



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale

Biologia Molecolare ed Applicata

**SCREENING FUNZIONALE PER L'IDENTIFICAZIONE DI MIRNA
CHIAVE NELL'INVASIONE E MIGRAZIONE CELLULARE NEL
CARCINOMA POLMONARE NON A PICCOLE CELLULE.**

**FUNCTIONAL SCREENING FOR THE IDENTIFICATION OF KEY
MIRNAs IN CELL INVASION AND MIGRATION IN NON-SMALL
CELL LUNG CANCER.**

Tesi di Laurea Magistrale
di:

Francesca Longo

Relatore
Chiar.mo Prof.

Adriana Canapa

Correlatore:

Fabrizio Bianchi

Roberto Cuttano

**Sessione Estiva (luglio)
Anno Accademico 2023/2024**

Sommario

1.INTRODUZIONE	4
1.1 Tumore al Polmone	4
1.1.1 Epidemiologia e fattori di rischio del tumore al polmone	4
1.1.2 Classificazione istologica del tumore al polmone	7
1.1.3 Patogenesi molecolare del tumore al polmone	10
1.1.4 Sintomatologia e diagnosi del tumore al polmone	13
1.1.6 Terapia del NSCLC metastatico	18
1.2 I microRNA	21
1.2.6 Organizzazione genomica e classificazione dei miRNA	21
1.2.7 Biogenesi e meccanismo d'azione dei miRNA	22
1.2.8 Ruolo dei miRNA nel processo metastatico del tumore al polmone	29
1.3 LA METASTASI	32
1.3.1 La cascata metastatica	32
2.SCOPO DELLA TESI	37
3.MATERIALI E METODI	39
3.1 Colture Cellulari	39

<i>3.2 Saggio di Vitalità Cellulare con PrestoBlue</i>	<i>39</i>
<i>3.3 Determinazione del titolo virale della libreria</i>	<i>40</i>
<i>3.4 Trasduzione lentivirale con la libreria lentivirale di miRNA.....</i>	<i>41</i>
<i>3.5 Citometria a Flusso.....</i>	<i>41</i>
<i>3.6 Saggi di Migrazione ed Invasione</i>	<i>42</i>
<i>3.7 Estrazione DNA genomico, amplificazione dei costrutti mediante PCR e sequenziamento delle librerie.....</i>	<i>43</i>
<i>3.8 Analisi Bioinformatica dei dati di sequenziamento e identificazione degli Hit</i>	<i>46</i>
4.RISULTATI.....	47
<i>4.1 Descrizione della libreria lentivirale utilizzata per lo studio funzionale del miRNoma umano nei processi di migrazione ed invasione delle cellule tumoriali polmonari.</i>	<i>47</i>
<i>4.2 Selezione del promotore ottimale per la libreria lentivirale di miRNA.....</i>	<i>48</i>
<i>4.3 Ottimizzazione il protocollo della trasduzione con i lentivirus</i>	<i>51</i>
<i>4.4 Determinazione del titolo virale nella linea A549</i>	<i>54</i>
<i>4.5 Ottimizzazione della selezione delle cellule trasdotte con puromicina</i>	<i>56</i>

<i>4.6 Infezione della linea cellulare con libreria lentivirale</i>	<i>58</i>
<i>4.7 Selezione fenotipica delle cellule A549 trasdotte con la libreria di miRNA</i>	<i>60</i>
<i>4.8 Analisi dei miRNA arricchiti nelle cellule migratorie e invasive.....</i>	<i>66</i>
<i>5.DISCUSSIONE.....</i>	<i>72</i>
<i>6.BIBLIOGRAFIA.....</i>	<i>79</i>

1.INTRODUZIONE

1.1 Tumore al Polmone

1.1.1 Epidemiologia e fattori di rischio del tumore al polmone

Il tumore al polmone è una delle neoplasie più diffuse a livello globale, rappresentando la principale causa di morte per cancro tra gli uomini e la seconda tra le donne, subito dopo il tumore al seno ¹. Nel 2020, ci sono stati circa 2,2 milioni di nuovi casi di cancro al polmone e 1,8 milioni di morti attribuibili a questa malattia. Il cancro al polmone rappresenta circa l'11,4% di tutte le diagnosi di cancro e il 18,0% di tutte le morti per cancro a livello globale ². In Italia, nel 2020 sono stati stimati circa 41.000 nuovi casi di tumore al polmone, con una maggiore incidenza tra gli uomini (27.550) rispetto alle donne (13.300) ³. La probabilità di sviluppare questa neoplasia nel corso della vita è di 1 su 10 per gli uomini e 1 su 35 per le donne ³. Nel 2017, in Italia, si sono registrati 34.000 decessi dovuti a tumore al polmone. Alla diagnosi, più di due terzi dei pazienti presenta già metastasi. La sopravvivenza a cinque anni dalla diagnosi rimane bassa, circa il 16%, a causa della diagnosi spesso tardiva, quando il tumore ha già metastatizzato ⁴.

Numerosi fattori di rischio sono associati all'insorgenza del tumore al polmone e possono essere suddivisi in due categorie principali: fattori esogeni ed

endogeni. I fattori esogeni includono principalmente il fumo di sigaretta, responsabile dell'85-90% dei nuovi casi. La relazione tra fumo e carcinoma polmonare è dose-dipendente: il rischio aumenta con il numero di sigarette fumate e la durata dell'abitudine al fumo. Il processo di cancerogenesi richiede un lungo periodo di latenza, con un picco di incidenza 40-50 anni dopo l'inizio del fumo. Il fumo di tabacco contiene almeno 70 sostanze cancerogene note, che danneggiano irreversibilmente il DNA cellulare, inducendo mutazioni⁵.

Altri fattori esogeni includono l'esposizione al radon, un gas radioattivo naturale prodotto dal decadimento dell'uranio nella crosta terrestre, che rappresenta circa il 10% dei casi di tumore al polmone. Anche l'asbesto, un minerale naturale fibroso, aumenta significativamente il rischio di sviluppare questa neoplasia soprattutto il mesotelioma, specialmente in ambito professionale ⁶ fig(1). L'inquinamento atmosferico, contenente biossido di azoto, biossido di zolfo e particolato fine (PM2.5), è un altro importante fattore di rischio, contribuendo significativamente alla mortalità per cancro ai polmoni, secondo solo al fumo di tabacco ⁷.

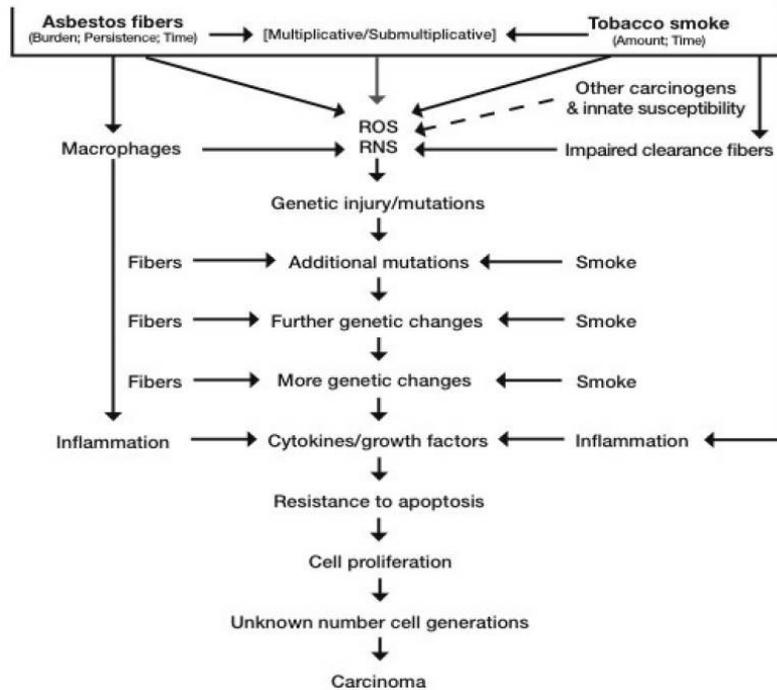


Fig (1) *Meccanismi di Genesi del Carcinoma Indotto da Fumo e Fibre di Amianto*: La figura illustra il complesso processo attraverso il quale l'esposizione al fumo di tabacco e fibre di amianto contribuisce allo sviluppo del carcinoma, evidenziando le interazioni molecolari e cellulari coinvolte.

Alcune patologie polmonari sono state associate a un aumento del rischio di cancro ai polmoni, in particolare l'associazione più forte è con la Broncopneumopatia Cronica Ostruttiva (BPCO). Oltre a questi e altri fattori ambientali, la componente genetica gioca un ruolo significativo nella patogenesi del cancro al polmone, influenzando sia la suscettibilità individuale alla malattia sia la capacità di risposta alle terapie. Una storia familiare di cancro al polmone è un significativo fattore di rischio, con alcuni loci genici

specifici identificati come suscettibili attraverso studi di associazione genome-wide (GWA). La sindrome di Li-Fraumeni, caratterizzata da una mutazione germinale nel gene soppressore del tumore p53, è un esempio di predisposizione genetica aumentata ⁸. Questi fattori di rischio, combinati, rendono il tumore al polmone una delle neoplasie più complesse e letali, richiedendo una diagnosi precoce e strategie terapeutiche efficaci per migliorare la prognosi e la sopravvivenza dei pazienti.

1.1.2 Classificazione istologica del tumore al polmone

Le cellule epiteliali che compongono i bronchi, i bronchioli e gli alveoli possono subire mutazioni genetiche e alterazioni epigenetiche che le trasformano in cellule tumorali. Istologicamente, i tumori polmonari sono classificati in due principali categorie: il carcinoma a piccole cellule (SCLC) e il carcinoma non a piccole cellule (NSCLC).

Il SCLC, noto anche come microcitoma polmonare, rappresenta circa il 15% dei casi di tumore al polmone. L'SCLC insorge prevalentemente nei fumatori o ex fumatori ed è associato a prognosi sfavorevole, con una sopravvivenza media a 5 anni del 7%. Questo tipo di tumore origina dalle cellule neuroendocrine che si trovano nell'epitelio bronchiale, che hanno funzioni

sensoriale e sono specializzate nella secrezione di ammine bioattive e di neuropeptidi in base alle fluttuazioni della concentrazione di ossigeno e CO₂. Il microcitoma è caratterizzato da rapida crescita, alta vascolarizzazione, instabilità genomica e precoce diffusione metastatica, specialmente al polmone, al cervello, al fegato, alle ghiandole surrenali e alle ossa.⁹. Per la diagnosi, vengono utilizzati marker specifici delle cellule neuroendocrine, come la DOPA decarbossilasi (DDC), la cromogranina A (CHGA), la molecola 1 di adesione delle cellule neurali (NCAM1 o CD56), la sinaptofisina (SYP) e la proteina associata all'insulinoma 1 (INSM1). Il NSCLC rappresenta oltre l'85% dei tumori polmonari ed è associato a una sopravvivenza media a 5 anni del 16%. I principali sottotipi istologici sono: adenocarcinoma, carcinoma squamocellulare e carcinoma a grandi cellule. L'adenocarcinoma costituisce circa il 40% dei casi di NSCLC ed è il più comune nei non fumatori. Origina prevalentemente dall'epitelio alveolare, in particolare dalle cellule alveolari di tipo 2 (AT2) che hanno funzione secernente (ghiandolare), e viene classificato in base ai diversi stadi iniziali come adenocarcinoma in situ (AIS), adenocarcinoma minimamente invasivo (MIA) e adenocarcinoma invasivo. I principali tipi di adenocarcinoma in base alla classificazione istologica includono adenocarcinoma lepidico, acinoso, papillare, micropapillare, solido, mucinoso invasivo, colloidale e adenocarcinoma non classificabile ¹⁰.

La diagnosi è supportata da analisi immunoistochimica con marcatori istologici come TTF1 e napsina-A e CK7

Il carcinoma squamocellulare (lung squamous carcinoma, LUSC) rappresenta il 25-30% dei casi di NSCLC e, a differenza dell'adenocarcinoma, presenta una prevalenza maggiore nei fumatori. Questo tumore origina dalle cellule che rivestono le vie respiratorie superiori (prevalentemente da cellule Basali e di tipo CLUB), ha una differenziazione di tipo squamoso e tende ad invadere le strutture adiacenti. La diagnosi è supportata dalla presenza quindi di cellule squamose con ponti intercellulari e cheratinizzazione e di positività all'espressione di marcatori come p40, p63, CK5 e CK6.¹¹

Il carcinoma polmonare a grandi cellule è il più raro, rappresentando il 4-9% dei NSCLC. È scarsamente differenziato e si localizza preferibilmente in sede periferica. Le cellule appaiono di grandi dimensioni al microscopio e viene diagnosticato per esclusione quando non si osservano caratteristiche ghiandolari o squamose e non si ha positività per l'espressione di marcatori immuno-istochimici tipici sottotipi istologici (NSCLC, LUSC).¹¹ .

1.1.3 Patogenesi molecolare del tumore al polmone

L'instabilità cromosomica, che comprende delezioni, duplicazioni, inserzioni e traslocazioni, svolge un ruolo cruciale nella patogenesi molecolare del tumore al polmone ¹². Le mutazioni nei geni TP53, KRAS e EGFR sono tra le alterazioni genetiche più comuni nell'adenocarcinoma polmonare. Il gene TP53 è mutato in circa il 50% dei casi e presenta mutazioni prevalentemente in una regione hotspot, che è la zona di legame al DNA. Queste mutazioni sono tipicamente di tipo missenso o nonsenso, portando alla perdita di attività della proteina.¹³ KRAS è mutato nel 25% degli adenocarcinomi e queste alterazioni si verificano prevalentemente ai codoni 12 e 13 (più comunemente G12C, G12V, G12D e G13X). Esse attivano il segnale RAS compromettendo la GTPasi intrinseca o alterando strutturalmente KRAS, rendendolo insensibile alle proteine attivanti la GTPasi, spostando l'equilibrio intracellulare complessivo a favore di uno stato attivo di KRAS. ¹⁴ Le mutazioni attivanti classiche del gene EGFR più frequenti sono le delezioni dell'esone 19 e la mutazione puntiforme L858R nell'esone 21, che insieme costituiscono l'80%-90% delle mutazioni rilevate. La prevalenza di queste mutazioni varia significativamente a seconda della regione geografica: sono molto più comuni nelle popolazioni asiatiche (40 % - 60 %) rispetto a quelle occidentali affette

da NSCLC (10 % - 15 %) ¹⁴. Con i progressi nelle tecnologie di sequenziamento di nuova generazione (next-generation sequencing, NGS), la caratterizzazione molecolare del tumore al polmone ha rivelato una serie di alterazioni che coinvolgono anche i geni ALK, ROS1, RET, NTRK1, BRAF, MET, alcune delle quali sono diventate bersagli di terapie mirate. In quest'ottica, i test molecolari per le mutazioni di EGFR, KRAS, i riarrangiamenti di ALK e ROS1 e le mutazioni BRAF V600E sono ora raccomandati per tutti i pazienti con LUAD avanzato di nuova diagnosi ¹⁵.

Nel LUSC, i geni TP53 e CDKN2A sono frequentemente mutati. TP53 è mutato nel 90% dei casi, mentre CDKN2A è inattivato in oltre il 70% dei tumori tramite metilazione, mutazioni inattivanti o delezioni. Altre mutazioni frequenti includono i geni FGFR1, PI3KCA, DDR2, EGFR e HER2 ¹⁶. Le alterazioni genetiche nei tumori dei fumatori differiscono significativamente da quelle nei non fumatori. I fumatori presentano una maggiore frequenza di mutazioni, in particolare trasversioni C-A, e mutazioni in geni come KRAS e TP53. Al contrario, nei non fumatori prevalgono le trasversioni C-T e mutazioni in geni come EGFR, ALK e ROS1 ^{14,17} Tab (1).

Frequency of Somatic Mutations and Alterations in NSCLC

Gene	Alteration type	Frequency in NSCLC
<i>EGFR</i>	Mutation	10-35%
<i>KRAS</i>	Mutation	15-25%
<i>FGFR1</i>	Amplification	20%
<i>PTEN</i>	Mutation	4-8%
<i>DDR2</i>	Mutation	~4%
<i>ALK</i>	Rearrangement	3-7%
<i>HER2</i>	Mutation	2-4%
<i>MET</i>	Amplification	2-4%
<i>BRAF</i>	Mutation	1-3%
<i>PIK3CA</i>	Mutation	1-3%
<i>AKT1</i>	Mutation	1%
<i>MEK1</i>	Mutation	1%
<i>NRAS</i>	Mutation	1%
<i>RET</i>	Rearrangement	1%
<i>ROS1</i>	Rearrangement	1%

Tab (1) Frequenza delle Mutazioni Somatiche e Alterazioni nel Cancro al Polmone Non a Piccole Cellule (NSCLC)¹⁸: La tabella riassume la frequenza delle principali mutazioni somatiche e delle alterazioni genetiche osservate nel cancro al polmone non a piccole cellule (NSCLC). Ogni riga della tabella elenca un gene specifico, il tipo di alterazione (mutazione, amplificazione, riarrangiamento), e la frequenza con cui questa alterazione è riscontrata nei casi di NSCLC.

1.1.4 Sintomatologia e diagnosi del tumore al polmone

I pazienti affetti da tumore al polmone spesso non manifestano sintomi nelle fasi iniziali della malattia. Quando i sintomi si manifestano, i più comuni includono tosse persistente, espettorato sanguinolento (emottisi), dolore toracico che aumenta con la respirazione profonda o la tosse, raucedine, perdita di appetito e di peso, respiro corto, spossatezza e frequenti infezioni respiratorie come bronchiti e polmoniti. Nei casi più avanzati, possono comparire ulteriori sintomi a seconda degli organi colpiti dalle metastasi, come dolore osseo, alterazioni neurologiche (mal di testa, debolezza o intorpidimento di un braccio o di una gamba, vertigini, problemi di equilibrio o convulsioni) e ittero ¹⁹.

Quando si sospetta un tumore al polmone (ad esempio, in presenza di emottisi o altri sintomi persistenti per oltre tre settimane), la diagnosi inizia con una radiografia del torace per identificare e localizzare eventuali lesioni tumorali. Tuttavia, questa tecnica non è sufficientemente precisa per distinguere tra masse benigne e maligne e, in caso di esito negativo, non esclude la presenza di un tumore. Pertanto, si prosegue con esami più dettagliati, come la tomografia assiale computerizzata (TAC) con contrasto, che fornisce informazioni sulla localizzazione, forma, margini della lesione primaria, invasione delle strutture circostanti e coinvolgimento dei linfonodi

mediastinici. In aggiunta, la tomografia a emissione di positroni (PET) può differenziare lesioni maligne da quelle benigne anche in noduli piccoli fino a 1 cm e rilevare eventuali metastasi a distanza. La risonanza magnetica (MRI) è utile per ottenere immagini dettagliate di tessuti molli e organi, risultando superiore alla TAC per rilevare l'invasione tumorale nei tessuti circostanti²⁰. Per una diagnosi definitiva e per la stadiazione della lesione, è necessario effettuare una biopsia del tessuto tumorale per un esame istologico/microscopico. Nei tumori primari, l'esame citologico dell'espettorato può essere utile, specialmente per i tumori centrali, rilevando circa il 71% dei tumori centrali ma meno del 50% dei tumori periferici. La broncoscopia flessibile è spesso scelta per i pazienti con tumori centrali, con una sensibilità dell'88%, scendendo al 70% per i tumori periferici. La spazzolatura e il lavaggio bronchiale invece hanno una bassa accuratezza e un ruolo marginale nel processo diagnostico¹⁹. L'agoaspirazione transbronchiale (TBNA) guidata dall'ecografia endobronchiale (EBUS) è preferibile per i tumori peribronchiali, fornendo materiale sufficiente per valutazioni istologiche e molecolari. L'EBUS-TBNA è anche utilizzata per confermare metastasi linfonodali quando la TAC o la PET mostrano linfonodi mediastinici ingrossati. Nei casi con risultati negativi, la diagnosi può essere confermata tramite mediastinoscopia, un procedimento che permette un'esplorazione

diretta del mediastino e la raccolta di campioni biotici. Infine, nei pazienti con effusione pleurica, la toracocentesi è impiegata per diagnosticare la causa dell'effusione e nel caso fosse negativa, si raccomanda una biopsia tramite toracosopia²¹.

1.1.5 Stadiazione del tumore al polmone

La classificazione degli stadi nel tumore al polmone è basata sul sistema internazionale TNM (tumor-node-metastasis), un metodo standardizzato basato sull'estensione del tumore primario (T), sull'interessamento linfonodale (N) e sulla presenza o assenza di metastasi (M). Per quanto riguarda il parametro T, sono stati stabiliti cinque livelli distinti: i) T0 indica l'assenza di tumore primario o un carcinoma in situ (Tis); ii) T1 rappresenta un tumore di dimensioni uguali o inferiori a 3 cm senza coinvolgimento della pleura viscerale o del bronco principale, ulteriormente suddiviso in T1a, T1b e T1c a seconda delle dimensioni (rispettivamente ≤ 1 cm, tra 1 e 2 cm, e tra 2 e 3 cm); iii) T2 indica un tumore di dimensioni comprese tra 3 e 5 cm, o di qualsiasi dimensione con coinvolgimento della pleura viscerale, a più di 2 cm dalla carena tracheale, o che provoca atelettasia polmonare, con sottoclassi T2a (3-4 cm) e T2b (4-5 cm); iv) T3 rappresenta un tumore di dimensioni variabili

(generalmente tra 5 e 7 cm) che invade la parete toracica, il diaframma, la pleura mediastinica, o che si trova a meno di 2 cm dalla carena tracheale; v) T4 indica un tumore che invade strutture come il mediastino, il cuore, i grossi vasi, la trachea, il corpo vertebrale, la carena, o che presenta noduli multipli in uno stesso lobo e/o versamento pleurico.²²

L'interessamento linfonodale (N) viene classificato in quattro livelli: i) N0 indica nessuna evidenza di metastasi linfonodali; ii) N1 identifica metastasi nei linfonodi bronchiali o ilari omolaterali al tumore primario; iii) N2 rappresenta metastasi nei linfonodi mediastinici e carenali omolaterali; iv) N3 riguarda metastasi nei linfonodi ilari, mediastinici e carenali controlaterali o sovraclaveari ²³. Per quanto riguarda il parametro M, che indica la presenza di metastasi a distanza, sono previsti due livelli: i) M0 per nessuna evidenza di metastasi a distanza; ii) M1 per la presenza di metastasi a distanza, suddiviso in M1a (noduli in lobi polmonari omolaterali diversi da quello del tumore, noduli o effusioni pleuriche o pericardiche), M1b (una singola metastasi extra-toracica in un singolo organo), e M1c (metastasi extra-toraciche multiple in uno o più organi) Fig(2) ²⁴. La combinazione dei livelli T, N e M determina lo stadio del tumore, che consente di definire la diagnosi, formulare una prognosi e guidare la scelta dell'approccio terapeutico. I tumori vengono quindi raggruppati in quattro stadi principali, indicati con numeri romani da I a IV. La

stadiazione clinica del tumore al polmone non a piccole cellule distingue nove tipi di stadi: IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IIIC, IVA e IVB, con tassi di sopravvivenza variabili a seconda dello stadio di diagnosi. Gli stadi da IA a IIIA, caratterizzati da scarso interessamento linfonodale e assenza di metastasi in altri organi, sono considerati operabili e mostrano una sopravvivenza media a cinque anni tra il 92% e il 36%. La presenza di metastasi a distanza colloca il tumore nello stadio IV, caratterizzato da inoperabilità e prognosi infausta, con una sopravvivenza a cinque anni compresa tra il 10% (IVA) e lo 0% (IVB) ²⁵ .

	N0	N1	N2	N3	M1a	M1b	M1c
T1a	IA1	IIB	IIIA	IIIB	IVA	IVA	IVB
T1b	IA2	IIB	IIIA	IIIB	IVA	IVA	IVB
T1c	IA3	IIB	IIIA	IIIB	IVA	IVA	IVB
T2a	IB	IIB	IIIA	IIIB	IVA	IVA	IVB
T2b	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IVA	IVA	IVB
T3	IIIB	IIIA	IIIB	IIIC	IVA	IVA	IVB
T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC	IVA	IVA	IVB

Fig(2)Stadiazione tumore al polmone ²⁴

1.1.6 Terapia del NSCLC metastatico

Le metastasi rappresentano la principale causa dell'elevata mortalità associata al cancro al polmone²⁶. Le metastasi del cancro al polmone possono interessare vari differenti organi, tra cui il cervello, le ossa, il fegato, le ghiandole surrenali.²⁷ fig (5). Questi siti metastatici sono spesso associati a specifici sottotipi istologici di cancro al polmone²⁷. L'adenocarcinoma metastatizza frequentemente alle ossa (39%) e al sistema respiratorio (22%)²⁷.

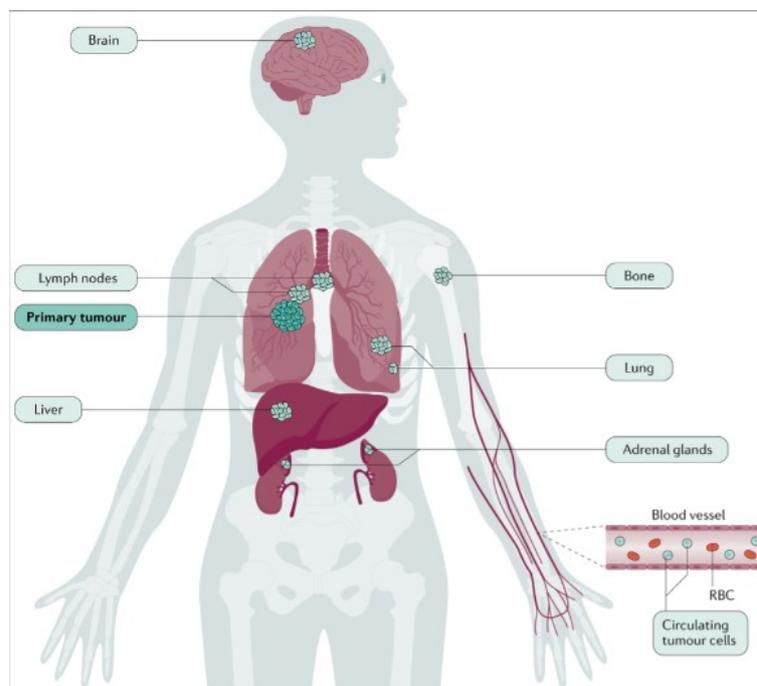


Fig (5) Metastasi più comuni nel cancro al polmone: La figura illustra il processo di metastasi, dove le cellule tumorali si diffondono dal tumore

*primario ad altre parti del corpo. Nella parte sinistra dell'immagine, viene mostrato come le cellule cancerose si staccano dal tumore primario e viaggiano attraverso il sistema linfatico e i vasi sanguigni. Una volta nel flusso sanguigno, queste cellule possono raggiungere organi distanti, dove possono formare nuovi tumori metastatici.*⁹

I principali trattamenti terapeutici di prima linea per il tumore al polmone metastatico variano significativamente a seconda della presenza o meno di mutazioni su oncogeni dette “driver”. In particolare, trattamenti di prima linea vengono selezionati in base alla presenza di specifiche mutazioni genetiche (ad esempio a carico dei geni EGFR, ALK, ROS1, BRAF ecc.) e alla caratterizzazione molecolare del tumore, permettendo così un approccio terapeutico con farmaci molecolari più personalizzato e mirato per il trattamento del tumore al polmone metastatico. Per i pazienti senza mutazioni driver, l'approccio terapeutico si basa principalmente sull'uso di immunoterapia e chemioterapia. A seconda dei livelli di espressione di PD-L1 a livello del tumore, il trattamento di prima linea fortemente raccomandato prevede l'utilizzo di inibitori del checkpoint immunitario PD-1/PD-L1 come pembrolizumab e atelizumab da solo (TPS>50%) o in combinazione con chemioterapia (TPS<50%)²⁸. La scelta del trattamento chemioterapeutico può ricadere sulla combinazione carboplatino + paclitaxel nel caso di carcinoma

squamocellulare o su carboplatino + pemetrexed nel caso di adenocarcinoma²⁹. Nei pazienti con mutazioni driver, le terapie mirate rappresentano la scelta primaria. Ad esempio, nei pazienti con mutazioni attivanti del recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR), osimertinib è raccomandato come trattamento di prima linea, poiché migliora significativamente la sopravvivenza libera da progressione (PFS) rispetto alla chemioterapia tradizionale³⁰. I pazienti con riarrangiamenti del gene ALK beneficiano di inibitori specifici come alectinib, brigatinib o lorlatinib, i quali sono stati associati a una migliore PFS rispetto al crizotinib³¹. Anche nei casi di riarrangiamenti del gene ROS1, gli inibitori come crizotinib o entrectinib sono raccomandati come terapia di prima linea³². Per quanto riguarda le mutazioni BRAFV600E, le combinazioni di inibitori di BRAF e MEK, come dabrafenib e trametinib o encorafenib e binimetinib, sono opzioni terapeutiche valide, basate su studi di fase II che hanno mostrato alte percentuali di risposta nei pazienti con NSCLC metastatico³³. Nei pazienti con mutazioni MET exon 14 skipping, gli inibitori come capmatinib e tepotinib sono raccomandati²⁸. Inoltre, per i riarrangiamenti del gene RET, selpercatinib o pralsetinib rappresentano le opzioni di trattamento preferite³⁴.

1.2 I microRNA

1.2.6 Organizzazione genomica e classificazione dei miRNA

I microRNA sono una classe di RNA conservati e non codificanti la cui lunghezza è compresa tra 17-22 nucleotidi, scoperti alla fine degli anni '90, i microRNA svolgono un ruolo cruciale nella regolazione dell'espressione genica a livello post-trascrizionale e sono riconosciuti come regolatori essenziali in numerosi processi biologici ³⁵.

L'ultima versione del database miRBase (www.mirbase.org) elenca 2.654 miRNA maturi nell' *Homo Sapiens*, ciascuno identificato da un prefisso "miR-" seguito da un numero progressivo che riflette l'ordine di scoperta. I miRNA con una sequenza identica nelle posizioni 2-8 della sequenza matura appartengono alla stessa famiglia, mentre differenze di pochi nucleotidi tra miRNA sono indicate da una lettera minuscola, come miR-125a e miR-125b. Se lo stesso miRNA maturo proviene da loci genetici diversi, viene aggiunto un suffisso numerico alla fine del nome, ad esempio miR-125b-1 e miR-125b-2. Ogni locus codifica per due miRNA maturi: uno derivante dal filamento 5'→3' del precursore e l'altro dal filamento 3'→5', indicati rispettivamente con i suffissi "-5p" e "-3p". Questo sistema di denominazione ha sostituito l'uso precedente dell'asterisco (*) per indicare il filamento meno abbondante, poiché

si è scoperto che anche il filamento passeggero o secondario può essere funzionale.

I geni miRNA sono spesso localizzati nelle regioni introniche di altri geni codificanti proteine o di lunghi RNA non codificanti (lncRNA), meno comunemente nelle regioni esoniche. In molte specie ci sono loci genici multipli di miRNA con sequenze correlate che derivano da duplicazioni geniche, formando dei cluster o unità policistroniche di trascrizione. I miRNA all'interno di un cluster sono co-trascritti ma possono essere ulteriormente regolati a livello post-trascrizionale. I miRNA intergenici sono trascritti come unità indipendenti con promotori propri. Sebbene la posizione precisa di queste regioni regolatorie non sia ancora ben definita per la maggior parte dei miRNA viene spesso dedotta dall'analisi delle isole di CpG. Alcuni geni di miRNA sono invece situati negli introni di geni codificanti proteine e condividono il promotore con il gene ospite.

1.2.7 Biogenesi e meccanismo d'azione dei miRNA

La biogenesi dei microRNA inizia nel nucleo a partire dai geni dei microRNA i quali sono trascritti dalla RNA Polimerasi II portando alla formazione dei cosiddetti costrutti primari anche chiamati pri-miRNA dotati delle

caratteristiche canoniche quali cappuccio al 5'- terminale e poliadenilazione al 3'- terminale. Il pri-miRNA è un lungo trascritto primario di circa 1000 paia di basi e la sua struttura è definita a forcina multipla, esso subisce un primo processo di maturazione (cropping) nel nucleo, durante il quale vengono rimossi segmenti alle estremità 5' e 3', formando una struttura a forcina di 60-100 nucleotidi, nota come pre-miRNA. Il taglio è mediato da un complesso proteico detto microprocessore composto da DROSHA, un'endonucleasi della famiglia delle RNAsi di tipo III, e DGCR8 (DiGeorge Critical Regulator 8), una proteina che lega l'RNA a doppio filamento conferendo specificità all'enzima. Il pre-miRNA viene quindi trasportato attivamente fuori dal nucleo attraverso il sistema Exportina-5/RanGTP. Exportina-5 (Exp-5) riconosce i due nucleotidi sporgenti al 3' lasciati dall'enzima DROSHA e funziona come un canale attivato dalla proteina RAN, la quale, idrolizzando il GTP a GDP e Pi, attiva il passaggio del pre-miRNA dal nucleo al citoplasma. Nel citoplasma avviene il secondo processo di maturazione (dicing), in cui il pre-miRNA viene ulteriormente tagliato dal complesso formato da DICER, un'altra RNAsi di tipo III, e dalla proteina TRBP. DICER interagisce con le estremità 5' e 3' delle forcine del pre-miRNA, tagliando il filamento in molecole di circa 20-22 nucleotidi in particolare Dicer taglia l'ansa terminale dallo stelo del pre-miRNA creando il duplex maturo che è lungo 18–21 coppie di basi e contiene sporgenze

in posizione 3'. Dicer contiene 2 domini RNase III catalitici, dominio Piwi-Argonaute-Zwille (PAZ) e il dominio DUF283. Il dominio PAZ riconosce il fosfato terminale 5' dei pre-miRNA e agisce da supporto al taglio all'estremità 3' dove i domini RNase III taglieranno uno strand per creare il duplex miRNA maturo ³⁶. Infine, il miRNA a doppio filamento viene riconosciuto dalle proteine AGO (AGO1-4) che si legano ad esso. Questo determina quale filamento diventerà il miRNA maturo o filamento guida, mentre l'altro filamento (miRNA*) verrà scartato Fig (3). Nelle cellule umane, AGO2 è l'unica dotata di attività catalitica. Dopo che AGO2 è stata caricata con il miRNA, il complesso si dissocia da DICER e forma un altro complesso noto come RISC (RNA-induced silencing complex)³⁷. Il complesso minimo di silenziamento indotto dai miRNA (miRISC) è costituito dal filamento guida e dall'AGO. Il nucleo del miRISC contiene una proteina Argonaute (AGO) caricata con miRNA e una proteina contenente ripetizioni glicina-triptofano di 182 kDa (GW182). La proteina Argonaute è composta da quattro domini: N-terminale, PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille), MID (dominio centrale), e PIWI (p-element induced wimpy testis). Il dominio N-terminale facilita il caricamento e lo svolgimento del miRNA. Il dominio PAZ riconosce e si ancora alle estremità 3' del miRNA. Il dominio MID, si lega al gruppo monofosfato terminale 5' e al nucleotide terminale 5' del filamento guida del miRNA. E

infine il dominio PIWI, mostra omologia con la RNasi H e ha attività endonucleolitica in AGO2, permettendo di tagliare gli mRNA bersaglio con piena complementarità ai miRNA ³⁸. Il miRISC utilizza una complementarità di basi imperfetta per identificare la sequenza bersaglio nell'mRNA tipicamente situata nella regione 3'UTR. La complementarità alla regione seed del miRNA (nucleotidi 2-7 dall'estremità 5') è cruciale per la previsione del sito bersaglio. Il pattern GW182/TNRC6 è necessario per la repressione della traduzione. GW182 funge da collegamento tra la proteina AGO e la proteina legante poli(A) (PABP) e recluta proteine effettrici come le deadenilasi PAN2-PAN3 e CCR4-NOT e fattori di decapping DCP1/2. Il dominio carbossiterminale di GW182 è responsabile del reclutamento di queste proteine. Una volta che il miRISC è legato all'mRNA bersaglio, uno dei primi passi nella degradazione dell'mRNA è la deadenilazione ovvero la rimozione della coda poli(A) dall'estremità 3' dell'mRNA. La deadenilazione è mediata principalmente dal complesso CCR4-NOT. Questo complesso è composto da diverse subunità che possiedono attività di deadenilasi. Le principali subunità coinvolte sono CCR4a/b e CAF1, che rimuovono progressivamente la coda poli(A) dell'mRNA. Dopo la deadenilazione, l'mRNA diventa soggetto al decapping cioè la rimozione del cappuccio 5'. Questa è una struttura modificata che protegge l'mRNA dalla degradazione. Il decapping è mediato dal complesso

DCP1-DCP2 con l'assistenza di altre proteine come EDC3 e Pat1, che facilitano la rimozione del 5' cap dell'mRNA. Una volta che l'mRNA è stato deadenilato ed è avvenuto il decapping, viene rapidamente degradato dagli esosomi e dalle endonucleasi citoplasmatiche. Dopo il decapping, l'mRNA è degradato dall'esonucleasi XRN1 che degrada l'mRNA dalla direzione 5' verso 3'. Simultaneamente il complesso dell'exosoma degrada l'mRNA dalla direzione 3' verso 5' ³⁹.

Un'altra modalità attraverso cui il miRISC inibisce la traduzione è l'interferenza con il reclutamento dei ribosomi. Il miRISC impedisce la formazione del complesso di iniziazione della traduzione 43S, bloccando l'interazione tra il fattore di iniziazione eucariotico eIF4E e il cappuccio 5' dell'mRNA. Questo impedimento è cruciale perché eIF4E è responsabile del legame del cappuccio 5', un passaggio iniziale fondamentale per il reclutamento dei ribosomi e l'avvio della traduzione. ⁴⁰ Inoltre, il miRISC può agire anche in fasi successive all'inizio della traduzione. Per esempio, può interferire con il prolungamento della catena polipeptidica o con la terminazione della sintesi proteica. Questo può essere realizzato attraverso l'interazione del miRISC con altre proteine effettrici che modificano direttamente i ribosomi o i fattori di elongazione ³⁹ Fig(4).

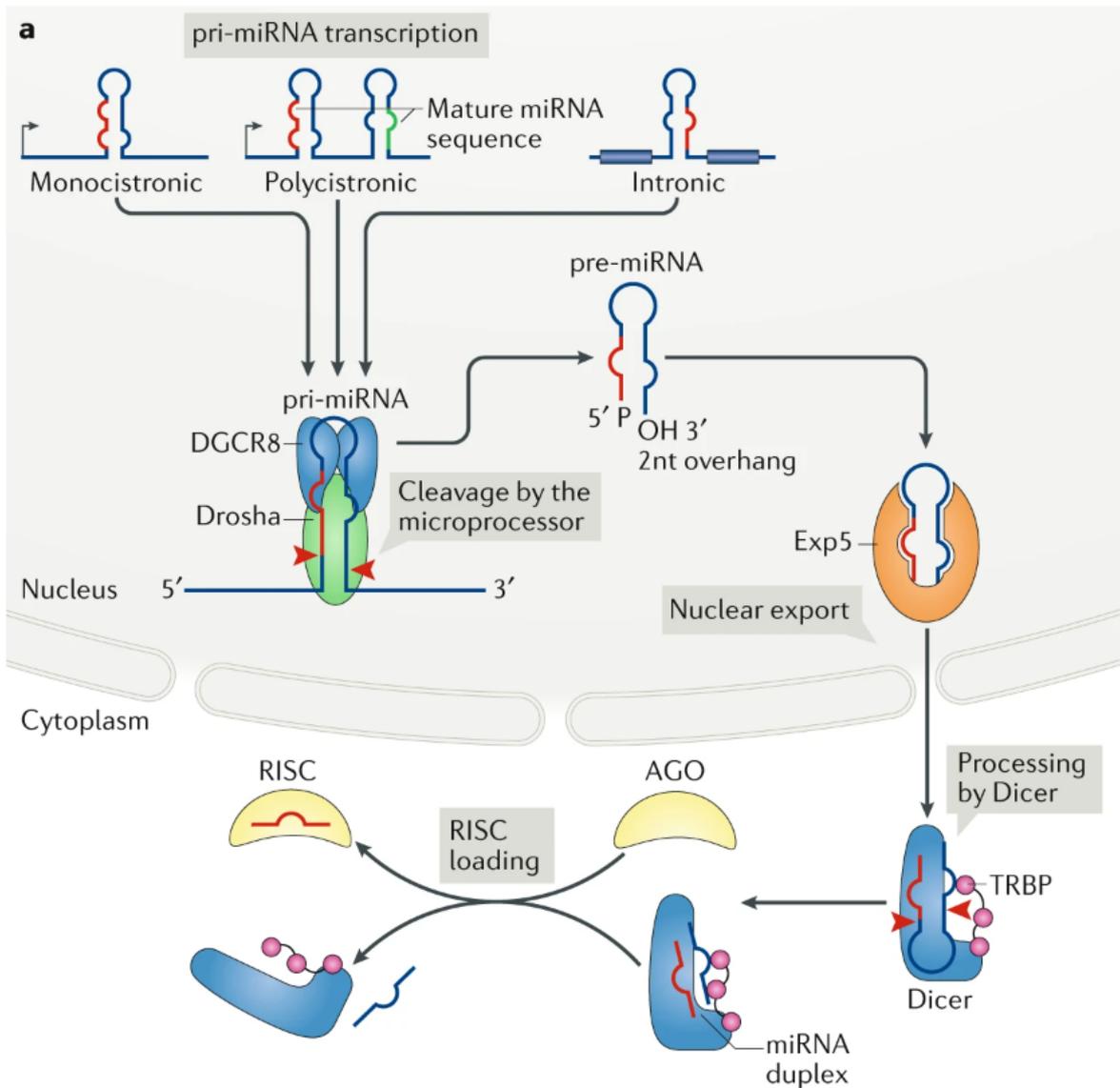


Fig (3) Il Processo di Biogenesi dei miRNA: La figura illustra le varie fasi della biogenesi dei miRNA, dal trascritto primario (pri-miRNA) alla formazione del complesso RISC (RNA-induced silencing complex) ⁴¹.

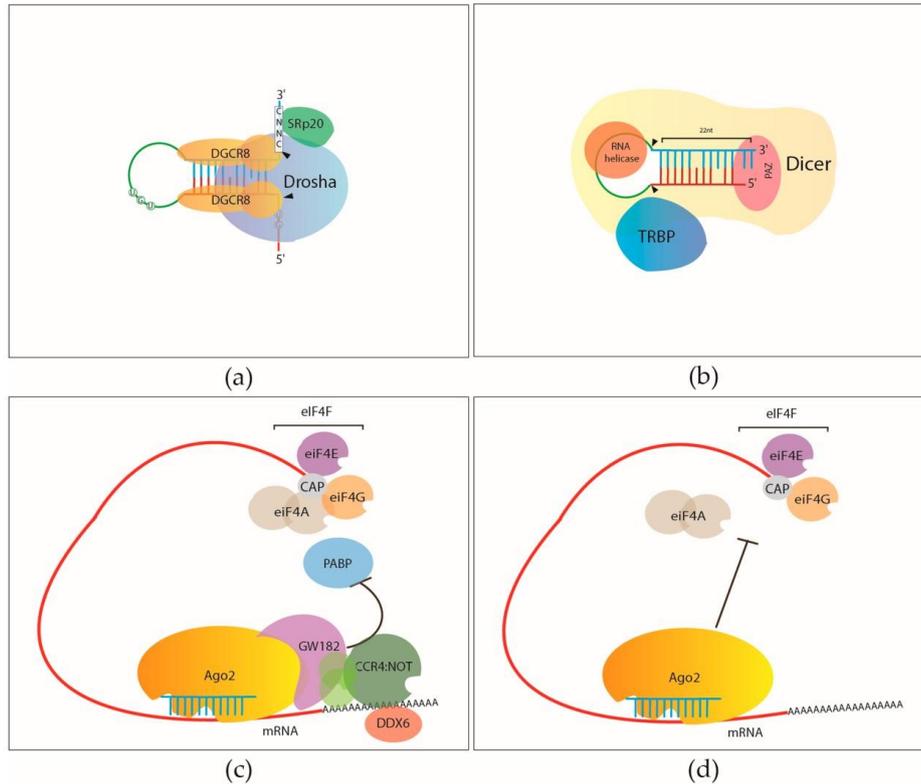


Fig (4) Processi Molecolari del Biogenesi e della Funzione del miRNA: (a) **Biogenesi del pri-miRNA:** Questa sezione illustra il processo di clivaggio del pri-miRNA mediato da Drosha e DGCR8 nel nucleo. Drosha, insieme al co-fattore DGCR8, riconosce e taglia il pri-miRNA per formare il pre-miRNA. (b) **Processamento del pre-miRNA:** Il pre-miRNA viene esportato nel citoplasma dove la Dicer, con l'aiuto di TRBP, processa il pre-miRNA in un miRNA a doppio filamento di circa 22 nucleotidi. (c) **Repressione Traslazionale Mediata dal miRISC:** Il miRNA maturo viene caricato nella proteina Argonaute (Ago2), formando il complesso miRISC. GW182 si associa ad Ago2, reclutando complessi deadenilasi come CCR4-NOT, che rimuovono la coda

*poli(A) dell'mRNA bersaglio, portando alla sua destabilizzazione e degradazione. (d) Inibizione dell'Iniziazione della Traduzione: Il miRISC può impedire l'iniziazione della traduzione interferendo con il complesso eIF4F, in particolare bloccando l'interazione tra eIF4E e il cappuccio 5' dell'mRNA, prevenendo così il reclutamento dei ribosomi e l'avvio della traduzione.*⁴²

1.2.8 Ruolo dei miRNA nel processo metastatico del tumore al polmone.

L'espressione dei miRNA è fortemente alterata nel cancro a causa di numerosi meccanismi molecolari presenti nelle cellule tumorali. Questi meccanismi includono anomalie cromosomiche, alterazioni nel controllo trascrizionale ed epigenetico e difetti nel macchinario responsabile della biogenesi dei miRNA. I miRNA influenzano diversi processi molecolari essenziali per lo sviluppo e la progressione del tumore. I miRNA si dividono in due categorie principali: i miRNA oncogeni (oncomiR) che attivano meccanismi oncogenici e/o reprimono geni oncosoppressori, e i miRNA soppressori tumorali (TS-miR) che possono inibire gli oncogeni. I miRNA giocano un ruolo cruciale anche in vari aspetti della biologia tumorale, dalla transizione epitelio-mesenchimale (EMT) alla formazione di un microambiente favorevole alla metastasi⁴³. Ad esempio, la famiglia miR-200, che include miR-200a, miR-200b, miR-200c,

miR-141 e miR-429, inibisce i fattori di trascrizione ZEB1 e ZEB2, noti promotori dell'EMT ⁴⁴. La riduzione dell'espressione dei miRNA della famiglia miR-200 permette l'attivazione di ZEB1 e ZEB2, favorendo così l'EMT e la disseminazione delle cellule tumorali ⁴⁵. Il miR-21 è frequentemente sovra-espresso nei tumori polmonari e contribuisce alla progressione del cancro attraverso la repressione di geni oncosoppressori come PTEN e TPM1 ⁴⁶. Questa sovraespressione riduce l'apoptosi e aumenta la proliferazione e l'invasione cellulare, facilitando la crescita metastatica ⁴⁷. Allo stesso modo, il miR-10b promuove la migrazione e l'invasione delle cellule tumorali polmonari regolando negativamente HOXD10, un soppressore della metastasi ⁴⁸. Il miR-30a-5p inibisce l'invasione e la metastasi nel NSCLC attraverso la regolazione negativa della proteina metastasi-associata 1 (MTA1) ⁴⁹. Inoltre, il miR-126 sopprime le metastasi nel carcinoma polmonare inibendo il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), cruciale per l'angiogenesi. La riduzione dell'espressione di miR-126 è associata a un aumento delle capacità metastatiche delle cellule tumorali ⁵⁰. Il miR-145 è noto per la sua capacità di inibire la migrazione e l'invasione delle cellule tumorali attraverso la regolazione negativa di bersagli come ADAM17 e IGF1R. La sua ridotta espressione è correlata a una maggiore invasività e capacità metastatica nel cancro al polmone ⁵¹. Al contrario, il miR-155, frequentemente sovra-espresso

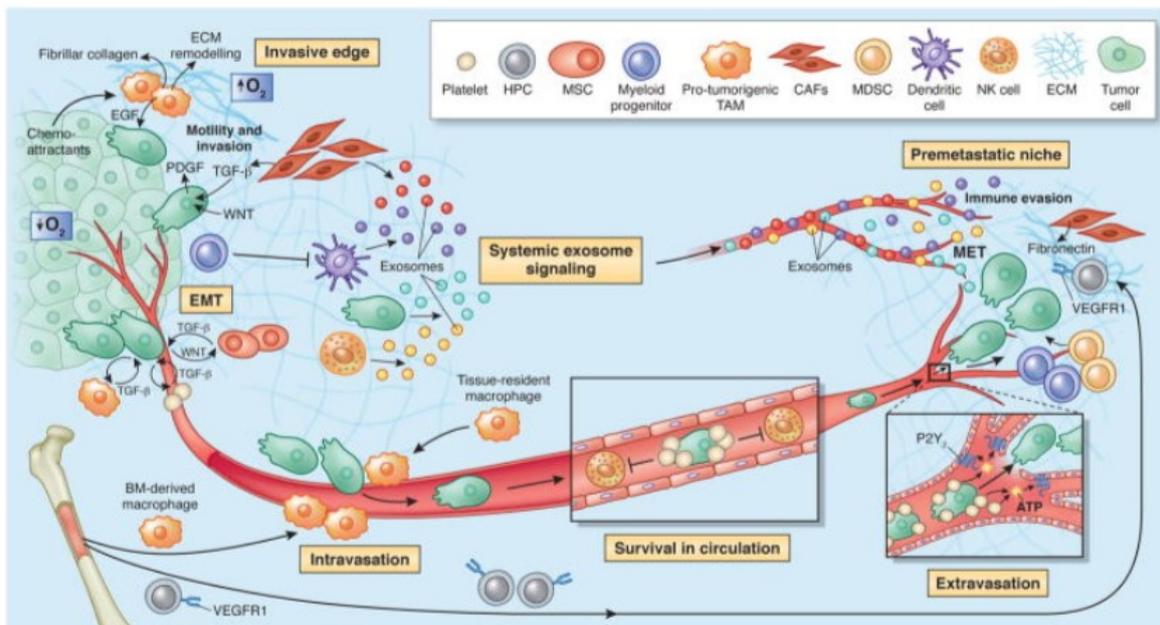
nei tumori polmonari, promuove le metastasi regolando geni associati alla proliferazione e migrazione cellulare, come il gene oncosoppressore SOCS1⁵². Il miR-34a agisce come un oncosoppressore, inibendo il processo metastatico nel carcinoma polmonare attraverso la regolazione di vari geni legati alla crescita cellulare, all'apoptosi e alla metastasi, come BCL2, MYC e MET⁵³. Il miR-148a riduce la metastasi del carcinoma polmonare inibendo la proteina metastasi-associata 1 (MTA1) e la metalloproteinasi 7 (MMP7), entrambe implicate nella degradazione della matrice extracellulare e nell'invasione cellulare⁵⁴. Il miR-7 inibisce la metastasi del carcinoma polmonare sopprimendo l'espressione del recettore del fattore di crescita dell'epidermide (EGFR). La sua espressione ridotta è associata a un aumento delle capacità metastatiche delle cellule tumorali. In sintesi, i miRNA regolano vari aspetti della metastasi del cancro al polmone, influenzando la migrazione, l'invasione, l'angiogenesi e la creazione di un microambiente favorevole alla crescita tumorale. Una comprensione più approfondita di questi meccanismi potrebbe offrire nuove opportunità per lo sviluppo di terapie mirate contro il cancro metastatico⁵⁵.

1.3 LA METASTASI

1.3.1 La cascata metastatica

Lo sviluppo di tumori secondari lontani dal sito del cancro primario, noto come “ metastasi ” è la causa principale del fallimento delle terapie antitumorali e della mortalità nei pazienti oncologici ⁵⁶. Le metastasi richiedono che le cellule tumorali lascino il sito primario, circolino nei vasi sanguinei o linfatici, sopportino la pressione del sangue nei vasi, si adattino a un nuovo ambiente cellulare in un sito secondario e sfuggano agli attacchi del sistema immunitario. ⁵⁷. Hanahan e Weinberg identificano "l'attivazione dell'invasione e delle metastasi" come un segno distintivo del cancro ⁵⁸. In effetti, l'invasione dei tessuti vicini e la colonizzazione di siti distanti per formare metastasi è una caratteristica centrale della malignità del cancro. La metastasi è un processo multi-step che include diverse fasi chiave, ognuna delle quali è fondamentale per la disseminazione delle cellule tumorali dal tumore primario ai siti secondari ⁵⁹ Fig (6) . Il processo di metastasi del cancro al polmone si articola in diverse fasi, fondamentali per la diffusione delle cellule tumorali nel corpo. Nella prima fase della cascata metastatica si assiste all' invasione della membrana basale e migrazione cellulare. Le cellule tumorali acquisiscono quindi la capacità di invadere i tessuti circostanti, superando la barriera della

membrana basale, che è un sottile strato di matrice extracellulare separante l'epitelio dal tessuto sottostante. Dopo aver attraversato questa barriera, le cellule tumorali migrano attraverso il microambiente tumorale (TME), un processo mediato da cambiamenti nell'adesione cellulare e nella struttura del citoscheletro, spesso facilitato dall'attivazione di proteasi come le metalloproteinasi della matrice (MMP). Successivamente, le cellule tumorali entrano nei vasi sanguigni o linfatici vicini, iniziando a circolare nel corpo (intravasazione nel sistema vascolare o linfatico). Questo passaggio è facilitato dalla perdita di adesione cellulare e dall'attività delle proteasi. Una volta nel flusso sanguigno, le cellule tumorali devono sopravvivere agli attacchi del sistema immunitario e alle forze meccaniche. Per aumentare la loro sopravvivenza, le cellule possono formare aggregati. Le cellule tumorali che sopravvivono nel flusso sanguigno devono poi uscire dai vasi sanguigni per colonizzare nuovi tessuti, un processo noto come extravasazione. Questo richiede la capacità di aderire all'endotelio vascolare e di degradare nuovamente la matrice extracellulare. Infine, le cellule tumorali proliferano e formano nuovi tumori nei siti secondari, influenzate dal microambiente del nuovo tessuto che le accoglie ⁶⁰.



Fig(6) Fasi della Metastasi e Coinvolgimento delle Molecole di Segnalazione: L'immagine illustra le diverse fasi del processo metastatico, evidenziando i meccanismi molecolari e cellulari che permettono alle cellule tumorali di invadere i tessuti circostanti e disseminarsi attraverso il corpo.⁶¹

Un ruolo importante all'interno del processo metastatico è svolto dal TME. La comunicazione tra le cellule tumorali e il TME associato è fondamentale per la crescita del tumore, l'invasione e la metastasi ⁶¹. Questa interazione influenza l'iniziazione della malattia, la progressione e la prognosi del paziente. Il TME supporta le cellule tumorali nel lasciare il sito primario e stabilirsi in organi secondari, fornendo segnali cruciali per il processo metastatico.⁶¹. Inoltre, un

altro meccanismo fondamentale per la progressione metastatica è la transizione epitelio-mesenchimale (EMT) ⁵⁷. L'EMT è una trans-differenziazione attraverso il quale le cellule epiteliali trasformate acquisiscono caratteristiche proprie delle cellule di tipo mesenchimali che le consentono di invadere, resistere allo stress e diffondersi ⁵⁷. Normalmente, le cellule epiteliali sono immobili e strettamente adese tra loro e alla matrice extracellulare (ECM) circostante. Tuttavia, l'EMT induce modifiche biochimiche reversibili che permettono a queste cellule di adottare appunto un fenotipo mesenchimale. Questo cambiamento conferisce alle cellule epiteliali una plasticità epiteliale-mesenchimale, fondamentale per la progressione del cancro e la formazione delle metastasi ⁵⁷ Fig (7).

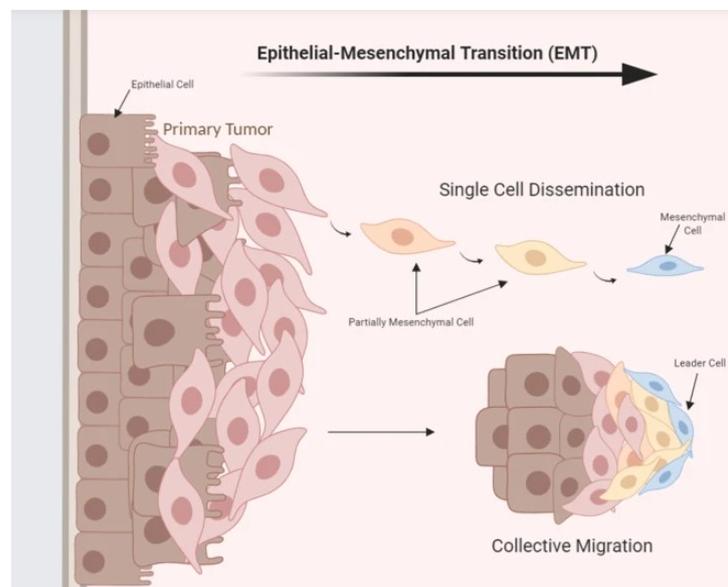


Fig (7) Transizione Epitelio-Mesenchimale (EMT) e Disseminazione delle Cellule Tumorali: La figura illustra il processo di Transizione Epitelio-

*Mesenchimale (EMT) e le modalità di disseminazione delle cellule tumorali durante la progressione del cancro*⁵⁷.

2. SCOPO DELLA TESI

Le metastasi rappresentano la principale causa di morte nei pazienti oncologici il cui meccanismo biologico e molecolare è tuttora poco compreso. Nel caso del cancro al polmone, circa il 66% dei pazienti presenta metastasi a livello locoregionale o in organi distanti al momento della diagnosi, con una sopravvivenza a 5 anni che varia dal 33% al 7%. A differenza dei tumori primari, che spesso possono essere trattati efficacemente con interventi chirurgici, le metastasi richiedono approcci sistemici, come la chemioterapia, le terapie mirate e l'immunoterapia. Nonostante i progressi in questi trattamenti, la maggior parte dei tumori metastatici non mostra remissioni durature dopo trattamento con questi farmaci. È quindi cruciale comprendere i meccanismi molecolari che guidano il processo metastatico e sviluppare nuove terapie per trattare le metastasi.

I miRNA sono molecole regolatorie che partecipano alla regolazione di quasi tutti i processi cellulari, inclusi quelli che portano allo sviluppo delle metastasi. Un'alterazione dell'espressione dei miRNA è stata osservata nei vari tipi di cancro, incluso il tumore al polmone. I miRNA possono regolare l'espressione di oncosoppressori e oncogeni critici per la biologia del tumore, e la loro disregolazione è stata documentata nei vari stadi della cascata metastatica. Nonostante ciò, non è ancora stata condotta un'analisi sistematica per

determinare il ruolo funzionale di ciascun miRNA umano nel processo metastatico.

Questa tesi si propone di sviluppare uno screening *in vitro* su cellule di tumore al polmone per esplorare il ruolo funzionale del miRNA umano in processi chiave della cascata metastatica come la migrazione ed invasione. L'obiettivo finale è identificare i miRNA che potrebbero influenzare questi processi nelle cellule tumorali polmonari e che potrebbero essere rilevanti nello sviluppo delle metastasi. I risultati di questo studio offriranno una visione più dettagliata del ruolo dei miRNA nella migrazione e invasione delle cellule tumorali polmonari e potranno suggerire nuovi target molecolari e quindi nuovi approcci terapeutici per il trattamento delle metastasi del tumore al polmone.

3.MATERIALI E METODI

3.1 Colture Cellulari

La linea cellulare di adenocarcinoma polmonare A549 è stata ottenuta dalla American Type Culture Collection (ATCC) ed è stata mantenuta in coltura nel terreno RPMI (Gibco) con 10% di FBS (Fetal-Bovine-Serum) (Thermo Fisher Scientific) e 1% di Penicillina/Streptomicina (Gibco, Invitrogen) ad una temperatura costante di 37 ° C in un'atmosfera umidificata con il 5% di CO₂. Periodicamente, le linee cellulari sono state sottoposte a test per rilevare la presenza di Micoplasma utilizzando la tecnica della reazione a catena della polimerasi (PCR).

3.2 Saggio di Vitalità Cellulare con PrestoBlue

La vitalità cellulare è stata valutata utilizzando il PrestoBlue™ (Life Technologies). Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti alle densità indicate e incubate a 37 °C e 5% di CO₂. Il giorno successivo, le cellule sono state trattate con dosi crescenti (0-10µg/mL) di puromicina (Gibco, Invitrogen) per 6 giorni. Al termine del trattamento, 10 uL di Presto. Blue sono stati aggiunti a ciascun pozzetto e incubati per 2 ore a 37 °C. L'assorbanza di ciascun pozzetto è stata registrata alla lunghezza d'onda di 570nm e 670nm

utilizzando un lettore di micropiastre (Biotek). I dati di assorbanza sono stati analizzati seguendo le istruzioni della ditta fornitrice.

3.3 Determinazione del titolo virale della libreria

Cellule A549 sono state seminate alla concentrazione di 4700 cellule/cm² in piastre da 96 pozzetti. Il giorno successivo è stata effettuata la conta cellulare in uno dei pozzetti mentre i restanti pozzetti sono stati infettati per 24 ore con diluzioni decrescenti della libreria lentivirale (1:5, 1:25, 1:125 e 1:625) in un volume finale di 1 ml RPMI al 10% FBS con aggiunta di polibrene (Sigma) alla concentrazione di 8µg/mL. Al termine delle 24 ore di infezione, è stato aggiunto terreno completo fresco ai pozzetti. A 48 ore dalla trasduzione, le cellule sono state analizzate al FACS (BD FACS CANTO II, Becton Dickinson, Biosciences) per valutare la percentuale di cellule GFP positive. Il titolo virale è stato calcolato utilizzando la formula:

$$\text{Titolo (unità trasducenti/ml)} = (N \times P \times D) / V$$

dove:

N = numero di cellule contate al momento dell'infezione

P = percentuale di cellule GFP positive

D = fattore di diluizione V = volume di virus in mL

3.4 Trasduzione lentivirale con la libreria lentivirale di miRNA

Circa 5,3 milioni di A549 sono state seminate ad una concentrazione di 4700 cellule/cm² per condizione sperimentale. Il giorno seguente, le cellule sono state trasdotte con la libreria lentivirale di miRNA (Dharmacon) ad una MOI (Multiplicity of Infection) di 0.3 in terreno di crescita (RPMI+10% FBS) contenente Polibrene (Sigma) ad una concentrazione di 8µg/mL. Due giorni dopo l'inizio della trasduzione, le cellule infettate sono state selezionate mediante l'aggiunta di terreno fresco contenente la puomicina (Gibco, Invitrogen) (2µg/mL) per circa 6 giorni.

3.5 Citometria a Flusso

Al momento dell'analisi, un totale di 100.000 cellule sono state risospese in una soluzione di PBS con FBS al 3%, alla quale è stato aggiunto, con una diluizione 1:100, il marcatore di vitalità DRAQ7 (Thermo Fisher). Dopo un'incubazione di 5 minuti a 4 °C su rotatore, le cellule sono state lavate e successivamente analizzate allo strumento BD FACS CANTO II utilizzando come eccitazione un laser con lunghezza d'onda 488 nm. L'analisi dei dati ottenuti è stata effettuata mediante il software FlowJo (Biosciences).

3.6 Saggi di Migrazione ed Invasione

I saggi di migrazione e invasione sono stati eseguiti utilizzando trans-well con membrana in policarbonato da 8,0 μm (Falcon; Corning, NY, USA). Nel saggio di invasione prima di piastrare le cellule, è stato aggiunto uno strato di Matrigel (Matrigel growth-factor reduced; Corning) concentrato a 150 $\mu\text{g/ml}$ sulla membrana dei trans-well (Corning) ed è stato lasciato solidificare in incubatore a 37 °C per 2 ore. Le cellule sono state risospese in terreno RPMI senza FBS e seminate a una densità di 10000 cellule nella camera superiore dei trans-well. Nella camera inferiore è stato aggiunto terreno RPMI con aggiunta del 20% di FBS, utilizzato come fattore chemo-attrattente. Dopo 16 ore di incubazione le cellule migrate o invase sono state recuperate e sono state sottoposte ad altri due round di migrazione o invasione. Dopo il terzo round di selezione fenotipica, le cellule sono state nuovamente sottoposte ad un saggio di migrazione o invasione. In questo caso, al termine delle 16 ore di incubazione, i transwell sono stati fissati con Paraformaldeide (PFA) al 4% e i nuclei delle cellule sono stati colorati con DAPI (1ng/ml; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA). Le cellule presenti nella camera superiore che non hanno migrato e invaso sono state rimosse con tampone di cotone e lavate due volte con PBS 1X. Dopo colorazione con DAPI, sono state acquisite dieci immagini con

ingrandimento 10X per ogni trans-well utilizzando il microscopio Eclipse TE300 (Nikon). Le cellule migrate ed invase sono state valutate contando i nuclei con Cell Count del Software Fiji.

3.7 Estrazione DNA genomico, amplificazione dei costrutti mediante PCR e sequenziamento delle librerie

Al termine della selezione fenotipica, le cellule sono state raccolte e il DNA genomico è stato isolato utilizzando un kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) secondo le istruzioni del produttore. Il DNA isolato da un totale di 1.330.000 cellule (quantitativo di cellule necessario per mantenere una rappresentazione di circa 500 volte per costrutto) è stato quantificato utilizzando uno spettrofotometro (Nanodrop, Thermo Scientific). I costrutti dei miRNA sono stati poi amplificati mediante PCR secondo le condizioni indicate dal produttore (Tab 2). Brevemente, 825 ng di DNA genomico sono stati amplificati in un volume di 50 μ l utilizzando la DNA Polimerasi Phusion Hot Start II (Thermo Fisher Scientific), e una coppia di primers (SMART Forward PCR primer e SMART Vector Reverse Index PCR primer) designati per amplificare in maniera specifica le sequenze del costrutto. (Horizon Discovery Ltd., PRM7668, PRM10186).

Componente	Volume per reazione	Concentrazione finale
5x Phusion HF Buffer	10 μ L	1x
dNTPs 10 mM	1 μ L	200 μ M ciascuno
SMARTvector Forward PCR Primer (50 μ M)	0.5 μ L	0.5 μ M
SMARTvector Reverse Index PCR Primer (50 μ M)	0.5 μ L	0.5 μ M
Betaine 5 M	5 μ L	0.5 M
gDNA + H ₂ O grado PCR	31 μ L	~ 825 ng/reazione
Phusion Hot Start II DNA Polymerase (2 U/ μ L)	2 μ L	0.08 U/ μ L
Totale	50 μL	

Tab (2) La tabella fornisce una panoramica dei componenti e dei volumi necessari per preparare una reazione di PCR utilizzando il Phusion Hot Start II DNA Polymerase. Ogni componente è elencato insieme al volume richiesto per reazione e alla concentrazione finale raggiunta nella miscela di reazione.

Per mantenere la rappresentazione di circa 500 volte per costrutto, sono state combinate per ogni condizione sperimentale 15 PCR. La PCR è stata eseguita a 98 °C per 3 minuti seguiti da 23 cicli di 98 °C per 10 secondi, 60 °C per 15 secondi, 72 °C per 15 secondi e 72 °C per 5 minuti su un termociclatore T100 TM (Bio-Rad, #1861096). I prodotti di PCR sono stati poi purificati utilizzando il kit PCR Purification Kit (Qiagen) secondo le istruzioni del produttore. Successivamente, gli ampliconi purificati sono stati analizzati mediante elettroforesi utilizzando il kit High sensitivity D1000 Screen Tape (Agilent) e

lo strumento Tape station 2200 (Agilent) e poi quantificati mediante il kit Qubit 1x dsDNA High sensitivity (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific) e lo strumento Qubit (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific). La concentrazione molare di ciascun campione è stata calcolata utilizzando la formula

$$\frac{\frac{ng}{\mu L}}{660 \frac{g}{mol} \times average\ library\ size} \times 10^6 = Molarity\ (nM)$$

Tutti i campioni sono stati quindi mescolati in concentrazione equimolare in maniera tale da ottenere un pool della libreria ad una concentrazione di 4nM. Il pool diluito e denaturato è stato quindi caricato su una flow cell (Mid Output Kit v2.5, 300 cycles, Illumina) alla concentrazione di 1,3 pM e sequenziato con una single read di 75 cicli utilizzando il sequenziatore Next seq 500 (Illumina).

3.8 Analisi Bioinformatica dei dati di sequenziamento e identificazione degli Hit

I dati di sequenziamento (FASTQ data) sono stati allineati ad un file di riferimento fornito dalla ditta produttrice contenente le sequenze di tutti i costrutti dei miRNA che compongono la libreria lentivirale utilizzando Bowtie2, creando un indice e allineando le letture per ogni campione. I file di allineamento SAM sono stati convertiti in file di conteggio (.count). L'analisi differenziale dell'abbondanza dei costrutti tra le condizioni sperimentali e di controllo è stata eseguita mediante t-test non accoppiato (DESeq tool) e quantitative trait analysis (BRB tool). Sono state considerate significative le variazioni con $P < 0.01$ e Fold change di $|1.2|$ nel caso di DESeq e di $P < 0.05$ nel caso di BRB. Il clustering gerarchico e la creazione delle heatmap sono stati effettuati utilizzando Cluster 3.0 (<http://bonsai.hgc.jp/wmdehoon/software/cluster/>) e Java Treeview (<http://jtreeview.sourceforge.net>).

4.RISULTATI

4.1 Descrizione della libreria lentivirale utilizzata per lo studio funzionale del miRNoma umano nei processi di migrazione ed invasione delle cellule tumorali polmonari.

Per studiare il ruolo funzionale dei miRNA nei processi di migrazione e invasione delle cellule tumorali polmonari abbiamo deciso di condurre uno screening a larga scala utilizzando shMIMIC Lentiviral human microRNA Pooled Library (Horizon). Questa libreria è composta da un pool di costrutti lentivirali che esprimono *mimics* di microRNA maturi per la sovraespressione di microRNA. In particolare, la libreria contiene un totale di 2555 costrutti che permettono l'overespressione di 2580 microRNA umani maturi annotati nel database miRBase v21. Il pool comprende inoltre controlli negativi, ovvero 30 shRNA che non colpiscono nessun target, oltre a controlli specifici per geni codificanti proteine housekeeping (otto costrutti per gene, per un totale di 80 shRNA). Ciascun costrutto lentivirale è composto da: i) uno specifico promotore di interesse, che consente l'espressione dei geni di interesse inseriti nel costrutto; ii) il gene per la proteina reporter turboGFP, per il monitoraggio visivo della trasduzione e dell'espressione; iii) il gene per la resistenza alla puomicina, che consente la pressione selettiva con antibiotico e la

propagazione degli integranti stabili; iv) uno SMARTvector universal scaffold, uno scaffold proprietario in cui è inserito il microRNA maturo da sovraesprimere (Figura 8).

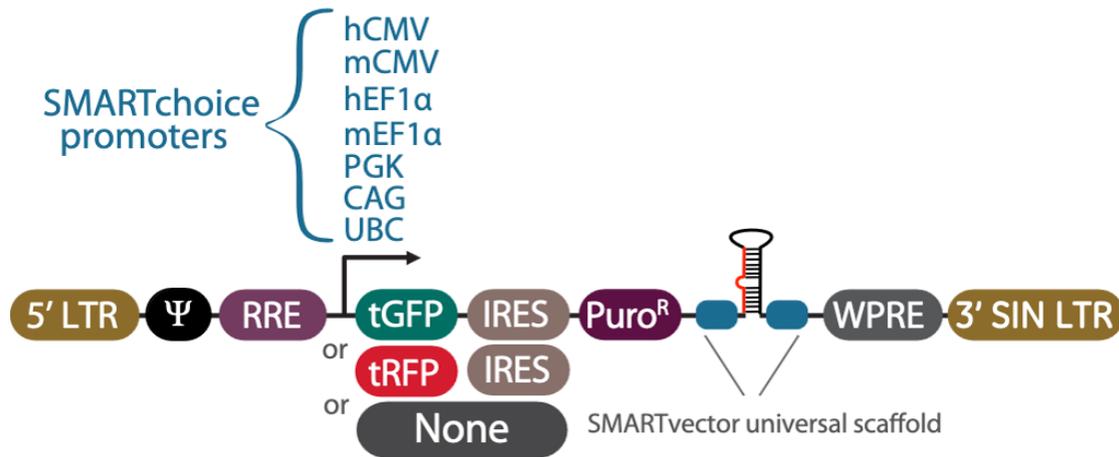


Fig (8) Struttura del Vettore Lentivirale SMARTvector utilizzato nella shMIMIC Lentiviral human microRNA Pooled Library. Rappresentazione schematica della mappa del vettore lentivirale utilizzato per costruire la libreria lentivirale. Le varie configurazioni possibili in termini di promotore virale e proteina reporter sono riportate.

4.2 Selezione del promotore ottimale per la libreria lentivirale di miRNA

La forza dell'attività di un promotore varia a seconda del contesto biologico e può influenzare significativamente i risultati sperimentali. In particolare, l'attività del promotore differisce a seconda del tipo cellulare che viene

utilizzato ⁶². Pertanto, è fondamentale selezionare il promotore che presenta la massima attività nel tipo di cellule specifico utilizzato, al fine di ottimizzare l'espressione di un costrutto di interesse. Di conseguenza, prima di procedere all'acquisizione della libreria lentivirale di miRNA, abbiamo inizialmente ottimizzato le opzioni di configurazione del vettore valutando quale potesse essere il promotore ottimale per l'espressione costitutiva dei costrutti oversprimenti i miRNA nella linea cellulare di interesse. In particolare, abbiamo focalizzato la nostra attenzione sulle cellule A549, una linea cellulare di adenocarcinoma polmonare isolata dal polmone di un paziente caucasico di 58 anni affetto da carcinoma polmonare con mutazione nel gene KRAS (p.G12S c.34G>A). Questo modello cellulare è facilmente manipolabile in vitro e ampiamente utilizzato in letteratura per studiare il ruolo dei miRNA nel tumore al polmone ⁶³. Le cellule A549 sono state quindi infettate con dei vettori di controllo esprimenti la proteina reporter TurboGFP sotto il controllo di sette promotori diversi (citomegalovirus umano [CMV], CMV murino, fattore di elongazione 1 alfa umano [EF1a], EF1a murino, chinasi del fosfoglicerato murino [PGK], ubiquitina C umana [UBC] e un costrutto ibrido sintetico costituito dall'enhancer CMV fuso ai promotori dell'actina beta del pollo [CAG]). Brevemente, le cellule sono state seminate e dopo 24 ore sono state trasdotte con i diversi vettori a titolari virali crescenti (8×10^5 TU, 4×10^5 TU,

2x10⁵ TU). A tre giorni dalla trasduzione, abbiamo poi analizzato l'espressione della proteina reporter TurboGFP mediante microscopia. Come riportato in Figura 9, il promotore CMV murino ha mostrato la massima espressione di TurboGFP nelle cellule, seguito poi dal promotore CMV umano mentre gli altri promotori analizzati hanno invece mostrato un'espressione della proteina reporter molto bassa anche a titoli virali molto alti. Sulla base di questi dati abbiamo quindi deciso di utilizzare una libreria lentivirale in cui l'espressione dei miRNA fosse sotto il controllo del promotore CMV murino.

Lentivirus Diluzione Seriale

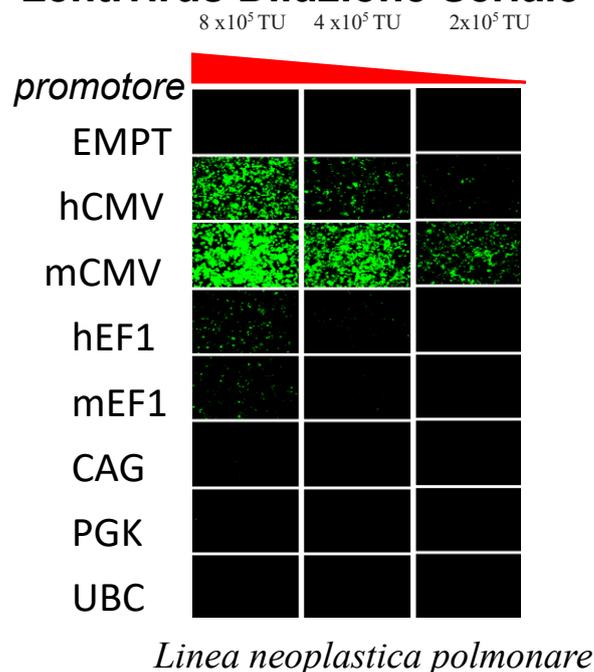


Figura 9 - Selezione del promotore ottimale per la libreria lentivirale di miRNA. Immagini di microscopia a fluorescenza di cellule infettate a dosi

crescenti di titolo virale con costrutti lentivirali esprimenti la proteina reporter TurboGFP sotto il controllo dei promotori indicati.

4.3 Ottimizzazione il protocollo della trasduzione con i lentivirus

Oltre all'efficienza del promotore, numerosi altri parametri possono influenzare l'efficienza di trasduzione dei vettori lentivirali e devono essere ottimizzati in laboratorio prima di procedere con lo screening su larga scala. Ad esempio, il mezzo di trasduzione e, in particolare, basse quantità di siero possono ridurre la presenza di fattori che inibiscono l'infettività delle particelle virali, potenzialmente aumentando l'efficienza di trasduzione a discapito però della vitalità cellulare ⁶⁴. L'aggiunta di polimeri cationici come il polibrene al terreno di coltura, seppure con un relativo rischio di tossicità cellulare a seconda della concentrazione utilizzata, può ridurre la carica superficiale delle cellule e quindi facilitare l'entrata del virus ⁶⁵. Anche la densità con cui le cellule sono seminate può influenzare l'efficienza di trasduzione; le cellule in fase di divisione possono essere più suscettibili alla trasduzione rispetto alle cellule quiescenti ⁶⁶. Infine, il tempo durante il quale le cellule sono esposte al vettore lentivirale, solitamente tra le 4 e le 24 ore, può influenzare l'efficienza di trasduzione. Un'esposizione più lunga può migliorare la trasduzione, ma potrebbe anche aumentare il rischio di tossicità ⁶⁷.

Abbiamo quindi determinato le condizioni ottimali di trasduzione dei vettori lentivirali per la specifica linea cellulare utilizzata, testando questi parametri all'interno delle cellule A549. Le cellule sono state piastrate a differenti concentrazioni e lasciate crescere *overnight*. Successivamente, sono state trattate con terreno completo al 10% FBS o terreno senza FBS in presenza di dosi crescenti di Polybrene. Al termine del trattamento è stato aggiunto il colorante PrestoBlue (Invitrogen), un reagente basato sulla resazurina che fornisce una misura indiretta della vitalità cellulare. In particolare, la resazurina è un composto non tossico non fluorescente di colore blu che all'interno delle cellule vive viene convertito a resofurina, un composto di colore rosso e altamente fluorescente. Come mostrato in Figura 10, in assenza di siero, la vitalità cellulare mostra una forte tendenza a diminuire con l'aumentare della concentrazione di polibrene. Questo effetto è più marcato nelle condizioni a più alta confluenza (7200 cellule/cm²) rispetto a quelle a bassa confluenza (4700 cellule/cm²), almeno alle dosi più basse di polibrene utilizzate (0-4 µg/mL). Nelle condizioni con siero, la vitalità cellulare si mantiene più stabile anche alle concentrazioni più alte di polibrene, con una leggera diminuzione a concentrazioni elevate. Anche in questo caso, la bassa confluenza sembra conferire una maggiore vitalità almeno a concentrazioni di polibrene comprese tra 0-8 µg/mL. Questi dati indicano quindi che la presenza di siero al 10% nel

mezzo di trasduzione e una densità cellulare di 4700 cellule/cm² sono parametri sperimentali importanti per mantenere un'elevata vitalità cellulare (>95%) durante la trasduzione in presenza di una concentrazione massima di polibrene di 8 µg/mL. Il tempo di esposizione non è stato ulteriormente indagato dato che già al tempo massimo di esposizione (24 ore) sono stati ottenuti dei livelli di vitalità molto alti per la maggior parte delle condizioni prese in esame.

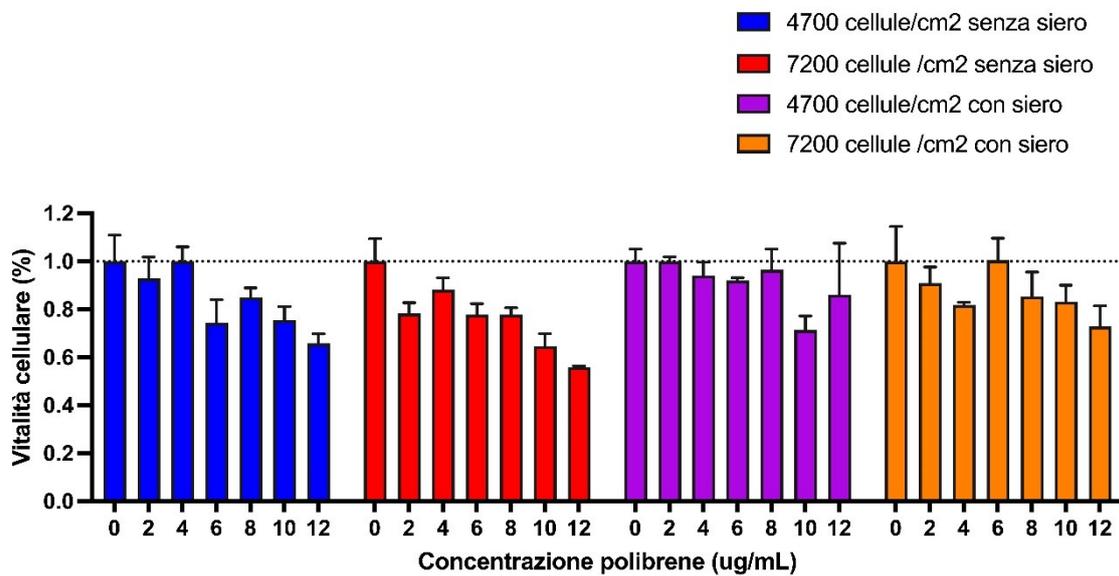


Figura 10 Ottimizzazione delle condizioni di trasduzione della linea cellulare A549. Grafico a barre che riporta la percentuale di vitalità cellulare nella linea cellulare di interesse trattata con diverse concentrazioni di Polibrene e coltivate in medium con o senza siero. La barra di errore indica la deviazione standard.

4.4 Determinazione del titolo virale nella linea A549

Il titolo delle particelle lentivirali della libreria di miRNA, riportato sul Certificato di Analisi (C of A) fornito dalla ditta produttrice, viene misurato nelle cellule HEK293T. L'efficienza di trasduzione lentivirale può variare anche in base al tipo di cellula bersaglio ⁶⁷. È quindi possibile che l'efficienza relativa di trasduzione della libreria lentivirale nella nostra linea cellulare sia diversa. Per questo motivo, abbiamo determinato il titolo virale della libreria di miRNA nelle cellule A549. Le cellule sono state piastrate alla concentrazione individuata negli esperimenti precedenti e il giorno successivo sono state trattate con diverse diluizioni di virus. Dopo due giorni, le cellule sono state staccate e la percentuale di cellule GFP positive è stata analizzata mediante citometria a flusso. Come si evince dalla Figura 11, a dosi crescenti di virus corrisponde una maggiore percentuale di cellule GFP positive. Basandosi sulla percentuale di cellule GFP positive e sulla diluizione di virus utilizzata, il titolo virale della libreria, che nelle HEK293T era di $1,53 \times 10^8$ unità trasducenti/mL, è risultato pari a $2,32 \times 10^8$ unità/mL nelle cellule A549, suggerendo quindi che l'efficienza relativa di trasduzione nelle A549 è circa 1,5 volte maggiore rispetto alle cellule HEK293T. Il titolo ottenuto nelle A549 è stato quindi

successivamente utilizzato per calcolare il volume di virus da utilizzare per infettare le cellule di interesse.

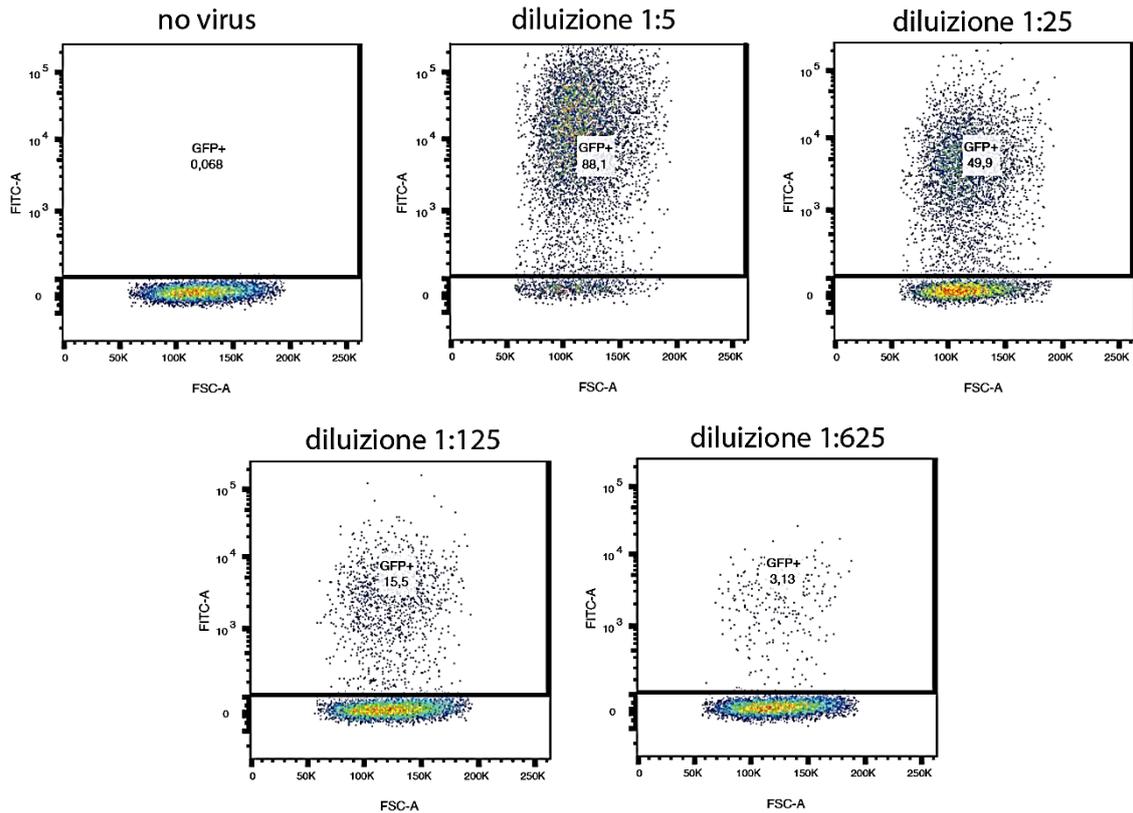


Fig (11) Analisi Citofluorimetrica del titolo virale A549: FITC vs FSC dot plot delle cellule A549 infettate con diluizioni crescenti della libreria lentivirale di miRNA. I gate, calcolati sul campione “no virus”, rappresentano la percentuale di cellule che sono turboGFP positive alle diluizioni indicate.

4.5 Ottimizzazione della selezione delle cellule trasdotte con puromicina

Il backbone del vettore contenuto nella libreria lentivirale contiene al suo interno il marcatore di selezione puromicina, che permette la selezione delle cellule che hanno integrato un costrutto. Prima di utilizzare la selezione con puromicina per generare una popolazione pura di cellule trasdotte, è fondamentale determinare la concentrazione ottimale di puromicina necessaria per eliminare le cellule non trasdotte. Generalmente, la concentrazione ottimale di puromicina è considerata quella più bassa capace di uccidere il 100% delle cellule in un arco di tempo compreso tra i 3 e i 6 giorni. Abbiamo quindi seminato le cellule alla densità ottimale individuata negli esperimenti precedenti (4700 cellule/cm²). Il giorno successivo, le cellule sono state trattate con un nuovo mezzo contenente puromicina a concentrazioni variabili (0-10 µg/mL). Le cellule sono state incubate per un periodo di 6 giorni, con sostituzioni del mezzo fresco contenente puromicina ogni 2-3 giorni. Al termine del trattamento, le cellule sono state trattate con PrestoBlue per monitorare la vitalità cellulare. Come illustrato nella Figura 11, la vitalità cellulare decresce con l'aumentare delle dosi di puromicina, raggiungendo un plateau intorno alla dose di 2 µg/mL. Dosi maggiori non inducono ulteriore mortalità cellulare, suggerendo che 2 µg/mL sia la dose minima di puromicina

capace di uccidere il maggior numero di cellule. Questa concentrazione è stata quindi scelta per garantire che solo le cellule trasdotte, ovvero che hanno integrato il costrutto, sopravvivano al trattamento con puromicina, permettendo di ottenere una popolazione cellulare pura e omogenea.

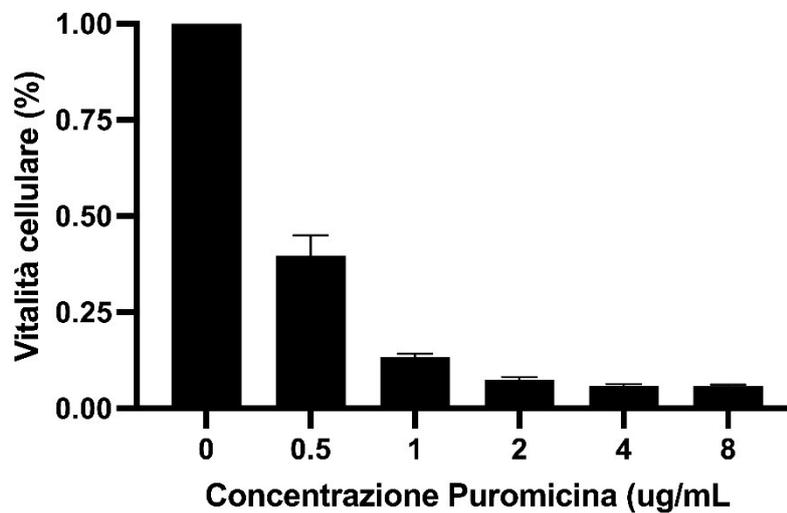


Fig (11) Effetto del trattamento con puromicina sulla vitalità cellulare. Grafico a barre che illustra la percentuale di vitalità cellulare dopo trattamento con puromicina per sei giorni alle concentrazioni di indicate. La barra di errore rappresenta la deviazione standard.

4.6 Infezione della linea cellulare con libreria lentivirale

Dopo aver ottimizzato le opzioni di configurazione del vettore (scelta del promotore) e le condizioni di trasduzione, abbiamo iniziato lo screening su larga scala. Le cellule sono state quindi seminate alla concentrazione di circa 4700 cellule per cm² e incubate overnight. Il giorno successivo, le cellule sono state trattate con le particelle virali ad un basso rapporto tra le unità di trasduzione delle particelle lentivirali e le cellule bersaglio (multiplicity of infection, MOI). In particolare, le cellule sono state trasdotte ad una MOI pari a 0.3, un valore per cui ogni cellula esprimerà un singolo costrutto in modo da associare il fenotipo cellulare alla sovraespressione di un singolo microRNA. Sulla base delle raccomandazioni fornite dal produttore e dai dati riportati in letteratura per questo genere di esperimenti, l'infezione lentivirale è stata condotta in duplicato biologico mantenendo una rappresentazione di circa 500 integrazioni indipendenti per costrutto. Infatti, un'elevata rappresentazione dei costrutti risulta in un'alta riproducibilità tra i replicati biologici e garantisce un'adeguata finestra di rilevamento per le variazioni nella rappresentazione dei costrutti dopo la selezione fenotipica ⁶⁸.

Dopo 48-72 ore dalla trasduzione, le cellule sono state trattate con puromicina per sei giorni utilizzando la dose identificata in precedenza. Al termine del

trattamento con puromicina, abbiamo analizzato l'efficienza di trasduzione mediante citofluorimetria delle cellule GFP positive. Come illustrato in Figura 12, la percentuale di cellule GFP positive dopo la selezione è stata superiore al 99% in entrambi i replicati sperimentali, suggerendo la selezione di due linee cellulari omogenee in cui ciascuna cellula esprime un particolare costrutto di miRNA ed in cui ogni costrutto è rappresentato circa 500 volte.

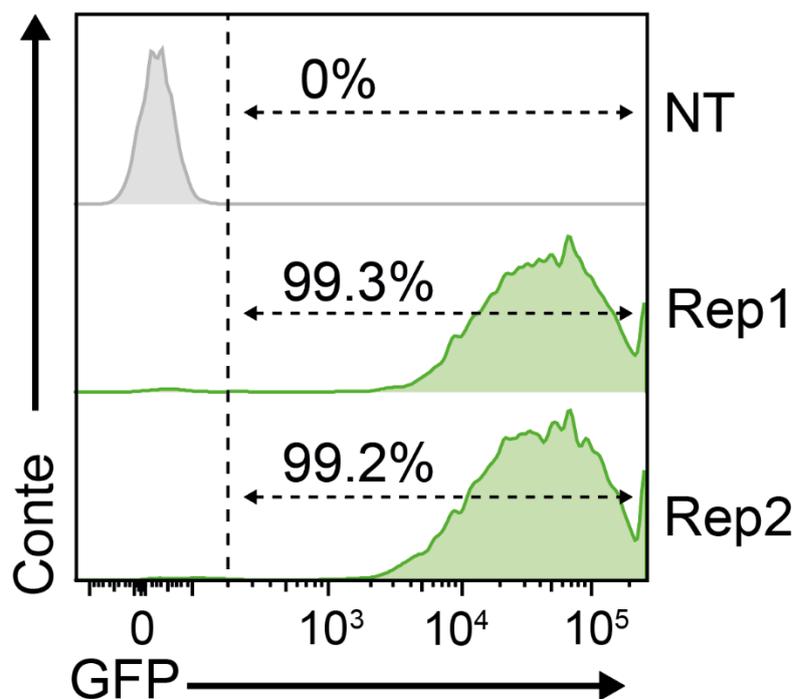


Fig (12) Analisi dell'efficienza di selezione con puromicina delle cellule A549 infettate con la libreria lentivirale di miRNA. Istogramma che riporta i livelli di espressione della proteina reporter turboGFP dopo selezione con puromicina. La percentuale di cellule turboGFP positive è riportata.

4.7 Selezione fenotipica delle cellule A549 trasdotte con la libreria di miRNA

Dopo la trasduzione, la linea cellulare A549 infettata con la libreria lentivirale di miRNA è stata sottoposta a selezione fenotipica con l'obiettivo di identificare i miRNA la cui sovraespressione fosse in grado di modificare la capacità migratoria e invasiva delle cellule. A tal fine, la linea cellulare è stata suddivisa in tre popolazioni: i) A549 controllo; ii) A549 migratorie; iii) A549 invasive (Fig 13).

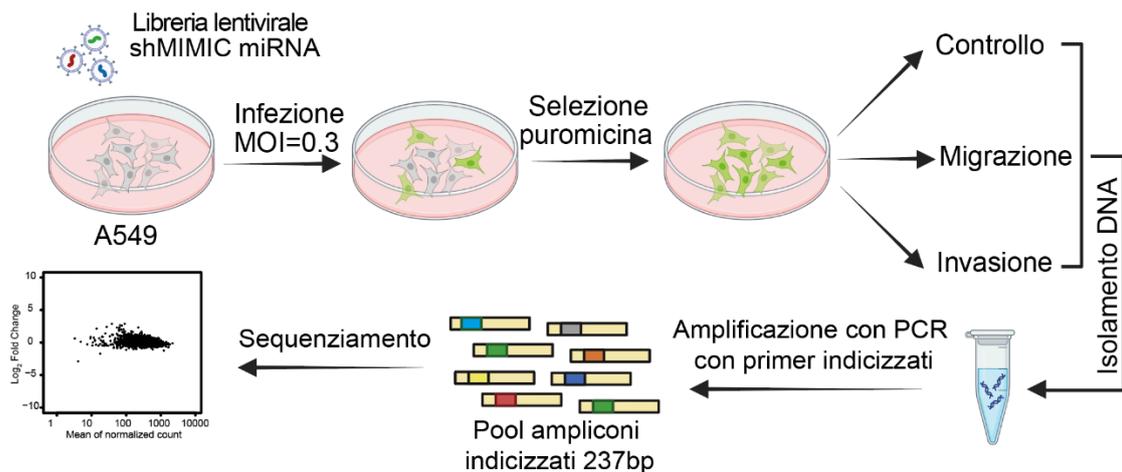


Fig (13) Schema del Protocollo di Screening per l'Identificazione di miRNA Coinvolti nella Migrazione e Invasione Cellulare. Rappresentazione schematica del protocollo sperimentale utilizzato per identificare i miRNA che influenzano la migrazione e l'invasione delle cellule A549 tramite una libreria lentivirale shMIMIC miRNA.

Le cellule A549 di controllo rappresentano una popolazione cellulare di riferimento. Queste cellule non hanno subito alcuna selezione fenotipica e sono state mantenute in coltura per tutta la durata dello screening. Per mantenere una costante ed elevata rappresentazione dei costrutti, ad ogni passaggio cellulare è stato garantito il mantenimento di un numero sufficiente di cellule corrispondente al numero desiderato di integranti lentivirali.

La linea A549 migratoria rappresenta una popolazione cellulare a cui è stata applicata una selezione fenotipica per identificare quei miRNA la cui overespressione è capace di modificare la capacità migratoria delle cellule A549. In particolare, queste cellule sono state sottoposte a tre round successivi di migrazione, ognuno della durata di circa 16 ore, attraverso transwell con pori di circa 8 μm (Fig 14). Brevemente, le cellule, attratte da una elevata concentrazione di FBS nella parte inferiore del transwell, migrano attraverso i pori e vengono poi recuperate e sottoposte a successivi round di migrazione. Al termine della pressione selettiva, abbiamo analizzato il fenotipo delle cellule arricchite attraverso questi round di migrazione in confronto con la popolazione di riferimento, che è stata mantenuta in coltura senza subire alcun trattamento. Come mostrato in Figura 15, le A549 migratorie, sottoposte a 3 round consecutivi di migrazione, mostrano una capacità migratoria di circa due volte maggiore rispetto alle cellule A549 di controllo.

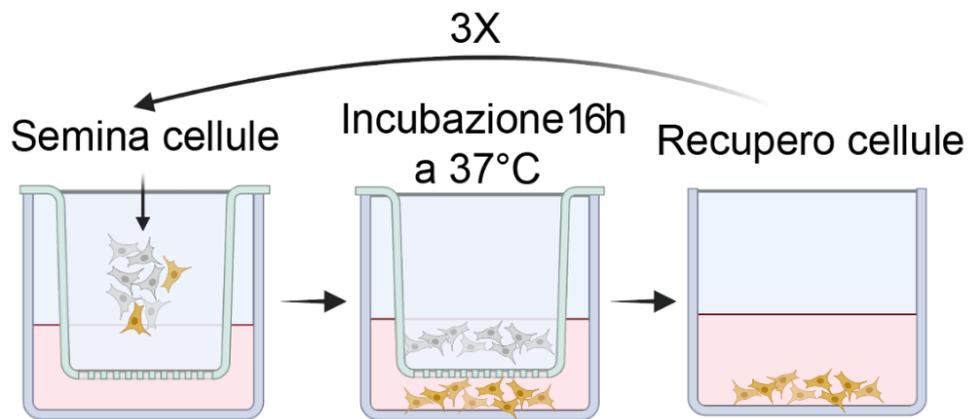


Fig (14) Selezione fenotipica mediante ripetuti saggi di di Migrazione Cellulare. Rappresentazione schematica della selezione fenotipica applicata alle cellule A549 infettate con la libreria lentivirale. Brevemente, le cellule sono state seminate in un transwell e incubate per 16 ore a 37°C. Le cellule migrate (giallo) sono state recuperare e sottoposte nuovamente ad altri due successivi round di migrazione.

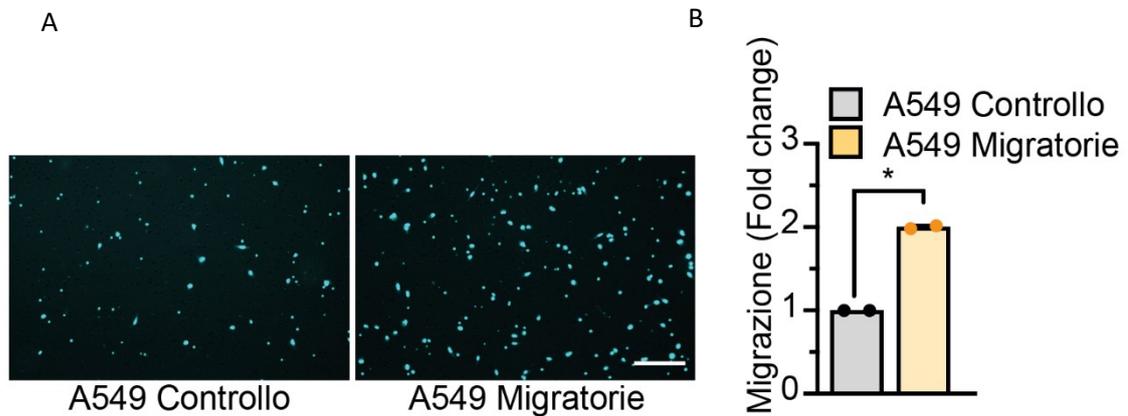


Fig (15) Analisi della capacità migratoria delle cellule infettate con la libreria lentivirale dopo selezione fenotipica. Saggio di migrazione delle cellule A549 migratorie e A549 di controllo. (A) Immagine di fluorescenza rappresentativa delle cellule migrate delle due popolazioni cellulari indicate. DAPI (blu chiaro) identifica i nuclei. Scale bar: 100 μ M. (B) Grafico a barre che rappresenta il grado di migrazione delle cellule A549 migratorie (giallo) e A549 di controllo (grigio). Il risultato è mostrato come Fold change rispetto alle cellule A549 di controllo. I dati rappresentano la media \pm SEM (n=2). Il P-value è stato calcolato con t-test a singolo campione.

Analogamente, la linea A549 invasiva è stata sottoposta a selezione fenotipica attraverso tre round di saggio di invasione (Fig 16). A differenza del saggio di migrazione, in questo caso il transwell è stato ricoperto da uno strato di Matrigel cioè un estratto di matrice extracellulare che fornisce una matrice

tridimensionale simulando così il microambiente delle cellule all'interno del nostro corpo. In particolare, cellule con una maggiore capacità di invasione sono in grado di degradare e attraversare la matrice extracellulare. Anche in questo caso, come mostrato in Figura 17, le cellule sottoposte a pressione selettiva (A549 invasive) mostrano una capacità di invadere circa due volte maggiore rispetto alla linea cellulare di riferimento (A549 controllo).

Questi dati confermano che la pressione selettiva applicata nel nostro modello cellulare (migrazione e invasione) è stata sufficiente per indurre una selezione fenotipica caratterizzata da cellule dotate di maggiore attività migratoria o invasiva.

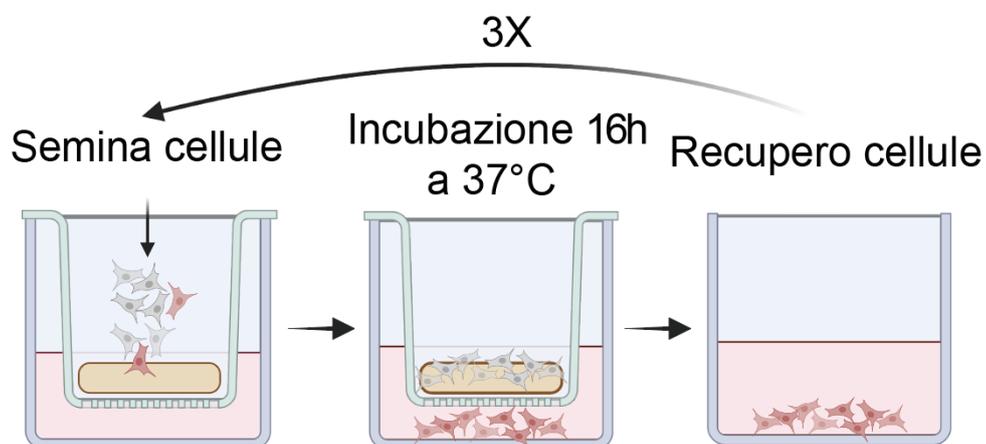


Fig (16) Selezione fenotipica mediante ripetuti saggi di Invasione Cellulare.
Rappresentazione schematica della selezione fenotipica applicata alle cellule

A549 infettate con la libreria lentivirale. Brevemente, le cellule sono state seminate in un transwell contenente uno strato di matrigel e incubate per 16 ore a 37°C. Le cellule invasive (rosso) sono state recuperate e sottoposte nuovamente ad altri due successivi round di invasione.

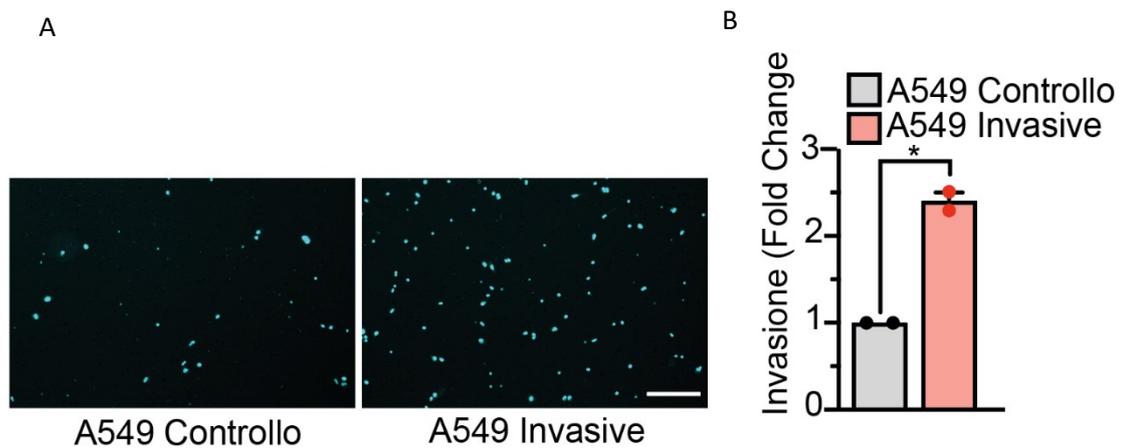


Fig (17) Analisi della capacità invasiva delle cellule infettate con la libreria lentivirale dopo selezione fenotipica. Saggio di invasione delle cellule A549 invasive e A549 di controllo. (A) Immagine di fluorescenza rappresentativa delle cellule invasive delle due popolazioni cellulari indicate. DAPI (blu chiaro) identifica i nuclei. Scale bar: 100 μ M. (B) Grafico a barre che rappresenta il grado di migrazione delle cellule A549 invasive (rosso) e A549 di controllo (grigio). Il risultato è mostrato come Fold change rispetto alle cellule A549 di controllo. I dati rappresentano la media \pm SEM (n=2). Il P-value è stato calcolato con t-test a singolo campione.

4.8 Analisi dei miRNA arricchiti nelle cellule migratorie e invasive

Come risultato della selezione fenotipica, le cellule che esprimono un determinato microRNA maturo coinvolto nei processi di migrazione ed invasione saranno arricchite o contro selezionate nella popolazione cellulare. Per identificare questi miRNA, abbiamo dapprima isolato il DNA genomico dalla popolazione cellulare di riferimento (A549 controllo) e dalle popolazioni cellulari arricchite dopo l'applicazione della selezione fenotipica (A549 migratorie e A549 invasive, cellule sperimentali) (Fig13). Successivamente, i costrutti di miRNA contenuti all'interno del DNA genomico isolato sono stati amplificati utilizzando dei primer forniti dalla ditta produttrice (PCR SMARTvector Forward e Reverse Index) (Fig 13). I primer SMARTvector sono stati ideati per amplificare i costrutti in modo efficiente, riducendo al minimo il bias termodinamico e la variazione nella rappresentazione. Inoltre, questi primer PCR includono sequenze adattatrici e di indice che consentono il sequenziamento degli ampliconi attraverso piattaforma Illumina. Dopo l'amplificazione, abbiamo valutato la qualità dei prodotti di reazione mediante elettroforesi. Come mostrato in Figura 18, abbiamo ottenuto un picco della libreria a 232 paia di basi, molto vicino a quello atteso riportato dal produttore (circa 237 paia di basi). I prodotti dell'amplificazione sono stati quindi caricati

su flow cell (Illumina) e sequenziati utilizzando i primer di sequenziamento forniti dalla ditta produttrice (SMARTvector Illumina). I costrutti dei miRNA sequenziati sono stati quindi mappati ad un file di riferimento fornito dall'azienda produttrice contenente le sequenze dei miRNA presenti all'interno della libreria, in modo tale da ottenere le conte per ciascun costrutto all'interno del DNA genomico. Le differenze nell'abbondanza dei costrutti microRNA tra le popolazioni di cellule di riferimento e sperimentali sono state analizzate per identificare gli hits dello screening (Fig13) utilizzando due metodi statistici alternativi come t-test parametrico (Deseq tool) e il Quantitative trait test (BRB tool). Mentre nel primo caso il test determina se vi sono differenze significative tra le medie delle conte di due gruppi (A549 migratorie vs A549 controllo e A549 invasive vs A549 controllo), il *quantitative trait* test permette di identificare miRNA significativamente correlati ad un tratto quantitativo specifico come la misurazione fenotipica. Come mostrato in Figura 19, 196 miRNA risultano essere significativamente associati al fenotipo migratorio delle cellule dopo analisi con entrambi i test statistici. Di questi, 58 miRNA risultano arricchiti nelle A549 migratorie rispetto a quelle di controllo, ovvero l'sovraespressione di questi miRNA è associata ad un fenotipo maggiormente migratorio nella linea cellulare A549 (Fig 19). La restante parte dei miRNA (n=138) risulta invece contro selezionata nelle A549 migratorie rispetto a

quelle di controllo Figura 19, suggerendo quindi che la sovraespressione di questi miRNA possa essere coinvolta in una riduzione della capacità migratoria delle cellule. Analogamente, un totale di 69 miRNA risulta essere associato in maniera significativa a cellule con una maggiore capacità invasiva rispetto alle cellule di controllo (Fig 20). Di questi, 50 risultano arricchiti e 19 contro selezionati nelle A549 invasive rispetto a quelle di controllo (Fig 20).

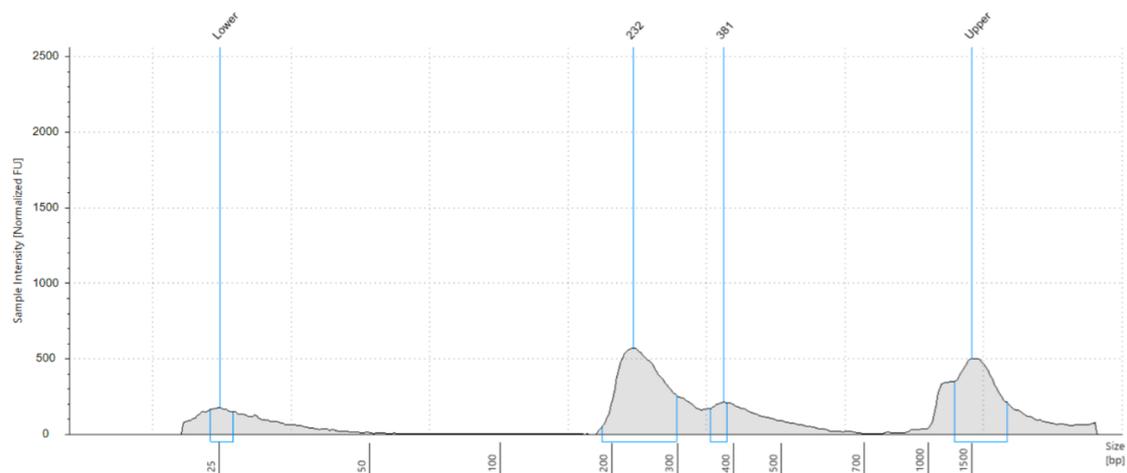


Fig (18) Analisi qualitativa pre-sequenziamento del pool degli ampliconi amplificati mediante PCR. Immagine rappresentativa di un elettroferogramma che rappresenta la distribuzione della dimensione dei frammenti di DNA contenuti all'interno della libreria da sequenziare.

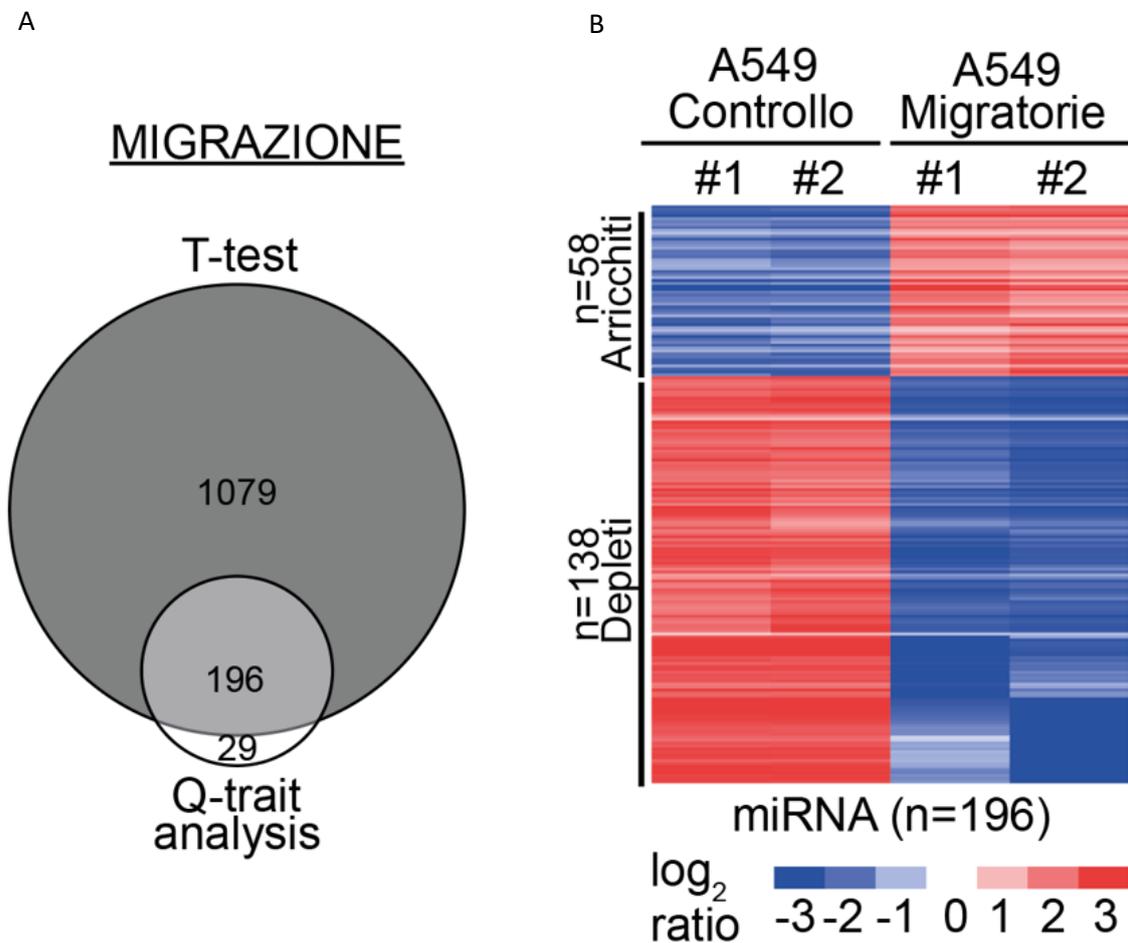


Fig (19) Analisi dei miRNA significativamente associati ad un fenotipo migratorio. (A) Diagramma di Venn che riporta i miRNA che risultano essere significativamente arricchiti o depleti nelle cellule A549 migratorie rispetto alle cellule A549 di controllo utilizzando T-test (DESeq tool, grigio) e la quantitative trait analysis (BRB tool, bianco). Il numero dei miRNA identificati è riportato all'interno di ciascuno cerchio. La grandezza dei cerchi è proporzionale al numero dei miRNA identificati. (B) Heatmap che rappresenta

il livello di abbondanza dei miRNA significativamente associati al fenotipo di migrazione da entrambi i test statistici utilizzati. I valori di abbondanza sono riportati come \log_2 ratio. Il numero dei miRNA arricchiti e depleti è riportato.

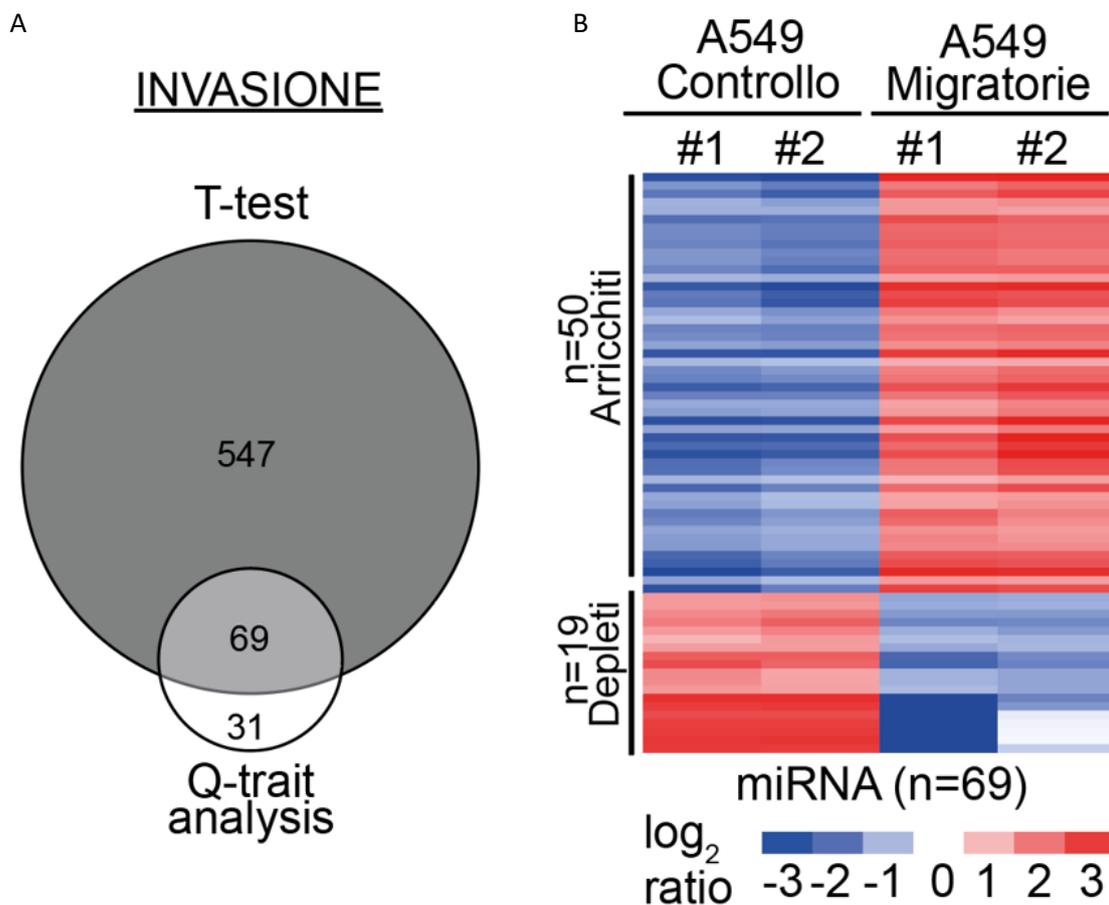


Fig (20) Analisi dei miRNA significativamente associati ad un fenotipo invasivo. (A) Diagramma di Venn che riporta i miRNA che risultano essere significativamente arricchiti o depleti nelle cellule A549 invasive rispetto alle cellule A549 di controllo utilizzando T-test (DESeq tool, grigio) e la

quantitative trait analysis (BRB tool, bianco). Il numero dei miRNA identificati è riportato all'interno di ciascuno cerchio. La grandezza dei cerchi è proporzionale al numero dei miRNA identificati. (B) Heatmap che rappresenta il livello di abbondanza dei miRNA significativamente associati al fenotipo di invasione da entrambi i test statistici utilizzati. I valori di abbondanza sono riportati come log₂ ratio. Il numero dei miRNA arricchiti e depleti è riportato.

Questi dati confermano che una larga frazione del miRNoma umano risulta essere implicata nei processi di migrazione ed invasione in un tipico modello sperimentale *in vitro* di tumore al polmone, suggerendo quindi futuri studi di validazione dello screening per confermare il coinvolgimento dei singoli hit identificati nella regolazione nel processo metastatico.

5.DISCUSSIONE

Le metastasi rappresentano la principale causa di mortalità nei pazienti oncologici ⁶⁹. Nel contesto del tumore al polmone, la diagnosi spesso avviene in stadi avanzati, quando il tumore ha già metastatizzato, riducendo drasticamente la sopravvivenza a cinque anni ⁷⁰. Nonostante i progressi nelle terapie sistemiche, non si riescono ancora ad ottenere remissioni durature per la maggior parte dei tumori metastatici ⁷¹ suggerendo l'importanza di approfondire i meccanismi molecolari alla base del processo metastatico per sviluppare nuove strategie terapeutiche efficaci. In questo contesto, i miRNA sono stati descritti come deregolati nei tumori ⁷² ed essere implicati nella modulazione di molecole chiave del processo metastatico ⁷³. Abbiamo quindi deciso di condurre uno screening a larga scala in vitro su cellule di adenocarcinoma polmonare, con l'obiettivo di comprendere il ruolo funzionale del miRNoma umano nella regolazione di processi critici della cascata metastatica.

La scelta della piattaforma tecnologica per condurre lo screening è stata cruciale. Abbiamo utilizzato una libreria lentivirale contenente più di 2500 costrutti diversi capaci di rappresentare l'intero miRNoma umano (n=2580 miRNA). Siccome va considerato che alcuni miRNA potrebbero non essere

espressi nel tessuto polmonare (sano o tumorale) e quindi non essere fisiologicamente rilevanti per la biologia del tumore al polmone, sarà quindi necessario confermare la rilevanza biologica degli hit ottenuti verificando anche la reale espressione di questi miRNA nel tessuto polmonare dei pazienti. Un vantaggio derivante dall'utilizzo di una libreria lentivirale di questo tipo è la possibilità di condurre screening a larga scala senza il bisogno di strumentazione costosa e di un workflow sperimentale particolarmente laborioso.

Un altro punto fondamentale è stata l'individuazione della linea cellulare in cui condurre lo screening. La nostra scelta è ricaduta sulla linea A549, un modello di adenocarcinoma polmonare frequentemente utilizzato in letteratura per studi sul tumore polmonare. Questa linea è caratterizzata da una mutazione nel gene KRAS (p.G12S c.34G>A), una delle mutazioni più comuni nel cancro al polmone ⁷⁴ rendendola quindi un modello rilevante per la malattia. Tuttavia, i risultati ottenuti potrebbero essere specifici per questo background genetico, rendendo necessaria la validazione dei risultati ottenuti in altre linee cellulari con differenti background genetici.

Infine, è stato fondamentale stabilire quale aspetto della cascata metastatica analizzare durante lo screening. La metastasi è un processo multi-step che può essere suddiviso in cinque fasi principali: (1) invasione della membrana basale

e migrazione cellulare; (2) intravasazione nel sistema vascolare o linfatico circostante; (3) sopravvivenza nella circolazione; (4) extravasazione dal sistema vascolare ai tessuti secondari; (5) colonizzazione nei siti tumorali secondari ⁵⁷. La scelta del fenotipo oggetto dell'analisi è ricaduta sulla migrazione ed invasione perché questi due fenomeni rappresentano le fasi iniziali della cascata metastatica in cui le cellule tumorali penetrano la membrana basale e navigano attraverso il microambiente stromale ⁷⁵. Inoltre, l'invasione attraverso la membrana basale è considerata il passaggio differenziante tra neoplasia pre-cancerosa e cancro maligno ⁷⁶.

Un passaggio critico nello sviluppo dello screening è stata la configurazione del vettore lentivirale e l'ottimizzazione dei parametri di trasduzione della libreria lentivirale e successiva selezione delle cellule trasdotte. I nostri risultati hanno dimostrato che il promotore mCMV è capace di indurre la massima espressione della proteina reporter TurboGFP nelle cellule A549, suggerendo quindi la scelta di questo promotore all'interno del backbone dei vettori che costituivano la libreria lentivirale di miRNA. L'ottimizzazione dei parametri di trasduzione, inclusa la concentrazione di polibrene, la concentrazione di FBS e la densità cellulare, è stata poi fondamentale per massimizzare l'efficienza di trasduzione mantenendo alta la vitalità cellulare. In particolare, una concentrazione di polibrene pari a 8µg/mL, una concentrazione di FBS al 10%

e una densità cellulare di 4700 cellule/cm² si sono rilevate essere le condizioni ottimali per mantenere una vitalità cellulare superiore al 95% dopo una trasduzione della durata di 24 ore. Successivamente, la determinazione del titolo virale specifico per le cellule A549 ha assicurato che le condizioni di trasduzione fossero adattate al nostro sistema sperimentale, permettendo quindi di calcolare il volume di particelle virali da poter utilizzare successivamente per infettare la linea cellulare alla MOI desiderata. Infine, è stata effettuata una curva di morte cellulare con dosi crescenti di puromicina per individuare la dose ottimale con cui selezionare isolare una popolazione pura di cellule trasdotte, garantendo che solo le cellule che hanno integrato il costrutto lentivirale siano mantenute in coltura, eliminando potenziali effetti confondenti dovuti alla presenza di cellule non trasdotte. Va considerato che tutti questi parametri potrebbero variare in altre linee cellulari, e quindi le condizioni sperimentali identificate potrebbero essere limitate alla linea A549.

Dopo aver individuato la migliore configurazione del vettore lentivirale e aver ottimizzato le condizioni di trasduzione, è stato effettuato lo screening a larga scala infettando le cellule A549 con la libreria lentivirale di miRNA ad una MOI di 0,3. La scelta di questo parametro è critica per poter controllare il numero di eventi integranti per cellula in questo tipo di screening. In particolare, secondo la distribuzione di Poisson, ad una MOI di 0,3, circa il 25%

delle cellule seminate vengono infettate. Di queste il 22% è predetto subire un solo evento di integrazione per cellule. Ne consegue che la maggior parte delle cellule infettate esprimerà un singolo costrutto, garantendo quindi che la over-espressione di un singolo miRNA in una particolare cellula sia responsabile del fenotipo da analizzare. Il restante 3% delle cellule infettate potrebbe contenere più di un integrante lentivirale, suggerendo quindi che alcuni degli hits risultanti dallo screening possano derivare dalla combinata e casuale over-espressione di più di un miRNA per cellula. Per limitare questo problema, le cellule sono state trasdotte in maniera tale che ogni costrutto sia rappresentato almeno 500 volte nella popolazione cellulare, riducendo quindi in maniera significativa la possibilità che gli hits identificati possano derivare da cellule che esprimono più di un miRNA.

Dopo aver ottenuto mediante selezione con puromicina una popolazione omogenea over-esprimente la libreria lentivirale, le cellule trasdotte hanno subito una selezione fenotipica mediante ripetuti saggi di migrazione ed invasione. I dati ottenuti hanno confermato che tre round di migrazione o invasione sono sufficienti per ottenere delle popolazioni cellulari dotate di maggiore capacità migratoria o invasiva rispetto ad una linea cellulare di riferimento trasdotta con la libreria lentivirale e mantenuta in coltura senza andare incontro ad alcuna pressione selettiva. Ne consegue che

l'overespressione di particolari miRNA nelle cellule A549 possa conferire un vantaggio migratorio o invasivo. Abbiamo quindi analizzato mediante NGS quali fossero i miRNA arricchiti o depleti nelle cellule dopo selezione fenotipica in rispetto ad una popolazione cellulare di riferimento. I nostri risultati confermano che una larga frazione del miRNoma umano può essere implicata nei processi di migrazione e invasione nelle cellule di adenocarcinoma polmonare A549. Nel prossimo futuro sarà fondamentale validare singolarmente gli hits ottenuti in altri modelli cellulari in vitro, utilizzando cellule con un differente background genetico rispetto alla linea cellulare, e in modelli preclinici in vivo utilizzando modelli murini. Dato l'alto numero di miRNA individuati, sarà fondamentale applicare uno step di prioritizzazione dei miRNA da validare, valutando l'espressione di questi miRNA nei tessuti polmonari dei pazienti e la loro eventuale associazione con la presenza di metastasi (parametro N e M dello stadio clinico). L'identificazione di miRNA specifici che modulano i processi di migrazione ed invasione potrebbe aprire nuove prospettive per lo sviluppo di terapie mirate contro le metastasi. In questa direzione, la complessità della regolazione dei miRNA e le loro interazioni con altri fattori molecolari richiedono ulteriori studi per comprendere appieno i loro meccanismi d'azione.

In conclusione, il nostro lavoro fornisce nuove indicazioni sul ruolo dei miRNA nella metastasi del tumore al polmone e fornisce una lista di microRNA da studiare il cui ruolo sembra essere determinante. Ulteriori investigazioni circa il ruolo di alcuni di questi miRNA nella progressione del tumore del polmone potrebbe contribuire a svelare i meccanismi chiave della metastatizzazione fornendo nuovi potenziali bersagli terapeutici oltre a fornire nuovi biomarcatori per predire la prognosi dei pazienti.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Mao Y, Yang D, He J, Krasna MJ. Epidemiology of Lung Cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 2016;25(3):439-445. doi:10.1016/j.soc.2016.02.001
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660
3. LINEE GUIDA NEOPLASIE DEL POLMONE. AIOM. Published November 12, 2021. Accessed April 10, 2024. <https://www.aiom.it/linee-guida-aiom-2021-neoplasie-del-polmone/>
4. Guida L. NEOPLASIE DEL POLMONE. Published online 2019.
5. Bonadonna G., Robustelli Della Cuna G., Valagussa P. *Medicina Oncologica. Volume 2. Capitolo 41 – Neoplasie Del Polmone.*
6. Park E, Takahashi K, Jiang Y, Movahed M, Kameda T. Elimination of asbestos use and asbestos-related diseases: An unfinished story. *Cancer Sci.* 2012;103(10):1751-1755. doi:10.1111/j.1349-7006.2012.02366.x
7. Turner MC, Andersen ZJ, Baccarelli A, et al. Outdoor Air Pollution and Cancer: An Overview of the Current Evidence and Public Health Recommendations. *CA Cancer J Clin.* Published online August 25, 2020;10.3322/caac.21632. doi:10.3322/caac.21632
8. Malhotra J, Malvezzi M, Negri E, La Vecchia C, Boffetta P. Risk factors for lung cancer worldwide. *Eur Respir J.* 2016;48(3):889-902. doi:10.1183/13993003.00359-2016
9. Rudin CM, Brambilla E, Faivre-Finn C, Sage J. Small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 2021;7(1):3. doi:10.1038/s41572-020-00235-0
10. Duma N, Santana-Davila R, Molina JR. Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc.* 2019;94(8):1623-1640. doi:10.1016/j.mayocp.2019.01.013
11. Turner BM, Cagle PT, Sainz IM, Fukuoka J, Shen SS, Jagirdar J. Napsin A, a New Marker for Lung Adenocarcinoma, Is Complementary and More Sensitive and Specific Than Thyroid Transcription Factor 1 in the

- Differential Diagnosis of Primary Pulmonary Carcinoma: Evaluation of 1674 Cases by Tissue Microarray. *Arch Pathol Lab Med*. 2012;136(2):163-171. doi:10.5858/arpa.2011-0320-OA
12. Massion PP, Carbone DP. The molecular basis of lung cancer: molecular abnormalities and therapeutic implications. *Respiratory Research*. 2003;4(1):12. doi:10.1186/1465-9921-4-12
 13. Li H, Yang L, Wang Y, et al. Integrative analysis of TP53 mutations in lung adenocarcinoma for immunotherapies and prognosis. *BMC Bioinformatics*. 2023;24(1):155. doi:10.1186/s12859-023-05268-2
 14. Chang YS, Tu SJ, Chen YC, et al. Mutation profile of non-small cell lung cancer revealed by next generation sequencing. *Respiratory Research*. 2021;22(1):3. doi:10.1186/s12931-020-01608-5
 15. Isla D, Lozano MD, Paz-Ares L, et al. New update to the guidelines on testing predictive biomarkers in non-small-cell lung cancer: a National Consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clin Transl Oncol*. 2023;25(5):1252-1267. doi:10.1007/s12094-022-03046-9
 16. Wang P, Wang F, He H, et al. TP53 and CDKN2A mutations in patients with early-stage lung squamous cell carcinoma: an analysis of the correlations and prognostic outcomes. *Annals of Translational Medicine*. 2021;9(16):1330-1330. doi:10.21037/atm-21-3709
 17. Liu Z, Deng M, Wu L, Zhang S. An integrative investigation on significant mutations and their down-stream pathways in lung squamous cell carcinoma reveals CUL3/KEAP1/NRF2 relevant subtypes. *Molecular Medicine*. 2020;26(1):48. doi:10.1186/s10020-020-00166-2
 18. Schabath MB, Cote ML. Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2019;28(10):1563-1579. doi:10.1158/1055-9965.EPI-19-0221
 19. Lung cancer - Symptoms and causes. Mayo Clinic. Accessed July 1, 2024. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/lung-cancer/symptoms-causes/syc-20374620>
 20. Lung Cancer Diagnosis. Published August 8, 2021. Accessed July 1, 2024. <https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/lung-cancer/lung-cancer-diagnosis>

21. Dennis K, Fan F. Lung and Respiratory Tract Cytology. In: Xu H, Qian X, Wang H, eds. *Practical Cytopathology : Frequently Asked Questions*. Springer International Publishing; 2020:95-117. doi:10.1007/978-3-030-24059-2_7
22. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2016;11(1):39-51. doi:10.1016/j.jtho.2015.09.009
23. Matilla JM, Zabaleta M, Martínez-Téllez E, Abal J, Rodríguez-Fuster A, Hernández-Hernández J. New TNM staging in lung cancer (8th edition) and future perspectives. *J Clin Transl Res*. 2020;6(4):145-154.
24. Jones GS, Baldwin DR. Recent advances in the management of lung cancer. *Clin Med (Lond)*. 2018;18(Suppl 2):s41-s46. doi:10.7861/clinmedicine.18-2-s41
25. Sohini G, Tanya M, Stephanie B. Staging and Diagnosis of Lung Cancer. In: MacRosty CR, Rivera MP, eds. *Lung Cancer: A Comprehensive Guide for the Clinician*. Springer International Publishing; 2023:97-121. doi:10.1007/978-3-031-38412-7_5
26. Wang X, Adjei AA. Lung cancer and metastasis: new opportunities and challenges. *Cancer Metastasis Rev*. 2015;34(2):169-171. doi:10.1007/s10555-015-9562-4
27. Riihimäki M, Hemminki A, Fallah M, et al. Metastatic sites and survival in lung cancer. *Lung Cancer*. 2014;86(1):78-84. doi:10.1016/j.lungcan.2014.07.020
28. Jaiyesimi IA, Leighl NB, Ismaila N, et al. Therapy for Stage IV Non–Small Cell Lung Cancer With Driver Alterations: ASCO Living Guideline, Version 2023.3. *JCO*. 2024;42(11):e1-e22. doi:10.1200/JCO.23.02744
29. FDA Approves Merck’s KEYTRUDA® (pembrolizumab) in Combination with Carboplatin and Either Paclitaxel or Nab-Paclitaxel for the First-Line Treatment of Patients with Metastatic Squamous Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) - Merck.com. Accessed July 2, 2024. <https://www.merck.com/news/fda-approves-mercks-keytruda-pembrolizumab-in-combination-with-carboplatin-and-either-paclitaxel-or->

nab-paclitaxel-for-the-first-line-treatment-of-patients-with-metastatic-squamous-no/

30. Soria JC, Ohe Y, Vansteenkiste J, et al. Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2018;378(2):113-125. doi:10.1056/NEJMoa1713137
31. Hida T, Nokihara H, Kondo M, et al. Alectinib versus crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer (J-ALEX): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet*. 2017;390(10089):29-39. doi:10.1016/S0140-6736(17)30565-2
32. Crizotinib for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer - NCI. Published June 17, 2013. Accessed July 2, 2024. <https://www.cancer.gov/types/lung/research/crizotinib>
33. Baik C, Cheng ML, Dietrich M, Gray JE, Karim NA. A Practical Review of Encorafenib and Binimetinib Therapy Management in Patients with BRAF V600E-Mutant Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. *Adv Ther*. 2024;41(7):2586-2605. doi:10.1007/s12325-024-02839-4
34. Drusbosky LM, Rodriguez E, Dawar R, Ikpeazu CV. Therapeutic strategies in RET gene rearranged non-small cell lung cancer. *Journal of Hematology & Oncology*. 2021;14(1):50. doi:10.1186/s13045-021-01063-9
35. Gebert LFR, MacRae IJ. Regulation of microRNA function in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(1):21-37. doi:10.1038/s41580-018-0045-7
36. Shang R, Lee S, Senavirathne G, Lai EC. microRNAs in action: biogenesis, function and regulation. *Nat Rev Genet*. 2023;24(12):816-833. doi:10.1038/s41576-023-00611-y
37. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*. 2010;11(9):597-610. doi:10.1038/nrg2843
38. Fabian MR, Sonenberg N. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat Struct Mol Biol*. 2012;19(6):586-593. doi:10.1038/nsmb.2296

39. Jonas S, Izaurralde E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet.* 2015;16(7):421-433. doi:10.1038/nrg3965
40. Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nat Struct Mol Biol.* 2008;15(4):346-353. doi:10.1038/nsmb.1405
41. Treiber T, Treiber N, Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(1):5-20. doi:10.1038/s41580-018-0059-1
42. Connerty P, Ahadi A, Hutvagner G. RNA Binding Proteins in the miRNA Pathway. *Int J Mol Sci.* 2015;17(1):31. doi:10.3390/ijms17010031
43. B S, B D, E Z, et al. Mesenchymal stem cell (MSC)-derived exosomes as novel vehicles for delivery of miRNAs in cancer therapy. *Cancer gene therapy.* 2022;29(8-9). doi:10.1038/s41417-022-00427-8
44. Cavallari I, Ciccicarese F, Sharova E, et al. The miR-200 Family of microRNAs: Fine Tuners of Epithelial-Mesenchymal Transition and Circulating Cancer Biomarkers. *Cancers (Basel).* 2021;13(23):5874. doi:10.3390/cancers13235874
45. Title AC, Hong SJ, Pires ND, et al. Genetic dissection of the miR-200–Zeb1 axis reveals its importance in tumor differentiation and invasion. *Nat Commun.* 2018;9(1):4671. doi:10.1038/s41467-018-07130-z
46. Chi LH, Cross RSN, Redvers RP, et al. MicroRNA-21 is immunosuppressive and pro-metastatic via separate mechanisms. *Oncogenesis.* 2022;11(1):1-12. doi:10.1038/s41389-022-00413-7
47. Silva MR, Santos P, Velada I, et al. MicroRNA-21 in lung cancer: overexpression in metastasis of pulmonary adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *BMC Proc.* 2010;4(Suppl 2):P14.
48. microRNA 10b - an overview | ScienceDirect Topics. Accessed July 2, 2024. <https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/microrna-10b>
49. Liang LB, Zhu WJ, Chen XM, Luo FM. Plasma miR-30a-5p as an Early Novel Noninvasive Diagnostic and Prognostic Biomarker for Lung

- Cancer. *Future Oncology*. 2019;15(32):3711-3721. doi:10.2217/fon-2019-0393
50. Roca E. *Revisione Bibliografica Secondo semestre 2015*.
51. Cho WC, Wong CF, Li KP, Fong AH, Fung KY, Au JS. miR-145 as a Potential Biomarker and Therapeutic Target in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(12):10022. doi:10.3390/ijms241210022
52. Zhao X dong, Zhang W, Liang H jun, Ji W yue. Overexpression of miR - 155 Promotes Proliferation and Invasion of Human Laryngeal Squamous Cell Carcinoma via Targeting SOCS1 and STAT3. *PLOS ONE*. 2013;8(2):e56395. doi:10.1371/journal.pone.0056395
53. Ma ZL, Hou PP, Li YL, et al. MicroRNA-34a inhibits the proliferation and promotes the apoptosis of non-small cell lung cancer H1299 cell line by targeting TGF β R2. *Tumor Biol*. 2015;36(4):2481-2490. doi:10.1007/s13277-014-2861-5
54. Li J, Song Y, Wang Y, Luo J, Yu W. MicroRNA-148a suppresses epithelial-to-mesenchymal transition by targeting ROCK1 in non-small cell lung cancer cells. *Mol Cell Biochem*. 2013;380(1):277-282. doi:10.1007/s11010-013-1682-y
55. Korać P, Antica M, Matulić M. MiR-7 in Cancer Development. *Biomedicines*. 2021;9(3):325. doi:10.3390/biomedicines9030325
56. Qian CN, Mei Y, Zhang J. Cancer metastasis: issues and challenges. *Chinese Journal of Cancer*. 2017;36(1):38. doi:10.1186/s40880-017-0206-7
57. Fares J, Fares MY, Khachfe HH, Salhab HA, Fares Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Sig Transduct Target Ther*. 2020;5(1):1-17. doi:10.1038/s41392-020-0134-x
58. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
59. Ganesh K, Massagué J. Targeting metastatic cancer. *Nat Med*. 2021;27(1):34-44. doi:10.1038/s41591-020-01195-4

60. Zhuyan J, Chen M, Zhu T, et al. Critical steps to tumor metastasis: alterations of tumor microenvironment and extracellular matrix in the formation of pre-metastatic and metastatic niche. *Cell & Bioscience*. 2020;10(1):89. doi:10.1186/s13578-020-00453-9
61. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*. 2013;19(11):1423-1437. doi:10.1038/nm.3394
62. Zhang M, Niibe K, Kondo T, Kamano Y, Saeki M, Egusa H. Gene Delivery and Expression Systems in Induced Pluripotent Stem Cells. In: Sasaki K, Suzuki O, Takahashi N, eds. *Interface Oral Health Science 2016*. Springer; 2017:121-133. doi:10.1007/978-981-10-1560-1_11
63. A549 – A model for non-small cell lung cancer. Accessed June 26, 2024. <https://biopharma.labcorp.com/industry-solutions/by-therapeutic-area/oncology/preclinical/tumor-spotlights/model-spotlight-a549-a-model-for-non-small-cell-lung-cancer.html>
64. Tips for successful lentiviral transduction. Accessed June 26, 2024. <https://www.takarabio.com/learning-centers/gene-function/viral-transduction/lentivirus/lentiviral-tips>
65. Lin P, Correa D, Lin Y, Caplan AI. Polybrene Inhibits Human Mesenchymal Stem Cell Proliferation during Lentiviral Transduction. *PLOS ONE*. 2011;6(8):e23891. doi:10.1371/journal.pone.0023891
66. Factors Influencing Transfection Efficiency - IT. Accessed June 26, 2024. <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/factors-influencing-transfection-efficiency.html>
67. Protocol 3 - Lentivirus Transduction into Target Cell Lines. Accessed June 26, 2024. <https://hollingscancercenter.musc.edu/research/shared-resources/shrna/lentivirus-transduction>
68. Millington M, Arndt A, Boyd M, Applegate T, Shen S. Towards a Clinically Relevant Lentiviral Transduction Protocol for Primary Human CD34+ Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *PLOS ONE*. 2009;4(7):e6461. doi:10.1371/journal.pone.0006461
69. Menyailo ME, Bokova UA, Ivanyuk EE, Khozyainova AA, Denisov EV. Metastasis Prevention: Focus on Metastatic Circulating Tumor Cells. *Mol Diagn Ther*. 2021;25(5):549-562. doi:10.1007/s40291-021-00543-5

70. Saab MM, FitzGerald S, Noonan B, et al. Promoting lung cancer awareness, help-seeking and early detection: a systematic review of interventions. *Health Promotion International*. 2021;36(6):1656-1671. doi:10.1093/heapro/daab016
71. Compton C. Systemic Therapy for Cancer. In: Compton C, ed. *Cancer: The Enemy from Within: A Comprehensive Textbook of Cancer's Causes, Complexities and Consequences*. Springer International Publishing; 2020:223-257. doi:10.1007/978-3-030-40651-6_9
72. Vahabi M, Dehni B, Antomás I, Giovannetti E, Peters GJ. Targeting miRNA and using miRNA as potential therapeutic options to bypass resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Metastasis Rev*. 2023;42(3):725-740. doi:10.1007/s10555-023-10127-w
73. Cuttano R, Colangelo T, Guarize J, et al. miRNome profiling of lung cancer metastases revealed a key role for miRNA-PD-L1 axis in the modulation of chemotherapy response. *Journal of Hematology & Oncology*. 2022;15(1):178. doi:10.1186/s13045-022-01394-1
74. KRAS G12S - My Cancer Genome. Accessed June 28, 2024. <https://www.mycancergenome.org/content/alteration/kras-g12s/>
75. Majidpoor J, Mortezaee K. Steps in metastasis: an updated review. *Med Oncol*. 2021;38(1):3. doi:10.1007/s12032-020-01447-w
76. Cancer - Metastasis, Tumor, Cells | Britannica. Published June 26, 2024. Accessed June 28, 2024. <https://www.britannica.com/science/cancer-disease/Invasion-and-dissemination>