



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

**CORSO DI LAUREA**  
**SCIENZE BIOLOGICHE**

**MUTAZIONI MULTIPLE ALL'INTERNO DI SINGOLI ONCOGENI**  
**ROLE OF MULTIPLE MUTATIONS IN INDIVIDUAL ONCOGENES**

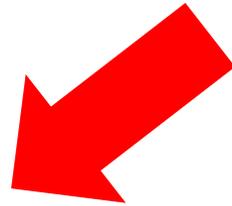
**CANDIDATO**  
**PIETRO CILLARI**

**DOCENTE REFERENTE**  
**DOTT. PROF. MARCO BARUCCA**

**SESSIONE LUGLIO 2022/2023**  
**ANNO ACCADEMICO 2022/2023**

# INTRODUZIONE

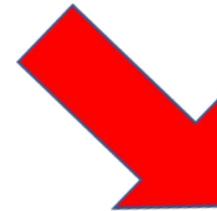
Con i progressi fatti nello studio del genoma degli organismi viventi sono stati identificati molti geni del cancro e mutazioni (chiamate «driver») che guidano il tumore dei pazienti.



ONCOSOPPRESSORI (TSG)



Interrotti da mutazioni recessive (senza senso o frameshift) su entrambi gli alleli (inattivazione biallelica).

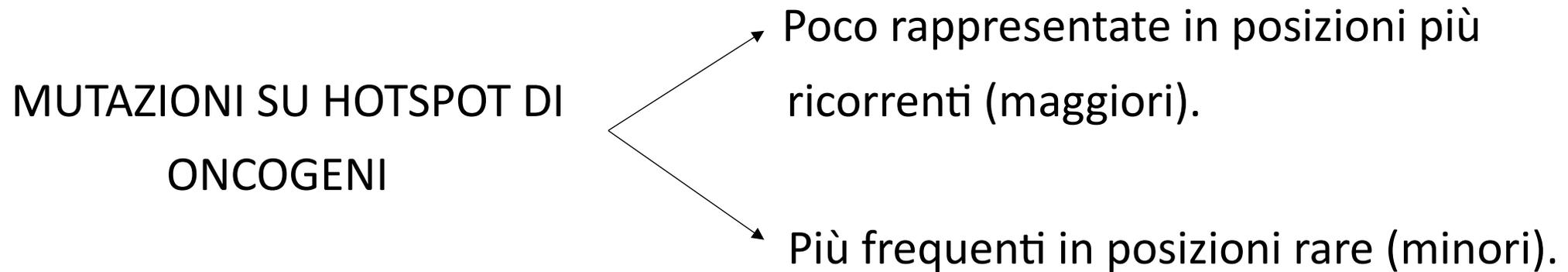


ONCOGENI



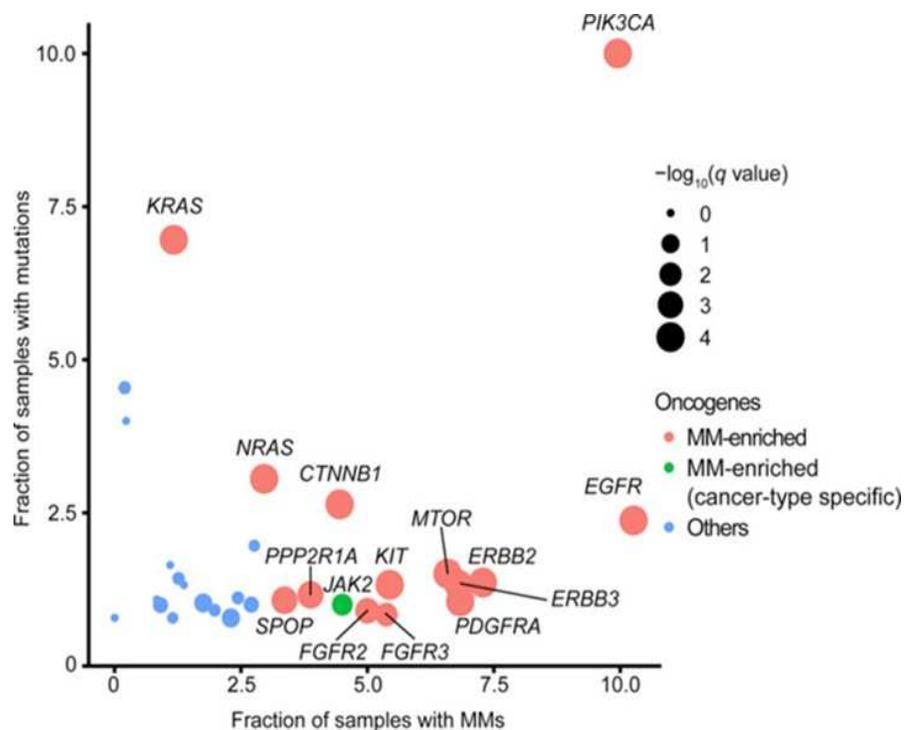
Attivati da mutazioni dominanti (basta mutare un solo allele), principalmente mutazioni missenso.

- Oncosoppressori → mutazioni distribuite su tutta la loro lunghezza.
- Oncogeni → mutazioni missenso in specifici «hotspot».



- Le mutazioni minori dell'hotspot sono funzionalmente deboli.
- Il 12%-87% delle mutazioni hotspot si trova in posizioni minori negli oncogeni.

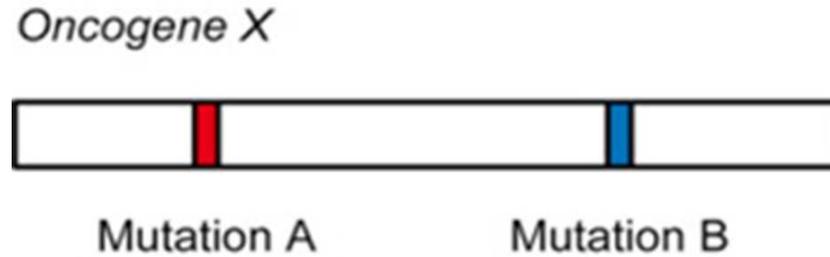
# MM «DE NOVO»



**Figura 2** La prevalenza di mutazioni multiple (MM) tra gli oncogeni. Frazione di campioni con MM (rispetto al numero totale di campioni mutati; asse x) e frazione di campioni con mutazioni (asse y) su 30 oncogeni. Gli oncogeni con un significativo arricchimento di MM nei modi pan-cancro e cancro-tipo specifico sono indicati rispettivamente in rosso e verde (Saito Y, Koya J, Kataoka K. Multiple mutations within individual oncogenes. Cancer Sci. 2021 Feb;112(2):483-489. doi: 10.1111/cas.14699. Epub 2021 Jan 11. PMID: 33073435; PMCID: PMC7894016.).

- Su 60.000 tumori, ¼ degli oncogeni esaminati presentavano MM («mutazioni multiple»).
- Questi sono MM «de novo», osservati in tumori primari non trattati (non correlati alla terapia).
- **CONCETTO DI CLONALITA'** = si generano cloni su cloni e il tumore acquisisce nel tempo una complessità più elevata (<https://oncoinfo.it/wp-content/uploads/2019/04/concept-paper-italiano.pdf>).

MM presenti in *cis*  
(due mutazioni  
sullo stesso allele).



MM è una  
combinazione di  
mutazioni driver-  
driver.

9% in primary untreated cancers

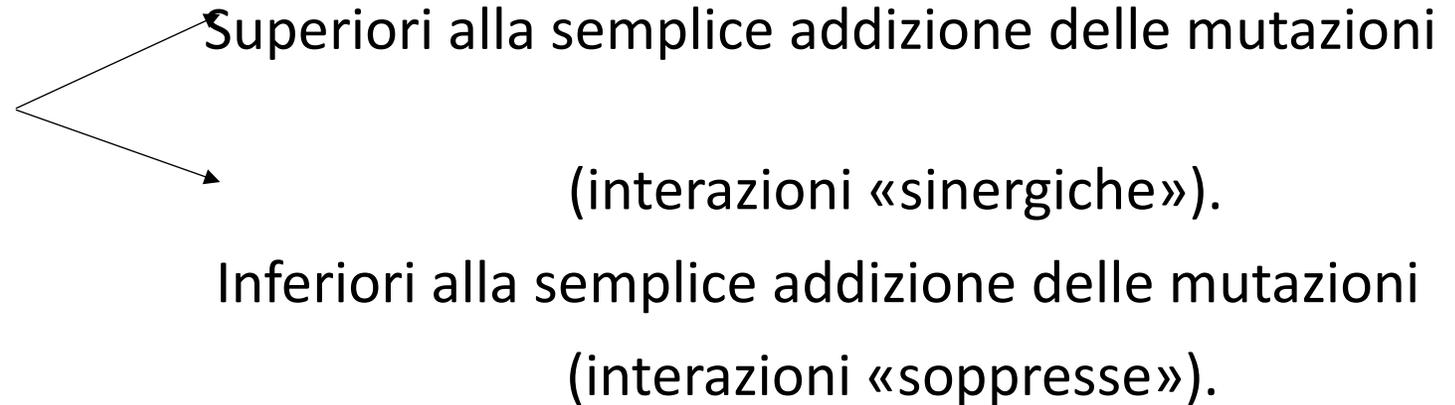
**Figura 3A** MM De Novo. Sono frequenti due mutazioni (mutazioni A e B) all'interno di singoli oncogeni (9% nei tumori primari non trattati) e si trovano principalmente in cis («Saito Y, Koya J, Kataoka K. Multiple mutations within individual oncogenes. Cancer Sci. 2021 Feb;112(2):483-489. doi: 10.1111/cas.14699. Epub 2021 Jan 11. PMID: 33073435; PMCID: PMC7894016»).

MM deriva da una coppia di mutazioni che sono rare come mutazioni singole. Nel MM si osservano mutazioni da hotspot «minori».

MM diversi da singole mutazioni per tipo, posizione e sostituzione amminoacidica.

# INTERAZIONI GENETICHE TRA MUTAZIONI DRIVER-DRIVER...

Gli effetti di due mutazioni che  
si combinano possono essere:



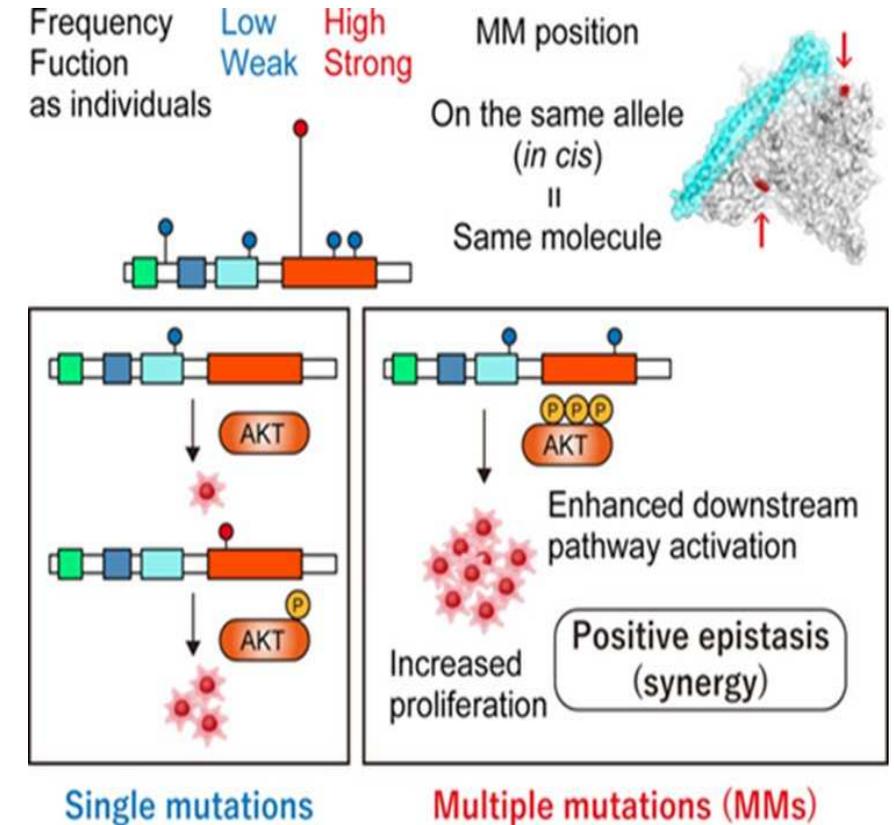
## ...EPISTASI:

effetto di una variante che maschera  
un'altra variante o deviazione dal risultato quando  
si combinano le mutazioni.

- EPISTASI INTERMOLECOLARE = tra varianti in geni diversi (importante il **concetto di esclusività**).
- EPISTASI INTRAMOLECOLARE = tra varianti dello stesso gene (rappresentata da MM oncogenica).

Attraverso studi di western blotting e saggi di crescita cellulare, si è visto che:

- MM ha effetti superiori sulla proliferazione, rispetto a mutazioni singole → epistasi positiva (sinergia, figura 1).
- Alcuni studi su MM riguardanti *PIK3CA* (responsabili del tumore al seno) dimostrano che il meccanismo dell'epistasi positiva mediata da MM oncogenico è un **meccanismo conformazionale**.
- Vi sono MM di hotspot principali (maggior-maggiore) meno comuni o funzionalmente esaurite → epistasi negativa (soppressione).

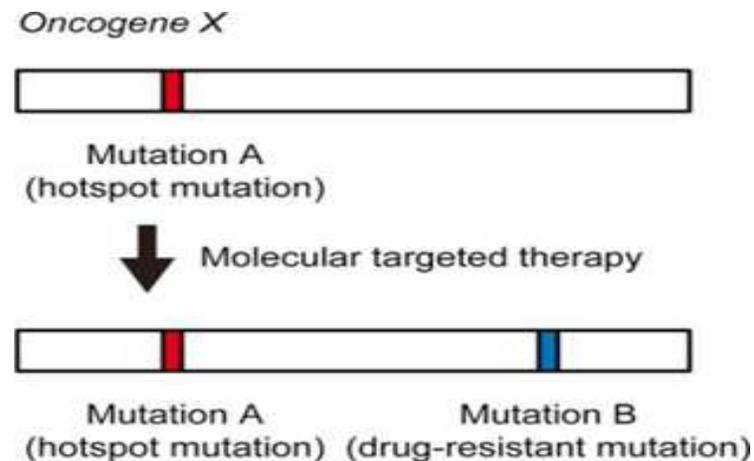


**Figura 1** Caratteristiche delle mutazioni multiple de novo (MM) all'interno di singoli oncogeni. Mutazioni funzionalmente deboli, minori (non frequenti) sono selezionate in de novo MM. MM in cis migliora sinergicamente l'attivazione del percorso a valle e la crescita del tumore, suggerendo un'epistasi positiva («Saito Y, Koya J, Kataoka K. Multiple mutations within individual oncogenes. *Cancer Sci.* 2021 Feb;112(2):483-489. doi: 10.1111/cas.14699. Epub 2021 Jan 11. PMID: 33073435; PMCID: PMC7894016»).

# MM SECONDARIO VS MM «DE NOVO»

**MM SECONDARIO** → MM associato a mutazioni secondarie resistenti ai farmaci.

Es. pazienti con carcinoma polmonare (mutazioni a carico di *EGFR*) trattati con inibitori della tirosin-chinasi (TKI) → dopo risposta iniziale, hanno acquisito resistenza ai farmaci (acquisiscono MM in *EGFR*).



**Figura 3B** MM secondario associato a mutazioni resistenti ai farmaci. I tumori con mutazioni hotspot (mutazione A) trattati con terapia a bersaglio molecolare spesso acquisiscono mutazioni secondarie (mutazione B), che conferiscono resistenza alla terapia («Saito Y, Koya J, Kataoka K. Multiple mutations within individual oncogenes. *Cancer Sci.* 2021 Feb;112(2):483-489. doi: 10.1111/cas.14699. Epub 2021 Jan 11. PMID: 33073435; PMCID: PMC7894016»).

MM «DE NOVO»	MM SECONDARIO
Si verifica in <i>cis</i> .	Si verifica in <i>cis</i> .
Sono selezionate mutazioni raramente osservate come mutazioni singole.	Sono selezionate mutazioni raramente osservate come mutazioni singole.
Ci sono combinazioni ricorrenti, anche se sono sovrarappresentate mutazioni provenienti da domini diversi o che coinvolgono hotspot minori.	Si verificano in specifici amminoacidi, in particolare nei residui all'interno o nelle tasche leganti i farmaci, indebolendo l'affinità con inibitori specifici.

# MM DA SUBCLONI

Come detto...

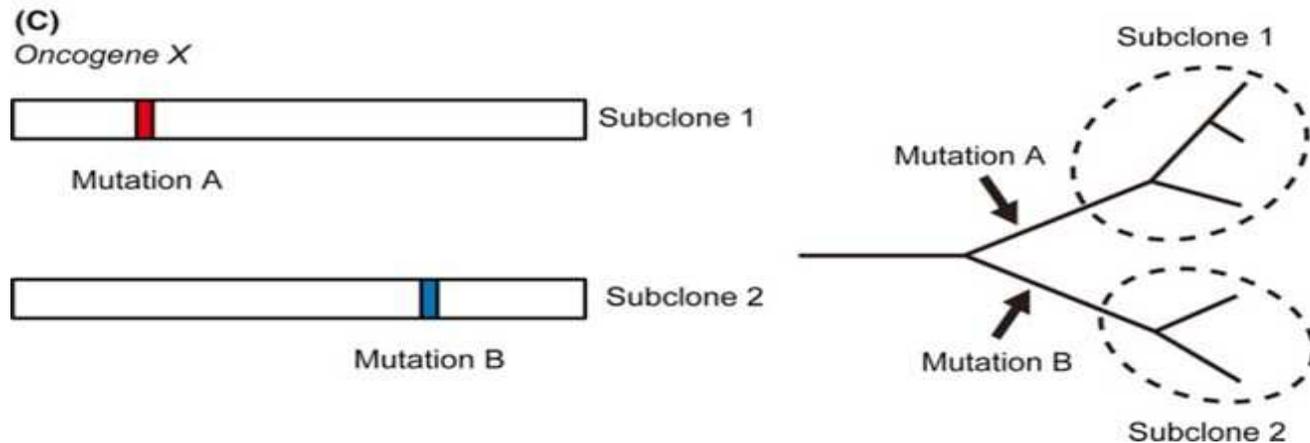
- MM in *cis* → coinvolgono hotspot oncogenici minori.

...ma possono esserci:

- MM in *trans* → coinvolgono combinazioni di mutazioni su hotspot maggiori-maggiori.

MM in trans hanno frequenze alleliche discordanti e basse,

suggerendo che sorgono da subcloni differenti  MODELLO DI «EVOLUZIONE PARALLELA»  
(Figura 3C)



**Figura 3C** MM da diversi sottocloni (a sinistra). Alberi evolutivi che illustrano il MM che causa un'evoluzione parallela (a destra). Due popolazioni subclonali di cellule tumorali (sottocloni 1 e 2) acquisiscono indipendentemente mutazioni (mutazioni A e B) nell'oncogene X, determinando un'evoluzione indipendente («Saito Y, Koya J, Kataoka K. Multiple mutations within individual oncogenes. *Cancer Sci.* 2021 Feb;112(2):483-489. doi: 10.1111/cas.14699. Epub 2021 Jan 11. PMID: 33073435; PMCID: PMC7894016»).

# A LIVELLO CLINICO, QUESTI RISULTATI COME POSSONO ESSERCI UTILI?

---

1. MM «de novo» e MM secondario possono essere utilizzati come biomarcatori → previsione della sensibilità alla terapia mirata.
2. Importanza nel valutare le mutazioni minori → si evita di trascurare pazienti che possono trarre beneficio da determinati inibitori.
3. Importanza di una valutazione completa delle mutazioni, almeno negli oncogeni arricchiti con MM.

# RIASSUMENDO

---

- Gli MM rappresentano dei meccanismi alternativi di attivazione degli oncogeni.
- Gli MM possono essere osservati in tumori primari non trattati («de novo») o possono essere acquisiti in risposta ad una resistenza ai farmaci verificandosi generalmente in *cis*, oppure possono verificarsi in *trans* evolvendosi parallelamente in due sottocloni differenti.
- MM selezionano principalmente mutazioni dell'hotspot minori, che individualmente hanno un basso potenziale oncogenico, il quale si rafforza in combinazione. Questo suggerisce l'importanza dell'epistasi nel cancro.
- MM è ricorrente sotto epistasi positiva, ma vi sono casi di epistasi negativa o di ordine superiore (coinvolgendo più di due mutazioni).

*GRAZIE PER L'ATTENZIONE*

