

Titolo: "Analisi del trascrittoma: regolazione della staminalità del cancro nel carcinoma duttale mammario in situ da parte dei composti della vitamina D - Analysis of the Transcriptome: Regulation of Cancer Stemness in Breast Ductal Carcinoma In Situ by Vitamin D Compounds"

Codice: VID003

Autore: Shan et al.

Data: 2020

Rivista: Cancer Prevention Research 13 (8): 673–686.

Argomento: vitamina D

Accesso libero: si

DOI: <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-19-0566>

URL: <https://aacrjournals.org/cancerpreventionresearch/article/13/8/673/47379/>

BLOG: <https://www.metododibellaevidenzescientifiche.com/2025/01/31/vid003-shan-et-al-2020/>

Parole chiave: carcinoma duttale, vitamina D, staminalità, metilazione, regolazione genica, trascrittoma, mammosfere

Tumore: carcinoma al seno

Traduzione: essendo un articolo molto tecnico, la sua traduzione è stata semplificata. La sezione Introduzione è pressoché fedele all'originale. La sezione Materiali e Metodi non è stata tradotta. La sezione "Risultati" è stata presentata per punti; la sezione "Discussione" presenta diverse semplificazioni.

**Punti di interesse:** Il cancro al seno è il tumore più comune e la seconda causa di morte per cancro nelle donne in tutto il mondo. Istologicamente, il cancro al seno può essere suddiviso in carcinoma duttale invasivo (IDC), carcinoma duttale in situ (DCIS) e carcinoma lobulare invasivo. Circa il 20% dei nuovi tumori al seno diagnosticati nel 2019 tra le donne statunitensi sono stati classificati come DCIS, per un totale di oltre 48.000 casi. Si prevede che fino al 50% dei casi di DCIS progredirà in IDC entro 10 anni dalla diagnosi iniziale. La storia naturale della progressione del DCIS in IDC deve ancora essere completamente determinata. È noto che la segnalazione della vitamina D è un potenziale bersaglio per la chemioprevenzione del cancro al seno. Il nostro laboratorio ha dimostrato che i composti della vitamina D inibiscono la carcinogenesi (o tumorigenesi) del cancro al seno triplo negativo riducendo l'espressione dei geni associati alle cellule staminali (CSC), e inducendo la differenziazione e regolando positivamente i marcatori mioepiteliali.

Questo studio è stato intrapreso per sviluppare profili di cambiamenti nell'espressione genica e nella metilazione in una coltura cellulare di DCIS umano (MCF10DCIS.COM) indotti da vitamina D e analoghi, per acquisire una comprensione dei percorsi molecolari coinvolti e identificare potenziali bersagli nella chemioprevenzione della progressione del cancro al seno da DCIS a IDC.

I risultati del lavoro dimostrano che la vitamina D e il suo analogo sono in grado di:

- 1) inibire la formazione di mammosfere nella coltura cellulare studiata
- 2) regolare l'espressione genica di migliaia di geni, alcuni dei quali con rilevanza accertata nel cancro al seno. In particolare la vitamina D controlla l'espressione genica di geni coinvolti nella staminalità e progressione del cancro al seno (transizione epiteliale-mesenchimale, invasione, migrazione cellulare, citochinesi), chemioresistenza, fenotipo basale del cancro al seno, involuzione

e differenziazione della ghiandola mammaria.

3) regolare l'espressione genica tramite la metilazione dei promotori nelle sequenze geniche controllate.

Ulteriori approfondimenti hanno:

4) identificato i regolatori a monte dei geni diversamente regolati da vitamina D e analoghi, e identificato i target a valle del recettore della vitamina D. Tra questi ultimi, il gene TP63 è un percorso chiave a valle del recettore vitamina D. Il TP63 è un membro della famiglia di fattori di trascrizione del soppressore tumorale p53. TP63 è essenziale per lo sviluppo e il mantenimento delle cellule staminali epiteliali. La perdita di espressione di TP63 promuove la migrazione delle cellule maligne, l'invasione e le metastasi a distanza nei tumori. I livelli proteici di TP63 nelle mammosfere sono sovraregolati in seguito al trattamento con composti della vitamina D.

5) evidenziato che il trattamento con la vitamina D porta all'aumento dei marcatori della differenziazione miopiteliale. Nel complesso, i dati suggeriscono che i composti della vitamina D prevengono la progressione del DCIS in IDC riducendo le cellule staminali cancerose (o la loro "staminalità") nella popolazione e inducendo invece la differenziazione mioepiteliale.

In sintesi, in questo lavoro sono stati identificati i cambiamenti epigenetici e di espressione genica regolati da vitamina D, e dal suo analogo preso in esame, nelle mammosfere MCF10DCIS utilizzando tecniche di analisi trascrittoma dell'RNA (RNA-seq) e della metilazione (metil-seq). I dati sul trascrittoma hanno fornito una visione globale dei geni regolati in modo differenziale da vitamina D e il suo analogo. Un elenco di potenziali geni interessati includeva quelli coinvolti nella staminalità e nella progressione del cancro al seno. I dati sulla metilazione hanno rivelato una modifica epigenetica dell'espressione genica nelle mammosfere MCF10DCIS. Questi risultati identificano potenziali percorsi chiave che potrebbero svolgere un ruolo significativo nella progressione del DCIS verso l'IDC e nella staminalità del cancro e offrono obiettivi che potrebbero essere sfruttati per inibire questa progressione.

Traduzione articolo

## Riassunto

**Il carcinoma duttale in situ (DCIS), che rappresenta una diagnosi su cinque di nuovo cancro al seno, progredirà in carcinoma duttale invasivo (IDC) potenzialmente letale in circa il 50% dei casi. È stato dimostrato che i composti di vitamina D inibiscono la progressione verso IDC nel modello MCF10DCIS. Questa inibizione sembra comportare una riduzione della popolazione simile alle cellule staminali tumorali nei tumori MCF10DCIS. Per identificare i geni coinvolti negli effetti della vitamina D, è stata intrapresa un'analisi trascrittomica globale delle cellule MCF10DCIS cresciute in colture di mammosfera, in cui le cellule simili alle cellule staminali tumorali crescono preferibilmente e producono colonie per auto-rinnovamento e maturazione, in presenza e assenza di  $1\alpha25(\text{OH})2\text{D}_3$  e un analogo della vitamina D, BXL0124. Utilizzando il sequenziamento dell'RNA di nuova generazione, abbiamo scoperto che i composti della vitamina D sottoregolavano i geni coinvolti nel mantenimento delle cellule staminali del cancro al seno (ad esempio, GDF15), nella transizione epitelio-mesenchimale, nell'invasione e nelle metastasi (ad esempio, LCN2 e S100A4) e nella chemioresistenza (ad esempio, NGFR, PPP1R1B e AGR2), mentre sovraregolavano i geni associati a un fenotipo basale (ad esempio, KRT6A e KRT5) e i regolatori negativi della tumorigenesi del seno (ad esempio, EMP1). Lo stato di metilazione genica è stato analizzato per determinare se i cambiamenti nell'espressione indotti dai composti della vitamina D si verificassero tramite questo meccanismo. È stata eseguita una Ingenuity Pathway analysis (IPA) per identificare i regolatori a monte, e i geni del percorso di**

**segnalazione a valle, regolati in modo differenziale dalla vitamina D, inclusi in particolare TP63 e i percorsi canonici mediati dal recettore della vitamina D. Questo studio fornisce una profilazione globale delle modifiche nella firma genetica del DCIS regolate dai composti della vitamina D e possibili bersagli per la chemioprevenzione della progressione del DCIS in IDC nei pazienti.**

## **Introduzione**

Il cancro al seno è il tumore più comune e la seconda causa di morte per cancro nelle donne in tutto il mondo (1). Sulla base della presenza o assenza del recettore degli estrogeni (ER), del recettore del progesterone (PR) e del recettore del fattore di crescita epidermico (HER2), i tumori al seno sono suddivisi in sottotipi: luminale A (ER+ e/o PR+; HER2-), luminale B (ER+ e/o PR+; HER2+), basale (ER-, PR- e HER2-) e arricchito di HER2 (ER-, PR- e HER2+;) (2). Lo sviluppo del cancro al seno è un processo in più fasi che coinvolge cambiamenti epigenetici e genetici che contribuiscono alla crescita cellulare aberrante (3). Istologicamente, il cancro al seno può essere suddiviso in carcinoma duttale invasivo (IDC), carcinoma duttale in situ (DCIS) e carcinoma lobulare invasivo. Circa il 20% dei nuovi tumori al seno diagnosticati nel 2019 tra le donne statunitensi sono stati classificati come DCIS, per un totale di oltre 48.000 casi (4). Il DCIS è un tipo non invasivo in fase iniziale caratterizzato dalla proliferazione di cellule epiteliali maligne nei dotti (5). Deriva da iperplasia duttale atipica e può progredire in IDC e cancro metastatico (5). Si prevede che fino al 50% dei casi di DCIS progredirà in IDC entro 10 anni dalla diagnosi iniziale (6). Sono state eseguite analisi dell'espressione genica e dei micro RNA (miRNA) per chiarire le caratteristiche molecolari della progressione del DCIS in IDC (7, 8). Tuttavia, la storia naturale della progressione del DCIS in IDC deve ancora essere completamente determinata.

Le cellule staminali tumorali (CSC) sono state identificate per la prima volta nel cancro al seno utilizzando i marcatori di superficie cellulare (CD44+/CD24-) (9). Questa popolazione è caratterizzata da firme di espressione genica delle cellule staminali, fenotipo farmaco-resistente e capacità di auto-rinnovamento in vitro e in vivo (10). Le lesioni DCIS umane formano sferoidi e strutture simili a dotti in colture organoidi ex vivo e tumori in topi immunodeficienti. Questo suggerisce che in questi tumori precoci siano presenti cellule simili a cellule staminali (11). MCF10DCIS.COM è un modello di coltura cellulare di DCIS umano che può dare origine sia a cellule mioepiteliali che luminali e avere progressione spontanea verso il cancro mammario invasivo in vivo (12, 13). Questa coltura cellulare contiene elevate sottopopolazioni di cellule con caratteristiche di staminalità, con capacità di auto-rinnovamento e sviluppo tumorale, simili alle CSC di tumori completamente invasivi (14). È ampiamente utilizzata come modello per lo sviluppo di IDC da lesioni precursori.

È noto che la segnalazione della vitamina D è un potenziale bersaglio per la chemioprevenzione del cancro al seno (15). Il nostro laboratorio ha dimostrato che i composti della vitamina D inibiscono la carcinogenesi (o tumorigenesi) del cancro al seno triplo negativo riducendo l'espressione dei geni associati alle cellule staminali (CSC), e inducendo la differenziazione e regolando positivamente i marcatori mioepiteliali (16). Questi composti riducono la formazione di mammosfere in vitro e la tumorigenesi in vivo, sebbene i meccanismi molecolari di questi effetti non siano noti. BXL0124 è un analogo modificato del calcitriolo ( $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) con maggiore attività biologica a concentrazioni inferiori (17). BXL0124 inibisce inoltre la tumorigenesi dello xenotrapianto MCF10DCIS in modo più potente di  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , apparentemente attraverso il meccanismo simile di soppressione delle CSC (18). Questo studio è stato intrapreso per sviluppare profili totali di cambiamenti nell'espressione genica e nella metilazione nelle cellule MCF10DCIS indotte da composti della vitamina D, per acquisire una comprensione dei percorsi coinvolti, per identificare potenziali bersagli che potrebbero essere sfruttati nella chemioprevenzione della progressione del cancro al seno da DCIS a IDC.

## Risultati

- 1) I composti della vitamina D inibiscono la formazione di mammosfere.
- 2) Profilazione dell'espressione genica totale nelle cellule trattate con composti di vitamina D: l'analisi ha mostrato che la vitamina D e il suo analogo possono regolare l'espressione genica di oltre 10 mila geni. Alcuni hanno rilevanza accertata nel cancro al seno e in particolare nel: determinare la staminalità del cancro, la progressione del cancro al seno (transizione epiteliale-mesenchimale (EMT), invasione, migrazione cellulare, citochinesi), la chemioresistenza, fenotipo basale del cancro al seno, involuzione e differenziazione della ghiandola mammaria.
- 3) Individuata dimostrata una correlazione tra metilazione del DNA e cambiamenti nell'espressione dell'RNA nelle mammosfere trattate con vitamina D
- 4) Identificati i regolatori a monte dei geni differenzialmente regolati dai composti della vitamina D e identificati i target a valle del recettore della vitamina D.
- 5) Identificazione di TP63 come percorso chiave a valle dei composti della vitamina D. Il TP63 è un membro della famiglia di fattori di trascrizione del soppressore tumorale p53. TP63 è essenziale per lo sviluppo e il mantenimento delle cellule staminali epiteliali (28). La perdita di espressione di TP63 promuove la migrazione delle cellule maligne, l'invasione e le metastasi a distanza nei tumori (29). I livelli proteici nelle mammosfere di TP63 sono sovraregolati in seguito al trattamento con composti della vitamina D.
- 6) Identificati marcatori della differenziazione miopiteliale dopo trattamento con vitamina D e analogo. Nel complesso, dati suggeriscono che i composti della vitamina D prevengono la progressione del DCIS in IDC riducendo le cellule staminali cancerose (o la loro "staminalità") nella popolazione e inducendo invece la differenziazione mioepiteliale.

## Discussione

Abbiamo avviato questo studio per ottenere informazioni sui cambiamenti nell'espressione genica determinati dai composti della vitamina D in colture cellulari del cancro al seno MCF10DCIS con il fine di fornire indizi sui meccanismi molecolari con i quali questi composti riducono la progressione del DCIS in IDC. Abbiamo osservato che i composti della vitamina D hanno ridotto significativamente la formazione di mammosfere, un indicatore del fatto che hanno ridotto la popolazione simile alle cellule staminali. Per quanto riguarda la regolazione dei geni che sono comunemente e differenzialmente regolati dalla vitamina D, l'analogo della vitamina D (BXL0124) ha regolato un numero maggiore di geni rispetto a  $1\alpha 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , coerente con il fatto che è un agonista più potente della segnalazione del recettore della vitamina D (VDR). Tra i geni controllati dalla vitamina D è stato stilato un elenco di 12 geni candidati per ulteriori studi. Questi geni sono coinvolti infatti nella promozione della crescita tumorale (aumento delle mammosfere e dei marcatori della staminalità delle cellule, promozione dell'invasione e della motilità delle cellule tumorali).

La chemioresistenza è uno dei tratti distintivi della staminalità del cancro (39). Il recettore del fattore di crescita nervoso (NGFR), un marcatore CSC nel melanoma, insieme al suo bersaglio a valle FGF13 (un mediatore della chemioresistenza), è aumentato nelle cellule del melanoma sensibili alla chemioterapia ma non nelle cellule chemio-resistenti (40). Le cellule del cancro al seno triplo negativo secernono il fattore di crescita nervoso che regola positivamente l'espressione di NGFR e inibisce l'induzione dell'apoptosi da parte di agenti chemioterapici (41). Nel nostro studio, l'espressione di NGFR è diminuita nelle mammosfere trattate con composti di vitamina D, suggerendo il possibile ruolo dei composti di vitamina D nella riduzione della chemioresistenza prendendo di mira le CSC.

KRT5 e KRT6 sono membri della famiglia del gene della cheratina coespressi durante la differenziazione dei tessuti epiteliali (42). Nel cancro al seno, KRT5 e KRT6a sono comunemente usati come marcatori del sottotipo basale (43). L'immunoistochimica dei campioni clinici di DCIS ha rivelato che l'espressione della citocheratina 5 e 6 era inversamente associata all'invasione nel tessuto mammario normale circostante (44). Pertanto, l'espressione aumentata di questi marcatori dopo il trattamento con composti di vitamina D suggerisce che la vitamina D induce la differenziazione mioepiteliale nel DCIS, impedendone la progressione verso l'IDC.

CAPN6 (calpaina-6), un membro della famiglia delle proteasi cisteiniche calcio-dipendenti, è sottoregolata nell'iperplasia duttale semplice e nell'iperplasia duttale atipica, ma sovraregolata nel carcinoma mammario DCIS, il che suggerisce la sua funzione nella progressione del carcinoma mammario (45). Il livello di espressione di CAPN6 è significativamente diminuito con il trattamento con vitamina D, indicando il suo effetto inibitorio nella progressione del carcinoma mammario.

Per convalidare ulteriormente i dati dell'analisi del trascrittoma (RNA-seq) dalla coltura di mammosfere MCF10DCIS, abbiamo eseguito un'analisi bioinformatica dei nostri dati in relazione al database disponibile al pubblico con cellule MCF10DCIS e confermato una forte relazione lineare positiva (Fig. S5 supplementare). Tuttavia, abbiamo osservato che i profili di espressione di alcuni geni nelle nostre mammosfere MCF10DCIS sono diversi da quelli delle cellule monostrato MCF10DCIS, suggerendo che questi geni potrebbero svolgere un ruolo nella crescita delle mammosfere guidata da staminali.

Lo stato di metilazione del DNA dei geni è stato esaminato per determinare se i loro cambiamenti nell'espressione fossero dovuti a cambiamenti nella metilazione del promotore indotta dai composti della vitamina D. Abbiamo scoperto che il trattamento con  $1\alpha 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  e BXL0124 ha mostrato modelli simili di cambiamenti nei profili di metilazione. Abbiamo anche identificato che alcuni dei siti di metilazione hanno mostrato una relazione diretta tra metilazione del DNA ed espressione dell'RNA, mentre alcuni hanno mostrato una relazione inversa: se la metilazione aumenta, l'espressione genica è stata sottoregolata e viceversa. Poiché un ampio corpo di prove mostra che la metilazione del promotore determina il silenziamento genico, per testare questa ipotesi, abbiamo selezionato il gene per un enzima che attiva la vitamina D, CYP24A1, che è fortemente indotto dai composti. Abbiamo scoperto che quando i promotori del gene sono ipometilati dai composti della vitamina D, l'espressione genica di CYP24A1 è sovraregolata. Nel complesso, questi risultati suggeriscono la regolazione epigenetica come potenziale meccanismo dei composti della vitamina D per la chemioprevenzione del cancro al seno.

La "Ingenuity Patway" analisi (IPA) dei trascrittomi ha rivelato potenziali percorsi di segnalazione e i target a valle, regolati dai composti della vitamina D nel DCIS. Tra questi, abbiamo selezionato il percorso TP63 per un'ulteriore analisi. Tp63, un membro della famiglia di fattori di trascrizione del soppressore tumorale p53, è essenziale per lo sviluppo e il mantenimento delle cellule staminali epiteliali (29). I topi modificati geneticamente per l'assenza di Tp63 hanno mostrato sviluppi mammari, epiteliali e cranio-facciali compromessi, indicando il ruolo di questo gene nella regolazione della proliferazione e della differenziazione di queste strutture (46). Studi di immunoistochimica (IHC) su tessuti mammari normali e malati mostrano che Tp63 è immunoreattivo nelle cellule mioepiteliali di lesioni normali e benigne ma non nel carcinoma mammario invasivo (47). Analisi recenti hanno mostrato che la migliore sopravvivenza complessiva è associata al fenotipo delle cellule mammarie mioepiteliali con espressione di Tp63 (48). La perdita di espressione di TP63 promuove la migrazione delle cellule maligne, l'invasione e le

metastasi a distanza nei tumori (13, 50).

I nostri dati hanno mostrato che nelle mammosfere DCIS trattate con  $1\alpha 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  e BXL0124, i livelli proteici di TP63 sono aumentati, in linea con la nostra ipotesi che il meccanismo con cui i composti della vitamina D inibiscono la progressione del DCIS verso l'IDC comporta una riduzione della popolazione simile alle CSC o della staminalità delle cellule. Per esplorare questa possibilità, abbiamo esaminato i marcatori della differenziazione mioepiteliale scoprendo che i composti di vitamina D hanno aumentato i livelli di marcatori di superficie delle cellule progenitrici mioepiteliali e basali.

In sintesi, abbiamo identificato cambiamenti epigenetici e di espressione genica regolati dai composti di vitamina D nelle mammosfere MCF10DCIS utilizzando tecniche di analisi dell'RNA (RNA-seq) e della metilazione (metil-seq). I dati sul trascrittoma hanno fornito una visione globale dei geni regolati in modo differenziale da  $1\alpha 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  e BXL0124. Un elenco di potenziali geni interessati includeva quelli coinvolti nella staminalità e nella progressione del cancro al seno. I dati sulla metilazione hanno rivelato una modifica epigenetica dell'espressione genica nelle mammosfere MCF10DCIS trattate con composti di vitamina D. Questa osservazione è ulteriormente supportata dalla convalida del gene CYP24A1. L'IPA ha identificato i principali regolatori a monte e i target a valle del VDR, tra cui, in particolare, TP63. Questi risultati identificano potenziali percorsi chiave che potrebbero svolgere un ruolo significativo nella progressione del DCIS verso l'IDC e nella staminalità del cancro e offrono obiettivi che potrebbero essere sfruttati per inibire questa progressione.