

Utilizzo di nuove tecnologie omiche per lo studio di patologie umane

miRNoma e metabolomica: nuovi approcci per la comprensione dei meccanismi molecolari coinvolti nello sviluppo di tumori cerebrali

DOI 10.12910/EAI2017-049

di **Barbara Tanno, Simona Leonardi e Mariateresa Mancuso**, ENEA; **Antonella Rosi, Sveva Grande e Alessandra Palma**, Istituto Superiore di Sanità

Nell'ultimo ventennio, la capacità di studiare i sistemi cellulari e molecolari è stata completamente rivoluzionata attraverso lo sviluppo delle scienze omiche [1]. Esse analizzano, nel loro insieme:

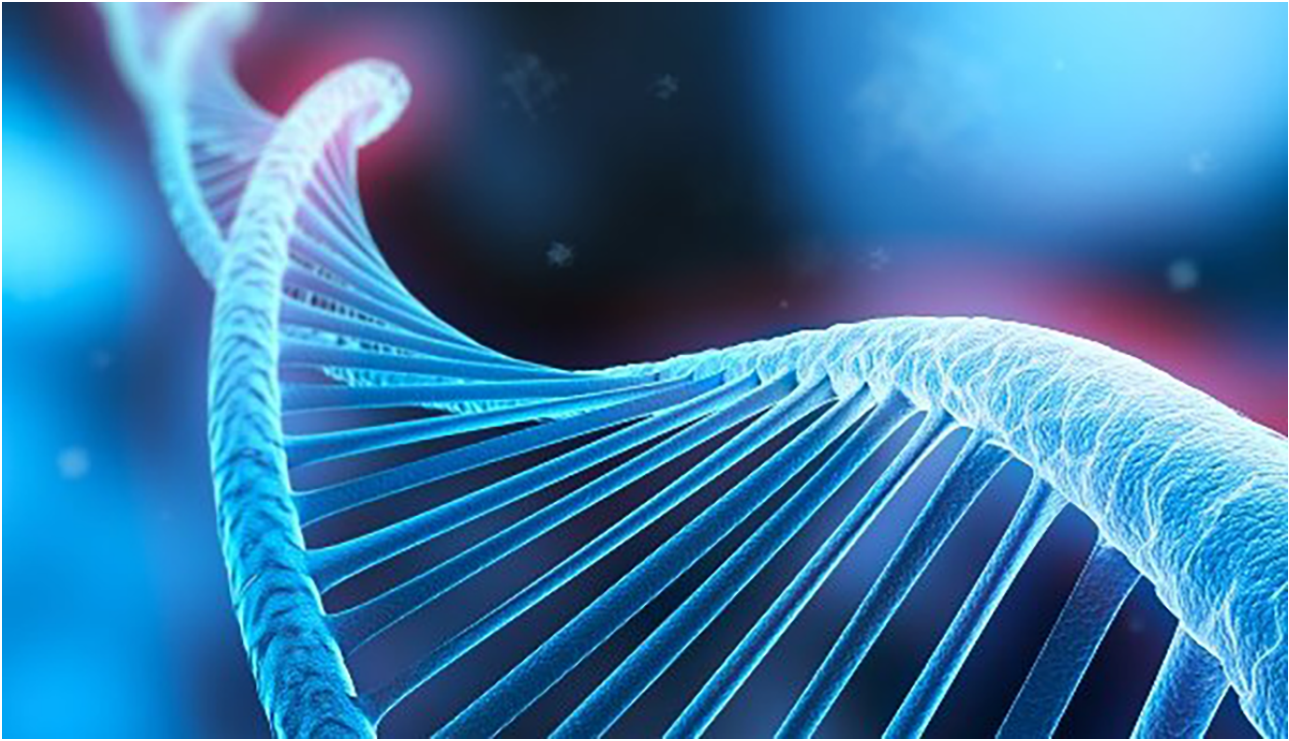
- i geni del DNA (genomica) e le loro funzioni (genomica funzionale);
- i trascritti del DNA, cioè l'RNA (trascrittomica e analisi del miRNoma);
- le proteine (proteomica);
- i metaboliti all'interno di un organismo (metabolomica);
- le reversibili modificazioni del DNA o delle proteine associate al DNA (epigenomica).

La diffusione delle discipline omiche è stata resa possibile principalmente grazie allo sviluppo di tecniche di indagine *high-throughput* in grado di generare enormi quantitativi di dati relativi ai diversi livelli gerarchici di complessità biologica (DNA, mRNA, proteine, metaboliti ecc.), contribuendo a rivoluzionare l'approccio allo studio dei sistemi complessi. A ciò si sono associate una molteplicità di piattaforme tecnologiche in grado di consentire livelli di produttività e costi di analisi inimmaginabili con le tecniche tradizionali. Tutto questo ha portato a una rivoluzione nel campo della ricerca biomedica, con un approccio olistico al problema biologico.

Un settore di ricerca strategico è quello rappresentato dall'applicazione delle tecnologie omiche per una sempre più approfondita conoscenza dei meccanismi molecolari che determinano l'insorgenza delle patologie tumorali. Tra queste, quelle cerebrali, per cui è nota la resistenza alle terapie convenzionali e l'alta incidenza di recidive, rappresentano certamente la categoria di tumori per cui è urgente identificare nuove strategie terapeutiche.

Approcci omici innovativi: l'analisi del miRNoma

Con l'avvento di un gran numero di studi di trascrittomica è stato ne-



cessario rivalutare il dogma centrale della biologia che identificava l'RNA come una molecola intermedia tra il DNA e le proteine. Dati recenti hanno dimostrato che solo circa il 3% del genoma codifica per proteine, mentre circa l'80% non è trascritto. Così se gli RNA messaggeri hanno il compito di trasportare le informazioni contenute nei geni per la produzione delle proteine, la restante percentuale del genoma, che potrebbe sembrare un insieme di "parole" senza senso, svolge invece un importante ruolo strutturale oltre ad avere il compito di modulare finemente e in modo transitorio l'espressione genica. La diffusione e il miglioramento delle tecnologie di caratterizzazione molecolare a cui abbiamo assistito in questi ultimi anni ci ha permesso di identificare molte migliaia di piccole molecole di RNA

non tradotte (non-coding RNA, microRNA, *piwi-interacting* RNA, and *small nuclear* RNA) con ruoli essenziali in molti processi fisiologici e patologici.

I microRNA (miRNA) sono piccoli frammenti di RNA (di ~22 nucleotidi di lunghezza) non codificanti che regolano l'espressione genica legandosi a specifici mRNA bersaglio promuovendone la loro degradazione e/o l'inibizione della traduzione. Il genoma umano codifica per centinaia di miRNA che svolgono la loro attività di silenziamento su un'ampia gamma di trascritti derivanti dall'espressione di migliaia di geni [2]. L'espressione aberrante dei miRNA è implicata nell'insorgenza di numerose patologie e per questo possono essere utilizzati a scopi terapeutici.

Inoltre lo studio dei miRNA, abbastanza stabili in differenti tipi di

campioni – sangue, plasma, urine e tessuti fissati in formalina – misurabili con una maggiore sensibilità delle proteine ci permettono di eseguire una caratterizzazione molecolare accurata di diverse patologie. Queste caratteristiche suscitano un considerevole interesse nell'identificazione dei miRNA come biomarcatori per diverse applicazioni di diagnostica molecolare e in applicazioni forensi, così come nel loro potenziale utilizzo come molecole terapeutiche per malattie con un elevato impatto socio-economico (cancro, diabete, patologie cardiovascolari e neurodegenerative).

Il miRNoma nel Medulloblastoma

Il medulloblastoma (MB), il più comune tumore pediatrico del sistema nervoso centrale, origina dalle cellule precursori dei granu-

li, è fatale nel 40–70% dei casi e la sua radio-resistenza contribuisce sia alla prognosi sfavorevole che ai casi di recidiva. Delle quattro distinte varianti molecolari note di MB, quella riconducibile all'attivazione della via di segnale di *Sonic Hedgehog* (SHH), caratterizza circa il 25–30% di MB sporadici.

I topi eterozigoti per il gene *Ptch1* (*Ptch1*^{+/-}), sono uno dei più studiati e comunemente usati modelli murini di MB. In questi topi, la percentuale di MB spontaneo (circa 8%) subisce un incremento pari a 10 volte (circa 80%) in seguito a irraggiamento in età neonatale, suggerendo che la deregolazione della via di segnale di Shh sia coinvolta non solo nello sviluppo del MB ma anche nella risposta al danno indotto dalle radiazioni. Poiché un approccio strategico per superare la radio-resistenza del MB potrebbe essere quello di capire i meccanismi molecolari che controllano la risposta alle radiazioni ionizzanti nelle cellule di origine del tumore, questo modello animale è uno strumento ideale per identificare miRNA potenzialmente utilizzabili per un trattamento terapeutico mirato che coadiuvi e implementi quello radioterapico. L'utilizzo delle nuove tecnologie omiche, in particolare dei sequenziatori di seconda generazione come *Next Generation Sequencing* (NGS), ci ha permesso di eseguire un'analisi comparativa dell'intero miRNAoma (l'insieme di microRNA) per studiare contemporaneamente i diversi livelli del flusso di informazione biologica nel nostro modello sperimentale. A partire, infatti, dalle cellule precursori dei granuli prelevate dai cervelletti di animali geneticamente normali (*wildtype*, WT) e geneticamente modificati

(*Ptch1*^{+/-}) irraggiati e non, è stato possibile identificare per ciascun gruppo sperimentale più di 700 miRNA.

L'analisi bioinformatica, necessaria per analizzare l'enorme quantità di dati generati, ha permesso di identificare alcune importanti famiglie di microRNA (*let-7a*, *mir-17*, *mir-34a*, *miR144* e *mir-486*, Figura 1), responsabili a loro volta della deregolazione di processi biologici alla base della tumorigenesi come senescenza, proliferazione e riparo del DNA [3]. L'utilizzo di queste metodologie per la caratterizzazione e l'analisi dei diversi livelli biologici consente di indirizzare meglio la conoscenza dei meccanismi patogenetici a livello molecolare. Ciò permette, dove possibile, di individuare dei sottogruppi di pazienti o biomarcatori che consentano di migliorare la diagnosi o addirittura pianificare delle te-

rapie personalizzate, in modo da programmare interventi farmacologici mirati ed essere in grado di migliorare le capacità diagnostiche e prognostiche.

Approcci omici innovativi: la metabolomica

La Metabolomica si occupa di analizzare alterazioni della funzionalità metabolica di sistemi biologici come biofluidi o sistemi cellulari modello (cellule in coltura e neurosfere) per la caratterizzazione di patologie del sistema nervoso, di patologie tumorali e cardiache e all'identificazione di marker diagnostici e prognostici che possano permettere una personalizzazione dei trattamenti. Numerose sono le tecniche utilizzate per studi di metabolomica: la *Fourier transform infrared spectroscopy* (FT-IR), la *Raman spectroscopy*, la spettro-

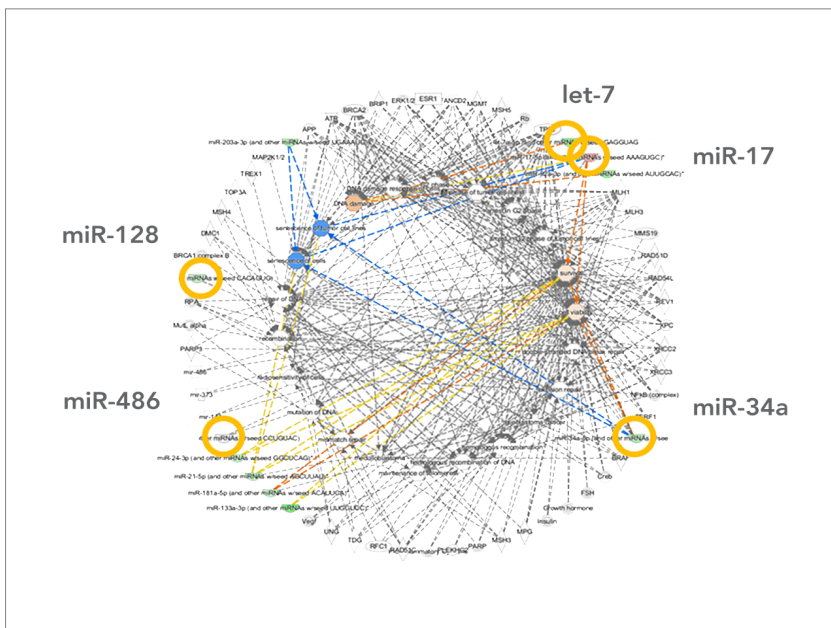


Fig. 1 Network ottenuto attraverso Ingenuity pathway analysis (IPA) utilizzando i datasets di miRNA and mRNA: nel cerchio interno, le funzioni biologiche; cerchio esterno miRNA e mRNA. Il gradiente di colore riflette la predetta forza di attivazione (arancio) o inibizione (blu)



metria di massa e la spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (MRS). L'identificazione e caratterizzazione dei profili metabolici è essenziale per la descrizione dettagliata delle interazioni tra metaboliti e per la comprensione dei cammini metabolici e della loro alterazione come risposta a stimoli esterni ed interni. Gli studi di metabolomica si applicano sia alla descrizione di patologie in essere, sia all'identificazione di stadi prepatologici (non manifesti) collegabili a fattori di rischio di insorgenza

delle malattie, cioè stati descrivibili da variabili dipendenti da alterazioni di origine genetica o ambientale che concorrono ad aumentare o a diminuire la possibilità di insorgenza di malattie e la cui conoscenza può aiutare a mettere in atto piani di prevenzione.

La metabolomica nel Glioblastoma Multiforme

Vi è sempre una maggiore evidenza del ruolo svolto dalle cellule staminali tumorali (*Cancer Stem Cells*,

CSC) nell'iniziazione tumorale e nelle recidive. Le CSC sono in grado di auto-rinnovarsi, proliferare, auto differenziarsi in più linee e sono di solito radio- e chemoresistenti.

Questo implica che la conoscenza dei meccanismi patogenetici a livello molecolare e metabolico delle CSC potrebbe contribuire a fornire nuove e più specifiche strategie terapeutiche. Tra le patologie tumorali, i gliomi maligni - in particolare il glioblastoma multiforme (GBM) - sono molto difficili da trattare e la prognosi è quasi sempre infausta. L'identificazione di profili metabolici, nelle linee staminali da GBM (*Glioblastoma Stem Cells*, GSCs), può fornire importanti informazioni sulla vulnerabilità o resistenza di queste cellule consentendo di pianificare terapie personalizzate. La MRS è molto spesso usato in campo clinico per studi di metabolismo, in particolare per diagnosi e prognosi di patologie tumorali. In particolare la spettroscopia RM è spesso usata per identificare profili metabolici *in vitro*, *ex vivo* ed *in vivo* anche in estratti e in tutti i fluidi biologici (urine, sangue e sue componenti, saliva ecc.) con un elevato grado di riproducibilità. Nel caso del GBM i tipici metaboliti analizzati sono: la creatina totale (tCr) e l'N-acetil aspartato (NAA) come marker di tessuto sano, composti contenenti la colina (tCho) che riflettono prodotti del processo di *turnover* della membrana plasmatica per cellule in attiva proliferazione, il lattato nella glicolisi ed i lipidi mobili come marker tumorali [4]. I nostri studi di spettroscopia 1D e 2D COSY 1H NMR, condotti su 17 linee cellulari provenienti da pazienti affetti da GBM e basati su un definito numero di metaboliti (inclusi quelli sopra citati) hanno

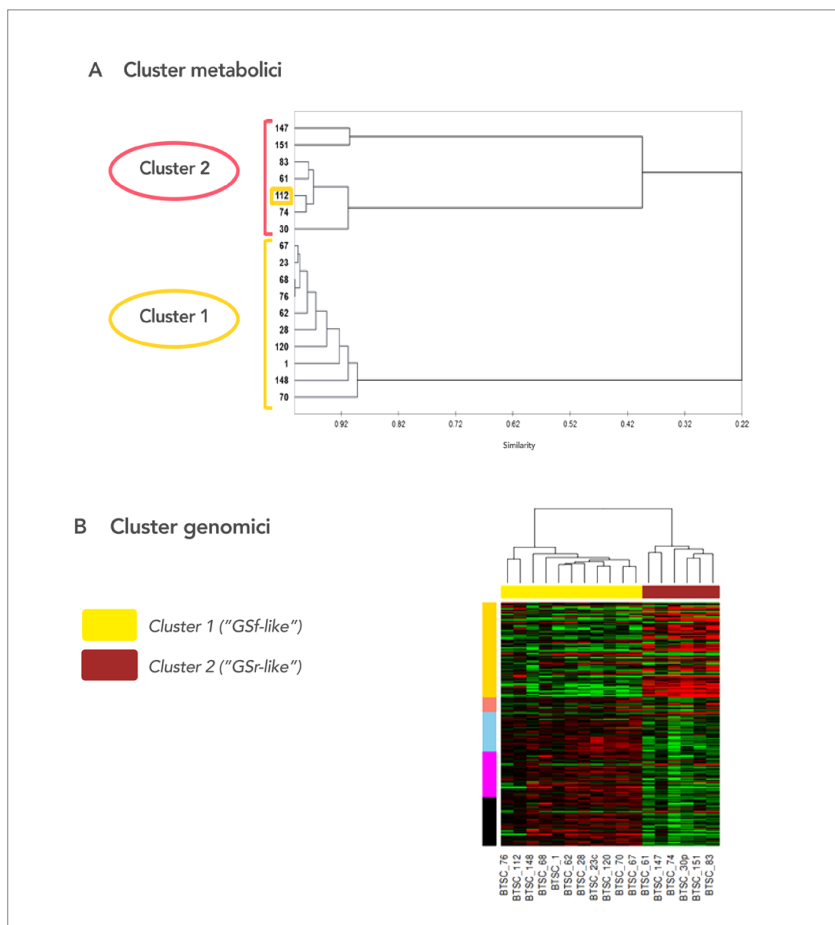


Fig. 2 (A) Analisi metabolica di 17 linee di GSCs. La Cluster analysis separa le GSCs in due cluster, cluster 1 e cluster 2. (B) La corrispondente analisi dell'espressione genica che suddivide le stesse 17 linee in due cluster genomici, GSF-like e GSR-like. I cluster genomici e metabolomici sono sovrapponibili con la sola eccezione della linea #112

permesso di caratterizzarle e classificarle, sulla base dei loro profili metabolici, in due cluster (Cluster 1 e 2) attraverso una *unsupervised cluster analysis*. I due cluster sono corrispondenti a due profili metabolici: uno di tipo neuronale/astrocitico e uno più simile ai veri e propri gliomi (Figura 2A).

È stato inoltre osservato che metabolismi differenti possono prevalere in linee diverse di GBM e che le linee del cluster 1 provengono da pazienti con una sopravvivenza più lunga rispetto a quella di pazienti le cui linee appartengono al cluster 2. Un esempio di integrazione tra tecniche omiche è presentato in un recente studio [5] il cui obiettivo era trovare una correlazione tra i risultati di metabolomica e quelli di genomica sempre su linee GSC. I dati di espressione genica ottenuti dalle stesse 17 linee di GBM sono stati analizzati mediante *cluster analysis* e hanno evidenziato due cluster genomici ben distinti di GSC (Figura 2B) che indentificano anche essi, come i dati di metabolomica, due sottoclassi di cellule tumorali.

Il fenotipo GSF è caratterizzato da una *signature* di espressione genica di tipo proneurale, (espressione di CD133, crescita come neurosfere ed elevata invasività *in vitro*), mentre le GSC con un fenotipo GSr mostrano una *signature* di espressione genica di tipo mesen-

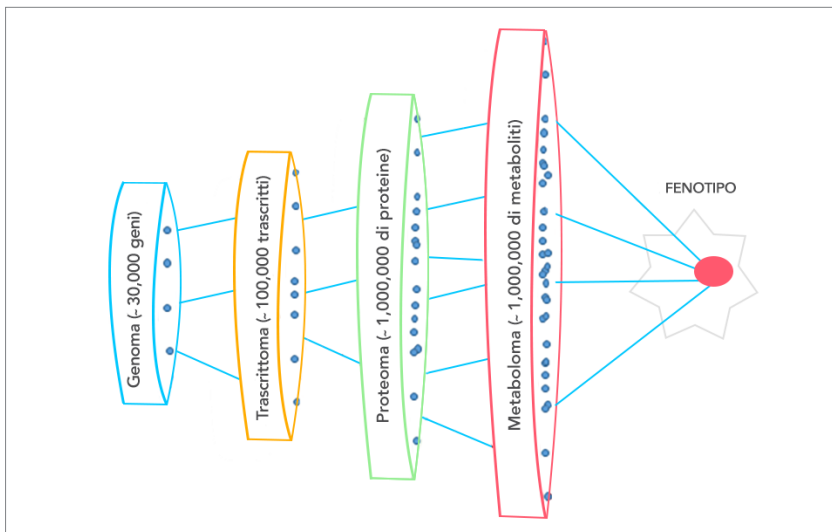


Fig. 3 Attraverso un approccio multidisciplinare ottenuto dall'integrazione di dati provenienti dalle diverse analisi omiche, è oggi potenzialmente possibile identificare lo schema molecolare (o il modello molecolare) caratteristico di una patologia (fenotipo)

chimale (assenza di espressione del CD133, crescita *in vitro* come cellule aderenti e ridotta invasività *in vivo*) [6].

Lo studio bioinformatico dell'analisi genomica suggerisce una associazione delle linee GSf-like, (subtipo proneurale), con il cluster metabolico 1 di tipo neuronale/astrocitico e delle linee GSr-like (subtipo mesenchimale) con il cluster metabolico 2 più simile ai veri e propri gliomi, confermando il valore aggiunto di studi integrati tra tecniche omiche per la comprensione di diverse patologie umane.

Conclusioni

L'integrazione di tutte le scienze e tecnologie omiche, definita "*system biology*" (Figura 3) ha avuto e avrà un impatto sempre più rilevante nella comprensione di come geni, proteine e metaboliti intervengano nei meccanismi fisiologici e fisiopatologici che stanno alla base di molte patologie umane e la loro applicazione potrà certamente avere un impatto strategico nella definizione di nuovi approcci terapeutici.

Per saperne di più:
mariateresa.mancuso@enea.it

BIBLIOGRAFIA

1. Y. Hasin, M. Seldin, A. Lusic (2017). Multi-omics approaches to disease. *Genome Biology* 18:83
2. C.C. Pritchard, H.H. Cheng, M. Tewari (2012). MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet.*, 13:358-369
3. B. Tanno, G. Babini, S. Leonardi, P. Giardullo, I. De Stefano, E. Pasquali, A. Ottolenghi, M.J. Atkinson, A. Saran, M. Mancuso (2016). Ex vivo miRNome analysis in Ptch1+/- cerebellum granule cells reveals a subset of miRNAs involved in radiation-induced medulloblastoma. *Oncotarget*, 7:68253-68269
4. L. Guidoni, L. Ricci-Vitiani, A. Rosi, A. Palma, S. Grande, A.M. Luciani, F. Pelacchi, S. di Martino, C. Colosimo, M. Biffoni, R. De Maria, R. Pallini, V. Viti (2014). 1H NMR detects different metabolic profiles in glioblastoma stem-like cells. *NMR Biomed*, 27:129-145
5. G. Marziali, M. Signore, M. Buccarelli, S. Grande, A. Palma, M. Biffoni, A. Rosi, Q.G. D'Alessandris, M. Martini, L.M. Larocca, R. De Maria, R. Pallini, L. Ricci-Vitiani (2016). Metabolic/Proteomic Signature Defines Two Glioblastoma Subtypes with Different Clinical Outcome. *Scientific Reports*, 7, DOI: 10.1038/srep21557
6. H.S. Gunther, N.O. Schmidt, H.S. Phillips, D. Kemming, S. Kharbanda, R. Soriano, Z. Modrusan, H. Meissner, M. Westphal, K. Lam-szus (2008). Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria. *Oncogene*, 27:2897-2909