Titolo: Evoluzione clonale divergente del tumore prostatico neuroendocrino resistente alla castrazione - Divergent clonal evolution of castration-resistant neuroendocrine prostate cancer

Codice: MUT018

Autore: Beltran et al.

Data: 2016

Rivista: *Nature Medicine* **22**, 298–305 (2016).

Argomento: Mutagenesi

Accesso libero: no

DOI/URL: https://doi.org/10.1038/nm.4045

BLOG: https://www.metododibellaevidenzescientifiche.com/2026/11/12/mut018-beltran-et-al-2016/

PANORAMICA VIDEO (IA): https://youtu.be/9LBPxlXrwG4

Parole chiave: carcinoma prostatico, metastasi, resistenza alla castrazione, tumore prostatico neuroendocrino, recettore degli androgeni, plasticità epiteliale, evoluzione clonale, pressione selettiva, resistenza, mutagenesi, epigenetica,

Tumore: tumore alla prostata

Traduzione: viene presentata una traduzione semplificata e una totale e fedele

Punti di interesse: Un meccanismo sempre più riconosciuto attraverso cui il tumore alla prostata sfugge ai farmaci mirati contro il recettore degli androgeni e/o alla sua segnalazione è la plasticità cellulare. Quando sottoposte a determinati farmaci, come l' enzalutamide e l'abiraterone, le cellule tumorali modificano il recettore, amplificandolo o cambiandolo, per sfuggire alle terapie. Ma possono arrivare anche ad assumere caratteristiche cellulari totalmente differenti ovvero da cellule epiteliali possono trasformarsi in neuroendocrine. Il tumore da un adenocarcinoma si trasforma in un carcinoma prostatico neuroendocrino. Analizzando il profilo genetico delle lesioni metastatiche in diversi momenti della malattia, i ricercatori hanno scoperto che l'adenocarcinoma classico e la forma neuroendocrina condividono una forte base genetica comune. Differiscono invece molto nel profilo epigenetico. Questo dimostra che la variante neuroendocrina non nasce come un tumore indipendente ma che, sotto la spinta di farmaci diretti al recettore, cambia attuando un processo di evoluzione clonale divergente guidato da modificazioni epigenetiche che rendono la cellula del tutto indifferente ai trattamenti. Gli autori portano diverse evidenze a supporto del fatto che entrambi i farmaci, agendo come potenti inibitori del recettore degli androgeni (AR), innescano questo processo sia nei pazienti sia nei modelli di laboratorio:

• Evidenze cliniche con abiraterone: nello studio vengono documentati casi di pazienti che, durante la progressione della malattia in corso di trattamento con abiraterone, hanno sviluppato nuove metastasi (es. epatiche) caratterizzate da istologia a piccole cellule e profilo neuroendocrino.

• Evidenze cliniche con enzalutamide: allo stesso modo, lo studio riporta casi di pazienti in progressione radiografica sotto terapia con enzalutamide la cui analisi molecolare ed epigenetica ha rivelato una chiara transizione verso il fenotipo CRPC-NE.

• Conferma sperimentale in vitro: per verificare se l'esposizione prolungata ai farmaci causi direttamente questi cambiamenti, gli autori hanno trattato a lungo termine cellule di adenocarcinoma prostatico (linea cellulare LNCaP) con enzalutamide. Le cellule sopravvissute hanno acquisito le caratteristiche molecolari ed epigenetiche tipiche del CRPC-NE, inclusa l'ipermetilazione e il silenziamento del gene soppressore SPDEF.

l meccanismo con cui si attuano questi cambiamenti è comune: entrambe le molecole bloccano in modo efficace la via di segnalazione di AR. Questo blocco elimina le popolazioni tumorali sensibili, ma seleziona cloni cellulari in grado di attivare programmi di plasticità epiteliale ed evoluzione clonale divergente, portando alla nascita di uno stato tumorale "AR-indifferente" e neuroendocrino.

Colpire il tumore solo nella sua crescita con terapie a bersaglio singolo non basta più: rischia di innescare una trasformazione genetica ed epigenetica da cui non si torna indietro. La vera svolta richiede approcci combinati capaci di bloccare, nello stesso momento, sia la proliferazione delle cellule sia la loro plasticità, chiudendo ogni via di fuga evolutiva prima che la malattia diventi incurabile.

TRADUZIONE SEMPLIFICATA

Introduzione e impatto clinico. Il cancro alla prostata rimane una delle principali cause di morte per tumore tra i maschi di tutto il mondo. Il pilastro della terapia per i pazienti con metastasi, compresa la malattia resistente alla castrazione, è la terapia ormonale che mira al recettore degli androgeni (AR) o alla sua segnalazione. L'enzalutamide e l'abiraterone sono terapie anti-androgeniche di nuova generazione approvate per il trattamento degli uomini con cancro alla prostata resistente alla castrazione (CRPC). Enzalutamide è un farmaco diretto al recettore AR, l'abiraterone agisce a monte come inibitore della sintesi degli androgeni. Sebbene l'uso di questi agenti migliori la sopravvivenza e la qualità della vita dei soggetti con CRPC, la maggior parte dei pazienti sviluppa infine resistenza ad essi. Un sottogruppo di tumori resistenti mostra caratteristiche di tumore a piccole cellule o neuroendocrine alla biopsia metastatica (CRPC-NE). Questo fenomeno può quindi riflettere una plasticità epiteliale che consente l'adattamento tumorale in risposta alle terapie dirette contro l'AR. La prognosi del CRPC-NE è sfavorevole a causa del riconoscimento tardivo, delle caratteristiche cliniche eterogenee e della mancanza di terapie sistemiche efficaci.

Impostazione dello studio e ipotesi di lavoro. Per comprendere l'origine della forma neuroendocrina, i ricercatori hanno esaminato oltre cento campioni di tumore metastatico da ottantuno pazienti, confrontando i casi di carcinoma resistenti alla castrazione (CRPC-Adeno) con quelli neuroendocrini (CRPC-NE). L'ipotesi principale era che la forma neuroendocrina emersa dopo la terapia non derivasse da cellule neuroendocrine già presenti fin dall'inizio nel tumore primario, ma che fosse il risultato di una trasformazione diretta dell'adenocarcinoma originario. Si è ipotizzato inoltre che individuare le alterazioni molecolari tipiche di questo cambio di fenotipo potesse aiutare a identificare precocemente i tumori a rischio di progressione.

Analisi del recettore degli androgeni e dei siti metastatici. L'analisi dei tessuti ha confermato che i tumori neuroendocrini presentano livelli molto più bassi di recettore degli androgeni e una generale riduzione dell'attività dei geni controllati da questo ormone. Tuttavia, i dati mostrano una sovrapposizione tra i due tipi di tumore, suggerendo l'esistenza di uno sfumato spettro di attività del recettore lungo il quale le cellule tumorali cambiano durante l'evoluzione della malattia.

Panorama delle mutazioni genetiche. Il sequenziamento del DNA ha mostrato che i due tipi di tumore condividono molte mutazioni di base, ma la forma neuroendocrina è fortemente arricchita dalla perdita simultanea di due importanti geni oncosoppressori, chiamati RB1 e TP53. La disattivazione congiunta di questi due guardiani del genoma è un evento caratteristico che favorisce l'insorgenza dei carcinomi a piccole cellule e conferisce al tumore una forte instabilità e aggressività.

Differenze nelle alterazioni somatiche di AR. L'amplificazione genomica, le mutazioni puntiformi attivanti e le varianti di splicing che coinvolgono l'AR sono comunemente osservate nel CRPC-Adeno e sono associate alla resistenza al trattamento con terapie dirette contro l'AR. Non sono difetti originari del tumore, ma alterazioni provocate direttamente dall'azione delle terapie mirate.

La forma neuroendocrina al contrario, è quasi del tutto priva di mutazioni o amplificazioni a carico di questo recettore. Sebbene potenzialmente influenzati dalle differenze nelle terapie precedenti, gli autori ipotizzano che l'assenza di alterazioni genomiche di AR nei tumori CRPC-NE possa essere dovuta alla selezione clonale di sottopopolazioni tumorali CRPC-Adeno non amplificate attraverso la pressione selettiva (nel contesto delle terapie dirette contro l'AR). I dati suggeriscono che la segnalazione di AR sia attenuata nel CRPC-NE. Insieme alla frequente perdita di RB1 e TP53 in questo sottotipo, questi risultati implicano che al CRPC-NE siano associate distinte proprietà biologiche.

Carico mutazionale complessivo e alterazioni condivise. Nel complesso, la quantità totale di alterazioni genetiche e di danni al genoma è risultata simile sia negli adenocarcinomi sia nei tumori neuroendocrini. Entrambi i sottotipi presentano un numero di mutazioni molto più elevato rispetto ai tumori prostatici iniziali non ancora trattati, a dimostrazione del fatto che la malattia metastatica ha accumulato cambiamenti genetici nel corso del tempo e dei trattamenti. Cinque dei sei campioni con il maggior numero di mutazioni puntiformi hanno mostrato alterazioni genetiche e/o dell'espressione proteica che coinvolgono i geni di riparazione del DNA, in coerenza con studi precedenti.

La delezione di CYLD e la perdita di eterozigosi come cooperatori dell'indipendenza recettoriale. L’adenocarcinoma e tumore neuroendocrino condividono una sostanziale sovrapposizione del profilo genomico complessivo. Tuttavia, l'analisi differenziale individua alterazioni specifiche che cooperano nell'abbandono della dipendenza dal recettore.

1) Delezione e silenziamento dell'oncosoppressore CYLD. CYLD codifica per un enzima segnalato come oncosoppressore coinvolto nella regolazione negativa di molteplici vie di segnalazione. CYLD è risultato deleto nel 51% dei campioni CRPC-NE ed è stato scoperto che la perdita genomica di CYLD era associata ad una ridotta espressione di mRNA e ad una modesta diminuzione dell'espressione di geni che codificano per fattori associati alla segnalazione di AR. La

perdita di *CYLD* riduce la segnalazione dell'AR. Sebbene insufficiente da sola a spegnere del tutto il recettore, la sua assenza coopera con altre lesioni molecolari per promuovere l'indifferenza ad AR.

2) Squilibrio allelico del proto-oncogene DEK: È stato altresì individuato uno squilibrio genomico del proto-oncogene DEK nei tumori CRPC-NE rispetto al CRPC-Adeno. DEK è modulatore della topologia del DNA con un ruolo chiave nell'aggressività neuroendocrina.

Ricostruzione dei modelli di evoluzione clonale. In linea di principio, diversi modelli possibili potrebbero spiegare l'evoluzione tumorale da un adenocarcinoma prostatico al CRPC-NE. Questo processo può basarsi sull'acquisizione sequenziale di alterazioni genomiche (espansione lineare). In alternativa, cloni indipendenti all'interno del tumore primario o della metastasi potrebbero dare origine a popolazioni tumorali resistenti parallele e distinte (evoluzione indipendente). Infine, nel tumore primitivo o nella lesione metastatica può verificarsi una diversificazione genetica come meccanismo di adattamento, che porta a una pressione selettiva e a un'evoluzione clonale divergente (evoluzione divergente). Studiando campioni di tessuto prelevati dallo stesso paziente in momenti diversi della terapia, i ricercatori di questo studio hanno confrontato questi tre possibili modelli di sviluppo. I dati genetici, come le mutazioni condivise nei geni BRCA2 e TP53, hanno dimostrato che il tumore neuroendocrino deriva direttamente dallo stesso antenato dell'adenocarcinoma. Sotto la pressione dei farmaci, la popolazione cellulare si divide in rami evolutivi distinti, dove uno dei rami abbandona l'identità epiteliale per diventare neuroendocrino. Gli autori sottolineano che altre possibilità non possono essere completamente escluse, come la dedifferenziazione di un adenocarcinoma verso uno stato cellulare più simile a un progenitore, con alcune cellule che successivamente adottano caratteristiche neuroendocrine a causa di effetti locali.

Il ruolo determinante dei cambiamenti epigenetici. Poiché le sole mutazioni del DNA non spiegavano completamente il cambio di fenotipo, lo studio ha analizzato la metilazione del DNA, ovvero i "segnali chimici" che accendono o spengono i geni senza modificarne la sequenza. A differenza del DNA, il profilo epigenetico ha mostrato una separazione netta tra adenocarcinoma e tumore neuroendocrino. L'analisi epigenetica è stata persino in grado di identificare come neuroendocrini alcuni tumori che al microscopio sembravano ancora normali adenocarcinomi, ma che nei pazienti mostravano già progressione di malattia in assenza di aumento del PSA.

Silenziamento di SPDEF e attivazione di EZH2. L'analisi dei geni differenzialmente metilati ha identificato le vie epigeneticamente disregulate, comprese quelle che coinvolgono i programmi neuronali, di adesione cellula-cellula, dello sviluppo, della transizione epitelio-mesenchimale (EMT) e delle cellule staminali. Tra i risultati più degni di nota è l'ipermetilazione e ridotta espressione del gene oncosoppressore SPDEF nelle varianti di tumore neuroendocrino. SPDEF è un attivatore trascrizionale e un regolatore della differenziazione cellulare che è stato segnalato essere coinvolto nella soppressione delle metastasi tumorali attraverso l'inibizione dell'EMT nel cancro alla prostata. Lo studio ha confermato la metilazione del promotore del gene SPDEF e la sottoregolazione dell'espressione dell'mRNA nella linea cellulare di cancro alla prostata neuroendocrino rispetto a quella nella linea di adenocarcinoma prostatico.

L'analisi epigenetica ha rivelato anche l'alterazione trascrizionale dell'enzima istone metiltransferasi EZH2, che era già stata associata alla malattia aggressiva nel cancro alla prostata. L'espressione di questo enzima è risultata doppia nel CRPC-NE rispetto al CRPC-Adeno. Questi

risultati si aggiungono al suo stato di espressione differenziale precedentemente riportato nel CRPC-NE rispetto al cancro alla prostata localizzato. Inoltre, i geni bersaglio repressi da EZH2 sono risultati significativamente sotto-regolati nel CRPC-NE, inclusi i geni di diverse vie di segnalazione. Nel complesso, i dati sull'analisi epigenetica supportano un ruolo chiave dell'epigenoma nell'insorgenza e/o nel mantenimento del CRPC-NE.

Sviluppo del classificatore molecolare a 70 geni. Per rendere più facile e precisa la diagnosi, gli autori hanno creato un test molecolare basato sull'espressione e il controllo epigenetico di settanta geni chiave. Questo classificatore ha dimostrato un'accuratezza quasi perfetta nel distinguere i tumori neuroendocrini, superando ampiamente i metodi di diagnosi tradizionale basati sulla semplice osservazione al microscopio o sulla misurazione dei marcatori standard come la cromogranina o il PSA.

Rilevanza clinica e prospettive terapeutiche. L'interrogazione dei dati trascrittomici di 683 campioni prostatici ha rivelato un punteggio del classificatore NEPC elevato fino all'8% dei tumori metastatici e in nessuno degli adenocarcinomi prostatici non precedentemente trattati o delle prostate benigne. Tra quelli con un punteggio del classificatore elevato, l'80% di essi presentava caratteristiche patologiche di CRPC-NE. Sebbene siano stati identificati casi con bassa segnalazione di AR e bassi punteggi del classificatore NEPC, e non possono essere esclusi un sottogruppo alternativamente distinto meno comune, i dati depongono a favore di un continuum di progressione da uno stato guidato da AR a uno stato indipendente da AR che è associato a caratteristiche molecolari neuroendocrine.

Riconoscere precocemente questa trasformazione molecolare consente di evitare la somministrazione continua di farmaci ormonali oramai inefficaci, indirizzando tempestivamente il paziente verso terapie diverse.

Conclusioni. I dati confermano che il carcinoma prostatico neuroendocrino non nasce dal nulla, ma è il risultato di un adattamento evolutivo divergente guidato dalla pressione selettiva delle terapie ormonali dirette al recettore AR. Il trattamento sebbene sia in grado di eliminare cellule sensibili, nel tempo spinge i cloni sopravvissuti ad acquisire alterazioni genetiche ed epigenetiche che spengono il recettore degli androgeni e conferiscono una nuova e aggressiva plasticità cellulare. Il tumore da epiteliale diventa neuroendocrino.

Traduzione articolo

Riassunto

Un meccanismo di resistenza alle terapie dirette contro il recettore degli androgeni (AR) nel cancro alla prostata, sempre più riconosciuto, coinvolge la plasticità epiteliale, in cui le cellule tumorali mostrano un'espressione di AR da bassa ad assente e presentano spesso caratteristiche neuroendocrine. L'eziologia e le basi molecolari di questo stato cellulare "alternativo" resistente al trattamento rimangono non del tutto comprese. Qui, analizzando i dati di sequenziamento dell'intero esoma (WES) di biopsie metastatiche ottenute da pazienti, abbiamo osservato una sostanziale sovrapposizione genomica tra i tumori resistenti alla castrazione caratterizzati istologicamente come adenocarcinomi prostatici (CRPC-Adeno) e il cancro alla prostata neuroendocrino (CRPC-NE); l'analisi dei campioni bioptici prelevati dagli stessi individui nel corso del tempo depone per un modello maggiormente compatibile

con un'evoluzione clonale divergente. L'analisi della metilazione del DNA a livello genomico ha rivelato marcate differenze epigenetiche tra i tumori CRPC-NE e il CRPC-Adeno, identificando inoltre come CRPC-NE alcuni campioni di CRPC-Adeno con caratteristiche cliniche di indipendenza da AR, il che suggerisce che i modulatori epigenetici possano svolgere un ruolo nell'induzione e/o nel mantenimento di questo stato di resistenza al trattamento. Questo studio supporta l'emergenza di uno stato cellulare alternativo "indifferente ad AR" attraverso un'evoluzione clonale divergente come meccanismo di resistenza al trattamento nel cancro alla prostata in fase avanzata.

Il cancro alla prostata rimane una delle principali cause di morte per tumore tra i maschi di tutto il mondo (1). Il pilastro della terapia per i pazienti con metastasi, compresa la malattia resistente alla castrazione, è la terapia ormonale che mira all'AR (2,3,4). L'enzalutamide e l'abiraterone sono potenti terapie dirette contro l'AR approvate per il trattamento degli uomini con cancro alla prostata resistente alla castrazione (CRPC) (5,6). Sebbene l'uso di questi agenti migliori la sopravvivenza e la qualità della vita dei soggetti con CRPC, la maggior parte dei pazienti sviluppa infine resistenza ad essi (7). Sono necessari biomarcatori predittivi che aiutino a distinguere i pazienti che risponderanno al trattamento da quelli che non risponderanno, prima dell'inizio della successiva linea di terapia ormonale. Noi e altri abbiamo osservato che un sottogruppo di tumori resistenti mostra caratteristiche di carcinoma a piccole cellule o neuroendocrine alla biopsia metastatica (CRPC-NE) (8,9,10). Questo fenomeno può quindi riflettere una plasticità epiteliale che consente l'adattamento tumorale in risposta alle terapie dirette contro l'AR (11,12,13,14). La prognosi del CRPC-NE è sfavorevole a causa del riconoscimento tardivo, delle caratteristiche cliniche eterogenee e della mancanza di terapie sistemiche efficaci.

Un ostacolo importante nella diagnosi e nel trattamento del cancro alla prostata indipendente dagli androgeni, compreso il CRPC-NE, è la nostra mancanza di comprensione delle basi genetiche ed epigenetiche di questo sottogruppo aggressivo. Per affrontare questo problema, abbiamo analizzato 114 campioni di tumore metastatico provenienti da 81 individui — tra cui 51 con caratteristiche cliniche e istologiche di CRPC-Adeno e 30 con caratteristiche di CRPC-NE, confermate da criteri di consenso patologico (8); abbiamo studiato cellule normali appaiate di tutti i pazienti, biopsie tumorali multiple da 17 pazienti e singole biopsie tumorali da 64 pazienti. Abbiamo ipotizzato che il CRPC-NE potesse essere distinto dal CRPC-Adeno sulla base di distinte alterazioni molecolari e che queste informazioni potessero migliorare e integrare le attuali caratteristiche diagnostiche, spesso complesse, che si basano sulla caratterizzazione morfologica. Abbiamo inoltre ipotizzato che il CRPC-NE che si sviluppa dopo la terapia origini clonalmente da un precursore CRPC-Adeno, piuttosto che dalla selezione di cloni neuroendocrini preesistenti. Infine, abbiamo ipotizzato che gli adenocarcinomi prostatici indipendenti da AR che condividono alterazioni molecolari specifiche del CRPC-NE possano rappresentare tumori ad alto rischio di progressione o di transizione verso il CRPC-NE.

Abbiamo valutato biopsie provenienti da un'ampia gamma di siti metastatici in base alla presenza e all'accessibilità delle lesioni, con un numero maggiore di biopsie ossee ottenute da pazienti con CRPC-Adeno rispetto a quelli con CRPC-NE (31% CRPC-Adeno contro 2% CRPC-NE; $P < 0,05$, test binomiale) (Fig. 1a). Le caratteristiche cliniche e patologiche dei campioni bioptici sono riassunte nella Tabella Supplementare 1 e nella Figura Supplementare 1. Come previsto, utilizzando

l'immunoistochimica abbiamo riscontrato una minore espressione proteica dell'AR, in media, nei campioni CRPC-NE (Fig. 1b). Abbiamo anche quantificato lo stato di segnalazione di AR misurando l'espressione degli mRNA inclusi in una firma di AR precedentemente definita da Hieronymus et al. (15) (Tabella Supplementare 2) e abbiamo osservato un'abbondanza complessivamente inferiore di questi mRNA nei campioni CRPC-NE rispetto ai campioni CRPC-Adeno (Fig. 1b); tuttavia, vi era sovrapposizione con un'ampia gamma di valori osservati all'interno di ciascun sottotipo, il che suggerisce che esista uno spettro di segnalazione di AR nel cancro alla prostata avanzato che attraversa i sottotipi patologici.

Per approfondire la nostra comprensione dell'indipendenza da AR in generale — e del fenotipo CRPC-NE in particolare — abbiamo dapprima eseguito il sequenziamento dell'intero esoma (WES) di 114 coppie tessuto tumorale metastatico-tessuto normale. Il panorama mutazionale dei tumori CRPC-NE era simile a quello del CRPC-Adeno, ma risultava anche coerente con quelli pubblicati negli studi sui tumori CRPC-NE (Fig. 1c) — inclusi un arricchimento per la perdita di RB1, che codifica per la proteina oncosoppressore retinoblastoma (nel 70% dei campioni CRPC-NE contro il 32% dei campioni CRPC-Adeno; P = 0,003, test delle proporzioni), e per la mutazione o delezione di TP53, che codifica per la proteina oncosoppressore p53 (nel 66,7% dei campioni CRPC-NE contro il 31,4% dei campioni CRPC-Adeno; P = 0,0043, test delle proporzioni). La perdita di RB1 è comune nei carcinomi primari a piccole cellule della prostata e del polmone, e promuove la patogenesi del carcinoma a piccole cellule in combinazione con una mutazione di TP53 (16,17,18); nella nostra serie, la perdita concomitante di RB1 e TP53 era presente nel 53,3% dei campioni CRPC-NE contro il 13,7% dei campioni CRPC-Adeno (P < 0,0004, test delle proporzioni).

Un'altra caratteristica che distingue i tumori CRPC-NE dal CRPC-Adeno è stata la scarsità di alterazioni somatiche che coinvolgono il gene AR in questi ultimi (P < 0,0001, test di Wilcoxon; Fig. 1d,e). L'amplificazione genomica, le mutazioni puntiformi attivanti e le varianti di splicing che coinvolgono l'AR sono comunemente osservate nel CRPC-Adeno e sono associate alla resistenza al trattamento con terapie dirette contro l'AR (19,20). Questa osservazione è stata confermata nella nostra coorte; 29 campioni hanno mostrato un'amplificazione focale o una mutazione puntiforme nell'AR, e 21 campioni presentavano alterazioni nei geni che codificano per noti co-attivatori di AR (FOXA1, NCOR1, NCOR2 e ZBTB16). Per contro, le mutazioni puntiformi di AR erano marcatamente assenti nei campioni CRPC-NE e le amplificazioni, quando presenti, erano di basso livello, ampie e spiegate dalla ploidia tumorale. Sebbene potenzialmente influenzati dalle differenze nelle terapie precedenti, ipotizziamo che l'assenza di alterazioni genomiche di AR nei tumori CRPC-NE possa essere dovuta alla selezione clonale di sottopopolazioni tumorali CRPC-Adeno non amplificate attraverso la pressione selettiva (nel contesto delle terapie dirette contro l'AR). La variante di splicing 7 di AR (AR-V7), associata alla resistenza guidata da AR nel CRPC (21,22), è stata osservata sia nei tumori CRPC-Adeno che CRPC-NE, e sebbene l'espressione complessiva di AR fosse inferiore nei tumori CRPC-NE, il rapporto tra l'mRNA di AR-V7 e quello di AR wild-type era significativamente inferiore nei campioni CRPC-NE rispetto ai campioni CRPC-Adeno (P = 0,0025, test di Wilcoxon) (Figura Supplementare 2). Questi dati suggeriscono che la segnalazione di AR sia attenuata nel CRPC-NE. Insieme alla frequente perdita di RB1 e TP53 in questo sottotipo, questi risultati implicano che al CRPC-NE siano associate distinte proprietà biologiche.

Lo spettro complessivo delle alterazioni genomiche, tuttavia, era simile nei tumori di entrambi i sottotipi di CRPC (Figura Supplementare 2) e si manteneva dopo aver corretto per il sito di biopsia e per la precedente esposizione alla chemioterapia (Figura Supplementare 3). Non vi sono state differenze significative nella distribuzione delle mutazioni puntiformi non silenti, della ploidia o del carico genomico del numero di copie tra i sottotipi tumorali CRPC-Adeno e CRPC-NE (in media >30% del genoma era aberrante), e i tumori di entrambi i sottotipi hanno mostrato un numero significativamente più elevato di mutazioni puntiformi clonali rispetto a quelli del cancro alla prostata clinicamente localizzato ($P < 10^{-7}$, test di Wilcoxon) (23,24). Il numero mediano di varianti a singolo nucleotide (SNV) non silenti nei campioni metastatici è stato 41 (intervallo: 2–729) (Tabelle Supplementari 3 e 4). Cinque dei sei campioni con il maggior numero di SNV (115–663) hanno mostrato alterazioni genetiche e/o dell'espressione proteica che coinvolgono i geni di riparazione del mismatch del DNA (Figura Supplementare 4), in coerenza con studi precedenti (20,25). Le alterazioni ricorrenti sono mostrate nella Figura 1c e le presunte fusioni geniche (determinate dall'analisi di sequenziamento dell'RNA) sono presenti nella Tabella Supplementare 5.

La sostanziale sovrapposizione nel panorama complessivo del numero di copie somatiche tra i tumori CRPC-Adeno e CRPC-NE (Fig. 1f) è risultata notevole alla luce delle marcate differenze genomiche tra adenocarcinomi e carcinomi a piccole cellule osservate in altri sottotipi tessutali (ad esempio, tumori del polmone e del tratto gastrointestinale). Dopo aver corretto per la commistione di cellule non tumorali e per la ploidia (26), abbiamo cercato di identificare le regioni del genoma che erano alterate in modo differenziale e abbiamo notato alterazioni del numero di copie arricchite nei campioni CRPC-NE o CRPC-Adeno (Tabelle Supplementari 6 e 7). I presunti geni tumorali (27) all'interno delle regioni con delezioni differenziali nel CRPC-NE con down-regulation concordante a livello di mRNA (tasso di falsi scopritori [FDR] < 10% sia per il DNA che per l'mRNA) sono evidenziati nella Figura 1f. Il gene al primo posto nella graduatoria è stato CYLD, che codifica per la cilindromatosi, un enzima deubiquitinante segnalato come oncosoppressore coinvolto nella regolazione negativa di molteplici vie di segnalazione, comprese quelle che coinvolgono il fattore nucleare (NF)-kβ (28), il fattore di crescita trasformante (TGF)-β e Notch (29). CYLD è risultato deleto nel 51% dei campioni CRPC-NE ed è stato verificato mediante analisi di ibridazione in situ in fluorescenza (FISH) (Figura Supplementare 5). Abbiamo scoperto che la perdita genomica di CYLD era associata a una ridotta espressione di mRNA e a una modesta diminuzione dell'espressione di geni che codificano per fattori associati alla segnalazione di AR (in questo studio, nella coorte SU2C/PCF 2015 di CRPC (20), e nelle linee cellulari; Figura Supplementare 5), suggerendo che la sola perdita di CYLD possa essere insufficiente a promuovere l'indifferenza ad AR, e che essa possa cooperare con altre alterazioni molecolari per farlo. Estendendo l'architettura computazionale dell'algoritmo CLONET (23,26) — che stima dapprima la purezza e la ploidia dei campioni tumorali e calcola poi la clonalità delle aberrazioni somatiche — abbiamo valutato la clonalità del numero di copie allele-specifico (Nota Supplementare) riscontrato, nell'intera coorte, una perdita di eterozigosi caratterizzata da un numero di copie invariato o alterato, in entrambi i casi focale od estesa. Ciò includeva uno squilibrio allelico focale del proto-oncogene DEK nei tumori CRPC-NE rispetto al CRPC-Adeno ($P = 0,04$, test binomiale). DEK appartiene a una classe di modulatori della topologia del DNA con un ruolo oncogenico segnalato nel cancro alla prostata, anche nel CRPC-NE (30,31).

In linea di principio, diversi modelli possibili potrebbero spiegare l'evoluzione tumorale da un adenocarcinoma prostatico al CRPC-NE (Fig. 2a). Questo processo può basarsi sull'espansione lineare di popolazioni di cellule tumorali clonali o subclonali originate dal tumore primario, con l'acquisizione sequenziale di alterazioni genomiche (lineare) (32). In alternativa, cloni indipendenti all'interno del tumore primario o della metastasi potrebbero dare origine a popolazioni tumorali resistenti parallele e distinte (indipendente) (33). Infine, potrebbe esserci una diversificazione genetica nel tumore primario o nella lesione metastatica come meccanismo di adattamento, che porta a una pressione selettiva e a un'evoluzione clonale divergente (divergente). Sebbene studi precedenti abbiano dimostrato la concordanza del riarrangiamento genomico specifico del cancro alla prostata TMPRSS2-ERG (9) e di altre alterazioni a singolo gene (18,34) tra i foci di adenocarcinoma e neuroendocrini nei tumori misti, suggerendo una cellula d'origine comune, questi complessi modelli di evoluzione genetica non erano stati valutati più rigorosamente. Per affrontare questo problema e dedurre le dinamiche di espansione clonale, abbiamo studiato campioni tumorali seriali di individui nel corso della loro malattia. Il paziente WCMC7520 è stato sottoposto a prostatectomia per un adenocarcinoma prostatico clinicamente localizzato Gleason 9 con interessamento linfonodale locale ed è stato trattato inizialmente con terapia di deprivazione androgenica (ADT) adiuvante seguita da chemioterapia al momento della malattia metastatica e della resistenza alla castrazione (Fig. 2b). Ventinove mesi dopo l'inizio dell'ADT, ha sviluppato un CRPC-NE, diagnosticato mediante biopsia metastatica. Abbiamo valutato il tumore primario, il linfonodo locale e la metastasi a distanza CRPC-NE da due punti temporali e abbiamo osservato una delezione omozigote del gene oncosoppressore BRCA2 e una mutazione in TP53 nei campioni bioptici di tutti i siti, suggerendo un antenato comune. L'analisi del DNA allele-specifico ha evidenziato diversi stati genomici di altri geni chiave come MYCN, che codifica per l'oncoproteina N-myc (Fig. 2b); MYCN è stato precedentemente descritto come oncogenico nel CRPC-NE (9). Dopo il confronto dei campioni di tutti i siti, il campione prostatico primario del paziente presentava lesioni che suggerivano percorsi divergenti, ma clonali, verso il linfonodo e verso entrambe le metastasi a distanza. Tuttavia, da questi dati non possiamo escludere definitivamente la semina da metastasi a metastasi, recentemente proposta come meccanismo di progressione tumorale (35). Il paziente WCMC161 ha mostrato una progressione di malattia dopo molteplici linee di terapia per il CRPC — incluso lo sviluppo di nuove metastasi viscerali al momento della progressione in corso di abiraterone, con una biopsia epatica che mostrava un carcinoma a piccole cellule (Fig. 2c e Figura Supplementare 6). Il confronto delle metastasi provenienti da tre diversi punti temporali — CRPC-Adeno (adenocarcinoma, metastasi linfonodale), CRPC-Adeno (adenocarcinoma, metastasi ossea) e CRPC-NE (carcinoma a piccole cellule, metastasi epatica alla progressione in terapia con abiraterone) — ha suggerito un'evoluzione clonale divergente, come esemplificato dal gene della sindrome di Shwachman-Bodian-Diamond (SBDS) (in cui lo stato allele-specifico di SBDS nei campioni metastatici non era compatibile con l'evoluzione lineare; Fig. 2c) e ha indicato che le metastasi linfonodali, ossee ed epatiche derivavano da un antenato comune. Gli alberi filogenetici che delineano l'evoluzione della malattia dall'adenocarcinoma al fenotipo neuroendocrino nei singoli pazienti, costruiti attraverso l'analisi di ulteriori casi multi-tumorali (Figura Supplementare 6), escludono collettivamente un modello evolutivo parallelo. Sulla base di queste serie di casi temporali, dell'elevato grado di clonalità nel CRPC e della somiglianza complessiva tra i profili genomici dei campioni CRPC-Adeno e CRPC-NE, il modello più parsimonioso che spiega i dati è

l'evoluzione clonale divergente del CRPC metastatico verso uno stato guidato da AR o indifferente ad AR (Fig. 2a, modello 5). In altre parole, i tumori CRPC-NE appaiono di origine clonale con un'ascendenza clonale riconducibile a un precursore CRPC-Adeno.

Sebbene informativi, i cambiamenti del DNA osservati non sembravano spiegare pienamente l'aggressività clinica del CRPC-NE. Abbiamo quindi ipotizzato che questo fenotipo possa essere mediato anche da modificazioni epigenetiche. A tal fine, abbiamo valutato la metilazione ricca di CpG su scala genomica mediante un'analisi della metilazione del DNA a risoluzione di singola citosina (utilizzando il sequenziamento del solfito ridotto arricchito [eRRBS]). A differenza dei dati genomici per lo più simili, i sottotipi CRPC-NE e CRPC-Adeno hanno mostrato una forte segregazione epigenetica, utilizzando l'analisi non supervisionata di siti di metilazione non selezionati (Fig. 3a, Figura Supplementare 7 e Tabella Supplementare 8). Inoltre, la metilazione dei primi esoni e dei promotori genici è stata associata a cambiamenti significativi nell'espressione genica ($P < 0,001$, test di Wilcoxon; Figura Supplementare 8). Nel complesso, è stata osservata una maggiore frazione di eventi epigenetici e trascrittomici concordanti con significatività crescente tramite l'analisi di espressione differenziale (Figura Supplementare 8), e il 22% dei trascritti maggiormente disregolati nel CRPC-NE ha mostrato cambiamenti concordanti nella metilazione del DNA ($P < 0,0002$). Ciò ha sollevato la possibilità che la transizione verso il sottotipo CRPC-NE, o l'avvento dello stesso, sia associata a una disregolazione epigenetica. In particolare, il segnale epigenetico ha identificato tre casi con caratteristiche cliniche di indipendenza da AR che erano stati classificati come adenocarcinoma sulla base della patologia standard, ma che hanno segregato con il CRPC-NE dopo l'analisi non supervisionata (Fig. 3a e Figura Supplementare 8). Tutti e tre questi pazienti hanno manifestato progressione radiografica in presenza di un livello sierico stabile o basso della proteina regolata dagli androgeni, l'antigene prostatico specifico (PSA). Questi dati suggeriscono che le predizioni di raggruppamento basate sulla metilazione del DNA possano fornire informazioni aggiuntive associate all'indipendenza da AR e al CRPC-NE, migliorando potenzialmente quelle basate sulla morfologia tumorale.

Utilizzando l'analisi di arricchimento funzionale dei geni differenzialmente metilati, abbiamo identificato le vie epigeneticamente disregulate, comprese quelle che coinvolgono i programmi neuronali, di adesione cellula-cellula, dello sviluppo, della transizione epitelio-mesenchimale (EMT) e delle cellule staminali (Fig. 3b), che si ritiene siano rilevanti per la progressione del CRPC-NE (36). Tra i nostri risultati degni di nota (Figura Supplementare 7), abbiamo osservato ipermetilazione e ridotta espressione del gene oncosoppressore SPDEF nel CRPC-NE ($P < 10^{-9}$, test di Wilcoxon) (Fig. 3c). SPDEF (che codifica per un fattore Ets derivato dalla prostata) è un attivatore trascrizionale e un regolatore della differenziazione cellulare che è stato segnalato essere coinvolto nella soppressione delle metastasi tumorali attraverso l'inibizione dell'EMT nel cancro alla prostata (37). Abbiamo confermato la metilazione del promotore del gene SPDEF e la down-regulation dell'espressione dell'mRNA nella linea cellulare di cancro alla prostata neuroendocrino NCI-H660, rispetto a quella nella linea di adenocarcinoma prostatico LNCaP (Figura Supplementare 9).

L'espressione dell'mRNA che codifica per la istone metiltransferasi EZH2, che in precedenza era stata associata alla malattia aggressiva nel cancro alla prostata (38,39,40,41), è risultata doppia nel CRPC-NE rispetto al CRPC-Adeno ($P < 10^{-6}$, test di Wilcoxon); anche la proteina EZH2 era più

abbondante nel CRPC-NE (Figura Supplementare 9). Questi risultati si aggiungono al suo stato di espressione differenziale precedentemente riportato nel CRPC-NE rispetto al cancro alla prostata localizzato (9,42). Inoltre, i geni bersaglio repressi da EZH2 (43,44) sono risultati significativamente down-regolati nel CRPC-NE ($P < 10^{-7}$, test di Wilcoxon) (Fig. 3d), inclusi i geni di segnalazione WNT come DKK1 (P = 0,0002, test di Wilcoxon), NKD1 (P = 0,0046, test di Wilcoxon) e i geni che codificano per il fattore homeobox (HOX) (P = 0,001, test di Wilcoxon). Il trattamento con l'inibitore di EZH2 GSK343 ha determinato una diminuzione preferenziale della vitalità delle cellule NCI-H660 rispetto ad altre linee cellulari di cancro alla prostata non neuroendocrine (Fig. 3e), con una sostanziale down-regulation di diversi geni associati al CRPC-NE dopo il trattamento, tra cui NCAM (CD56), MYCN (9) e PEG10 (45) (Figura Supplementare 9). Nel complesso, questi dati supportano un ruolo chiave dell'epigenoma nell'insorgenza e/o nel mantenimento del CRPC-NE.

Sulla base delle attuali lacune nella valutazione clinica e molecolare del CRPC-NE, abbiamo utilizzato questi dati per sviluppare un classificatore molecolare volto a migliorare potenzialmente la diagnosi, spesso complessa, del CRPC-NE. Questo classificatore integrato a 70 geni del cancro alla prostata neuroendocrino (NEPC) è stato sviluppato utilizzando i dati di espressione dei geni prioritizzati dallo stato genomico, trascrittomico o epigenomico (Fig. 4a,b e Figura Supplementare 10; vedere Metodi Online), e ha dimostrato sia una precisione che un richiamo (recall) >0,99 nell'identificare il CRPC-NE nella nostra coorte di scoperta (Fig. 4c,d e Tabella Supplementare 9). All'interno del classificatore erano inclusi anche i geni che avevamo precedentemente descritto come sovraespressi nel CRPC-NE (9), tra cui AURKA ($P < 10^{-5}$, test di Wilcoxon) e MYCN ($P << 10^{-4}$, test di Wilcoxon) (Figura Supplementare 10). L'interrogazione dei dati trascrittomici di 683 campioni prostatici (Tabella Supplementare 10) utilizzando i set di dati del The Cancer Genome Atlas (TCGA) (46), di Grasso et al. (19) (coorte del Michigan 2012), di Robinson et al. (20) (coorte SU2C/PCF 2015) e del nostro gruppo (9,47) (WCMC 2011/14) ha rivelato un punteggio del classificatore NEPC elevato fino all'8% dei tumori metastatici (n = 191) e in nessuno degli adenocarcinomi prostatici non precedentemente trattati (n = 460) o delle prostate benigne (n = 32) (Fig. 4d e Figure Supplementari 10 e 11). Tra quelli con un punteggio del classificatore elevato, abbiamo riesaminato la patologia di tali campioni e abbiamo scoperto che l'80% di essi presentava caratteristiche patologiche di CRPC-NE (il restante 20% era costituito da adenocarcinomi) (Fig. 4d e Figura Supplementare 12). Sebbene vi fossero numeri relativamente piccoli di casi di CRPC-NE nelle coorti di validazione, il classificatore NEPC integrato ha dimostrato una precisione e/o un richiamo superiori tra i set di dati rispetto ad altre variabili, come i marcatori neuroendocrini convenzionali (vale a dire i trascritti di CGHA, SYP, NSE e CD56) più il PSA (Figura Supplementare 12), l'espressione dell'mRNA di AR, lo stato di segnalazione di AR e i geni espressi differenzialmente ad alto rango (come SPDEF) (Fig. 4c). Sebbene riconosciamo l'influenza di altri fattori, comprese le differenze nelle terapie precedenti, sui cambiamenti dell'espressione genica, ipotizziamo che i tumori resistenti alla castrazione con un punteggio NEPC moderato o in aumento possano rappresentare tumori con caratteristiche indipendenti da AR che sono in transizione verso la progressione a CRPC-NE o ad alto rischio di essa durante il trattamento con terapie dirette contro l'AR. Di fatto, una sottopopolazione di cellule di adenocarcinoma prostatico (LNCaP) trattate a lungo termine con enzalutamide ha acquisito caratteristiche molecolari del CRPC-NE (vale a dire, la metilazione di SPDEF) (Figure Supplementari 8 e 13).

Sebbene abbiamo identificato casi con bassa segnalazione di AR e bassi punteggi del classificatore NEPC, e non possiamo escludere un sottogruppo alternativamente distinto meno comune, i nostri dati depongono a favore di un continuum di progressione da uno stato guidato da AR a uno stato indipendente da AR che è associato a caratteristiche molecolari neuroendocrine. Questi risultati giustificano la valutazione clinica di un numero maggiore di campioni per approfondire la potenziale superiorità e applicabilità dei criteri diagnostici del classificatore rispetto ai criteri diagnostici più convenzionali, e per verificare se questo possa essere utile come biomarcatore prognostico o predittivo (associato alla mancanza di risposta alle terapie contro l'AR). In particolare, questo approccio si presta alle biopsie di cancro alla prostata metastatico in cui la disponibilità di tessuto è limitata e molteplici saggi immunoistochimici per i metodi diagnostici attuali sono spesso impraticabili. L'incorporazione di diversi livelli molecolari aiuta ad applicare il classificatore a diversi set di dati quando sono disponibili solo parti di essi (DNA, RNA o metilazione) (Tabella Supplementare 9) e apre la strada a futuri studi che potrebbero applicare il classificatore a tipi di campioni liquidi (come il DNA tumorale circolante) (48). Se le alterazioni del CRPC-NE potessero essere rilevate prima durante la progressione della malattia CRPC-Adeno, ad esempio, tali individui potrebbero potenzialmente essere selezionati per terapie sistemiche dirette contro il CRPC-NE (come la chemioterapia a base di platino) piuttosto che per terapie mirate all'AR, o per approcci terapeutici a bersaglio combinato. Inoltre, questi dati pongono le basi per il test dinamico della reversibilità dello stato di CRPC-NE con un intervento precoce o con modificatori epigenetici, possibilmente inclusi gli inibitori di EZH2.

In sintesi, i nostri dati supportano l'evoluzione divergente del CRPC-NE da una o più cellule CRPC-Adeno (adattamento) piuttosto che un'evoluzione clonale lineare o indipendente, con la pressione selettiva di popolazioni subclonali con AR wild-type e l'acquisizione di nuovi driver genomici ed epigenomici associati a una ridotta segnalazione di AR e ad una plasticità epiteliale. Tuttavia, esistono anche altre possibilità che non possono essere completamente escluse, come la dedifferenziazione di un adenocarcinoma verso uno stato cellulare più simile a un progenitore, con alcune cellule che successivamente adottano caratteristiche neuroendocrine a causa di effetti locali.

METODI

• Reclutamento dei pazienti e classificazione patologica: Lo studio ha analizzato campioni metastatici di 81 pazienti di sesso maschile. I tessuti sono stati esaminati da patologi ed classificati in base alla morfologia in adenocarcinoma prostatico classico (CRPC-Adeno) o in diverse varianti di carcinoma neuroendocrino (CRPC-NE).

• Analisi immunoistochimica (IHC): Sono stati utilizzati anticorpi specifici per valutare l'espressione proteica di vari marcatori (tra cui il recettore degli androgeni AR, i marcatori neuroendocrini come sinaptofisina e cromogranina A, e regolatori epigenetici come EZH2) nei diversi compartimenti cellulari.

• Sequenziamento dell'intero esoma (WES) e purezza tumorale: Il DNA estratto dai tessuti è stato sequenziato per identificare le mutazioni somatiche. È stato impiegato l'algoritmo CLONET per stimare con precisione la purezza e la ploidia dei campioni tumorali, correggendo i dati genomici ed eseguendo un'analisi allele-specifica del numero di copie.

• Sequenziamento e analisi dell'RNA (RNA-seq): L'RNA estratto dai campioni è stato mappato sul genoma umano per quantificare l'espressione genica, studiare la via di segnalazione del recettore degli androgeni e individuare eventuali fusioni geniche o trascriventi correlate alla resistenza.

• Profilazione della metilazione del DNA (eRRBS): Mediante sequenziamento a base di solfito, sono stati analizzati i siti di metilazione CpG per identificare alterazioni epigenetiche differenziali tra i sottotipi tumorali e valutare il silenziamento di geni chiave come SPDEF.

• Classificatore molecolare NEPC a 70 geni: È stato sviluppato un punteggio integrato basato su 70 geni selezionati da dati genomici, trascrittomici ed epigenomici, utilizzato per stimare con elevata accuratezza la probabilità che un campione tumorale presenti caratteristiche neuroendocrine.

• Studi su linee cellulari: Sono stati condotti esperimenti in vitro su linee cellulari (come LNCaP e NCI-H660) trattate a lungo termine con inibitori (come enzalutamide o l'inibitore di EZH2 GSK343) per validare i meccanismi di resistenza, la plasticità cellulare e il silenziamento genico.

• Metodi statistici: Sono stati impiegati test non parametrici (come il test di Mann-Whitney-Wilcoxon) e correzioni per test multipli (procedura di Benjamini-Hochberg) per garantire il rigore analitico dei dati genetici ed epigenetici.