page;

Icon  allows you to download data in PDF format;

Icon  produces a general summary of all the documents present in the system associated with the check list, with evidence of the date of the last revision;

The progress in compiling the checklists is represented by a dot:

- **Red** to indicate that the CL must be completed;
- **Yellow** to indicate that the CL is being compiled/compiled but must be validated;
- **Green** to indicate that the CL is valid and all checks/items have been reviewed.

CHECK LIST SECTIONS DETAIL

By clicking on the icon  in the “Actions” column of the check list, the detail page will be shown with the checks to be carried out.

The standard has logically grouped the requirements to be met in:

- General requirements
- Structural requirements
- Resource requirements
- Process requirements
- Quality management system requirements

each logical grouping indicated above will be proposed in a dedicated form, with evidence of the completion of the contents of the form:

This screenshot shows a detailed view of a checklist named "Checklist 1". It includes sections for "Riassunto" (Summary), "Checklist 1" (with details like Ente Accreditatore, Accreditata, Numero di riferimento, Data riconosciuta, Data fine validità, Ultimo verifica specifica, and Data riconosciuta), "Stato Compilazione" (Status Compilation) with five categories (Requisiti Generali, Requisiti Strutturali, Requisiti relativi alle risorse, Requisiti del processo, Requisiti del sistema di gestione per la qualità), and a large table titled "Tabella dei Requisiti" (Requirements Table) listing requirements from 1 to 5 across these categories. Icons at the bottom right indicate the status of each requirement: green for completed, yellow for in progress, and red for pending.

Fig. 9 – compilation status

The page will display a section, always visible, which highlights the completion status of the checks, and further sections containing the requirements established by the standard, divided by type.

By clicking on each single section, this is opened to show the specific data of the selected requirement:

Fig. 10 – sections

The open section for the specific type of requirement offers the user the list of requirements to be met, with evidence of the date and time of the upload:

Fig. 11 – section detail

The progress in compiling the individual requirements is represented by a dot:

- **Red** to indicate that the compilation of the requirement is incomplete;
- **Yellow** to indicate that the requirement has been filled in but must be validated;
- **Green** to indicate that the requirement has been validated.

PROCEDURES

Procedures can consist of documents, videos, references to procedure or system links, notes.

By clicking on the icon in the "Procedures" column of the single requirement, a page is presented for the procedures associated with the requirement being processed:

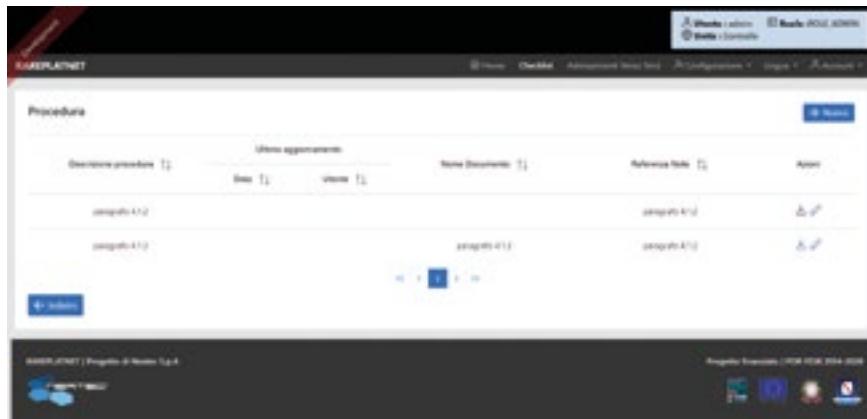


Fig. 12 – procedures

By clicking the button  it is possible to enter the data of a new procedure:

- description of the procedure
 - possible address to external procedures or documents
 - Note

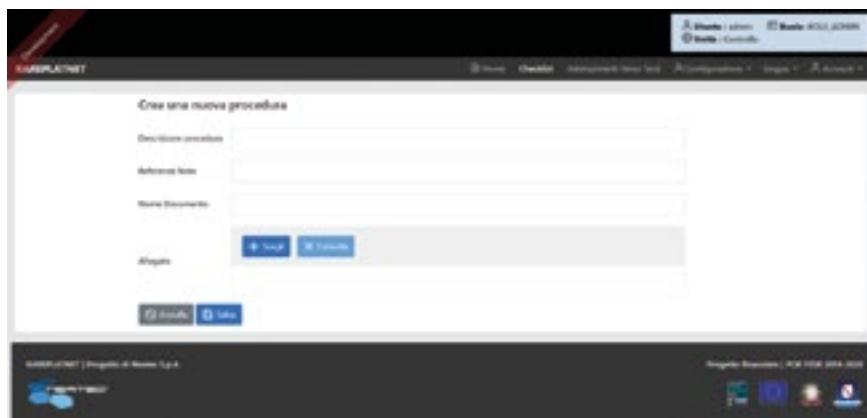


Fig. 13 – Procedure insertion

Selecting the button  opens a window for loading various types of documents; the user selects the file to upload from their file system:

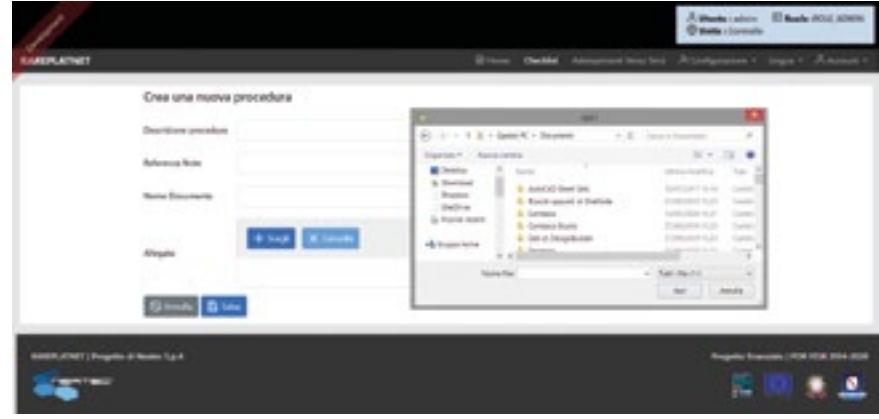


Fig. 14 – procedure choose file

And then confirm the upload or cancel the operation:

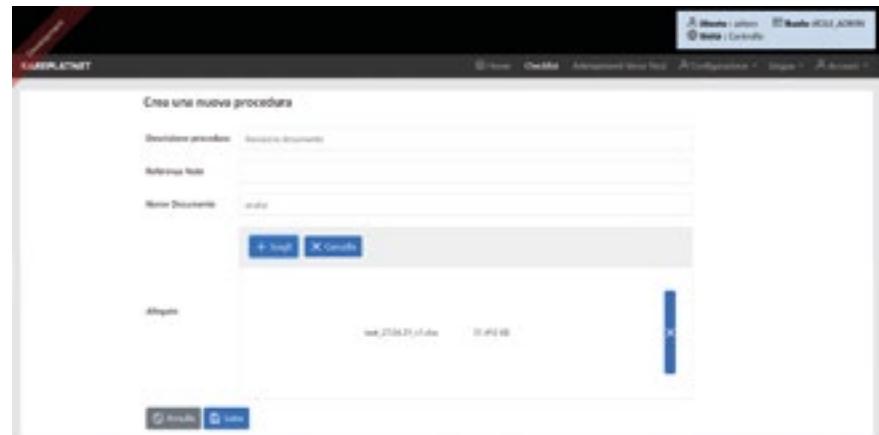


Fig. 15 – procedure upload file

Once the operation is confirmed, the new evidence is added to the list and associated with the requirement being processed:

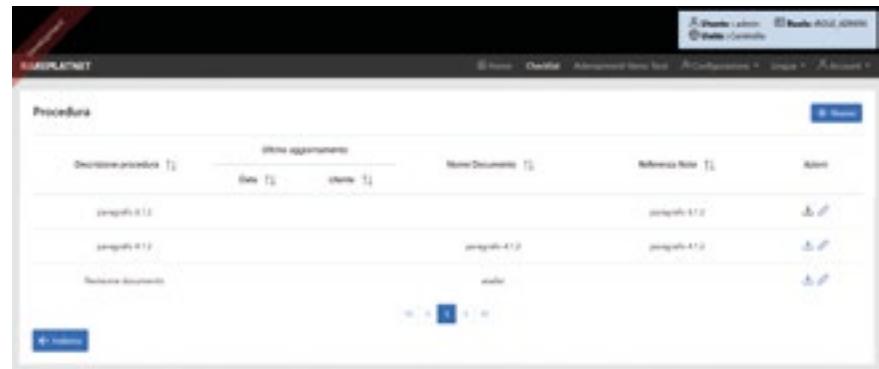


Fig. 16 – procedure

The icon  allows you to access the details of the individual lines to update their contents; it is possible to update the version of an attached document, if the file names match.

Updates made are notified to predefined distribution lists.

DOCUMENTED RECORDS

Documented records can consist of third-party documents, videos, references to links of procedures or systems, notes.

By clicking on the icon  in the “Documented records” column of the single requirement, a window is presented for managing the evidence to be produced for the fulfilment of the requirement.

The association process is carried out in the same way as already described for the previous paragraph, relating to the Procedures.

Distribution lists

Distribution lists are the list of system users to whom a notification must be sent automatically in case the data of a specific requirement is updated.

By clicking on the icon  in the “Distribution lists” column of the individual requirement, the system diversifies the proposed page based on the access profile:

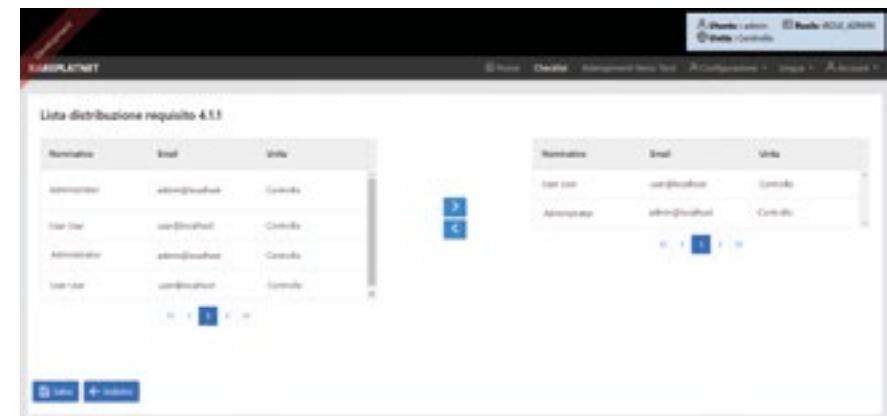
for the operator access profile, a new page opens showing the list of recipients of the notification:



Ricevitore	Email	Role
Carlo Rossi	carlo@outlook.com	Carlo
Marcos Rossi	marcos@gmail.com	Carlo

Fig. 17 – distribution list displays

for the administrator access profile, a new page opens that allows you to create and update a distribution list:



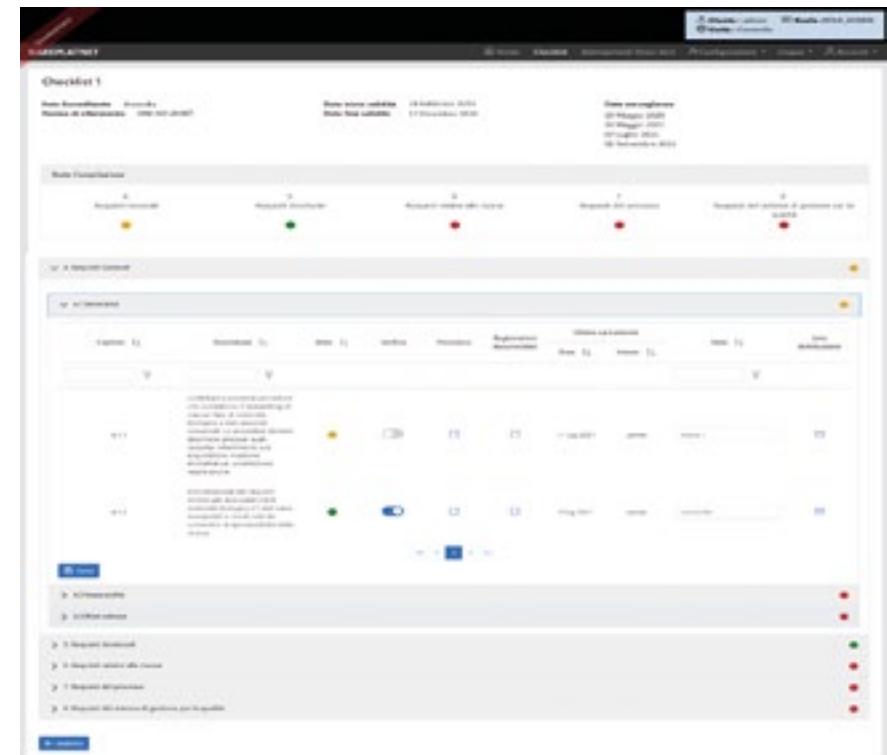
Ricevitore	Email	Role
Carlo Rossi	carlo@outlook.com	Carlo
User User	user@outlook.com	Carlo
Administrator	admin@outlook.com	Carlo
User User	user@outlook.com	Carlo

Fig. 18 –updated distribution list

VALIDATION

The contents entered for the individual requirements by the operators must be verified and confirmed by a function in charge to which the validator user profile has been assigned.

By accessing the checklist detail, the additional “Verification” column is displayed on the validator profile:



Nome Verificatore	Nome di riferimento	Nome di controllo	Nome utente verificatore	Nome utente controllo	Nome utente aggiornamento
Marco Rossi	Marco Rossi	Marco Rossi	Marco Rossi	Marco Rossi	Marco Rossi

Fig. 21 – validation

The validator examines the contents entered for the requirements updated by the operators and identified by the yellow dot in the “Status” column and validates them; the requirement passes into a validated state and the dot in the “State” column turns green.

CERTIFICATE DETAIL

By clicking on the icon  in the “Certificate” column of the single requirement, if selectable, the system displays a page with the identification data of the certificate:



Fig. 19 – certified details

AUDITS

The accredited institution is periodically subject to surveillance visits; by clicking on the icon  in the “Audits” column of the individual requirement, a window opens with the list of inspections received and the possibility of inserting new ones:

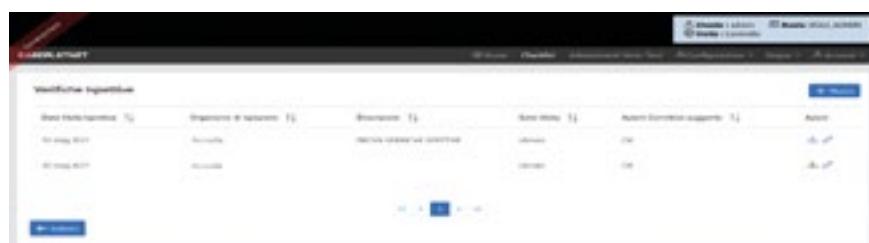


Fig. 20 – audits list

By selecting the icon  on the relevant line, it will be possible to manage the data relating to the selected check.

THIRD PARTY OBLIGATIONS

Some documents uploaded to the system may be subject to third party compliance.

For these documents, an alert must be sent to predefined distribution lists so that they can carry out the necessary actions at the deadline.

By accessing the Fulfilments towards third parties’ function, a summary table of all the documents present in the system will be displayed:

Fig. 22 – obligations towards third parties

The user selects the document subject to compliance from the list on the left and indicates:

- description of fulfilment, i.e. the type of activity to be carried out for the document;
- fulfilment date, the date on which the alert must be notified
- frequency of sending the alert, in the event that it is a recursive activity;
- the subjects to be notified of the deadline for compliance, by creating a dedicated distribution list.

If the document subject to fulfilment is updated in the system, this operation is notified not only to the distribution list identified for the reference requirement, but also to the distribution list identified for third party obligations.

In conclusion, the prototype presented here represents one of the innovative products created within the RARE.PLAT.NET project of great help in managing the accreditation of research biobanks.

Alessandro Rullo¹, Elena Rubinacci¹, Patrizia Ferroni^{2,3}, Fiorella Guadagni^{2,3}

¹ - Neatec SpA, Via Campi Flegrei, 34, 80078 Pozzuoli, Napoli

² - Multidisciplinary Interinstitutional Biobank BioBIM, IRCCS San Raffaele Roma, Via di Val Cannuta, 247

³ - Department of Human Sciences and Promotion of the Quality of Life, Telematic University San Raffaele Roma, Via di Val Cannuta 247, Roma e Corso Umberto, 209, 95024 Acireale CT

An innovative multiple network-based bioinformatics pipeline for the study of oncological diseases

ABSTRACT

The era of “Targeted therapy” has arrived. Considering the intrinsic complexity of biological systems and our limited knowledge on the growth and proliferation of cancer cells, the development of targeted therapies requires a much deeper understanding of the system to identify new drug targets and to understand how molecule modifications and the transduction of biological signal flow drive disease. The aim of the work is to define an innovative bioinformatics pipeline: “multiple networks analysis” (Dotolo S. et al., 2021), focused on the study of biological networks, as a promising strategy for the silencing of specific mediators responsible of network alterations, trying to improve not only the cancer diagnostics, but also patient treatment, offering a broader context of available therapies that could be adopted for each specific case, especially if there are more mutations involved in the disease.

INTRODUCTION

The main purpose of personalized medicine is to identify new (gene-protein) targets involved in the tumor, which can be used for the prediction and achievement of new drug molecules, as tumors are not caused by the genetic alterations of a single target, but derive from complex interactions present between multiple molecular targets. Targeted Therapy is designed to interfere with specific molecular target involved in tumor development, growth and progression (Yan L. et al, 2011). This allowed to investigate the mechanisms involved in a healthy control subject and in a sick person in more detail, to evaluate the complex interactions and integrate this information with those obtained from the disease and from clinical analysis as well as from “omic” ones. By generating models based on “biological-molecular networks” (Barabási AL et al, 2011), it is possible to explore these networks, to reveal mechanisms that have not yet been elucidated but important in the understanding of tumor pathogenesis (Tong H. et al, 2018).

In order to develop the best strategies for therapeutic treatment, it is important to determine which factors play a key role in the network alteration. Network-based therapies for the treatment of human cancers could have promising biological-clinical applications, as the network analysis and the identification of new hubs could help researchers and physicians to find new drug targets for use as diagnostic markers to identify the early stages of the disease (Oates CJ and Mukherjee S. 2012). Further, it could help the physician to screen a patient and identify the most suitable therapy for the individual patient (Li P., Fu Y. and Wang Y.

2015). The information obtained from these models is extremely useful to identify new treatments for very rare tumors, such as Neuroendocrine Tumors (NETs) (Lamberts S.W. et al, 2001). These last are rare tumors that involve particular molecular mechanisms that are not yet fully understood, and there are no suitable drugs for the patient treatment. (Basuroy R. et al, 2016). In these cases, the development of new strategies based on a different interpretation of biological networks can help to improve the personalized medicine approach.

METHOD AND RESULTS

We have developed a bioinformatics pipeline defined “multiple networks analysis” which was applied to the mutational data of a cohort of patients with colorectal cancer, further details are recorded in the article by Dotolo S. et al., 2021, published in *Briefings in Bioinformatics*. This procedure is then applied to the study of NETs. The developed pipeline is characterized by a series of steps (Fig. 1) that allow to understand not only the changes of molecular tumor profiling in the presence of one or more mutations, but also how drug therapy changes for the individual patient. All steps have been realized and analyzed using the Cytoscape v3.7 Core platform (and its plugins) (Bauer-Mehren A. 2013).



Figure 1 Multilayer network-based workflow

The study is conducted on three types of NETs (Glioblastoma Multiforme “GBM”, Medullary Thyroid Carcinoma “CMT” and Gastro-entero-pancreatic tumor “GEP-NET”) and the mutational data are extrapolated from public databases. Here, only the results of the GEP-NETs are reported. Furthermore, only pathogenic mutations with clinical significance are analyzed. The comparative study of combined and single mutations is very important, since it is possible to analyze the joint effect derived from the presence of two (or more) mutations; further allowing to identify other molecular mechanisms and find new potential pharmacological therapies, capable of blocking or reducing the tumor growth. The disease-disease network (Fig. 1a) has been elaborated to obtain map that allows to identify which diseases are directly or indirectly correlated, outlining tumor development and progression and also predicting possible secondary symptoms that a patient may develop over time (Jianhua L. et al, 2016) (Fig. 2).

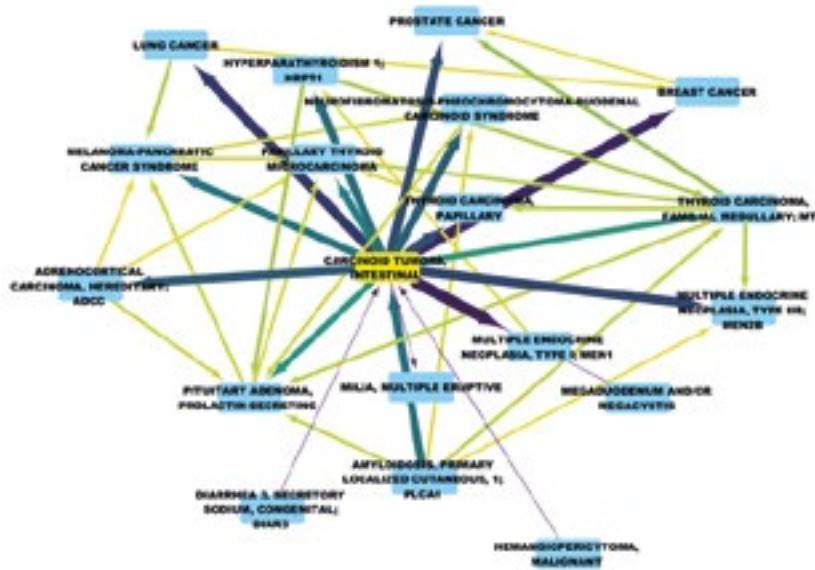


Figure 2 Disease-disease network

The results have demonstrated that there are several inflammatory and precancerous intestinal diseases linked to this pathology. This information is useful both for the identification of priority genes (Fig. 1b) and pathogenic variants mainly involved in GEP-NETs (Fig. 1c). This has allowed to achieve the subsequent interaction networks between genes and proteins, shown in Fig. 1d-e. It has been possible to investigate how their molecular profiles are different in the presence of a double mutation, due to an indirect involvement of some molecular mechanisms not present in a single mutation (Table 1).

SINGLE AND DOUBLE MUTATION	TOP RANKED LEADING AND PRIORITY GENES	EDGEBETWEENNESS	MOLECULAR MECHANISMS
EGFR all mutations	EGFR	2.65	Signaling ERBBs, Signaling EGFR/GRB2, cell growth, cell differentiation, motility, invasion and angiogenesis pathways, development biology pathways
	MAP2K7	4.97	
	HRAS	4.28	
	PDGFRB	5.63	
	PIK3CA	3.46	
	AKT1	3.52	
	ERBB2	3.41	
	IGF1R	3.86	
	ERBB4	4.30	
	KRAS	3.20	
RET all mutations	ERBB3	3.74	
	RET	9.23	Signaling to ERKs/MAPKs, FGFR1/2/3 signaling, cellular growth, cell proliferation and motility, cell survival
	HRAS	7.07	
	EGFR	9.36	
	NF1	13.76	
	MEN1	10.46	
	NTRK1	4.79	
	KDR	8.40	
RET-EGFR	CHGA	18.30	Survival signaling pathway, cell growth, invasion and angiogenesis pathways, development biology pathways
	CUX1	11.33	
	RET	3.19	
	EGFR	2.57	
	PIK3CA	2.62	
	ALK	3.27	
	GNA11	2.33	
	KRAS	2.93	

Table 1. Top ranked of priority genes and guide genes with their molecular mechanisms and the calculation of the EdgeBetweenness parameter (indicative of the strength and level of biological significance of the interactions present within the network)

In this way, the molecular mechanisms mainly involved in NET are extrapolated allowing to identify the main therapies used. The innovative result reveals that the network generated starting from the double mutation involves genes and molecular mechanisms that are different from those implicated in the single mutations. This means also that the therapies adopted for each patient can be different, through the creation of the multilayer drugs network, as shown in Fig. 1f. This is obtained by combining the results of the previous phases (Boccaletti S. et al, 2014). As a result, we obtain a series of pharmacological treatments already approved or still in clinical trial phase personalized for the single

patient, trying to lower as much as possible the side effects, adverse effects and contraindications of single and combined therapies for individual patient. In more detail, the suggested treatments approved by the FDA are Cabozantinib and Motesanib (only suggested in the single mutations of the RET gene) and Vandetanib (which are indicated in both single mutations), while Selpercatinib and Pralsertinib (which we find only in single mutations of the RET gene) are still in Phase III of the clinical trial.

CONCLUSIONS

In conclusion, it is possible to analyze single/double/multiple mutations with our pipeline, with the aim of evaluating the joint effects derived from the presence of one or more mutations in a single patient. This has allowed us to outline a more complex and complete model of tumor development and progression, which takes into account the clonal evolution of the tumor, in order to identify suitable pharmacological treatments for different stages of disease. It has been observed that in the presence of different mutations in patients with the same disease, both similar and also very dissimilar networks are possible, while in patients with the same disease and mutation, identical networks and molecular behavior are found. This helps us to group patients in order to evaluate who can receive a certain therapy and who cannot in function of specific characteristics, in the latter case patients must be subjected to other conventional therapies. The pipeline can be used in both directions (from gene to therapy and vice versa), according to initial data and the goal setting. In addition, it can be applied to different types of disease, making any necessary adjustments based on the available data. The results obtained from these analyses have to be always confirmed and validated at the pre-clinical and clinical level.

*Serena Dotolo^{1,3}, Anna Marabotti², Angelo Facchiano³
e Roberto Tagliaferri^{1,*}*

*1 - NeuRone Lab, Dept. of Management & Innovation Systems (DISA-MIS),
University of Salerno, Italy*

2 - Dept. of Chemistry and Biology "A. Zambelli" (DCB), University of Salerno, Italy

3 - Institute of Food Science, Italian National Research Council (ISA-CNR), Avellino (Italy)

Acknowledgements

This work was supported by ELIXIR IT research infrastructure project, by the project "RARE. PLAT.NET", CUP B63D18000380007 and SURF 17061BP000000012. The authors would like to thank the R&D Department of Kelyon S.r.l. and its Director, Stefano Tagliaferri.

References

- Barabási A.L., Gulbahce N., et al. Network medicine: a network-based approach to human disease. *Nat Rev Genet.* 2011;12(1):56-68.
- Basuroy R, Srirajaskanthan R, Ramage JK. Neuroendocrine Tumors. *Gastroenterol Clin North Am.* 2016 Sep;45(3):487-507.
- Bauer-Mehren A. Integration of genomic information with biological networks using Cytoscape. *Methods Mol Biol.* 2013;1021:37-61.
- Boccaletti S., Bianconi G., et al. The structure and dynamics of multilayer networks. *Physics Report* 544, (1) (2014), 1-122.
- Dotolo S, Marabotti A, Rachiglio AM, Esposito Abate R, Benedetto M, Ciardiello F, De Luca A, Normanno N, Facchiano A, Tagliaferri R. A multiple network-based bioinformatics pipeline for the study of molecular mechanisms in oncological diseases for personalized medicine. *Brief Bioinform.* 2021 May 28:bbab180.
- Jianhua L., Xiaoyan L., et al. A Comprehensive Evaluation of Disease Pheno-type Networks for Gene Prioritization. *PLoS One.* 2016; 11(7): e0159457.
- Lamberts SW, Hofland LJ, Nobels FR. Neuroendocrine tumor markers. *Front Neuroendocrinol.* 2001 Oct;22(4):309-39.
- Li P., Fu Y. and Wang Y. Network based approach to drug discovery: a mini review. *Mini Rev Med Chem.* 2015;15(8):687-95
- Oates C.J. and Mukherjee S. Network Inference and Biological Dynamics. *The Annals of Applied Statistics* 2012, Vol. 6, No. 3, 1209–1235
- Tong H., Qian W., et al. Analyzing of Molecular Networks for Human Diseases and Drug Discovery. *Curr Top Med Chem.* 2018; 18(12): 1007–1014.
- Yan, L., Rosen, N., & Arteaga, C. (2011). Targeted cancer therapies. *Chinese journal of cancer*, 30(1), 1–4. <https://doi.org/10.5732/cjc.010.10553>

A procedure for the extraction of the gene-gene mutation network core for gene mutation networks

ABSTRACT

The study of the comparison between graphs plays a role of fundamental importance for many scientific sectors and in different application fields. In fact, according to the specific context, various similarity/dissimilarity measures have been defined able to quantify the comparison between graphs and compare their structural properties.

This study proposes a methodology capable of defining and extracting a subgraph formed by the set of the most common relationships between the nodes belonging to a set of networks (network core).

As part of the RARE.PLAT.NET project, the study focused on the application of this methodology to the gene-gene mutation networks of neuroendocrine tumors. In these networks, which can be represented by a directed graph, the nodes represent the genes and the direction of the link between pairs of genes depends on the signalling pathways and the molecular mechanisms that are activated.

For each oncological pathology analysed, the methodology made it possible to extract the core network, formed by the bonds most represented in all gene networks, defined as gene-gene mutation network core, which made it possible to identify specific gene sequences typical of the pathology under analysis.

INTRODUCTION

The comparison between graphs is one of the most important and most faced problems in the study of complex systems that can be represented in the form of a network. This topic has been extensively addressed in the literature and in different disciplinary fields - from biology, to engineering, to data analysis - paying particular attention, on the one hand, to measures capable of quantifying the divergence between pairs of graphs, thanks to the definition of similarity/dissimilarity measures and, on the other hand, the matching algorithms between graphs aimed at identifying and extracting common subgraphs (Koutra et al., 2011). The present study focused on comparing graphs in the different applications that can be identified in the biological field. In this context, the comparison between graphs is of significant interest for the researcher in order to highlight the presence of common structures between different biological networks. The structure of a biological network is given, in general, by the representation of a set of nodes, that is the biological components (such as, for example, genes, proteins, molecules, diseases, drugs) and a set of links that highlight their relationships. In particular, the gene networks are represented here by means of a directed graph, in

which the nodes of the graph represent the genes and the link is defined starting from the regulatory action between different genes.

In line with the objectives of the RARE.PLAT.NET1 project for the study of rare Neuroendocrine tumors (NETs), this contribution presents a defined analysis strategy for matching between graphs and its application to the set of gene networks obtained for pathologies being analysed. Specifically, these are different networks defined starting from the mutation of a single gene and whose structure differs due to the presence of a different number of genes and bonds that are presumed to be, at least in part, induced by the disease.

In general, cancer genomes possess many mutations, including somatic mutations and copy number variations (CNVs). Among these, some mutations that contribute to the progression of cancer from normal to malignant are called driver mutations, and those that accumulate in cells but do not contribute to cancer development are called passenger (Greenman et al., 2007; Stratton, Campbell and Futre, 2009). Therefore, distinguishing functional driver mutations, drivers or core modules from random passengers is believed to be a crucial step in understanding the molecular mechanisms of carcinogenesis, which can further aid in the effective diagnosis, treatment, and prognosis of cancer patients.

Generally, the goal is to detect the individual driver genes that cause tumors. A standard approach for this purpose is to identify recurrent mutations in a large cohort of cancer patients. However, it is recognized that the wide mutational heterogeneity of cancer genomes (Jones et al., 2008) makes this type of method sometimes ineffective because patients of even the same tumor type can have different driver mutations.

From the empirical point of view, this problem mainly translates into the identification of subgraphs that are contained, in whole or in part, in another graph. The procedure presented below for the networks of genes mutated starting from a specific tumor pathology allows to identify the set of the most common relationships in these networks. This set of relationships is referred to here as gene-gene mutation network core. It is formed by the most represented subgraph (in terms of frequency of appearance) in all gene mutation networks. Since these links are specific to mutations, it is assumed that their presence characterizes the pathology in question.

PROCEDURE FOR THE EXTRACTION OF THE NETWORK CORE

The proposed procedure was implemented in the R environment (R Core Team, 2021), using the igraph package (Csardi and Nepusz, 2006).

The qualitative scheme of the procedure is illustrated below.

Let $\{\mathcal{N}_1, \mathcal{N}_2, \dots, \mathcal{N}_m\}$ be a set of m networks under analysis. Each network \mathcal{N}_i is defined by the directed graph $\mathcal{G}_i(\mathcal{V}_i, \mathcal{E}_i)$; $i = 1, \dots, m$; $\mathcal{G}_i(\mathcal{V}_i, \mathcal{E}_i)$; $i = 1, \dots, m$; where \mathcal{V}_i is the set of vertices and \mathcal{E}_i is the set of bonds (arcs) for each graph.

For each pair of networks $\mathcal{N}_i, \mathcal{N}_j$; $i \neq j$; $\{i, j\} = 1, \dots, m$; $\mathcal{N}_i, \mathcal{N}_j$; $i \neq j$; $\{i, j\} = 1, \dots, m$; we recall:

The union of \mathcal{G}_i and \mathcal{G}_j , like the graph formed by the vertices belonging to either \mathcal{G}_i or \mathcal{G}_j and by the edges incident to them:

$$G_i \cup G_j = (V_i \cup V_j, E_i \cup E_j) \quad G_i \cap G_j = (V_i \cap V_j, E_i \cap E_j).$$

The intersection of $\underline{G_i}$ and $\underline{G_j}$, like the graph formed by the vertices belonging to both $\underline{G_i}$ and $\underline{G_j}$ and by the edges incident to them: $\underline{G_i} \cap \underline{G_j} = (V_i \cap V_j, E_i \cap E_j)$.

The steps of the procedure are presented:

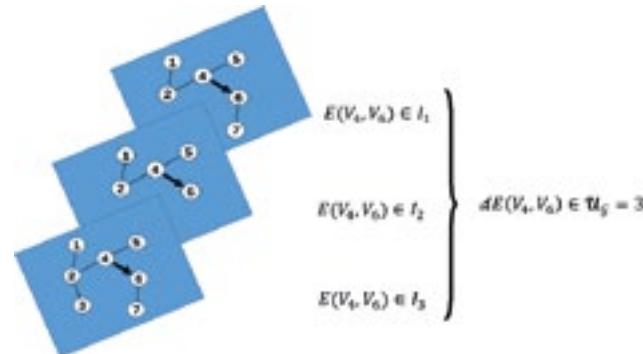
Generation of $K = \frac{m(m-1)}{2}$ graphs I_k obtained as intersection between all pairs of graphs G_i e G_j .

Graph's generation $U_g = \bigcup_{k=1}^K I_k$ $U_g = \bigcup_{k=1}^K I_k$ obtained as union of K graphs intersection I_k

Calculation of the weight of each bond (arc): for the graph $\underline{U_g}$ the "depth" d (depth) of each bond is calculated, obtained as the number of occurrences of the bond in the K intersections, for each pair of vertices present in the union graph. Hence, the depth is the number of times the same pair of nodes have a link in the K intersecting networks. Figure 1 shows a simple example of calculating depth.

The weighted direction graph defines the core network $u_g(V, E, d)$; such that the depth $d: E \subset (V \times V) \rightarrow \mathbb{N}$ $d: E \subset (V \times V) \rightarrow \mathbb{N}$.

Figure 1 - Example of calculation of the depth d for the relationship between two vertices (4 and 6) in three hypothetical intersection networks.



Application of the network core extraction procedure to neuroendocrine tumor gene networks

This procedure was specified, as part of the RARE.PLAT.NET project, for networks defined starting from genetic mutation data at single gene level. For the NETs under analysis, the networks, defined starting from the mutation of a single gene, were extracted in the Cytoscape environment (Shannon et al., 2003).

For tumor pathologies, the proposed analysis procedure results in the identification of the u_g graph, obtained from the union of all the intersection networks between pairs of single-mutation gene networks. Specifically, the u_g graph represents the gene-gene mutation network core, as it groups the genes common to all the mutation networks considered.

Overall, three datasets were considered defined by the extraction of 12 single-mutation networks for tumors of the gastro-entero-pancreatic tract - GEP; of 19 networks for glioblastoma - GBM; of 22 Medullary Thyroid Cancer Networks - CMT.

The application of the procedure to the data available for single-mutation networks present in the dataset created for the GEP is presented below. Table 1 shows a summary of the 12 mutated networks (N_{GEP}) (N_{GEP}), in terms of the number of nodes, the number of bonds observed for each network, and the density value. Density measures the degree of global connectivity of a network. It is defined as the ratio between the number of bonds observed in a graph and the maximum possible number of bonds which, for oriented graphs, is equal to $v(v-1)v(v-1)$. The density value assumes values between 0, in the case of an empty graph, and 1, in the case of a complete graph. Note that these values reproduce medium-high densities (between 16.3% and 42.4%) for biological networks (Pavlopoulos et al., 2011).

GEP-NET_GENE-GENE MUTATED NET...	NUMBER OF NODES	NUMBER OF BONDS	DENSITY
BRAF	19	145	0.424
CDKN2A	20	138	0.363
EGFR	25	190	0.317
FGFR1	15	57	0.271
H3F3A	10	37	0.411
HRAS	16	84	0.350
MEN1	18	50	0.163
NKX2	19	93	0.272
NOTCH1	20	143	0.376
PIK3CA	20	148	0.389
RET	25	123	0.205
TP53	18	103	0.337

Table 1 Summary of the set of mutated gene networks observed for the GEP.

Starting from the intersection between all the pairs of the 12 networks that make up the N_{GEP} set, we arrive at the generation of the gene-gene mutation network core for the GEP - u_{GEP} u_{GEP} which is composed of 34 genes connected by 171 bonds weighed by the depth index d , and a density of 0.152. Figure 2 shows the directed and weighted graph u_{GEP} u_{GEP} , where the size of the nodes is a function of the total number of bonds (degree), while the thickness of the bonds depends on the calculated value of the depth de , therefore, on the number of occurrences of the bonds between the pairs of genes. From the analysis of the GEP network

set out here, the 34 genes typical of the mutations present in the core are: MITF, NRAS, CDKN2A, NF1, HRAS, CCND1, PTEN, TP53, MC1R, PIK3CA, EGFR, MAP2K7, AKT1, GNAQ, CDK4, CDKN2C, MDM2, RET, SYP, KRAS, KIT, KRT5, ERBB4, KMT2D, ATRX, GNA11, SDHB, CHGA, MEN1, TMEM127, SDHD, DAXX, CALCA, SMAD4.

The bonds that connect these genes occur with a different intensity in the union graph, as evidenced by the calculation of the depth index. The most common ones concern a subgroup of genes and, specifically: RET, PIK3CA, TP53, PTEN, HRAS, NF1, NRAS, CDKN2A. These genes also have the highest values of the centrality indices with respect to the degree (number of total bonds - degree, number of inbound bonds - indegree and number of outbound bonds - outdegree) reported in Table 2.

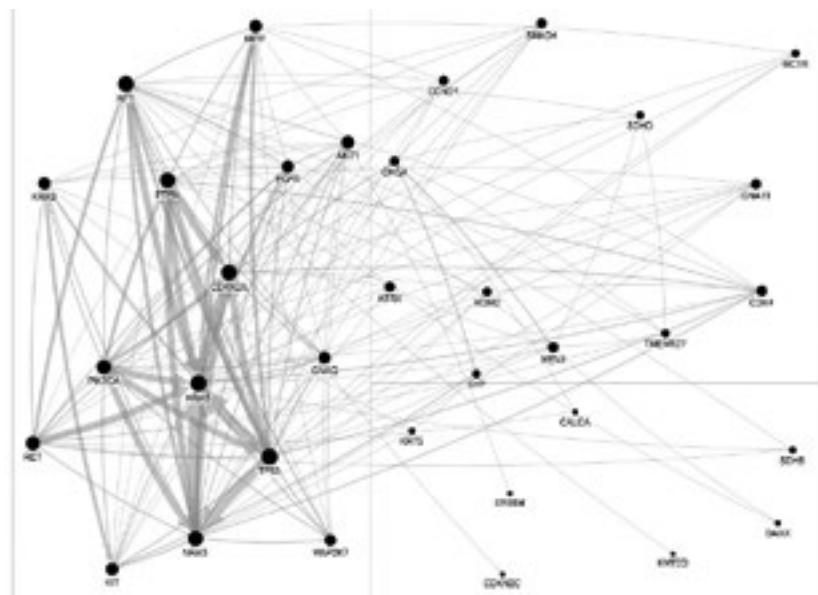


Figure 2 Union graph of the intersections between pairs of single mutation networks (GEP). The size of the nodes depends on the degree, the thickness of the links is proportional to the depth.

	DEGREE	INDEGREE	OUTDEGREE
HRAS	23	20	3
TP53	22	7	15
NF1	21	12	9
CDKN2A	21	19	2
NRAS	20	14	6
PTEN	20	15	5
PIK3CA	17	3	14
RET	17	10	7

Table 2 - Degree measures for the gene-gene mutation network core

CONCLUSIONS

The procedure shown in this contribution aims to define a subgraph formed by the nodes having the most recurrent bonds in a set of networks.

From the results of the procedure applied to the single mutation network set of gastro-entero-pancreatic tumors - GEP, the gene-gene mutation network core was generated, i.e. the subgraph that is presumed to present specific links of the mutations and, therefore, the presence of these genes could characterize the pathology under analysis.

Giuseppe Giordano¹, Ilaria Primerano¹, Pierluigi Ritrovato²

¹ - Department of Political and Social Studies, University of Salerno

² - Department of Information and Electrical Engineering and Applied Mathematics, University of Salerno

Bibliography

- Csardi G. and Nepusz T. (2006). The igraph software package for complex network research. *InterJournal Complex Systems*, 1695.
- Greenman C., Stephens P., Smith, R. et al. (2007). Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*, 446, 153–158.
- Jones S. et al. (2008). Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science*, 321, 1801–1806.
- Koutra, D., Parikh, A., Ramdas, A., and Xiang, J. (2011). Algorithms for graph similarity and subgraph matching. In *Proc. Ecol. Inference Conf (Vol. 17)*.
- Pavlopoulos G.A., Secrier M., Moschopoulos C.N. et al. (2011). Using graph theory to analyze biological networks. *BioData Mining*, 4, 10.
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Shannon P., Markiel A., Ozier O., Baliga N.S., Wang J.T., Ramage D., Amin N., Schwikowski B., and Ideker T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*, 13(11), 2498-2504.
- Stratton M.R., Campbell P.J., Futreal P.A. (2009). The cancer genome. *Nature*, 458: 719-724.

Innovation tools in Neuroendocrine Tumors (NETs) and Rare Cancers

ABSTRACT

Neuroendocrine tumors (NETs) affect a large number of organs: from the lung to the bronchus, from the intestine to the rectum, from the pancreas to the adrenal glands.

These are rare neoplasms, with a low incidence, but with a high prevalence because patients live with the disease for many years. NETs represent less than 0.5 percent of all malignant tumors and in Italy there are 4-5 new cases per 100,000 inhabitants.

In this context, in recent years, there has been a slow but incremental increase in the incidence of brain tumors, such as glioblastoma, especially in the over 65s with about 4 cases per 100,000 inhabitants in our country.

Today there is no prevention strategy, and basic research, advanced diagnostics and innovative therapies remain the only ways, still not fully explored, to try to block the beginning and progression of the disease.

Innovation is the keystone of translational research, a combination capable of leading to more accurate early diagnoses and more effective treatments: advanced diagnostics supported by genetic characterization directs precision medicine and the development of new drugs.

The excellence of scientific research, the network that integrates skills and knowledge, the patent that guarantees the protection of innovations, the designation of "innovative drug", the funds allocated for this class of drugs with high ethical value and the AIFA 5 national fund %, represent a good toolbox to support innovation.

The Rare PlatNet project is outlined as a best practice of great interest due to its scientific and popularization relevance through the creation of a technological platform, an ecosystem that brings together multidisciplinary knowledge and innovative tools in the fight against rare oncological pathologies.

THE IMPORTANCE OF COLLABORATIVE NETWORKS IN SCIENTIFIC RESEARCH

Scientific research allows a country to be competitive in the global knowledge "market", to keep pace with the most advanced countries and to guarantee the well-being of the population. Technology transfer and the exploitation of applied research results play a decisive role in the modern dynamics of the development of economic and social systems.

Doing research, especially in the scientific field, requires a synergy of integrated skills, which allow the generation of new knowledge and technologies capable of feeding an innovation ecosystem.

Skills are the ability of individuals to collaborate and combine, in an effective and responsible way, the different elements of knowledge and skills they possess, with the aim of achieving a common goal. From the

reciprocity of the exchange the threads of the net are consolidated, the value of which often changes the fate of science, offering innovative and "out of the box" solutions.

Innovation and progress do not arise exclusively from the work of individual brilliant minds, but can be the result of an "import-export" activity of knowledge, virtuous and creative interactions based on dialogue and the iteration between different forms of knowledge.

The advantages of cooperation are many: broadening the scope and perspectives of scientific research, sharing resources, optimizing processes by breaking down organizational and regulatory barriers, controlling the effects of research bias, shortening time to market, disseminating knowledge.

This latter process is further benefited by the development of the internet and ICT technologies that have allowed free access to scientific content, experimental data and new diagnostic methods.

The availability of data improves the quality of research by moving the frontier of knowledge and supports technology transfer and innovation which are fundamental elements for the development of innovative solutions to support the well-being of the community.

Dialogue and interaction within the scientific community plays a key role thanks to the comparison of new points of view and research perspectives enriched by a variety of disciplinary approaches.

The social benefits associated with the development of projects based on "Platforms and Infrastructures" are very significant and directly affect the public health supply chain, through the introduction of important innovations, both in the diagnosis and treatment of oncological diseases.

These benefits are also linked to the reduction of costs due to the increase in the speed and accuracy of diagnosis and the possibility of increasing the effectiveness of treatments through efficient use of the devices, protocols and drugs that will be introduced into the system.

In this context, the Rare.Plat.Net project has created a regional collaboration network by integrating experts with different skills who have increased knowledge in the field of rare diseases represented by neuroendocrine tumors and glioblastoma, and have addressed aspects that are not only purely technical but also regulatory and technological.

At the national and international level, there are numerous collaborative initiatives between experts in the field who together try to respond to the needs of patients: the most representative associations in this area are NET Team, ENETS (European Neuroendocrin Tumor society), ASCO and IART (Italian Association Rare Tumor).

The network assumes an important role of know-how sharing with the knowledge transfer to patients and the harmonization of territorial differences in relation to access to new therapies. Also, in this case, the groups of patient associations involved in the innovation process guide the development of new solutions in the clinical and diagnostic field with their needs and allow the dissemination of important information regarding clinical trials and the centers involved.

PATENT PROTECTION AND REGIONAL SPECIALIZATION LEVEL ON RARE.PLAT.NET

Innovation is one of the main drivers of the development of a company, a community, a country.

From the point of view of law, the invention is understood as the technical solution of a problem, the high immaterial value of which takes on a connotation that is not only economic, but above all ethical.

The protection of intellectual property is an important strategic asset that plays a fundamental role in increasing competitiveness by recognizing the inventor the exclusive right to implement it, produce it, and sell it.

The patent is an innovation tool that encourages and stimulates progress because through the publication and dissemination of the invention, all experts in the field can use them as building blocks for future discoveries.

Scientific production, especially in the academic field, supports innovation with publications or patents that can be awarded in a technological process to spin-offs, startups or companies.

The level of specialization of scientific production indicates the weight of the know-how produced in that specific region in relation to a national or international context.

To analyze the level of regional specialization in relation to the technologies developed in the Rare.Plat.net project and contextualize scientific production at a national and international level, an analysis was conducted on Scopus (www.scopus.com)

Bibliometric parameters and scientific production were evaluated on Scopus.

Scopus (Elsevier) is a large database covering different scientific fields from health sciences, life sciences, physics to social sciences that allows for trend analysis.

The first step of the SCOPUS analysis was the construction of a query containing key words that identified the themes and technologies contained in the Rare.Plat.Net project. Some of these keywords are: endocrine tumors, hypothalamus, adrenals, blood, biomarkers, patient, diseases, thyroid and parathyroid, glioblastoma, radioimmunological techniques, monoclonal antibodies, surgical, bioptic, genomic, epigenomic, selective, targeting, drug delivery, pharmaceutical formulation.

The query made it possible to understand the scientific production that was produced and by which type of actors (researchers, universities, research institutions, etc.)

The research results highlighted 12,046 documents. 1,091 documents were produced by Italian researchers mainly belonging to the universities of Rome and Milan. In the Campania Region, the Universities of Naples, Salerno and Benevento have produced 109 papers. Using scientific production on a national scale as a baseline, it was possible to obtain a specialization index of the Campania Region equal to 1.50, higher than the national average.

The World scientific production began in the 1970s, and the greatest contribution was made by the United States with one of the most ambitious funding programs in the history of research promoted by the National

Cancer Institute. After an inflection, in 1985 the number of publications referring to the themes of the project started to grow again, thanks also to numerous initiatives based on public funding in support of cancer research (fig. 1 and fig. 2).



fig.1: Number of worldwide publications per year on the themes of the Rare.Plat.Net project

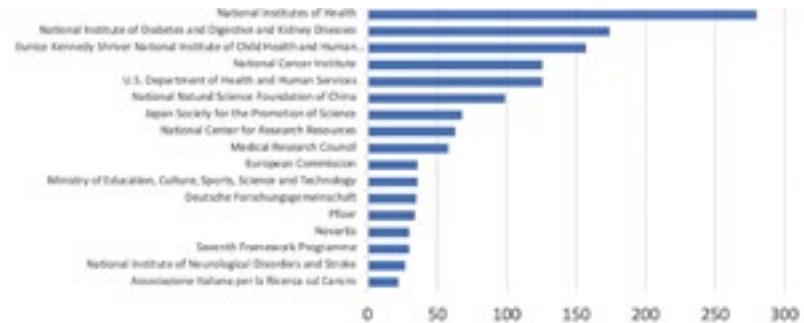


fig.2: Number of publications by funding sponsors

Scientific research in the field of cancers studied in the European Rare.Plat.Net project is mainly funded by British, American and Chinese institutions.

In tenth place we find the European Commission with the framework programs and only in 17th place an Italian association, the AIRC (fig. 2). Italy ranks third in the world for the number of publications on the topics of the query, despite the fact that the funding received is lower than the American and European average. This result explains the high quality of Italian research (fig. 3))

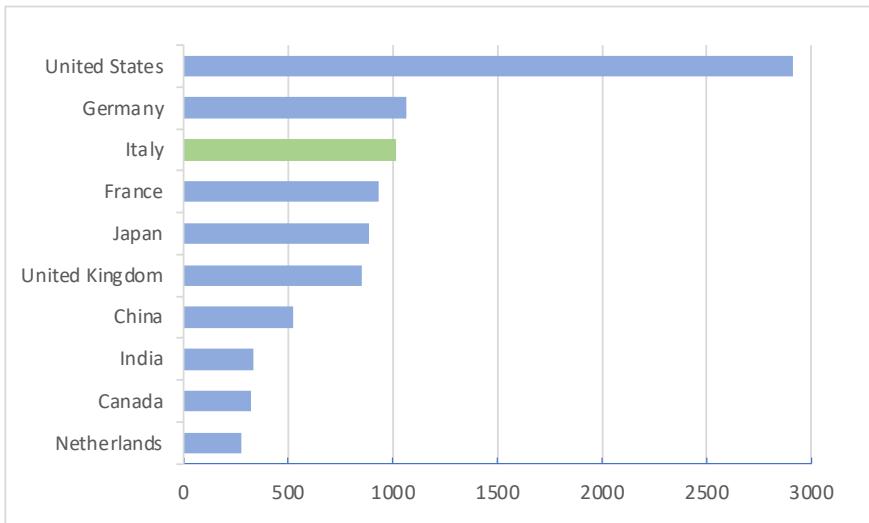


fig.3: scientific production by Country

In line with scientific production, the number of patent applications has also grown exponentially in recent years (fig.4)

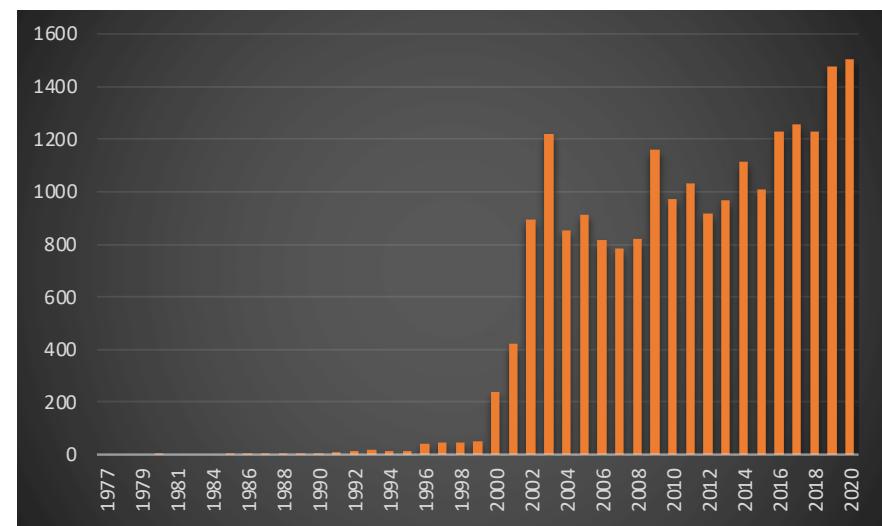


fig. 4: Number of patent applications in the world from 1977 to today

INNOVATIVE DRUG DESIGNATION AND FUNDING ALLOCATIONS

“New” is not always synonymous with “innovative”. The Italian Medicines Agency, AIFA with resolution no. 1535/2017 established the criteria for the attribution of innovative to oncological and non-oncological drugs, fundamental for the refund of the same, based on two specific funds of 500 million euros each, set up for innovative oncological drugs with the 2017 Budget Law

The criteria for awarding innovativeness have as their objective “[...]

to guarantee rapid access on the national territory to drugs that have a clear therapeutic added value compared to the alternatives available, and on the other hand to encourage the development of drugs that offer substantial therapeutic benefits for patients “.

This statement underlies two delicate aspects, the first concerns the issue of equality in access to increasingly promising therapies. It is known that some regional health systems are characterized by unjustified delays and limitations in access to care. In fact, in the case of new drugs used in increasingly complex and widespread pathologies, this could become a strong element of inequality in health, generating a classification among patients based on territorial reasons and / or on diagnosis and treatments. Taking into account the imminent availability of new high-cost medicines, many of which are used precisely in the oncology field, this risk is self-evident.

The second aspect, the subject of debate in the scientific community, is linked to the nature and rewarding effects of the “restricted funds system”, which incentivize the development of drugs whose added value is represented by the clinical benefit that the patient receives.

The definition of innovativeness allows the drug to be included in the fund for innovative drugs, benefiting from an economic advantage in terms of reimbursement and prompt inclusion in the Regional Handbooks.

The “innovative” feature, therefore, takes on a crucial connotation in terms of refund, access to the drug and clinical expectations and its definition requires scientific rigor.

The evaluation model chosen by AIFA provides for a multidimensional approach and takes into account three elements: the therapeutic need, the response to the therapeutic needs of a patient population (unmet medical need); the added therapeutic value, represented by the extent of the clinical benefit (greater or lesser effectiveness) brought by the new drug compared to the alternatives available if any; and finally the quality and validity of the scientific analyzes and tests supporting the request for recognition of innovativeness.

Following the joint evaluation of these three parameters, the judgment of innovativeness will be formulated.

Drugs considered to be innovative are recognized when the therapeutic need and the added therapeutic value reach a “maximum” or “important” level, and a “high” quality of evidence. The innovativeness cannot be recognized, however, in the presence of a therapeutic need and / or an added therapeutic value judged as “poor” or “absent”, or in the presence of a “low” or “very low” quality of evidence.

An exception to this classification is applied to drugs intended for rare diseases. For these drugs, in fact, given the small number of patients that characterize these pathologies, a great difficulty in conducting clinical studies is recognized (inadequate statistical power). Therefore, in the presence of a high therapeutic need and strong indications of an added therapeutic benefit, it will be possible to attribute the innovation also on the basis of “Low” quality tests.

An example is represented by Lutetium - ^{177}Lu - oxodotreotide (Lutathera), the first radiopharmaceutical approved in Europe and Italy for

NETs, developed by Advanced Accelerator Applications (AAA - Novartis Company). It has gained groundbreaking drug status in the frontline treatment of neuroendocrine tumors of the gastro-entero-pancreatic tract (NET-GEP).

In 2017, two additional funds were established to pharmaceutical expenditure of 500 million euros each, created to support therapies provided with innovative oncological and non-oncological drugs. These funds are confirmed through the budget law and are intended for those drugs that meet the requirement of full or conditioned therapeutic innovativeness.

Each year the list of these drugs is reviewed to ensure compliance with the innovation criteria granted and the list is published on the AIFA website. Thanks to this tool, innovative products are made immediately available to clients despite the high cost.

Further financial aid in support of rare diseases is the National Fund "AIFA" -Fund 5%. Law 326/2003 provided for the establishment of a national fund at AIFA for the use of orphan drugs for the treatment of rare diseases.

The Fund consists of 50% of the contribution that pharmaceutical companies pay to AIFA on an annual basis. This contribution corresponds to 5% of the annual expenses for promotional activities that pharmaceutical companies allocate to doctors.

This tool allows access to drugs not yet marketed and guarantees their economic sustainability.

Reducing the "time to market" for these new drugs represents a challenge not only for the scientific community.

Virtuous projects such as the RarePlatNET platform, lays the foundations for a rational that can lead to new therapeutic and / or diagnostic opportunities and implement the value chain, expanding the process of dissemination of results and frontier knowledge.

*Annunziata Cummaro, Maria Emilia Mercurio,
Valentina Battista, Aniello Cammarano, Caterina Meglio*

Materias srl, Corso N. Protopisani, 50 - 80146 Napoli

References

AIRC www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/guida-ai-tumori/tumori-neuroendocrini

OMAR www.osservatoriomalattierare.it/i-tumori-rari/glioblastoma/14375-glioblastoma-accertata-l-esposizione-a-radiazioni-ionizzanti-come-fattore-di-rischio

Progetti di ricerca e innovazione in ambito oncologico regione Campania programmazione unitaria 2021 febbraio

www.europa.regionecampania.it/wp-content/uploads/2021/06/Ricerca_Oncologico_FEB2021.pdf

SCOPUS www.scopus.com/

Eckhouse S, Lewison G, Sullivan R. Trends in the global funding and activity of cancer research. Mol Oncol. 2008;2(1):20-32. doi:10.1016/j.molonc.2008.03.007

Fund for the contribution to the reimbursement to the regions for the

purchase of innovative medicines and the Fund for the contribution to the reimbursement to the regions for the purchase of innovative oncological medicines "; law 11 December 2016, n. 232 - State budget for the financial year 2017 and multi-year budget for the three-year period 2017-2019 (16G00242) (GU General Series n.297 of 21-12-2016 - Ordinary Supplement n. 57), article 1, paragraph 397-408

AIFA determines n. 1535/2017 of March 31, 2017, updated by Resolution 1535/201725 of September 12, 2017)

Gori et al. Differences in the availability of new anti-cancer drugs for Italian patients treated in different regions. Results of analysis conducted by the Italian Society of Medical Oncology (AIOM)- 2010

AIFA www.aifa.gov.it/farmaci-innovativi

National Fund "AIFA" - Fund 5%
<https://www.aifa.gov.it/-/aifa-riapre-1-accesso-al-fondo-5>



UNIONE EUROPEA Fondo europeo di sviluppo regionale

Progetto: *Innovazioni diagnostiche e terapeutiche per tumori neuroendocrini, endocrini e per il glioblastoma attraverso una piattaforma tecnologica integrata di competenze cliniche, genomiche, ICT, farmacologiche e farmaceutiche (Rare.Plat.Net)* - CUP B63D18000380007

Obiettivo del progetto è di migliorare la gestione clinica di pazienti affetti da neoplasie rare come i tumori aggressivi ipotalamo-ipofisari, i carcinomi corticosurrenali, i NET ed i glioblastomi, attraverso lo sviluppo di nuove metodiche, nuove tecnologie, nuove procedure, nuove molecole per la diagnosi precoce iniziale e di recidiva di malattia, per la definizione di precise categorie tumorali a differente prognosi, per la predizione di risposta a terapie più mirate ed efficaci e meno tossiche, in grado di essere attive sia sulle forme ben differenziate a crescita indolente che in quelle scarsamente differenziate più aggressive.



MATERIAS
ideas come to life for a sustainable world