



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

Corso di Laurea

Scienze Biologiche

TITOLO TESI (Italiano)

Meccanismi epigenetici nella terapia e resistenza del tumore al seno

TITOLO TESI (Inglese)

Epigenetics mechanisms in breast cancer therapy and resistance

Tesi di Laurea di:
di:

Riccardo Brugiati

Docente Referente
Chiar.mo Prof.

Oliana Carnevali

Sessione Luglio

Anno Accademico 2022-2023

INTRODUZIONE

La ghiandola mammaria è una ghiandola esocrina, caratteristica dei mammiferi, in grado di produrre latte. Fondamentale per un primo sviluppo psico-fisico e immunitario della prole.

E' presente sia nell'uomo sia nella donna. Nel primo si ha uno sviluppo rudimentale poiché vi è inibizione androgeno-mediata. Nella donna invece si ha uno sviluppo paragonabile alla metamorfosi a partire dalla pubertà.

Purtroppo questa struttura può andare in contro a neoplasie, più o meno gravi, che stanno però diventando sempre più curabili.

Per evitare ricadute, o contenere la malattia, si utilizza la terapia endocrina, la quale risulta abbastanza efficace, ma si è visto che nel 20% dei casi il tumore acquisisce resistenza. Si stanno sviluppando tecniche epigenetiche in grado di ristabilire la sensibilità endocrina di queste cellule terapeutico-resistenti.

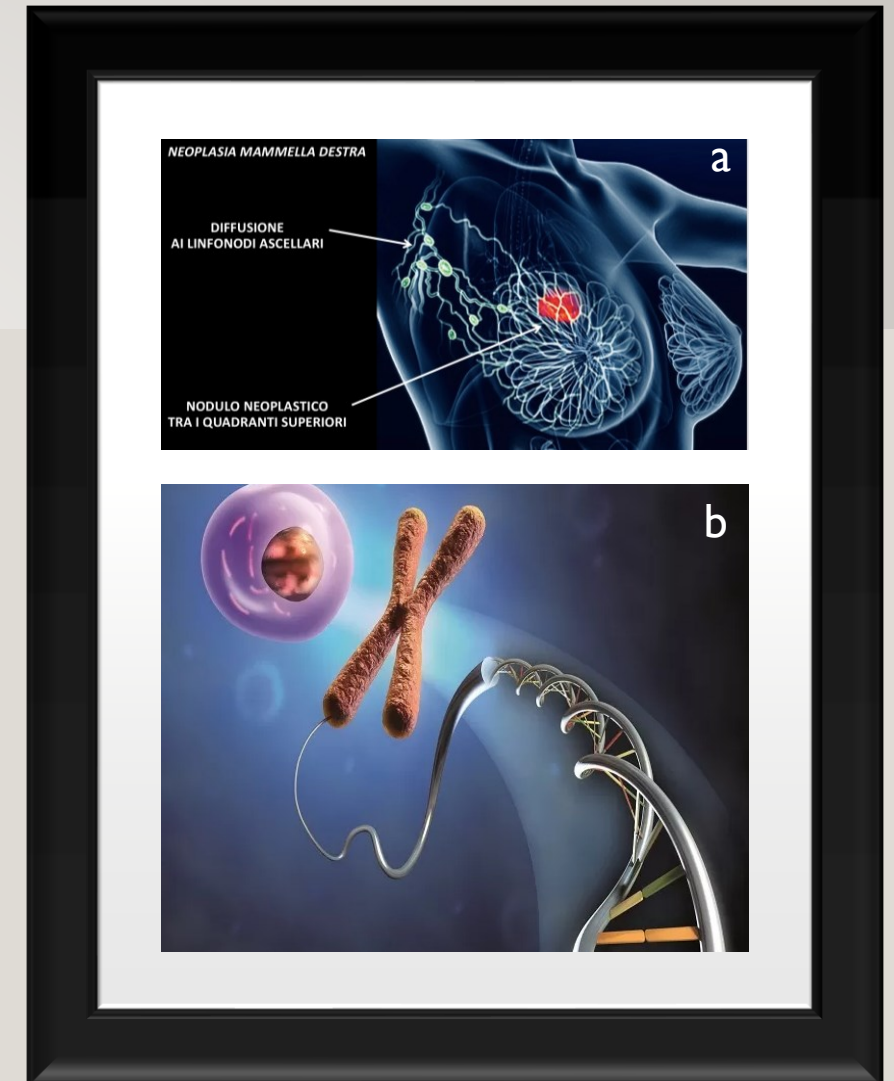


Figura 1

- Figura 1 a: immagine nodulo neoplastico con dettaglio sui linfonodi ascellari.
- Figura 1 b: immagine rappresentativa epigenetica.

ANATOMIA DELLA GHIANDOLA MAMMARIA

- Lo sviluppo della ghiandola mammaria è sotto controllo:
 - **Genico**, soprattutto in fase embrionale;
 - **Ormonale**, soprattutto in pubertà e gravidanza.
- Può essere:
 - **INATTIVA** ➡ Si forma già nella vita intrauterina, con la formazione di linee mammarie e gemme mammarie. La proliferazione di queste cellule genera il **cordone mammario** dal quale si originano **capezzolo, areola** e **dotti galattofori**;
 - **ATTIVA** ➡ Durante la gravidanza, la massima attività funzionale si raggiunge durante l'allattamento.

GHIANDOLA MAMMARIA INATTIVA

- Si tratta di una **ghiandola sudoripara modificata** in grado di produrre latte.
- In particolare è una **ghiandola alveolare composta** ➔ Possiede un monostrato di **cellule alveolari** rivestite da membrana basale
- È costituita da ➔ **Tessuto connettivo denso**
➔ **Tessuto adiposo**
- Si articola in ➔ **Lobuli**
➔ **Dotti escretori interlobulari**
- Risulta costituita da 15/20 unità ghiandolari indipendenti: **lobi mammari** ➔ i quali sono separati da setti connettivali immersi in tessuto adiposo.

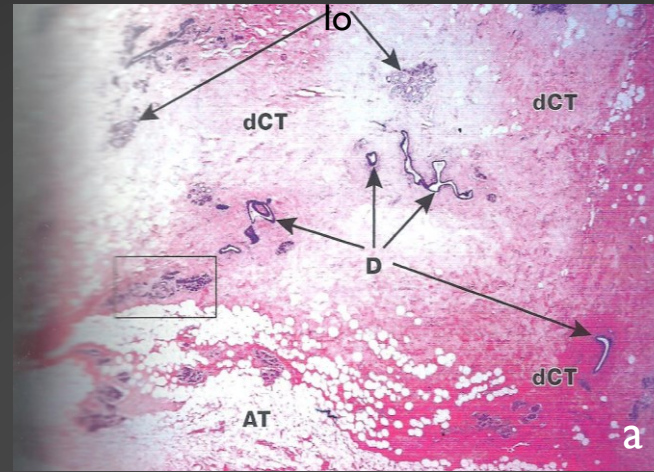


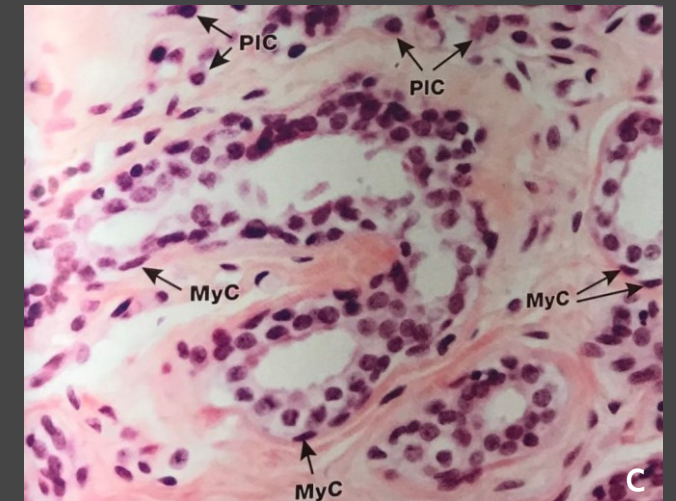
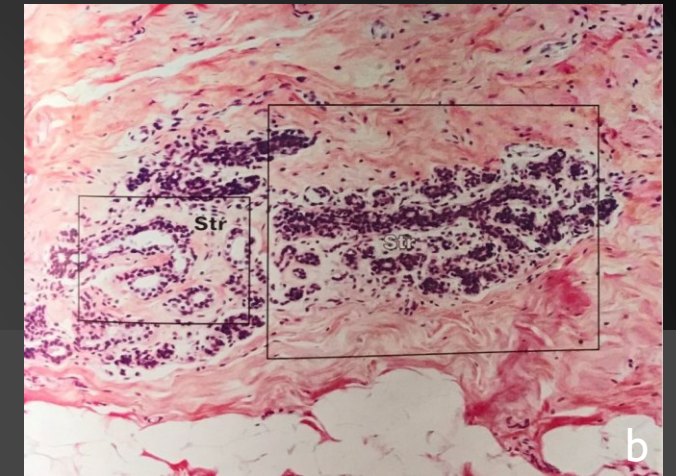
Figura 2

• Figura 2 a: ingrandimento in 10X ghiandola mammaria inattiva umana. AT= tessuto adiposo, dCT=tessuto connettivo denso, lo=lobuli, D=dotti escretori interlobulari.

• Figura 2 b: ingrandimento 100X della figura 2 a. Particolare del lobulo mammario. Str=stroma, presente all'interno di ogni lobulo, specializzato e ormone sensibile.

• Figura 2 c: ingrandimento 400X della figura 2 b, si nota l'epitelio cubico semplice. MyC= cellule mioepiteliali disposte estremenamente e incluse nella membrana basale. Si nota l'infiltrato presente nello stroma costituito da linfociti e plasmacellule.

• Immagini ricavate da "Anatomia Microscopica Atlante", M. Morroni.



GHIANDOLA MAMMARIA ATTIVA

- A seguito della secrezione di diversi ormoni durante la gravidanza, gli adenomeri (o alveoli) vanno in ipertrofia (aumento di dimensione) e iperplasia (aumento di numero) andando a sostituire il tessuto connettivo.
- Il connettivo si riduce quindi in sottili setti che separano il parenchima in numerosi lobuli.
- Tra i lobuli ghiandolari rimane presente il tessuto adiposo.
- La secrezione di latte da parte delle cellule alveolari è sotto controllo degli ormoni adenoipofisari ➔ Luteotropo
➔ Prolattina
- Il latte prodotto contiene ➔ Lattosio
➔ Caseina
➔ IgA

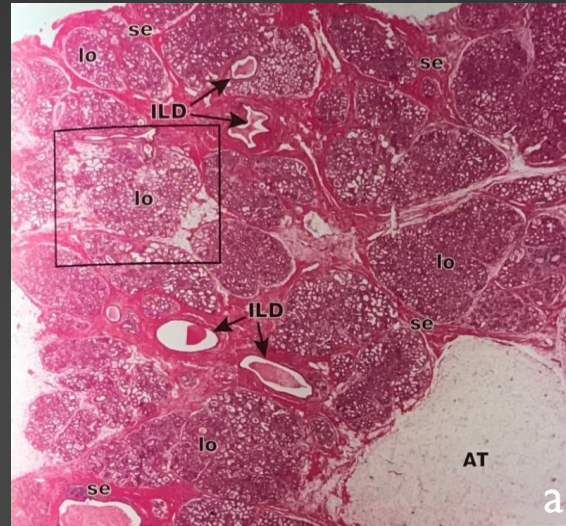
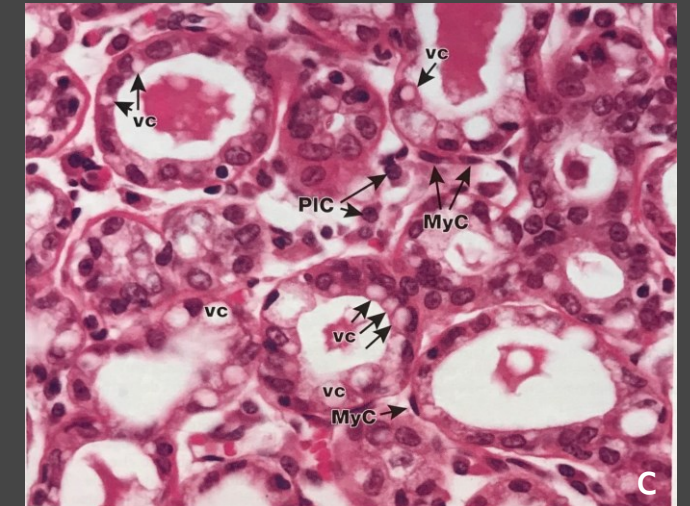
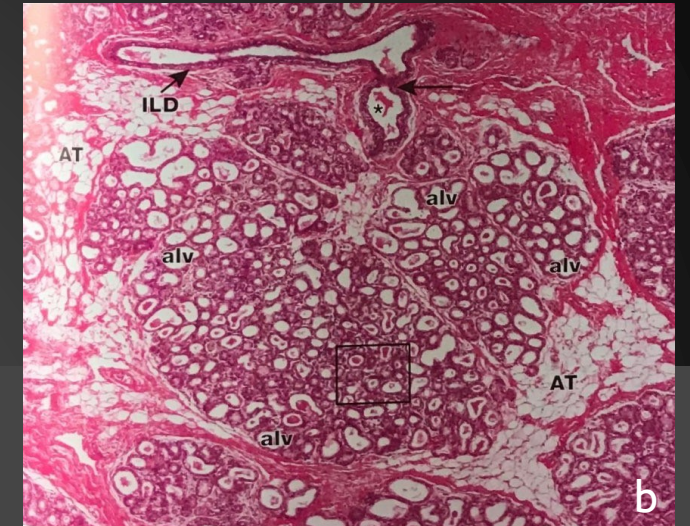


Figura 3



- Figura 3a: ingrandimento 10X di ghiandola mammaria attiva, se=setti, lo=lobuli, ILD=dotti interlobulari che trasportano vasi e nervi, AT=tessuto adiposo.
- Figura 3b: figura 3a con ingrandimento 40X. Particolare di un lobulo della ghiandola mammaria. Si nota la morfologia ipertrofica degli alveoli (alv).
- Figura 3c: ingrandimento 400X della figura 3b che mette in evidenza gli alveoli. Essi risultano costituiti da cellule alveolari, cubiche che contengono vacuoli apicali (vc). Cellule mioteliiali (MyC) si intercalano tra la membrana basale e le cellule alveolari, la loro attività contrattile consente la progressione del secreto. Presenti plasmacellule (PIC) nello stroma connettivale che secernono IgA.
- Immagini ricavate da "Anatomia Microscopica Atlante" M. Morroni.

TUMORE AL SENO

- Nella maggior parte dei casi si origina dai lobuli che formano la parete dei dotti.
- Ne esistono più tipologie:
 - **Carcinoma duttale**, rappresenta il 70% dei tumori al seno, parte dalle cellule dei dotti e si diffonde anche oltre esse;
 - **Carcinoma lobulare**, 10% dei tumori al seno, parte dal lobulo e si estende anche oltre la parete. Può colpire in contemporanea ambedue i seni;
 - **Carcinomi tubulare, papillare, mucinoso e cribriforme**, sono i meno diffusi, generalmente a prognosi favorevole;
 - **Carcinoma intraduttale in situ**, poco invasivo e a prognosi molto favorevole.
- **Fattori di rischio:**
 - **Modificabili** (abitudini poco salutari);
 - **Non modificabili** (età, familiarità, mutazioni geni *BRCA1/2*)
- **Prevenzione:**
 - Screening periodico → Mammografia, ecografia, autopalpazione;
 - Comportamenti e abitudini salubri;
 - Allattamento.

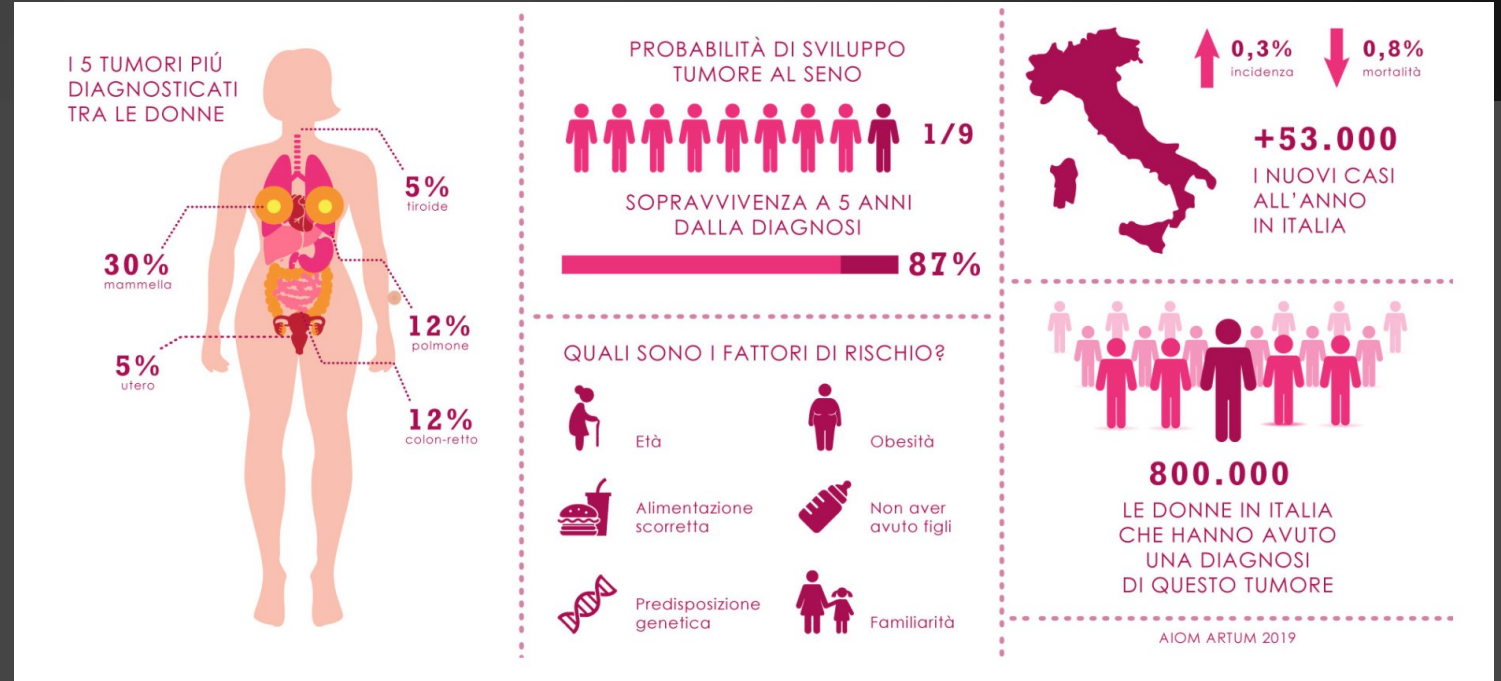


Figura 4, immagine ricavata da ihealthyou.com

MECCANISMI MOLECOLARI NELLO SVILUPPO DEL TUMORE AL SENO

- Deregolazioni di processi epigenetici nello sviluppo giocano un ruolo importante nella proliferazione e resistenza del tumore al seno.
- **Ipermetilazioni** di sequenze di DNA che codificano inibitori di WNT (es. DKK3), sono tra le maggiori cause di proliferazioni, resistenze e ricadute tumorali.
- È possibile modulare la via WNT utilizzando agenti epigenetici per ristabilire i normali meccanismi di regolazione.

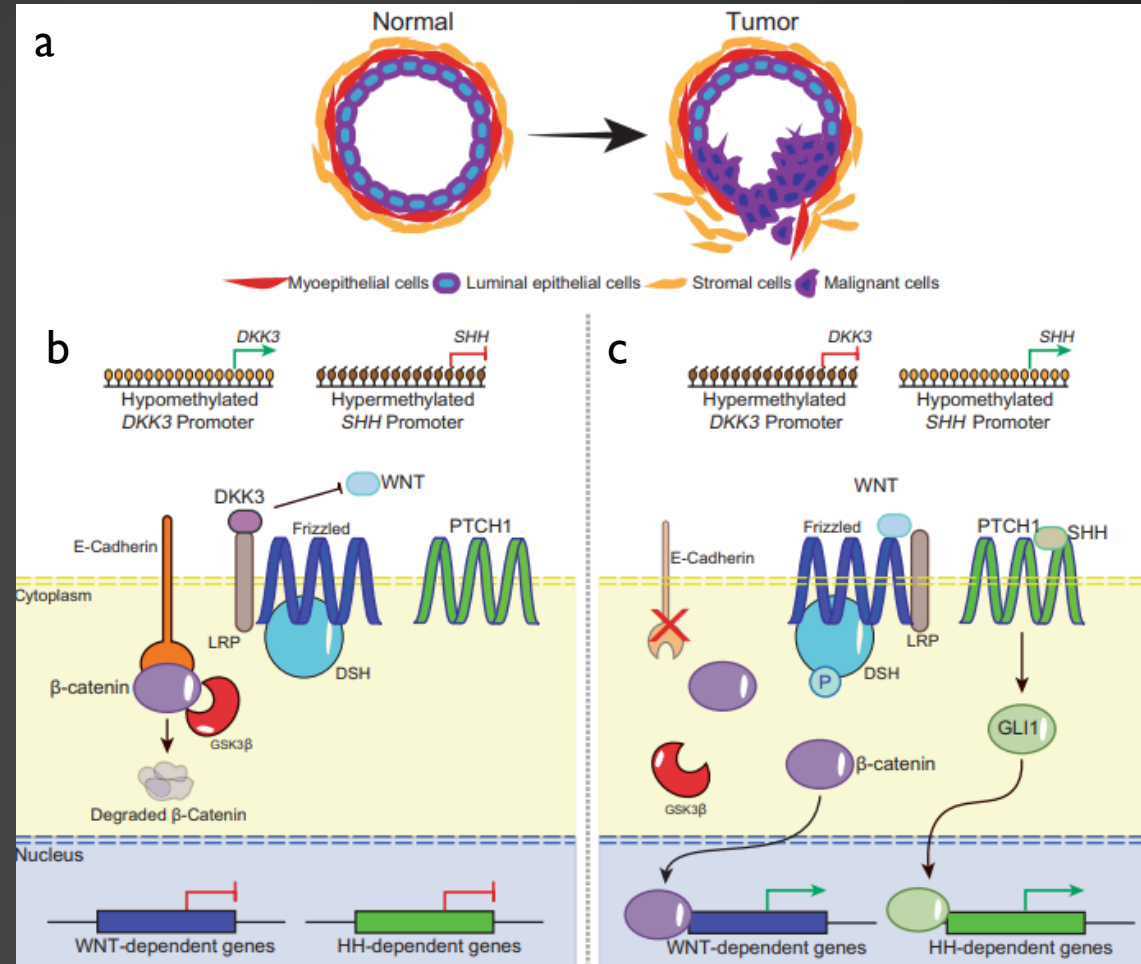


Figura 5 a: proliferazione cellule tumorali maligne. Figura 5 b: normale inibizione di WNT da parte di DKK3, SHH ipermetilato. Figura 5 c: attivazione della via WNT per assenza di DKK3 (ipermetilato) e attivazione della via SHH (ipometilato): proliferazione tumorale incontrollata.

Figura 5, immagine ricavata da www.nature.com

Recettore ER α

- Recettore nucleare.
- Alti livelli di espressione in cellule neoplastiche del tumore al seno.
- Risponde alla segnalazione di un estrogeno ➔ **17- β -estradiolo (E2)**.
- Possiede **domini funzionali** che determinano funzioni trascrizionali ed epigenetiche

- ➔ **AF1(N-term.):** Target di **chinasi mitogeniche**
- ➔ **AF2(C-term.):** Target di **E2** (dominio di legame)
- ➔ **DBD:** Dominio legante il DNA (sequenza ERE)
- ➔ **Dominio "a cerniera":** Tra AF1 e AF2 (localizzazione nucleare).

- Attivato da **coattivatori** per **omodimerizzazione**, lega la sequenza consenso grazie a fattori di trascrizione "**pionieri**".
- Fisiologicamente è coinvolto nella maturazione dei dotti e sviluppo delle cellule della ghiandola mammaria sia in pubertà che in fase attiva (gravidanza).
- Una sua overespressione, dovuta a mutazione dei geni *BRCA1/2*, comporta proliferazione incontrollata delle cellule del carcinoma mammario.

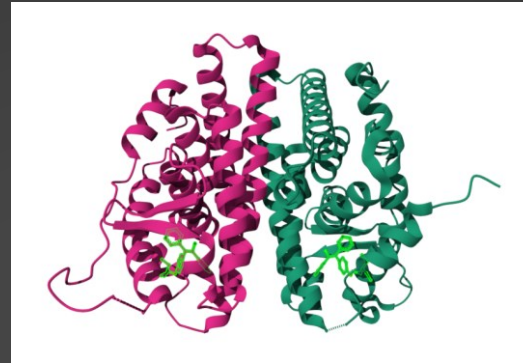


Figura 6: struttura molecolare 3D di ER α attivo. Immagine ottenuta con PBD.

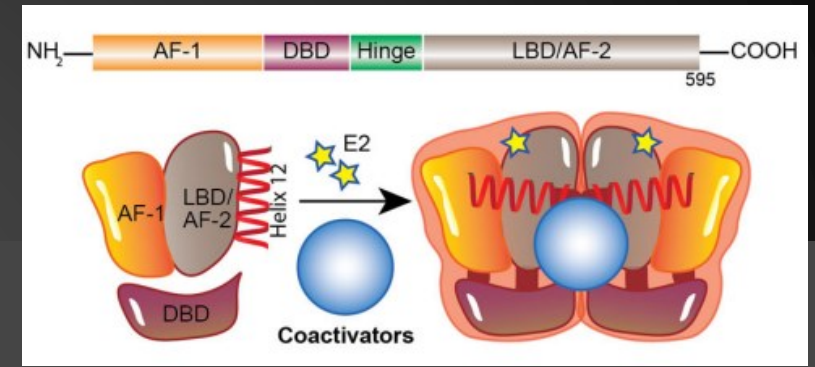


Figura 7: attivazione ER α .

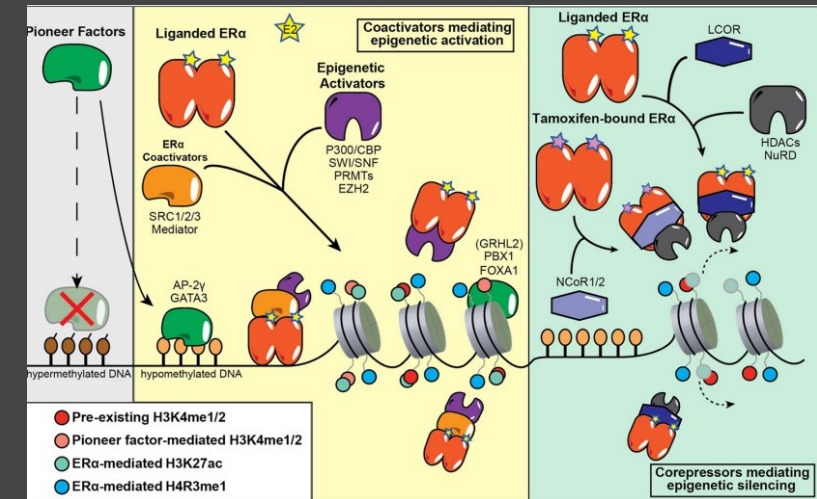


Figura 8: attività trascrizionale di fattori pionieri ed ER α .

Immagini 7 e 8 ricavate da www.nature.com.

TERAPIA ENDOCRINA

Ha come bersaglio l'asse oncogenico E2- ER α , è rappresentata da tre classi di farmaci principali:

➤ SERM, "Selective Estrogen Receptor Modulators"

- Il **Tamoxifene** fu il primo agente approvato con target ER α , ormai in utilizzo da più di trent'anni. Solitamente in donne pre-menopausa;
- Questa molecola compete con E2 per ER α , previene il reclutamento di cofattori che espongono il DNA a ER α ;
- Il suo meccanismo agonista nella regione AFI, comporta mancata attivazione di ER α e blocco di modificazioni post-trascrizionali mediate da CDK7, MAPK e mTOR per mezzo del reclutamento di corepressori.

➤ SERD, "Selective Estrogen Receptor Degraders"

- Antagonisti competitivi. Impediscono la dimerizzazione di ER α e la sua localizzazione nel nucleo, portando a blocco completo della via trascrizionale ER α -mediata tramite degradazione del recettore;
- Aspettativa di sopravvivenza maggiore rispetto agli AI in pazienti che precedentemente non avevano svolto terapia ormonale;
- Usati solitamente in donne post-menopausa assieme ad AI e con inibitori CDK4/6;
- Potenziale chimico limitato da possibili danni al tessuto muscolare.

➤ AI, "Aromatase Inhibitors". Possono essere:

- **Steroidei**, legano irreversibilmente l'aromatasi ➔ **Exemestano**;
- **Non steroidei**, legano reversibilmente e competitivamente l'aromatasi ➔ **Letrozolo**.

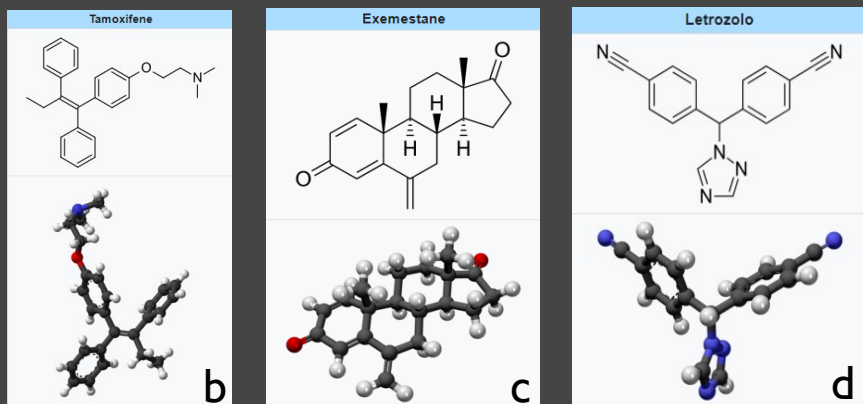
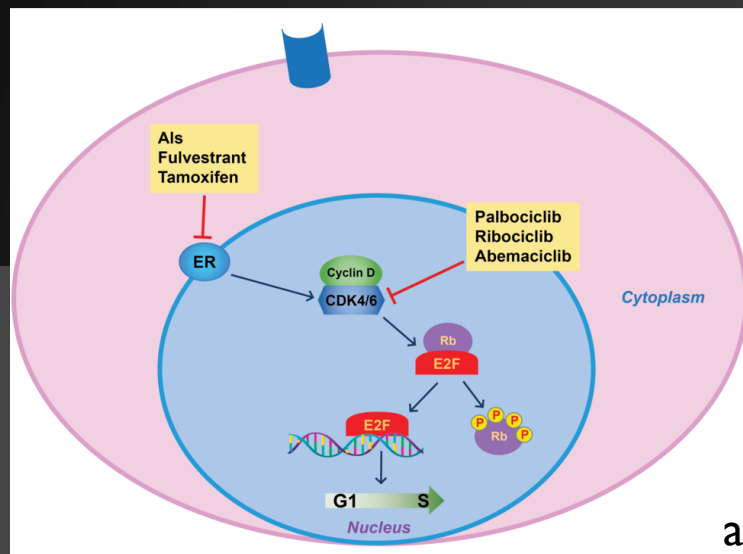


Figura 9, immagini ricavate da wikipedia.com

- Figura 8 a: immagine schematica sul meccanismo d'azione della terapia endocrina;
- Figura 8 b, c, d: immagini di alcuni farmaci endocrini.

Attualmente sono in via di sviluppo farmaci in grado di legare ER α che combinano l'azione di SERM e SERD.

RESISTENZA ALLA TERAPIA ENDOCRINA

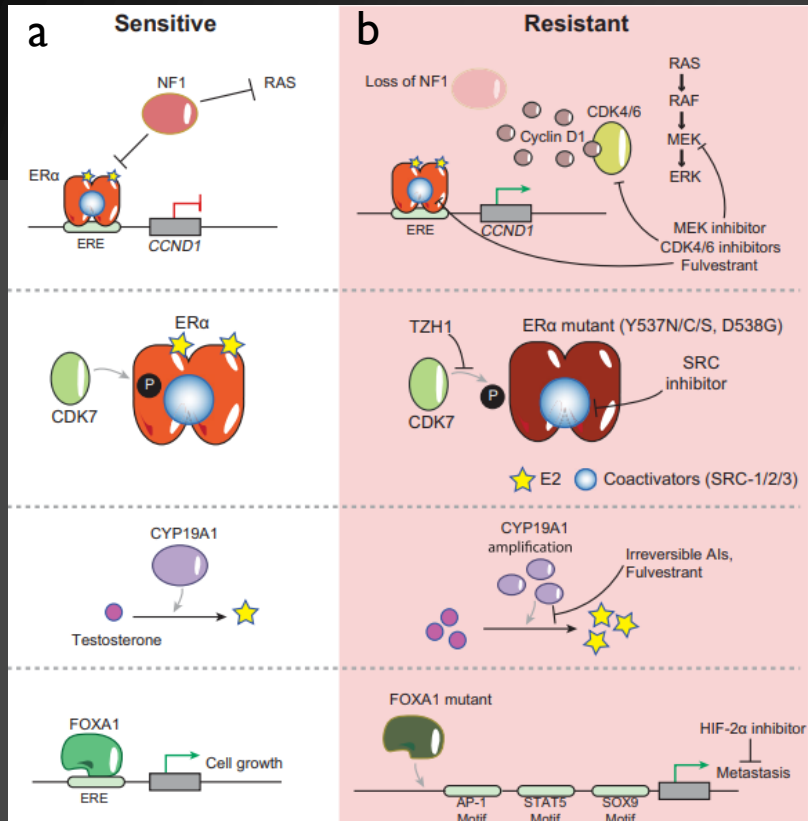


Figura 10, immagine ricavata da www.nature.com

- Figura 10 a: fenotipo sensibile alla terapia;
- Figura 10 b: fenotipo resistente alla terapia nelle mutazioni elencate.

- Purtroppo, nel 25% dei casi, a seguito dell'utilizzo di agenti endocrini, le cellule tumorali sono in grado di acquisire resistenza alla terapia. Ciò avviene mediante mutazioni genetiche che eliminano o modificano i bersagli endocrini, in modo da bypassare la via ER α -mediata;
- Queste mutazioni sono presenti nell'1% di tumori iniziali (resistenza intrinseca) ma ben nel 20/40% di metastasi post trattamento endocrino ➔ Evidenza di resistenza acquisita;
- Si sono osservate principalmente mutazioni che comportano:
 - **Perdita o alterazioni di coregolatori di ER α** , es NFI (GTPasi, corepressore di ER α), con una sua perdita si verifica disregolazione di ER α , overespressione di ciclina D, rapido passaggio G1/S, proliferazione incontrollata;
 - **Alterazioni del gene *ESR1*** (codificante ER α) che generano un ER α modificato (sostituzione dominio DBD con proteina YAPI), in grado di attivarsi a prescindere dal legame con E2 e dalla fosforilazione di CDK7, sottraendo bersagli terapeutici;
 - **Mutazioni del gene per l'aromatasi** (enzima CYP19A1) portano ad un incremento dei livelli di estrogeni complicando la terapia. Questa mutazione è stata osservata in pazienti che avevano concluso la terapia con AI;
 - **Mutazioni missenso del gene *FOXA1* e amplificazioni degli enhancer**, si genera una FOXA1 overespressa e con attività aumentata. Ciò comporta crescita cellulare incontrollata e formazione di metastasi.

PROSPETTIVA EPIGENETICA DI CURA

- La terapia endocrina risulta efficace verso tumori al seno di grande volume, ma fallisce nel colpire piccole popolazioni cellulari, che possono provocare resistenza e ricaduta;
- Le **disregolazioni epigenetiche** sono i fattori che più contribuiscono a oncogenesi e resistenza terapeutica come conseguenza dell'adattamento alle condizioni di stress generate dagli antitumorali ➡ Plasticità epigenetica;
- È stato osservato che, una prolungata soppressione di ER α porta a mutazione del gene **ARID1A**, perdita di espressione di ER α , switch fenotipico delle cellule da luminali a basali e quindi resistenza;
- Sono in sviluppo molecole “epidrugs” in grado di colpire regolatori di cromatina:
 - **Inibitori di HDAC** (Entinostat e Varinostat), bloccano HDAC impedendo l'acetilazione della Lys 27 della coda dell'istone H3 (**H3K27AC**). Questo evita l'ipermetilazione di **ESR1** tipica della resistenza endocrina. Ma legano anche siti off target ➡ Beneficio limitato;
 - **Componenti di ipometilazione del DNA** (Decitabina e 5-azocitidina), risolvono la trimetilazione della Lys 27 dell'istone H3 (**H3K4me3**) inibendo le molecole che la causano.

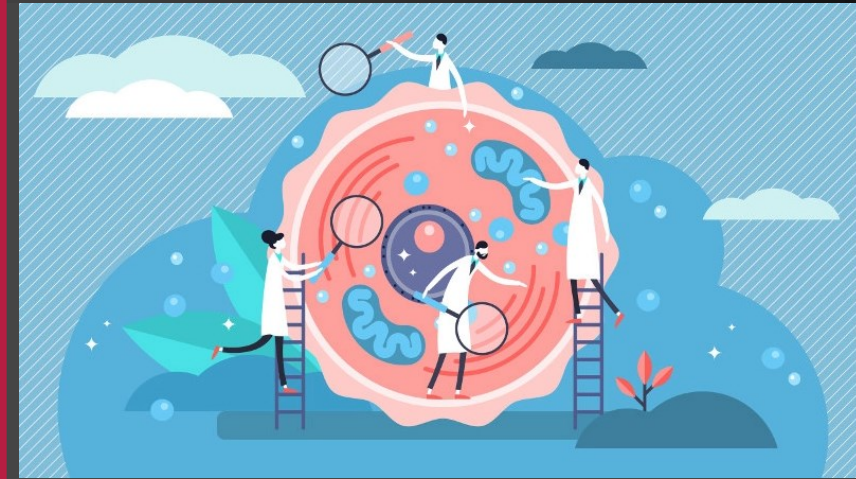


Figura 11

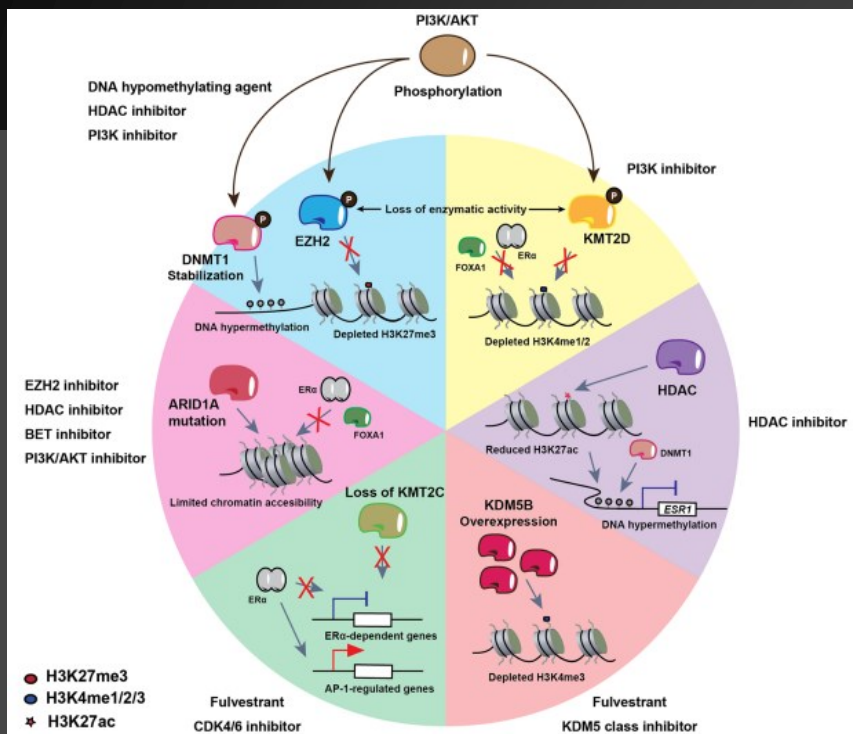


Figura 12: pathway PL3K/AKT e modifiche innescate da una sua alterazione. Immagine ricavata da www.nature.com

➤ La ridistribuzione di queste modifiche epigenetiche repressive risponde allo stesso pathway di segnale: **PL3K/AKT**.

- **PL3K** regola l'epigenoma del tumore al seno metilando enhancer di ERα e FOXA1;
- **AKT** fosforila KMT2D, EZH2, DNMT1 inibendone l'attività metil-transferasica;
- Quindi gli enhancer per ERα e suoi coattivatori rimangono metilati, indisponibili;
- Vengono a mancare i bersagli della terapia endocrina ➡ Fenotipo resistente.

L'inibizione di PL3K/AKT in combinazione con farmaci epigenetici è una forte candidata come strategia di cura.

➤ Recentemente si è scoperto che **KDM5B** (demetilasi), ha un ruolo nell'aumento della variabilità e quindi della resistenza in cellule tumorali luminali:

- Regola l'eterogeneità della trascrittoma cellulare per diminuzione della larghezza della **H3K4me3** (trimetilazione della Lys4 di H3);
- Questo consente di acquisire **variabilità trascrizionale** e quindi resistenza. La **plasticità epigenetica** aumenta la fitness della cellula tumorale;
- Inibitori di questo enzima hanno dimostrato un aumento di sensibilità al Fulvestrant (SERD) sia in linee cellulari ormone-sensibili che endocrino-resistenti.

PROSPETTIVE FUTURE: MODIFICAZIONI EPIGENETICHE DELL'RNA NEL TUMORE AL SENO



Figura 13: immagine RNA ripiegato ad ansa.

- Disregolazioni nei processi di maturazione degli RNA sono coinvolte in patogenesi tumorale e resistenza.
- Modifiche chimiche di proteine coinvolte nella decodifica o nella regolazione degli RNA possono alterare importanti processi biologici in cui sono coinvolti questi acidi nucleici:
 - **ALKBH5** (demetilasi), è un'oncoproteina di cellule tumorali del seno. Rimuove il metile della 6-metil-adenosina degli RNA in maturazione, aumentandone la stabilità e il legame con le binding protein → Proliferazione e turnover cellule staminali del tumore al seno;
 - **YBX1**, è un oncogene che interagisce con la 5-metil-citosina degli RNA ma anche direttamente con ER α . Regolando la trascrizione e quindi la proliferazione tumorale;
 - **MePCE** (metiltransferasi), metila il CAP5' degli RNA conferendo potenziale invasivo alle cellule del tumore al seno.

Studi clinici di queste molecole potrebbero essere approfonditi in futuro e fornire nuove armi nella lotta alla progressione e resistenza tumorale.

CONCLUSIONE

- I risultati della sperimentazione clinica in termini di efficacia e tossicità non dimostrano l'ipotesi di lavoro. Ciò va attribuito al fatto che queste molecole hanno numerosi substrati con cui interagire, oltre a quelli di interesse, quindi sono poco selettive;
- La reversibilità dei processi epigenetici in questione rimane la prima preoccupazione per quanto riguarda la riespressione di geni terapeutico-resistenti in assenza di epidrugs;
- L'approccio epigenetico, se perfezionato, rimane un'ottima intuizione, potenzialmente in grado di salvare e migliorare la vita di moltissime donne.
- Le epidrugs potranno fornire l'opportunità di risensibilizzare cellule tumorali endocrino-resistenti, la strada per un possibile uso clinico è ancora lunga;

La ricerca sta tentando di risolvere questioni che potrebbero far compiere passi enormi alla terapia epigenetica del tumore al seno.

Dedicato alle dott.sse Paola Tomassini e Giovanna Piratoni

Esempi di umiltà e coraggio indelebili

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- Anatomia Microscopica Atlante. M.Morrone. Edi-Erme;
- Biologia, Cellula e Tessuti. Colombo,Olmo. Edi-Erme;
- Biologia Molecolare del Gene. James D. Watson. Zanichelli;
- Fisiologia. D'Angelo, Perez. Edi-Erme.

- www.nature.com "Epigenetics mechanisms in breast cancer therapy and resistance" L. Garcia-Martinez;
- www.airc.it;
- www.wikipedia.com;
- www.treccani.it.

RIASSUNTO

La maggior parte dei tumori al seno esprime alti livelli di ER α attivo, l'utilizzo di molecole in grado di alterare questo pathway rappresenta la principale metodologia di trattamento per combattere ricaduta e resistenza tumorale. La terapia endocrina ha dimostrato efficacia nel trattamento di cellule tumorali ormone-sensibili del tumore al seno sin dai primi utilizzi. Purtroppo, può verificarsi resistenza terapeutica, questa può innescare processi che causano recidive della patologia. Studi recenti hanno aumentato le conoscenze in merito al cambiamento della struttura della cromatina e come le deregolazioni di fattori epigenetici possano guidare il passaggio da un fenotipo sensibile ad uno resistente. L'epigenoma infatti, risulta essere determinante nella risposta alla terapia endocrina. I fattori epigenetici sono in studio per diventare target farmacologici con lo scopo di combattere e superare la resistenza terapeutica.