

---

TEZĂ DE DOCTORAT

Caracterizarea micromediului  
tumoral pulmonar în vederea  
identificării de markeri prognostici  
și combinații terapeutice

---

Doctorand **Radu Pîrlog**

---

Conducător de doctorat Prof.Dr. **Ioana Neagoe**

---

---

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	17
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	
<b>1. Cancerul și micromediul tumoral</b>	21
1.1. Cancerul pulmonar	21
1.2. Cancerogeneza	22
1.3. Tranziția epitelial-mezenchimală	23
1.4. Cancerizarea în câmp	24
1.5. Organizarea micromediului tumoral	27
<b>2. Analiza micromediului tumoral</b>	29
2.1. Analiza morfologică	30
2.2. Analiza imunohistochimică	31
2.3. Analiza proteomică	32
2.4. Analiza prin secvențiere de nouă generație	32
2.5. Analiza prin secvențiere single-cell	33
2.6. Analiza prin secvențiere celulară cu rezoluție spațială	34
<b>3. Biomarkeri în cancer</b>	37
3.1. Biomarkeri proteici	37
3.2. Biomarkeri genomici	39
3.3. Biomarkeri pe bază de ARN-uri non-codificatoare	40
3.3.1. Biomarkeri pe bază de miARN	40
3.3.2. Biomarkeri pe bază de lncARN	41
<b>4. Terapii țintite în oncologia de precizie</b>	43
4.1. Imunoterapia în cancer	43
4.2. Inhibitorii de tirozin-kinaze în cancer	44
4.3. Terapia combinatorie în era oncologiei de precizie	46
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	
<b>1. Ipoteza de lucru</b>	51
<b>2. Metodologie generală</b>	53
<b>3. Studiul 1 – Analiza morfologică și imunohistochimică a micromediului tumoral în cancerul pulmonar incipient</b>	57
3.1. Introducere	57

3.2. Ipoteza de lucru	59
3.3. Material și metodă	59
3.4. Rezultate	62
3.5. Discuții	72
3.6. Concluzii	74
<b>4. Studiul 2 – Identificarea de noi biomarkeri pe bază de microARN-uri în cancerul pulmonar incipient</b>	75
4.1. Introducere	75
4.2. Ipoteza de lucru	77
4.3. Material și metodă	77
4.4. Rezultate	82
4.5. Discuții	96
4.6. Concluzii	99
<b>5. Studiul 3 – Caracterizarea morfologică și moleculară a adenocarcinoamelor pulmonare mutate KRAS G12C</b>	101
5.1. Introducere	101
5.2. Ipoteza de lucru	102
5.3. Material și metodă	102
5.4. Rezultate	105
5.5. Discuții	110
5.6. Concluzii	113
<b>6. Concluzii generale</b>	115
<b>7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	119
<b>REFERINȚE</b>	121

**Cuvinte cheie:** Cancer pulmonar, micromediu tumoral, patologie moleculară, imunohistochimie, secvențiere de nouă generație, biomarkeri, combinații terapeutice.

## INTRODUCERE

Cancerul reprezintă o problemă complexă de sănătate publică la nivel global fiind responsabil de peste 10 milioane de decese anual. Incidența și mortalitatea asociată cancerului se află pe un trend ascendent fiind necesară îmbunătățirea abordărilor preventive, diagnostice și terapeutice asociate cancerului. O nouă abordare ce va permite înțelegerea organizării procesului tumoral și a modului de dezvoltare în fazele incipiente ale creșterii tumorale este reprezentată de studiul micromediului tumoral și al interacțiunilor celulare ce au loc la acest nivel.

Micromediul tumoral este o structură complexă alcătuită dintr-un compartiment celular și un compartiment stromal, având inițial un rol de limitare a dezvoltării tumorale, însă odată cu progresia tumorală, are loc o alterare fenotipică a componentelor celulare în vederea susținerii proliferării celulare. Astfel, studiarea interacțiunilor existente la nivel molecular între componentele micromediului celular și procesul tumoral poate identifica noi abordări diagnostice și terapeutice ce pot fi utilizate în managementul cancerului.

În cadrul tezei doctorale s-a utilizat cancerul pulmonar ca model de analiză și caracterizare al interacțiunilor existente între celulele tumorale și cele ale micromediului tumoral. Cancerul pulmonar este al doilea cel mai frecvent tip de cancer și cancerul responsabil de cel mai mare număr decese, iar îmbunătățirea managementului său terapeutic este un subiect de actualitate.

O nouă abordare utilizată pentru înțelegerea mecanismelor moleculare implicate în tumorigeneză și în comunicarea intercelulară este reprezentată de studierea ARN-urilor non-codificatoare, în special a microARN-urilor (miARN), care sunt specii scurte de ARN cu un rol esențial în reglarea expresiei genelor. MiARN-urile sunt implicate în reglarea proceselor celulare în majoritatea tipurilor de cancer, având un profil de expresie specific unui anumit cancer și o distribuție tisulară extinsă, fiind astfel candidați ideali pentru rolul de noi biomarkeri diagnostici, prognostici și predictivi de răspuns la terapie.

În primele 2 studii s-a realizat o caracterizare morfologică și imunohistochimică (IHC) a unui lot de cancere pulmonare în stadiu incipient, iar prin intermediul analizelor bioinformatică am identificat și validat un panel format din 4 miARN-uri cu rol diagnostic în cancerul pulmonar incipient. De asemenea, pe baza analizei profilului imunohistochimic și al datelor de expresie pentru cele 4 miARN-uri am identificat 2 miARN-uri asociate cu profilul imunohistochimic al tumorilor analizate.

În studiul 3 s-a realizat o caracterizare morfologică și moleculară a unui subtip molecular de cancer pulmonar, reprezentat de adenocarcinoamele pulmonare cu prezenta mutației *KRAS G12C*. Studiarea acestui subtip molecular de cancer pulmonar este un subiect de actualitate ca urmare a introducerii terapiei țintite cu inhibitori specifici ai oncoproteinei mutante *KRAS*. În cadrul studiului s-a identificat un subgrup molecular de cancere ce prezintă mutația genei *STK11* asociată mutației *KRAS G12C* în 25% din cazurile analizate. Aceste tumori cu acest profil mutațional particular prezintă particularități imunohistochimice și pot prezenta un răspuns îmbunătățit la terapia cu noua clasă terapeutică de inhibitori *KRAS*.

### **Studiu 1. Analiza morfologică și imunohistochimică a micromediului tumoral în cancerul pulmonar incipient**

Cancerule pulmonare sunt împărțite în funcție de aspectul morfologic în două clase histologice principale cancer pulmonar cu celule non-mici (NSCLC), care reprezintă 80-

85% și cancer pulmonar cu celule mici (SCLC) acoperind restul de 10-15%. NSCLC este reprezentat de 3 subtipuri histologice principale: adenocarcinoame pulmonare (LUAD), carcinoame scuamoase (LUSC) și carcinoame neuroendocrine cu celule mari. Două aspecte conduc la dezvoltarea și progresia tumorală: modificări genetice/epigenetice în celulele premaligne și reorganizarea componentelor micromediului tumoral (TME) prin interacțiuni reciprocă și dinamică. La nivelul TME se regăsesc celule tumorale, celule stromale, precum fibroblaste asociate tumoral, celulele endoteliale și celulele imune, precum macrofagele, limfocitele T, celulele NK, celulele dendritice și celulele mieloide supresoare, precum și componentele non-celulare ale matricei extracelulare: colagen, fibronectina, hialuronanul și laminina.

O nouă abordare în detecția incipientă a cancerului analizează înțelegerea alterărilor moleculare apărute la nivelul TME în stadiile incipiente ale dezvoltării tumorale, acestea având potențialul de a fi utilizate ca și biomarkeri de diagnostic și prognostic în managementul pacienților oncologici.

Scopul acestui studiu este de a identifica noi biomarkeri pentru diagnosticul incipient al cancerelor pulmonare utilizând o abordare translațională bazată pe analiză clasică morfologică, IHC și bioinformatică. În acest studiu am inclus o serie de 51 de cazuri de cancere pulmonare în stadiu incipient în vederea caracterizării tumorale și a TME pentru identificarea caracteristicilor particulare de organizare a TME în fazele incipiente, în vederea identificării de noi biomarkeri de diagnostic și prognostic.

În cadrul prezentului studiu am analizat o serie de 51 de cancere pulmonare în stadiu incipient și am caracterizat din punct de vedere morfologic și IHC profilul tumoral și al TME. Am evidențiat o prezență crescută a necrozei intratumorale în aceste cancere încă din stadiile incipiente, asociată cu prezența atipiilor nucleare. Profilul IHC al proliferărilor tumorale au evidențiat o reducere a expresiei E-caderinei în stadiile incipiente, fără a se identifica o pierdere completă a expresiei proteice, iar expresia markerului IHC p53 a evidențiat o pozitivitate în 45% din cazuri, sugerând că alterarea funcției genei *TP53* este un eveniment genomic esențial în cancerogeneza pulmonară incipientă. Analiza TME a evidențiat un micromediu activ imunologic în peste 80% din cancerele pulmonare imunologic cu prezența celulelor imune preponderent la nivelul compartimentului stromal. Structurile limfoide terțiare (SLT) au fost prezente în 74% din cazuri, iar centri germinativi activi în 45% din cazurile cu SLT. Analiza IHC pentru markerii CD4 și CD8 au permis analiza distribuției infiltratului limfocitar la nivel stromal și intratumoral în TME asociat cancerelor pulmonare incipiente. Limfocitele CD4 pozitive au fost mai abundente la nivel stromal, iar cele CD8 pozitive mai abundente la nivel intratumoral. Dintre tipurile histologice de cancer pulmonar, LUAD și LUSC au prezentat un TME mai activ imunologic comparativ cu cancerele pulmonare neuroendocrine.

---

## **Studiu 2. Identificarea de noi biomarkeri pe bază de microARN-uri în cancerul pulmonar incipient**

Înțelegerea profilului mutațional în cancerul pulmonar și a impactului fenotipic al mutațiilor identificate a dus la identificarea unor gene „driver”, esențiale în progresia cancerului pulmonar, precum *EGFR*, *KRAS*, *ALK*, *BRAF*, *HER2/Erbb2*, *PIK3CA*, *AKT1*, *MAP2K1* și *MET*. Identificarea acestor mutații a schimbat practica clinică datorită introducerii moleculelor țintă și a diagnosticului molecular. Prin urmare, în diagnosticul patologic complet al cancerului pulmonar, identificarea acestor mutații cu impact terapeutic este obligatorie.

O sursă posibilă de noi biomarkeri este reprezentată de ARN-urile non-codificatoare, în special miARN, ce sunt reprezentate de secvențe scurte de ARN cu lungimea între 18 și 28 de nucleotide. Expresia specifică a miARN-urilor este dereglată în cancerele umane din cauza unor alterări genomice funcționale și structural precum, amplificări sau deleții ale situsurilor unde sunt prezente genele miARN-urilor, modificări în reglarea post-transcripțională, alterări epigenetice sau mutații în mașina de biogenează a miARN. Astfel, un număr tot mai mare de studii au indicat valoarea posibilă a miARN-urilor ca potențiali biomarkeri pentru diagnosticul, prognosticul și potențial de ținte terapeutice în cancer.

În vederea depășirii limitărilor actuale legate de identificarea incipientă a cancerelor pulmonare am realizat o analiză bioinformatică pornind de la principalele gene cu expresie alterată în cancerul pulmonar incipient și la nivelul TME asociat pentru a identifica noi biomarkeri ce pot fi utilizați în procesul diagnostic. Pe baza rezultatelor analizei bioinformatică și a datelor din literatură am selectat un panel de 4 miARN: hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-25-3p și hsa-miR-205-5p care s-au calificat ca potențiali biomarkeri pentru diagnosticarea cancerului pulmonar în stadiu incipient. Nivelul de expresie al acestor 4 miARN-uri a fost evaluat diferențiat în 3 tipuri principale de cancer pulmonar incipient și s-a evaluat corelarea nivelului de expresie al celor 4 miARN-uri cu profilul IHC al cancerelor pulmonare incipiente.

În cadrul acestui studiu am realizat o caracterizare aprofundată a TME într-un subset de cancer pulmonare în stadiu incipient indiferent de subtipul histologic. Analiza noastră a evidențiat că aceste cancer sunt tumori active imunologic, care au un TME inflamator activ și că cea mai mare parte a infiltratului inflamator este localizat în compartimentul stromal unde SLT au fost identificate în 74,5% din cazuri. Componenta principală a TME sunt limfocitele CD4 pozitive, acestea fiind principala componentă celulară la nivel stromal peritumoral.

Pe baza analizei bioinformatică, am reușit să validăm 4 miARN-uri ce pot fi investigate pentru rolul lor de biomarker diagnostic în cancerul pulmonar incipient. Acest panel de 4 miARN-uri a prezentat un nivel de expresie diferit între țesutul tumoral și țesutul normal adiacent, iar miARN-ul supresor tumoral hsa-miR-181a-5p a

fost semnificativ mai scăzut în toate cele 3 tipuri principale de cancer pulmonar, inclusiv la analiza individuală pe subtipuri de cancer.

Nivelul de expresie al celor 2 miARN-uri supresoare de tumori, hsa-miR-29b-3p și hsa-miR-181a-5p, a fost corelat cu profilul IHC al p53, evidențiind prezența unui mecanism intern de compensare a pierderii rolului genei *TP53* de „gardian al ciclului celular”. O analiză moleculară amănunțită, combinată cu analiza datelor clinice de răspuns la tratament și prognostic, pot identifica noi mecanisme interne de răspuns la căile moleculare oncogene activate în procesul tumoral și identifica modalități de contracarare a acestora.

### **Studiu 3. Caracterizarea morfologică și moleculară a adenocarcinoamelor pulmonare mutate KRAS G12C**

În peisajul molecular al LUAD, o mutație în gena *KRAS* este prezentă în 30% din cazuri, fiind cea mai frecventă oncogenă “driver” mutată în acest tip de cancer. LUAD-urile cu prezența mutației genei *KRAS* sunt un subgrup de cancere heterogene din punct de vedere molecular și al răspunsului la terapie. Mutațiile genei *KRAS* au fost obiectul a multor studii de cercetare ce au încercat să dezvolte molecule țintite care să blocheze proteina mutantă, însă, din cauza structurii moleculare a proteinei *KRAS*, țintirea acesteia a fost dificilă până în prezent, *KRAS* fiind considerată o genă imposibil de țintit terapeutic. Printre diferitele mutații ale acestei gene, mutația glicină la cisteină la nivelul codonului 12 (*KRAS* c.34G>T / *KRAS* G12C) este responsabilă pentru aproximativ 13% din mutațiile *KRAS* în LUAD și este considerată cea mai promițătoare alterare moleculară pentru dezvoltarea de molecule țintite, deoarece datorită aminoacidului cisteină nou introdus se poate ținti această formă mutantă a proteinei *KRAS*. În urma publicării rezultatelor studiilor clinice, FDA a acordat Breakthrough Therapy Designation în iunie 2021 pentru aceste moleculele țintite împotriva mutației *KRAS* G12C în LUAD. În august 2022, pe [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) sunt prezente 48 de studii clinice care evaluează inhibitorii *KRAS* G12C în NSCLC, care găzduiesc mutații specifice *KRAS* G12C.

Scopul studiului este realizarea unei caracterizări clinice, morfologice și moleculare comprehensive a unui subgrup de LUAD cu prezența mutației *KRAS* G12C în vederea înțelegerii avansate a profilului genomic asociat acestui subtip de LUAD în vederea identificării unor subgrupuri de pacienți ce pot beneficia de un răspuns ridicat la noua clasă de inhibitori specifici ai proteinei mutante *KRAS* G12C. Această caracterizare are potențialul de a identifica subtipuri moleculare de LUAD asociate cu un răspuns mai bun sau care ar putea beneficia de o terapie combinatorie pe baza profilului molecular.

În cadrul acestui studiu am realizat o analiză retrospectivă a 202 probe LUAD cu mutația *KRAS* G12C identificată prin secvențiere de nouă generație (NGS). Folosind o abordare combinată morfologică și moleculară, am caracterizat aspectele histologice

cu accent pe caracterizarea TME și principalele modificări moleculare asociate cu mutația KRAS G12C. O limitare potențială a studiului nostru este legată de lipsa datelor clinice privind tratamentul oncologic al acestor pacienți și corelarea profilului molecular cu răspunsul la tratament și supraviețuirea globală.

Studiul nostru morfologic, imunohistochimic și molecular prezintă o cohortă de 202 de cazuri de LUAD-uri mutate KRAS G12C. Caracterizarea morfologică a arătat că aceste subgrupuri de tumori au un TME activ cu o abundență moderată până la mare de LIT în majoritatea cazurilor și o pozitivitate PD-L1 în 44% din probe.

Analiza moleculară a evidențiat coexistența a multiple alterări genomice în diverse gene, inclusiv *MET* și *STK11*. În plus, în timpul analizei moleculare s-a evidențiat un subgrup de tumori în 25% din cazuri care prezintă mutația KRAS G12C și concomitent mutația genei *STK11*. Acest subgrup prezintă caracteristici morfologice și IHC specifice precum un nivel redus de expresie IHC pentru TTF1 și PD-L1.

O caracterizare aprofundată a LUAD-urilor cu mutație KRAS G12C este esențială, întrucât datorită introducerii noilor inhibitori de KRAS intrăm într-o nouă era terapeutică. Odată cu creșterea numărului de alterări genomice ce prezintă abordări terapeutice țintite este necesară realizarea unui profil genomic mai aprofundat pentru identificarea alterărilor genomice coexistente în vederea utilizării lor în cadrul comisiilor multidisciplinare pentru alegerea celei mai potrivite abordări terapeutice.

### **Concluzii, originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei**

Cancerul utilizat ca și model de studiu în cadrul tezei doctorale a fost cancerul pulmonar, acesta fiind al doilea cel mai frecvent tip de cancer diagnosticat la om și principala cauză de mortalitate prin cancer. Utilizând probe tisulare din această patologie am realizat o caracterizare integrată a loturilor incluse în cele 3 studii cu ajutorul (1) tehnicilor clasice histologice ce au evidențiat organizarea arhitecturală specifică, caracteristici morfologice precum dimensiunea celulară, forma nucleară, prezența necrozei intratumorale, abundența și modul de organizare al TME; (2) tehnici imunohistochimice pentru identificarea proteinelor implicate în EMT, apariția de mutații în genele supresoare tumorale, modul de distribuție al populațiilor celulare imune la nivelul TME, precum și stabilirea profilului de expresie al PD-L1 în vederea evaluării posibilității de utilizare a imunoterapiei; (3) NGS ce a permis studierea detaliată a profilului molecular a probelor incluse în studiu și identificarea principalelor gene alterate în cancerul pulmonar. De asemenea, pe baza datelor generate prin intermediul acestor tehnici am utilizat softuri de analiză bioinformatică în vederea identificării de noi biomarkeri cu rol diagnostic și prognostic, precum și pentru înțelegerea moleculară a proceselor celulare specifice celulei maligne ce au loc în etapa incipientă a tumorigenezei.

Originalitatea și aspectele inovative ale tezei de cercetare doctorală sunt reprezentate de realizarea unei abordări translaționale în studiul cancerelor



---

pulmonare incipiente pornind de la aspectele morfologice asociate cu profilul imunohistochimic și combinat cu profilul molecular al acestor tumori. Această abordare integrată a permis identificarea unor noi asocieri moleculare prin intermediul analizelor bioinformatică între markeri genetici și imunohistochimici cunoscuți și profilul de expresie al unor miARN-uri.

Un aspect inovativ este legat de identificarea unui panel de 4 miARN-uri reprezentat de hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-25-3p și hsa-miR-205-5p ce prezintă un profil de expresie specific în cancerul pulmonar incipient și care poate fi studiat pentru rolul său diagnostic și prognostic. De asemenea, prin analiza individuală în subtipurile histologice a expresiei acestor 4 miARN-uri s-a evidențiat profilul particular al hsa-miR-181a-5p care este subexprimat în toate cele 3 tipuri histologice analizate, indicând că inhibarea acestui miARN este un proces important în tumorigeneza timpurie a cancerului pulmonar.

În cadrul studiilor realizate am identificat existența unei corelații pozitive între profilul IHC al p53 și expresia a două miARN-uri supresoare tumoral, hsa-miR-29b-3p și hsa-miR-181a-5p. Acesta este un rezultat inovativ pentru că descrie un posibil mecanism de compensare a alterării funcției p53 prin supraexprimarea a două miARN-uri supresoare tumoral. Acest mecanism poate fi analizat în continuare pentru caracterizarea căilor moleculare implicate și poate permite identificarea de noi moduri de limitare a progresiei tumorale.

Caracterizarea morfologică și moleculară a unui lot de 202 de cazuri de LUAD cu prezența mutației KRAS G12C prin tehnici morfologice, IHC și NGS reprezintă un studiu original ce a permis identificarea de asocieri noi mutaționale în genomul acestor tipuri de cancere. Seria de cazuri este una din cele mai mari publicate în literatură și reprezintă o resursă valoroasă pentru înțelegerea profilului morfologic și molecular al acestui subtip de cancere.

Un aspect inovativ este reprezentat de caracterizarea unui subgrup de cancere pulmonare cu prezența comutației KRAS G12C și STK11, reprezentând 25% din cazurile de LUAD cu prezența mutației KRAS G12C. Acest subgrup molecular prezintă un profil IHC particular cu o reducere semnificativă a expresiei pentru TTF1 și PD-L1, fiind în general considerate a fi rezistente la imunoterapie și asociate cu un prognostic negativ. Însă, conform studiilor recente publicate în literatură, această asociere mutațională ar putea oferi o sensibilitate crescută la noua clasă de inhibitori de KRAS G12C. De asemenea, în urma analizei genomului a 202 LUAD-uri cu prezența mutației KRAS G12C am identificat coexistența a multiple alterări moleculare ce pot avea un rol important asupra selecției tratamentului oncologic.

---

PHD THESIS

Characterization of the lung cancer  
microenvironment in order to identify  
prognostic markers and therapeutic  
combinations

---

PhD Student **Radu Pîrllog**

---

Scientific supervisor Prof. Univ. Dr. **Ioana Neagoe**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

---

# TABLE OF CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	17
<b>STATE OF THE ART</b>	
<b>1. Cancer and the tumor microenvironment</b>	21
1.1. Lung cancer	21
1.2. Tumorigenesis	22
1.3. Epithelial to mesenchymal transition	23
1.4. Field cancerization	24
1.5. Organization of the tumor microenvironment	27
<b>2. Tumor microenvironment analysis</b>	29
2.1. Morphologic analysis	30
2.2. Immunohistochemical analysis	31
2.3. Proteomics analysis	32
2.4. Next generation sequencing analysis	32
2.5. Single cell sequencing analysis	33
2.6. Spatial transcriptomics analysis	34
<b>3. Biomarkers in cancer</b>	37
3.1. Protein biomarkers	37
3.2. Genomics biomarkers	39
3.3. Non-coding RNA biomarkers	40
3.3.1. miRNA biomarkers	40
3.3.2. lncRNA biomarkers	41
<b>4. Targeted therapies in precision oncology</b>	43
4.1. Immunotherapy in cancer	43
4.2. Tyrosine-kinase inhibitors in cancer	44
4.3. Combinatorial treatment in the era of precision oncology	46
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	
<b>1. Working hypothesis</b>	51
<b>2. General Methodology</b>	53
<b>3. Study 1 – Morphological and immunohistochemical analysis of the tumor microenvironment in early-stage lung cancer</b>	57
3.1. Introduction	57

3.2. Working hypothesis	59
3.3. Materials and methods	59
3.4. Results	62
3.5. Discussions	72
3.6. Conclusions	74
<b>4. Study 2 – Identification of novel miRNA biomarkers in early-stage lung cancer</b>	<b>75</b>
4.1. Introduction	75
4.2. Working hypothesis	77
4.3. Materials and methods	77
4.4. Results	82
4.5. Discussions	96
4.6. Conclusions	99
<b>5. Study 3 – Morphological and molecular characterization of KRAS G12C mutated lung adenocarcinomas</b>	<b>101</b>
5.1. Introduction	101
5.2. Working hypothesis	102
5.3. Materials and methods	102
5.4. Results	105
5.5. Discussions	110
5.6. Conclusions	113
<b>6. General conclusions</b>	<b>115</b>
<b>7. Originality and innovative contributions of the thesis</b>	<b>119</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>121</b>

**Key words:** Lung cancer, tumor microenvironment, molecular pathology, immunohistochemistry, next generation sequencing, biomarkers, combinatoric treatments.

## INTRODUCTION

Cancer represents a complex public health problem globally, being responsible for more than 10 million deaths annually. The incidence and mortality associated with cancer is on an upward trend, therefore, it is necessary to improve the preventive, diagnostic and therapeutic approaches. A new approach that will allow understanding the organization of the tumor process and the way of development in the early phases of tumorigenesis is represented by the study of the tumor microenvironment and the cellular interactions that take place at this level.

---

The tumor microenvironment is a complex structure consisting of a cellular and stromal compartment, initially having a role to limit tumor development, but with tumor progression, a phenotypic alteration of the cellular components takes place in order to support cell proliferation. Thus, studying the existing interactions at the molecular level between the components of the cellular microenvironment and the tumor cells can identify new diagnostic and therapeutic approaches that can be used in cancer management.

In the doctoral thesis, lung cancer was used as a model for analysis and characterization of the existing interactions between tumor cells and cells of the tumor microenvironment. Lung cancer is the second most common type of cancer and the cancer responsible for the largest number of cancer related deaths, and improving its therapeutic management is a hot topic in cancer research.

A new approach used to understand the molecular mechanisms involved in tumorigenesis and intercellular communication is the study of non-coding RNAs, especially microRNAs (miRNAs), which are short RNA species with an essential role in the regulation of gene expression. MiRNAs are involved in the regulation of cellular processes in most types of cancer, having a cancer-specific expression profile and an extensive tissue distribution, thus being ideal candidates for the role of new diagnostic, prognostic and predictive biomarkers of therapy response.

In the first 2 studies, a morphological and immunohistochemical (IHC) characterization of a cohort of early stage lung cancers was carried out, and through bioinformatics analyzes we identified and validated a panel consisting of 4 miRNAs with a diagnostic role in early lung cancer. Also, based on the analysis of the immunohistochemical profile and the expression data for the 4 miRNAs, we identified 2 miRNAs associated with the immunohistochemical profile of the analyzed tumors.

In study 3, a morphological and molecular characterization of a molecular subtype of lung cancer was performed, represented by lung adenocarcinomas with the presence of the *KRAS G12C* mutation. The study of this molecular subtype of lung cancer is an important subject of cancer research following the introduction of targeted therapy with specific inhibitors of the mutant *KRAS* oncoprotein. In the third study, a molecular subgroup of cancers was identified showing the *STK11* gene mutation associated with the *KRAS G12C* mutation in 25% of the analyzed cases. These subset of tumors with this particular mutational profile show immunohistochemical peculiarities and may show an improved response to therapy with the new therapeutic class of *KRAS* inhibitors.

### **Study 1 – Morphological and immunohistochemical analysis of the tumor microenvironment in early-stage lung cancer**

---

Lung cancers are divided according to morphological appearance into two main histological classes non-small cell lung cancer (NSCLC), which accounts for 80-85% and small cell lung cancer (SCLC) covering the remaining 10-15%. NSCLC is represented by 3 main histological subtypes: lung adenocarcinomas (LUAD), squamous cell carcinomas (LUSC), and large cell neuroendocrine carcinomas. Two aspects drive tumor development and progression: genetic/epigenetic changes in premalignant cells and reorganization of components of the tumor microenvironment (TME) through reciprocal and dynamic interaction. Tumor microenvironment consists of tumor cells, stromal cells, such as tumor-associated fibroblasts, endothelial cells, and immune cells, such as macrophages, T lymphocytes, NK cells, dendritic cells, and myeloid suppressor cells, as well as the non-cellular components of the extracellular matrix: collagen, fibronectin, hyaluronan and laminin.

A new approach for the early detection of cancer analyzes the molecular alterations occurring at the level of the TME in the early stages of tumor development, which have the potential to be used as diagnostic and prognostic biomarkers in the management of oncological patients.

The aim of this study is to identify new biomarkers for the early diagnosis of lung cancers using a translational approach based on classical morphological analysis, IHC and bioinformatics. In this study we included a series of 51 cases of early-stage lung cancers in order to characterize the tumor and their associated TME to identify the particular characteristics of TME organization in the early stages, in order to identify new diagnostic and prognostic biomarkers.

In the present study, we analyzed a series of 51 early-stage lung cancers and characterized the tumor and TME profile morphologically and immunohistochemically. We highlighted an increased presence of intratumoral necrosis in these cancers, associated with the presence of nuclear atypia. The IHC profile of tumor proliferations revealed a reduction in E-cadherin expression in the early stages, without identifying a complete loss of protein expression, and the expression of the IHC marker p53 revealed a positivity in 45% of cases, suggesting that the alteration of the function of the *TP53* gene is an essential genomic event occurring in early lung development. TME analysis revealed an immunologically active microenvironment in over 80% of lung cancers with the presence of immune cells predominantly in the stromal compartment. Tertiary lymphoid structures (TLS) were present in 74% of cases, and active germinal centers in 45% of cases with TLS. IHC analysis for CD4 and CD8 markers allowed the identification of the distribution of lymphocytic infiltrate in the stromal and intratumoral levels early lung cancers TME. CD4 positive lymphocytes were more abundant at the stromal level, and CD8 positive cells more abundant in the intratumoral compartment. Among the lung cancer histological types, LUAD and LUSC showed a more immunologically active TME compared to neuroendocrine lung cancers.

---

## **Study 2 - Identification of novel miRNA biomarkers in early-stage lung cancer**

The understanding of the mutational profile in lung cancer and the phenotypic impact of the identified mutations led to the identification of "driver" genes, which are essential in the progression of lung cancer, such as *EGFR*, *KRAS*, *ALK*, *BRAF*, *HER2/ErbB2*, *PIK3CA*, *AKT1*, *MAP2K1* and *MET*. The identification of these mutations has changed clinical practice due to the introduction of target molecules and molecular diagnosis. Therefore, for the complete pathological diagnosis of lung cancer, the identification of these mutations with therapeutic impact is mandatory.

A possible source of new biomarkers is represented by non-codingRNAs, especially miRNAs, which are represented by short RNA sequences between 18 and 28 nucleotides in length. The specific expression of miRNAs is dysregulated in human cancers due to functional and structural genomic alterations such as amplifications or deletions of sites where miRNA genes are present, changes in post-transcriptional regulation, epigenetic alterations or mutations in the miRNA biogenesis machinery. Thus, a growing number of studies have indicated the possible value of miRNAs as potential biomarkers for diagnosis, prognosis and potential therapeutic targets in cancer.

In order to overcome the current limitations related to the early identification of lung cancers, we performed a bioinformatics analysis starting from the main genes with altered expression in early stage lung cancer and in the associated TME to identify new biomarkers that can be used in the diagnostic process. Based on the results of the bioinformatics analysis and literature data we selected a panel of 4 miRNAs: hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-25-3p and hsa-miR-205-5p which have qualified as potential biomarkers for the diagnosis of early-stage lung cancer. The expression level of these 4 miRNAs was differentially evaluated in 3 main types of early stage lung cancer, and the correlation of the expression level of the 4 miRNAs with the IHC profile of early lung cancers was evaluated.

In this study, we performed an in-depth characterization of the TME in a subset of early-stage lung cancers regardless of histological subtype. Our analysis revealed that these cancers are immunologically active tumors that have an active inflammatory TME and that most of the inflammatory infiltrate is located in the stromal compartment where TLSs were identified in 74.5% of cases. The main component of the TME is represented by CD4 positive lymphocytes, which are the main cellular component at the peritumoral stromal level.

Based on bioinformatics analysis, we were able to validate 4 miRNAs that can be investigated for their role as diagnostic biomarkers in early stage lung cancer. This panel of 4 miRNAs showed different expression level between tumor tissue and adjacent normal tissue, and tumor suppressor miRNA hsa-miR-181a-5p was

significantly lower in all 3 main types of lung cancer, including in the individual analysis by cancer subtypes.

The expression level of the 2 tumor suppressor miRNAs, hsa-miR-29b-3p and hsa-miR-181a-5p, was correlated with the IHC profile of p53, highlighting the presence of an internal mechanism to compensate for the loss of the role of the *TP53* gene as "guardian of the cell cycle". A thorough molecular analysis, combined with the analysis of clinical data of treatment response and prognosis, can identify new internal response mechanisms to the oncogenic molecular pathways activated in the tumor process and identify new ways to counteract them.

### **Study 3 – Morphological and molecular characterization of KRAS G12C mutated lung adenocarcinomas**

In the molecular landscape of LUAD, a mutation in the *KRAS* gene is present in 30% of cases, being the most frequent "driver" oncogene mutated in this type of cancer. LUADs with the presence of *KRAS* gene mutation are a subgroup of cancers heterogeneous in terms of molecular landscape and response to therapy. Mutations in the *KRAS* gene have been the subject of many research studies trying to develop targeted molecules to block the mutant protein, but due to the molecular structure of the *KRAS* protein, targeting it has been difficult until now, with *KRAS* being considered an impossible gene to target therapeutically. Among the various mutations of this gene, the glycine to cysteine mutation at codon 12 (*KRAS* c.34G>T / *KRAS* G12C) is responsible for approximately 13% of *KRAS* mutations in LUAD and is considered the most promising molecular alteration for the development of targeted molecules, because, thanks to the newly introduced amino acid cysteine, this mutant form of the *KRAS* protein can be targeted specifically. Following the publication of clinical trial results, the FDA granted Breakthrough Therapy Designation in June 2021 for the molecules targeting the *KRAS* G12C mutation in LUADs. As of August 2022, there are 48 clinical trials evaluating *KRAS* G12C inhibitors in NSCLC harboring specific *KRAS* G12C mutations on [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov).

The aim of the study is to develop a comprehensive clinical, morphological and molecular characterization of a subgroup of LUADs with the presence of the *KRAS* G12C mutation in order to advance the understanding of the genomic profile associated with this subtype of LUADs in order to identify subgroups of patients who can benefit from a high response to the new class of specific inhibitors for the mutant *KRAS* G12C protein. This characterization has the potential to identify molecular subtypes of LUADs associated with a better response or that may benefit from combinatoric therapy based on the specific molecular profile.

In this study, we performed a retrospective analysis of 202 LUAD samples with the *KRAS* G12C mutation identified by next generation sequencing (NGS). Using a combined morphological and molecular approach, we characterized the histological



---

aspects with a focus on characterization of the TME and the main molecular changes associated with the KRAS G12C mutation. A potential limitation of our study is related to the lack of clinical data on the oncological treatment of these patients and the correlation of the molecular profile with treatment outcome and overall survival.

Our morphological, immunohistochemical and molecular study presents a cohort of 202 cases of KRAS G12C mutated LUADs. Morphological characterization showed that these tumor subgroups have an active TME with moderate to high abundance of tumor infiltrating lymphocytes in most cases and PD-L1 positivity in 44% of samples.

Molecular analysis revealed the coexistence of multiple genomic alterations in various genes, including *MET* and *STK11*. In addition, during the molecular analysis, a subgroup of tumors was revealed in 25% of the cases presenting the KRAS G12C mutation and the concomitant *STK11* gene mutation. This subgroup shows specific morphologic and IHC features such as a lower IHC expression for TTF1 and PD-L1.

An in-depth characterization of LUADs with KRAS G12C mutation is essential, as we are entering a new therapeutic era thanks to the new KRAS inhibitors. With the increase in the number of genomic alterations presenting targeted therapeutic approaches, it is necessary to perform a more in-depth genomic profile analysis to identify coexisting genomic alterations in order to use them within multidisciplinary committees to choose the most appropriate therapeutic approach.

### **Conclusions, originality and innovative contributions of the thesis**

The cancer used as a study model in the doctoral thesis was lung cancer, which is the second most common type of cancer diagnosed in humans and the main cause of cancer mortality. Using tissue samples from this pathology, we performed an integrated characterization of the cohorts included in the 3 studies with the help of (1) classic histological techniques that highlighted the specific architectural organization, morphological characteristics such as cell size, nuclear shape, the presence of intratumoral necrosis, the abundance and mode of organization of TME; (2) immunohistochemical techniques for the identification of proteins involved in EMT, the occurrence of mutations in tumor suppressor genes, the distribution of immune cell populations at the TME level, as well as establishing the expression profile of PD-L1 in order to evaluate the possibility of using immunotherapy as a therapeutic option; (3) NGS which allowed the detailed study of the molecular profile of the samples included in the study and the identification of the main altered genes in lung cancer. Also, based on the data generated through these techniques, we used bioinformatics analysis software in order to identify new biomarkers with a diagnostic and prognostic role, as well as for the molecular understanding of the cellular processes specific to the malignant cells that take place in the early stage of tumorigenesis.

---

The originality and innovative aspects of the doctoral research thesis are represented by the development of a translational approach for the study of early stage lung cancers starting from the morphological aspects associated with the immunohistochemical profile and combined with the molecular profile of these tumors. This integrated approach allowed the identification of new molecular associations through bioinformatics analyses between known genetic and immunohistochemical markers and the expression profile of some miRNAs.

An innovative aspect is related to the identification of a panel of 4 miRNAs represented by hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-25-3p and hsa-miR-205-5p that present a specific expression profile in early stage lung cancer and can be studied for its diagnostic and prognostic role. Also, through the individual analysis in the histological subtypes of the expression of these 4 miRNAs, the particular profile of hsa-miR-181a-5p was highlighted, which is underexpressed in all 3 histological types analyzed, indicating that the inhibition of this miRNA is an important process in early stage lung cancer tumorigenesis.

In the studies carried out we identified the existence of a positive correlation between the IHC profile of p53 and the expression of two tumor suppressor miRNAs, hsa-miR-29b-3p and hsa-miR-181a-5p. This is an innovative result because it describes a possible compensation mechanism for the alteration of p53 function by the overexpression of two tumor suppressor miRNAs. This mechanism can be further analyzed to characterize the molecular pathways involved and may allow the identification of new ways to limit tumor progression.

The morphological and molecular characterization of a batch of 202 cases of LUADs with the presence of the KRAS G12C mutation through morphological, IHC and NGS techniques represents an original study that allowed the identification of new mutational associations in the genome of these types of cancers. The case series is one of the largest published in the literature and represents a valuable resource for understanding the morphological and molecular profile of this subtype of cancers.

An innovative aspect is represented by the characterization of a subgroup of lung cancers with the presence of KRAS G12C and STK11 mutations, representing 25% of LUAD cases with the presence of KRAS G12C mutation. This molecular subgroup shows a particular IHC profile with a significant reduction in expression for TTF1 and PD-L1, being generally considered to be resistant to immunotherapy and associated with a poor prognosis. However, according to recent studies published in the literature, this mutational association could confer increased sensitivity to the new class of KRAS G12C inhibitors. Also, following the genome analysis of 202 LUADs with the presence of the KRAS G12C mutation, we identified the coexistence of multiple molecular alterations that can have an important role on the selection of oncological treatment.