



# Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN  
"SCIENZE BIOMEDICHE"

CICLO XXV

COORDINATORE Prof. Capitani Silvano

## **PKC COME NUOVO TARGET MOLECOLARE NEL CONTROLLO DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE DEI TUMORI NEUROENDOCRINI**

Settore Scientifico Disciplinare MED/13

**Dottoranda**

Dott.ssa Molè Daniela

**Tutore**

Prof. degli Uberti Ettore

Anni 2010/2012

## INDICE

1	Introduzione	3
1.1	Tumori neuroendocrini	3
1.2	Classificazione dei tumori neuroendocrini	5
1.3	Tumori neuroendocrini del pancreas (PETs)	8
1.3.1	Epidemiologia	8
1.3.2	Origine e Classificazione	8
1.3.3	Markers di differenziazione neuroendocrina	11
1.3.4	Markers ormonali	12
1.3.5	Staging e prognosi	13
1.3.6	Correlazioni clinico-patologiche	13
1.3.7	Background genetico dei tumori endocrini pancreatici	14
1.4	Insulinoma	17
2	Carcinoma midollare della tiroide	21
2.1	Diagnosi	21
2.2	Forme familiari	23
2.3	Test genetici	24
2.4	Trattamento chirurgico	25
2.5	Terapie future	30
3	Le protein chinasi C	33

3.1	Proteine che legano PKC	36
3.2	Substrati nucleari di PKC	36
3.3	PKC $\beta$	39
3.4	Isoforme di PKC e proliferazione cellulare	40
3.5	Espressione di PKC in cellule tumorali e nei tumori	44
3.6	Inibitori di PKC	49
3.6.1	Enzastaurin hydrochloride (LY317615)	49
3.6.2	Briostatine	51
3.6.3	Analoghi dei fosfolipidi	52
3.6.4	Derivati della staurosporina	53
3.6.5	Oligonucleotidi antisenso	54
4	Scopo dello studio	55
5	Materiali e metodi	56
6	Risultati	63
7	Discussione	81
8	Bibliografia	92

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 TUMORI NEUROENDOCRINI

I tumori neuroendocrini sono un gruppo eterogeneo di neoplasie costituite da cellule neuroendocrine che fanno parte del Sistema Endocrino Diffuso (DES). Le cellule del DES ed i tumori che ne derivano sono stati scoperti nella seconda metà del XIX secolo. Da allora la definizione di cellula neuroendocrina ha subito diverse modificazioni. Inizialmente cellule peculiari della mucosa gastrica ed intestinale hanno attirato l'attenzione dei ricercatori poichè in grado di colorarsi mediante sali di cromo, per cui sono state chiamate cellule enterocromaffini. La concomitante scoperta della secretina da parte di Baylis e Starling nel 1902 ha dimostrato che il sistema gastrointestinale era sito di produzione di sostanze secrete nel sangue, chiamate ormoni, con effetto fisiologico a distanza dalla loro fonte di produzione. Nel 1938 Feyrter ha descritto in vari organi cellule epiteliali non evidenziabili con coloranti convenzionali. Tali cellule, che includono anche le cellule cromaffini, sono state definite "cellule chiare". Ad esse è stata attribuita una funzione locale, con produzione e secrezione di peptidi o amine ad azione paracrina, e, a causa della loro distribuzione in molti organi, sono state classificate come DES. Nel 1966 Pearse ha identificato un gruppo di cellule capaci di captare precursori che poi trasformano in amine mediante decarbossilazione intracellulare. Queste cellule, in gran parte corrispondenti alle "cellule chiare" di Feyrter, sono state raggruppate come cellule APUD (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation system), comprendenti anche le cellule argentaffini e le cellule che immagazzinano 5-idrossitriptofano (5HT) dell'apparato gastrointestinale. Contemporaneamente allo sviluppo del concetto di DES, è stato scoperto un tumore epiteliale non convenzionale a lento sviluppo, definito da Öberendorfer come "karzinoid". Le proprietà argentaffini di alcuni di questi tumori è stata descritta da Gosset e Masson nel 1914 e successivamente è stata stabilita la loro correlazione con le cellule enterocromaffini. Con lo sviluppo dell' immunisto chimica sono state identificate sempre più cellule dell'apparato gastrointestinale, del pancreas e del sistema nervoso capaci di produrre e secernere amine. Da qui l'introduzione del termine "cellula neuroendocrina".

Oggi le cellule endocrine sono descritte secondo i seguenti criteri:

- produzione di neurotrasmettitori, neuromodulatori o neuropeptidi;
- presenza di granuli di secrezione a nucleo denso dai quali l'ormone è prodotto e secreto mediante esocitosi in risposta a stimoli esterni;
- assenza di assoni e sinapsi.

I tumori neuroendocrini sono un gruppo eterogeneo di neoplasie che comprendono carcinoidi gastrointestinali, tumori pancreatici insulari, tumori ipofisari cromofobi, carcinomi midollari della tiroide e feocromocitomi. I tumori neuroendocrini gastrointestinali rappresentano la maggioranza dei tumori neuroendocrini. Solitamente sono tumori sporadici, ma possono anche far parte di sindromi genetiche e clustering familiare. Inoltre, circa il 20% dei pazienti con tumori neuroendocrini sviluppano neoplasie secondarie.

## **1.2 CLASSIFICAZIONE DEI TUMORI NEUROENDOCRINI**

I tumori neuroendocrini sono stati a lungo fonte di interesse clinico e patologico. Inizialmente, nel 1907, essi sono stati classificati da Öberendorfer sotto il termine "karzinoid". Nel 1963 è stato proposto di classificare i carcinoidi, in base al sito di origine embrionale, come foregut (vie respiratorie, stomaco, duodeno prossimale, sistema biliare, pancreas), midgut (duodeno distale, digiuno, ileo, appendice, colon prossimale) e hindgut (colon distale, retto) <sup>(1)</sup>. Tuttavia, questa classificazione si è dimostrata inaffidabile poichè raggruppa tumori con caratteristiche morfologiche, funzionali e cliniche diverse, come per esempio tumori neuroendocrini del tratto gastrointestinale e del polmone. Nel 1980 la classificazione del WHO (Tabella 1) ha separato i tumori gastrointestinali dai tumori di origine diversa. I tumori gastrointestinali, che costituiscono circa il 90% di tutti i tumori neuroendocrini, sono stati classificati come carcinoidi. I restanti includono tumori neuroendocrini del pancreas, della tiroide, paragangliomi, tumori polmonari a piccole cellule e tumori della cute a cellule di Merkel. I carcinoidi, in base a varie tecniche di colorazione, sono stati poi sottoclassificati in carcinoidi a cellule enterocromaffini, carcinoidi a cellule contenenti gastrina e altri tipi di carcinoidi. Tuttavia anche questa classificazione ha creato confusione. L'uso del termine "carcinoide" per classificare i tumori

neuroendocrini non è preciso e non riesce ad incorporare l'ampio spettro di neoplasie che originano dai vari tipi di cellule neuroendocrine che producono sostanze biologicamente attive. Nel 1994 Capella et al. hanno suggerito di sostituire i termini "carcinoide" con il termine "tumore neuroendocrino", in modo da poter includere tutte le neoplasie con carattere neuroendocrino, e hanno proposto una nuova classificazione basata su aspetti clinici e patologici. I tumori sono inizialmente suddivisi secondo il sito di origine e successivamente suddivisi in tumori con comportamento benigno, tumori con comportamento incerto, tumori maligni a basso grado, tumori maligni ad alto grado. La suddivisione è basata sulla differenziazione istologica, la dimensione, l'invasione di tessuti circostanti, e l'invasione dei vasi (<sup>2,3</sup>). La secrezione ormonale è strettamente correlata al quadro clinico provocato da questi tumori ed è quindi importante per la loro classificazione. Tali tumori sono classificati come tumori neuroendocrini funzionanti quando i livelli ormonali sierici sono elevati, con conseguente sindrome clinica da iperproduzione, e come tumori neuroendocrini non funzionanti quando non provocano significativo aumento dei livelli ormonali sierici. La classificazione più recente del WHO (<sup>4</sup>) è basata su una serie di caratteristiche istopatologiche e biologiche : grading, sito e dimensioni del tumore primario, markers di proliferazione cellulare, invasività locale e vascolare, produzione di sostanze attive dal punto di vista biologico.

Le principali categorie sono:

- 1) *tumori endocrini ben differenziati (well differentiated endocrine tumors)* caratterizzati da basso grado di malignità;
- 2) *carcinomi endocrini ben differenziati (well differentiated endocrine carcinomas)*, più aggressivi per la presenza di metastasi;
- 3) *carcinomi endocrini scarsamente differenziati (poorly differentiated endocrine carcinomas)* con alto grado di malignità e prognosi peggiore;
- 4) *carcinomi esocrini-endocrini misti (mixed exocrine-endocrine tumors)*.

Questa classificazione permette una diagnosi facile dei tumori neuroendocrini del tratto gastroenteropancreatico.

Classification	Well-differentiated endocrine tumor	Well-differentiated endocrine tumor	Well-differentiated endocrine carcinoma	Poorly differentiated endocrine carcinoma
Site	Benign behavior	Low-grade malignant	Low-grade malignant	High-grade malignant
Pancreas	<p>Confined to pancreas &lt;2 cm, &lt;2 mitoses per 10 HPF &lt;2% Ki-67 positive cells No vascular invasion</p> <p>– functioning: insulinoma – non-functioning</p>	<p>Confined to pancreas <math>\geq</math>2 cm &gt;2 mitoses per 10 HPF &gt;2% Ki-67 positive cells or vascular invasion</p> <p>– functioning: gastrinoma, insulinoma, VIPoma, glucagonoma, or somatostatinoma – non-functioning</p>	<p>Well to moderately differentiated Mitotic rate often higher (2–10 per 10 HPF) Ki-67 index &gt;5% Gross local invasion and/or metastases</p> <p>– functioning: gastrinoma, insulinoma, VIPoma, glucagonoma, or somatostatinoma – non-functioning</p>	<p>Necrosis common &gt;10 mitoses per 10 HPF &gt;15% Ki-67 positive cells Prominent vascular and/or perineural invasion</p> <p>Small cell carcinoma</p>
Stomach	<p>Confined to mucosa–submucosa, <math>\leq</math>1 cm No vascular invasion</p> <p>Non-functioning: – ECL tumor associated with chronic atrophic gastritis (CAG) or MEN 1 – serotonin-producing tumor – gastrin-producing tumor</p>	<p>Confined to mucosa–submucosa, &gt;1 cm or vascular invasion</p> <p>Non-functioning: – ECL tumor associated with CAG or MEN 1 or sporadic – serotonin-producing tumor – gastrin-producing tumor</p>	<p>Well- to moderately differentiated Invasion to muscularis propria or beyond or metastases</p> <p>Functioning or non-functioning: – ECL tumor usually sporadic – serotonin-producing tumor – gastrin-producing tumor</p>	<p>Small cell carcinoma</p> <p>Usually non-functioning Occasionally with Cushing syndrome</p>
Duodenum, upper jejunum	<p>Confined to mucosa–submucosa, <math>\leq</math>1 cm No vascular invasion</p> <p>Non-functioning: – gastrin-producing tumor – serotonin-producing tumor – gangliocytic paraganglioma</p>	<p>Confined to mucosa–submucosa, &gt;1 cm or vascular invasion</p> <p>– gastrin-producing tumor, functioning or non-functioning, sporadic or MEN 1 associated – somatostatin-producing tumor with or without Recklinghausen – serotonin-producing tumor, non-functioning</p>	<p>Well- to moderately differentiated Extending beyond submucosa or beyond or metastases</p> <p>– gastrin-producing tumor, functioning or non-functioning, sporadic or MEN 1 associated – somatostatin-producing tumor with or without Recklinghausen – serotonin-producing tumor, non-functioning or functioning (any size or extension) – malignant gangliocytic paraganglioma</p>	<p>Small cell carcinoma</p>
Ileum, colon, rectum	<p>Confined to mucosa–submucosa, <math>\leq</math>1 cm (small intestine) <math>\leq</math>2 cm (large intestine) No vascular invasion</p> <p>Non-functioning: – serotonin-producing tumor – enteroglucagon-producing tumor</p>	<p>Confined to mucosa–submucosa, &gt;1 cm (small intestine) &gt;2 cm (large intestine) or vascular invasion</p> <p>Non-functioning: – serotonin-producing tumor – enteroglucagon-producing tumor</p>	<p>Well to moderately differentiated Invasion to muscularis propria or beyond or metastases</p> <p>– serotonin-producing tumor with or without carcinoid syndrome – enteroglucagon-producing carcinoma</p>	<p>Small cell carcinoma</p>
Appendix	<p>Non-functioning Confined to appendiceal wall <math>\leq</math>2 cm No vascular invasion</p> <p>Non-functioning: – serotonin-producing tumor</p>	<p>Enteroglucagon-producing Confined to subserosa &gt;2 cm or vascular invasion</p> <p>Non-functioning: – enteroglucagon-producing tumor</p>	<p>Well to moderately differentiated Invasion to mesoappendix or beyond or metastases</p> <p>– serotonin-producing tumor with or without carcinoid syndrome</p>	<p>Small cell carcinoma</p>

**TABELLA 1 : Classificazione WHO dei tumori neuroendocrini gastro-entero-pancreatici.**

## **1.3 TUMORI NEUROENDOCRINI DEL PANCREAS (PETs)**

### **1.3.1 EPIDEMIOLOGIA**

I tumori endocrini pancreatici sono rari e rappresentano soltanto il 2% di tutte le neoplasie pancreatiche. Non mostrano una significativa predilezione di sesso e possono presentarsi in tutte le età, con un picco d'incidenza tra i 30 e i 60 anni. Questi tumori sono generalmente di piccole dimensioni (< 1 cm), essendo riscontrati in circa l'1% di biopsie. L'incidenza totale dei PETs è aumentata negli ultimi anni, probabilmente a causa dell'applicazione di approcci diagnostici più sensibili, come per esempio tecniche di imaging, test laboratoristici più affidabili ed analisi morfofunzionali più dettagliate mediante tecniche di immunistochimica e biologia molecolare (<sup>5,6,7,8,9,10</sup>).

### **1.3.2 ORIGINE E CLASSIFICAZIONE**

Le cellule di origine dei PETs sono virtualmente tutte le cellule facenti parte del pancreas endocrino. Queste cellule sono localizzate sia nelle insule che nell'epitelio dei dotti e dei duttuli. Le cellule dei duttuli sono considerate multipotenti ed hanno un ruolo molto importante nella rigenerazione del pancreas, com'è dimostrato da esperimenti su animali che hanno evidenziato capacità rigenerativa del pancreas dopo parziale pancreatectomia. Tale capacità rigenerativa è caratteristica sia di cellule differenziate esocrine ed endocrine che di cellule dei duttuli, capaci di dare origine a nuovi lobuli pancreatici ed insule (<sup>11,12</sup>).

I PETs rappresentano un gruppo eterogeneo di neoplasie che mostrano caratteristiche morfologiche, cliniche e molecolari diversi. Dall'inizio del secolo scorso numerosi studi hanno cercato di chiarire le caratteristiche clinico-patologiche e molecolari di queste neoplasie. A causa dei diversi approcci metodologici usati per classificare questi tumori, sono state proposte numerose nomenclature, che spesso hanno causato confusione tra clinici e patologi(<sup>13</sup>). Nel 1995, un gruppo di patologi endocrinologi (<sup>14</sup>) hanno proposto una classificazione dei tumori neuroendocrini del polmone, del tratto gastroenterico e del pancreas, con lo scopo di identificare le caratteristiche cliniche e morfologiche, utili nel delineare categorie di tumori con prognosi diverse. Tra i fattori prognostici, i marker di proliferazione apparivano

promettenti e utili nel riconoscimento di tumori con un alto rischio di malignità e prognosi peggiore (<sup>15,16</sup>). Il primo studio sull'utilità di un marker proliferativo nella valutazione della malignità dei PETs è stato pubblicato nel 1992 da Pelosi et al (<sup>17</sup>). Gli autori hanno dimostrato che un marker nucleare di proliferazione cellulare maggiore del 5% è correlato alla diminuzione della sopravvivenza media dei pazienti. Tuttavia, il marker di proliferazione Ki-67, valutato mediante l'uso dell' anticorpo monoclonale MIB1, è stato dimostrato essere migliore, nel valutare la prognosi dei pazienti. Si è stabilito che un indice di proliferazione con Ki-67 minore del 2% è indicativo di comportamento benigno e che il rischio di comportamento maligno aumenta progressivamente con l'aumentare di Ki-67 dal 2% al 10% (<sup>18</sup>). In aggiunta al Ki-67, vari altri parametri morfologici sono stati studiati e sono risultati utili nel prevedere il comportamento clinico dei tumori neuroendocrini (<sup>19,62</sup>). I fattori istopatologici di malignità presi in considerazione sono:

- dimensione tumorale;
- invasività di tessuti contigui;
- atipia strutturale con prevalenza di aree solide;
- presenza di necrosi;
- atipia cellulare con aumentato rapporto nucleo/citoplasma;
- distribuzione irregolare della cromatina e nucleoli evidenti;
- numero di mitosi ( $>2/\text{mm}^3$ ).

Tra questi criteri, l'invasione microvascolare sembra essere più sensibile e specifica nel predire la malignità, solo se identificata tramite CD31 sulla parete vasale. Questi criteri, presentati dal gruppo internazionale dei patologi nel 1995, hanno rappresentato la base per la recente classificazione WHO dei PETs (<sup>20</sup>) (Tabella 2).

WHO Classification of Pancreatic Endocrine Tumors [239]	
1	Well differentiated endocrine tumor
1.1	Benign behavior: confined to the pancreas, nonangioinvasive, <2 cm in size; ≤ two mitoses and ≤ 2% Ki-67-positive cells per 10 HPF
1.1.1	Functioning: insulinoma
1.1.2	Nonfunctioning
1.2	Uncertain behavior: confined to the pancreas, ≥ 2 cm in size, more than two mitoses and > 2% Ki-67-positive cells per 10 HPF, or angioinvasive
1.2.1	Functioning: gastrinoma, insulinoma, VIPoma, glucagonoma, somatostatinoma, inappropriate hormone secreting tumors <sup>a</sup>
1.2.2	Nonfunctioning
2	Well differentiated endocrine carcinoma
2.1	Low-grade malignant: gross local invasion and/or metastases
2.1.1	Functioning: gastrinoma, insulinoma, glucagonoma, VIPoma, somatostatinoma, inappropriate hormone secreting tumors <sup>a</sup>
2.1.2	Nonfunctioning
3	Poorly differentiated endocrine carcinoma High-grade malignant: small to large cell carcinomas

<sup>a</sup>Inappropriate hormone secreting tumors may cause the following endocrine syndromes: Cushing (ACTH), acromegaly or gigantism (GRF), hypercalcemia, and so forth.

**TABELLA 2 :** Classificazione WHO dei PETs.

I PETs possono essere anche classificati, in base alla loro funzione endocrina ed alle conseguenti manifestazioni cliniche, in funzionanti e non funzionanti (Tabella 3).

Functional Classification of Pancreatic Endocrine Tumors		
%	Type	Behavior
5-10	Nonfunctioning, clinically silent	Mostly benign
50	Insulinomas	90% benign
20	Other functioning tumors: gastrinoma, glucagonoma, somatostatinoma, carcinoid, Cushing's tumors, and so forth	50-90% Malignant, low grade
20	Nonfunctioning, locally symptomatic tumors	70-80% Low grade malignancies
1-5	Small cell carcinoma with poor endocrine differentiation	All malignant, high grade

**TABELLA 3:** Classificazione funzionale dei PET.

### **- Tumori funzionanti**

Sono associati a sindromi cliniche causate dalla secrezione inappropriata di ormoni. Di questo gruppo fanno parte insulinomi, glucagonomi, somatostatini, gastrinomi, VIPomi e alcuni tumori meno comuni.

### **- Tumori non funzionanti (o inattivi, clinicamente silenti)**

Non sono associati ad una distinta sindrome clinica ma possono comunque mostrare elevati livelli ormonali nel sangue o immunoreattività in prelievi di tessuto. Perciò tumori con cellule che per la maggior parte esprimono e spesso anche secernono polipeptide pancreatico (PP) o neurotensina sono inclusi nella categoria dei tumori non funzionanti, perchè non causano una sindrome ormonale clinica definita. Questi tumori diventano clinicamente apparenti per le loro elevate dimensioni, l'invasione di organi adiacenti, per la presenza di metastasi e in rari casi dall'insorgenza di pancreatite acuta. Molto spesso sono individuati incidentalmente mediante tecniche di imaging. Tumori con diametro minore di 0,5 cm vengono denominati microadenomi e normalmente sono non funzionanti.

### **1.3.3 MARKERS DI DIFFERENZIAZIONE NEUROENDOCRINA**

I PETs possono essere identificati usando anticorpi diretti contro markers simili a quelli presenti in tutte le cellule neuroendocrine, come la sinaptofisina, una glicoproteina integrale della membrana delle vescicole sinaptiche, o il PGP 9.5, una proteina citoplasmatica. Un altro marker che può essere utilizzato è l'enolasi neuro-specifica (NSE), ma i risultati devono essere interpretati con cautela perché ha una bassa specificità. La presenza di cromogranine immunoreattive, componenti glicoproteiche del citoplasma delle cellule neuroendocrine con granuli secretori, indica la presenza di questi ultimi ed indirettamente valuta il grado di differenziazione delle cellule tumorali<sup>(53,54)</sup>. In cellule meno granulate la positività per cromogranina è meno intensa e diffusa, anche se risulta intensa quella per la sinaptofisina. I PETs contengono inoltre citocheratine 8, 18 e 19 e in alcuni casi anche neurofilamenti.

### 1.3.4 MARKERS ORMONALI

L'uso di questi markers è utile nel caratterizzare il tipo di cellule tumorali e il loro specifico prodotto ormonale. Nella maggior parte dei tumori funzionanti l'ormone che causa la sindrome clinica può essere rilevato con metodi di immunocistochemica. Tuttavia, i tumori funzionanti sono caratterizzati in base ai sintomi clinici, perché l'intensità della colorazione o il numero delle cellule positive non sono correlati all'intensità dei sintomi. Questo è in parte dovuto all'alterazione della regolazione genetica e post-traslazionale della sintesi e secrezione ormonale. C'è un elevato grado di eterogeneità nel contenuto di ormoni e di mRNA corrispondente in ciascuna cellula dello stesso tumore, inoltre tali ormoni possono presentare una ridotta attività biologica o una diversa emivita plasmatica. E' possibile che in tumori altamente funzionanti l'immunocistochemica risulti negativa, probabilmente per la loro rapida secrezione. In questi casi tecniche di biologia molecolare per l'analisi qualitativa di mRNA possono risultare utili. D'altra parte l'immunocistochemica può risultare positiva in tumori non funzionanti per la disregolazione della via secretoria (<sup>54</sup>).

Immunophenotyping of pancreatic endocrine tumours.

<b>General neuroendocrine markers</b>
Synaptophysin
Protein Gene Product (PGP) 9.5
CD56
MAP18
<b>Markers of the matrix of secretory granules</b>
Chromogranins
<b>Hormone (cell type) – specific markers</b>
Insulin
Glucagon
Somatostatin
Gastrin
Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP)
Pancreatic Polypeptide (PP)
Serotonin
ACTH
Neurotensin
Calcitonin

**TABELLA 4:** Markers immunofenotipici di PETs.

Vari studi riportano che molti tumori sono composti da più di un fenotipo cellulare, tuttavia solo uno è correlato con la sindrome clinica da inappropriata produzione ormonale. Perciò la classificazione deve essere morfofunzionale e non basata soltanto sulla tipizzazione cellulare. E' necessario quindi prendere in considerazione principalmente i segni e i sintomi clinici e la determinazione delle ormoni circolanti. Inoltre le metastasi possono produrre ormoni diversi da quelli prodotti dal tumore primitivo (<sup>54</sup>).

### **1.3.5 STAGING E PROGnosi**

Nessun sistema di staging, come il sistema UICC TNM, è stato applicato ai PETs. L'indicatore più affidabile di comportamento maligno è la presenza di metastasi nei linfonodi regionali o epatiche e l'infiltrazione di organi adiacenti. Molti dei tumori di piccole dimensioni, inclusa la maggior parte degli insulinomi, probabilmente hanno potenziale malignità, ma l'interruzione del loro decorso naturale con asportazione chirurgica previene l'espressione di questo potenziale. È stata proposta la separazione dei PETs in gruppi prognostici in base al livello mitotico e alla presenza di aree necrotiche (<sup>21</sup>).

Gli insulinomi funzionanti sono per la maggior parte tumori ben differenziati a comportamento benigno. Solo per il 15% sono classificati come tumori ben differenziati a comportamento incerto, mentre l'85% ha carattere di carcinoma. Tra i tumori non funzionanti, solo una piccola parte rientra nella categoria dei tumori ben differenziati a comportamento benigno o incerto, mentre la maggioranza (fino al 95% dei casi) rientra nella categoria dei carcinomi ben differenziati.

I carcinomi endocrini scarsamente differenziati sono rari (<sup>54</sup>).

### **1.3.6 CORRELAZIONI CLINICO-PATOLOGICHE**

È chiaramente necessario stabilire una stretta correlazione tra la classificazione morfologica e le sindromi cliniche provocate dai tumori, anche perchè è difficile predire il comportamento biologico dei tumori endocrini ben differenziati basandosi solo su criteri istologici.

Per stabilire la natura benigna di un tumore è necessario un lungo follow-up clinico poichè le metastasi possono svilupparsi molti anni dopo la rimozione chirurgica della lesione primitiva.

Fatta eccezione per i carcinomi scarsamente differenziati, la progressione della malattia è spesso significativamente lenta. Dopo la comparsa di metastasi la sopravvivenza a 5 o a 10 anni dopo la comparsa di metastasi è abbastanza frequente. Tuttavia la secrezione ormonale inappropriata può causare sindromi cliniche che mettono in pericolo il paziente.

In conclusione, la classificazione morfofunzionale di un PET deve prendere sotto considerazione :

- la sindrome clinica provocata o associata con un tumore;
- i livelli plasmatici ormonali;
- la massa tumorale;
- le caratteristiche istologiche e il comportamento biologico probabile del tumore;
- il fenotipo delle varie cellule tumorali;
- l'analisi genetica del tumore.

### **1.3.7 BACKGROUND GENETICO DEI TUMORI ENDOCRINI PANCREATICI**

Le alterazioni molecolari che determinano la perdita del controllo della crescita cellulare in cellule neuroendocrine sono poco note, ad eccezione dei tumori sviluppati in pazienti con alterazioni specifiche del genoma, come per esempio MEN1 e malattia von Hippel-Lindau (VHL),

#### **- Forme ereditarie di PETs**

Una piccola percentuale di PETs si manifestano in pazienti con sindromi ereditarie come la MEN1 e la malattia VHL.

- La MEN1 è una rara sindrome autosomica dominante caratterizzata principalmente da anomalie endocrinologiche che interessano ipofisi, paratiroidi, pancreas endocrino e duodeno. PETs ereditari si sviluppano nell' 80-100% dei pazienti (<sup>22,23</sup>). Per la maggior parte questi tumori sono piccoli, non funzionanti, multipli e solitamente benigni. Prendendo in considerazione i tumori funzionanti, 54% dei pazienti sviluppano gastrinomi, 21% insulinomi e meno del 5% altri tipi di PETs (<sup>73</sup>). I PETs associati alla

MEN1 hanno età di incidenza più bassa e recidive post- operatorie molto più frequenti dalla loro controparte sporadica. Rappresentano la causa di morte più frequente dei pazienti affetti da MEN1. La mutazione alla base dell' ereditarietà della MEN1 è una mutazione germinale del gene oncosoppressore MEN1, localizzata, mediante studi di LOH (loss of heterozigosity) e di clonage posizionale, in un breve intervallo genomico nel locus 11q13 (<sup>24,25,26</sup>). Tale mutazione è stata evidenziata in tutte le famiglie affette da MEN1 studiate fino ad oggi. Mutazioni germinali in eterozigosi disperse in tutto il gene MEN1 sono state identificate nel 95% delle famiglie con pazienti che presentano almeno 3 lesioni principali caratterizzanti la sindrome ed anche in parenti di primo grado che presentano almeno una di tali lesioni. I tumori associati alla MEN1 presentano alterazioni somatiche del rimanente allele da perdita cromosomica, perdita cromosomica con duplicazione o altri eventi localizzati come mutazioni puntiformi. Queste informazioni suggeriscono un meccanismo molecolare di oncogenesi dovuta a inattivazione della menina, la proteina codificata dal gene MEN1. Anche se il meccanismo molecolare preciso di soppressione della crescita esercitato dalla menina non è noto, molti dati suggeriscono che la menina probabilmente è coinvolta nella riparazione o sintesi del DNA e che il meccanismo attraverso il quale esercita azione soppressiva della crescita è mediata da interazioni con fattori di trascrizione(<sup>27,28,29</sup>).

➤ La VHL è una sindrome ereditaria dominante che predispone all' insorgenza di varie neoplasie, sia maligne che benigne, più frequentemente rappresentate da neoplasie retiniche, cerebellari, emangioblastoma spinale, carcinoma renale, feocromocitoma e tumori pancreatici cistici e/o endocrini (<sup>30</sup>). I tumori pancreatici correlati a VHL solitamente sono adenomi micro cistici esocrini, ma nel 15% dei pazienti si possono riscontrare dei PETs (<sup>31,32,33</sup>). La maggior parte dei tumori sono multipli e non funzionanti (<sup>34</sup>) e circa il 30-40% di questi tumori dimostrano positività focale per PP, somatostatina, glucagone e/o insulina. Questi tumori sono altamente vascolarizzati e nella maggior parte dei casi presentano una crescita lenta e rimangono asintomatici.

#### **- Forme sporadiche di PETs**

La grande maggioranza dei PETs si presentano sporadicamente e anche se ci sono informazioni dettagliate sul profilo fenotipico e funzionale di queste neoplasie, abbiamo solo poche informazioni riguardanti il genotipo di tumori ben differenziati e virtualmente nessuna informazione per le forme scarsamente differenziate. Inoltre, i

markers molecolari e immunoistochimici attualmente usati sono di scarso valore nel stimare la malignità dei PETs.

Mutazioni somatiche del gene MEN1 sono state riscontrate in circa il 30% dei PETs sporadici (<sup>35,36,37</sup>), con frequenze diverse tra i vari tipi tumorali : alterazioni del MEN1 sono state riscontrate nel 54% dei gastrinomi, nel 50% dei VIPomi, in 2/3 dei glucagonomi, in quasi tutti i somatostatinomi, ma solo nel 7% degli insulinomi e circa nel 26% dei tumori non funzionanti (<sup>103,38,39,40,41</sup>).

#### **- Fattori di crescita**

Recenti studi hanno evidenziato nell'ambito dei PETs la presenza di recettori per i fattori di crescita e la loro sintesi intracellulare. Il significato preciso di questi peptidi nello sviluppo dei PETs non è del tutto chiarita. In generale, questi studi sembrano indicare che l'espressione de novo di fattori di crescita e/o dei loro recettori è coinvolta nello sviluppo tumorale ma non nell' aggressività. I fattori di crescita fibroblastici acidi e basici (aFGF-bFGF) non sono espressi, invece i loro recettori (FGFR1-4) sono espressi nella maggior parte dei tumori (<sup>42</sup>). Nelle cellule insulari normali questi recettori hanno una distribuzione specifica, ma nei PETs sono iperespressi . Il TGF- $\alpha$  è stato rivelato in molti PETs (<sup>43,44</sup>), ma il suo recettore (EGFR) è espresso a bassi livelli e spesso si riscontra una forma incompleta composta solo da uno dei due domini recettoriali (<sup>134</sup>). Il fattore di crescita epatocitario (HGF) è espresso da NF-PETs, gastrinomi, VIPomi e insulinomi (<sup>45</sup>). Alcune di queste neoplasie esprimono anche il recettore del HGF (met), suggerendo l'esistenza di un meccanismo di regolazione della crescita tumorale di tipo autocrino/paracrino (<sup>135,46</sup>). Il fattore di crescita epatocitario è noto per stimolare la metastatizzazione tumorale, ma nel caso dei PETs non sembra essere correlato all' insorgenza di metastasi. Anche altri fattori di crescita e loro recettori sono stati osservati nei PETs (IGF, TGF- $\beta$ , VEGF, PDGF), ma il loro ruolo biologico non è noto.

### **1.4 INSULINOMA**

Gli insulinomi sono tumori funzionanti e generalmente benigni caratterizzati dalla presenza di cellule B differenziate e da ipoglicemia dovuta all'inappropriata secrezione di insulina, hanno una eziologia e patogenesi sconosciuta. Sono i più

frequenti PETs funzionanti con un' incidenza di 2-4 pazienti per 1000000/anno. Possono colpire tutte le età ma sono molto rari prima dei 15 anni e presentano un picco d'incidenza tra i 40 e 60 anni. Il rapporto maschi/femmine è circa 1,5/1 (<sup>47,48,49,50,51,52,53</sup>). Dal punto di vista embriologico derivano da cellule precursori simili a quelle delle insule pancreatiche normali (<sup>54</sup>). Un recente studio di clonalità suggerisce che inizialmente sono neoplasie policlonali o oligoclonali che diventano monoclonali per la prevalenza di un clone più aggressivo (<sup>55</sup>).

La maggior parte degli insulinomi si localizzano nel pancreas o sono adiacenti ad esso. Gli insulinomi ectopici (extrapancreatici) con sintomi ipoglicemici sono riscontrati molto raramente (1,8%) e più spesso si localizzano nelle pareti duodenali. Meno frequentemente possono essere localizzati nell'ileo, digiuno, stomaco, milza, legamento gastrosplenico, polmone, cervice e ovaio.

Possono localizzarsi in qualsiasi parte del pancreas, con una lieve prevalenza della testa e della coda del pancreas. Nell' 85% dei casi sono unici, nel 6-13% sono multipli e nel 4-6% dei casi sono associati alla MEN1 (<sup>56,57,58,59,60,61,62</sup>).

Macroscopicamente sono tumori ben circoscritti, di consistenza più molle rispetto al parenchima circostante e la loro superficie è rossa-marrone.

La maggior parte degli insulinomi viene diagnosticato precocemente quando il diametro del tumore non supera i 2 cm, tuttavia sono stati segnalati anche tumori con diametro fino a 11 cm.

Gli insulinomi maligni possono infiltrare il grasso peripancreatico e/o organi vicini come il duodeno e la milza. Di solito le prime metastasi sono riscontrate nei linfonodi regionali (peripancreatici, celiaci, periaortici) e nel fegato (<sup>51</sup>).

La sintomatologia può essere distinta in due categorie principali : sintomi neurologici e sintomi adrenergici. Spesso prevalgono i sintomi della neuroglicopenia, mentre i sintomi adrenergici sono attenuati e il sospetto clinico è di un malattia neurologica o psichiatrica. L'ipoglicemia si verifica in genere lontano dai pasti o la mattina a digiuno e può essere precipitata dall'esercizio fisico. I sintomi della neuroglicopenia includono diplopia, visione offuscata, confusione, alterazioni del comportamento e amnesia. Alcuni pazienti possono presentare crisi epilettiche focali, perdita della coscienza, coma o anche danno cerebrale permanente. Il rilascio delle catecolamine dovuto a ipoglicemia può provocare sudorazione profusa, astenia, senso di fame, tremori, nausea, ansietà e palpitazioni (<sup>63,64,65,66</sup>).

La diagnosi di insulinoma si basa sui criteri di Whipple e sulla dimostrazione di livelli plasmatici di insulina inappropriatamente elevati per i bassi valori glicemici. Il riscontro in un paziente sintomatico di una glicemia <45mg/dl, di concentrazione plasmatica dell'insulina >10μU/ml e di concentrazione del peptide C >1,5ng/ml è patognomonico di iperinsulinismo endogeno e quindi indicativo di un insulinoma se si esclude l'assunzione di sulfoniluree. Gli elevati livelli di peptide C escludono la possibilità di autosomministrazione di insulina da parte del paziente, mentre le sulfoniluree e i loro metaboliti dovrebbero essere sempre ricercati nel plasma e nelle urine per escludere la possibilità di ipoglicemia factitia. In alcuni casi però i livelli di insulina e peptide C nei pazienti con insulinoma non sono così francamente elevati. Nei soggetti normali l'insulinemia diventa praticamente indosabile (<6μU/ml) quando la glicemia scende sotto i 60mg/dl, quindi sono considerati inappropriati valori di insulinemia >6μU/ml e di peptide C >1ng/ml quando la glicemia è inferiore a 45-50mg/dl. Inoltre il rapporto insulinemia/glicemia è <0,3 in soggetti normali, mentre nei pazienti con insulinoma è >0,4 in genere. La secrezione di insulina da parte del tumore può essere episodica, perciò il rapporto può essere normale in un'occasione e abnorme in un'altra. Circa il 30% dei pazienti presenta un'ipoglicemia sintomatica dopo una notte di digiuno. Per gli altri pazienti è necessario programmare un digiuno prolungato fino a 72h, in regime di ricovero e sotto stretta sorveglianza medica, con prelievi ogni 6h per la determinazione della glicemia e della insulinemia. La prova viene interrotta quando il paziente presenta sintomi di ipoglicemia e dopo il prelievo viene somministrato glucosio. Nel 70% dei pazienti con insulinoma la crisi ipoglicemica si presenta entro 24h e nel 90% entro 48h dall'inizio del digiuno. Se l'ipoglicemia non compare entro 72h, il digiuno può essere protratto per alcune ore e associato a esercizio fisico. Nei casi in cui la risposta al digiuno è dubbia può essere utile un carico endovenoso di insulina (0,1 U/kg/h) per valutare la sopprimibilità dei livelli plasmatici di peptide C. Una mancata inibizione è indicativa di produzione autonoma di insulina.

Per localizzare il tumore vengono convenzionalmente impiegate l'ecografia, la tomografia computerizzata, la scintigrafia con analoghi della somatostatina marcati (<sup>111</sup>In-pentetreotide), PET con <sup>11</sup>C-5-HTP, <sup>11</sup>C-1-DOPA, <sup>18</sup>F-DOPA o <sup>67</sup>Ga-DOTA-DPhe<sup>1</sup>-Tyr<sup>3</sup>-octreotide e l'arteriografia selettiva. L'ecografia e la TC spesso non riescono a mettere in evidenza il tumore, che è in genere di piccole dimensioni, ma possono evidenziare eventuali metastasi epatiche o linfonodali. L'arteriografia, con

somministrazione di mezzo di contrasto attraverso l'arteria pancreatico-duodenale, individua il tumore in 30-85% dei casi. In assenza di una localizzazione preoperatoria, se non c'è evidenza di metastasi, è indicata una laparotomia esplorativa con ausilio dell'ecografia intraoperatoria che può localizzare l'insulinoma in oltre il 90% dei casi. Nei casi in cui l'intervento esplorativo non identifichi la lesione, prima del reintervento sono disponibili tecniche di localizzazione, mediante RM con iniezione di gadolinio, cateterizzazione selettiva dei rami minori dell'arteria gastroduodenale è la tecnica meno invasiva, ma identifica meno del 40% dei piccoli tumori.

La terapia d'elezione è chirurgica. Nel caso di mancata localizzazione del tumore, si procede comunque alla resezione progressiva del pancreas, iniziando dalla coda e progredendo fino a rimuovere il 70-80% del parenchima ghiandolare.

Durante l'intervento è opportuno monitorare la glicemia ogni 15-30 min poiché la completa rimozione del tessuto tumorale ne determina in genere un brusco aumento.

Il trattamento medico consiste nell'utilizzo del diazossido, un potente inibitore della secrezione insulinica, che è in grado di correggere l'ipoglicemia in circa il 50% dei casi. Agisce aprendo i canali del potassio ATP-dipendenti e iperpolarizzando le membrane delle cellule B. Dosi di 300-600mg/die suddivise in tre somministrazioni sono di solito efficaci nel controllare l'ipoglicemia, tuttavia possono manifestarsi effetti collaterali tra cui edema dovuto alla ritenzione di sodio, irritazione gastrica e lieve irsutismo. Per contrastare l'effetto edemigeno e la tendenza all'iperkaliemia è utile associare 25-50mg/die di idroclorotiazide. In alternativa possono essere impiegati analoghi della somatostatina (octreotide, lanreotide), b-bloccanti, calcioantagonisti e glucocorticoidi. Tuttavia il trattamento con octreotide appare limitato in quanto questo analogo della somatostatina ha un'affinità maggiore per il recettore della somatostatina di tipo 2, mentre l'isoforma prevalente a livello pancreatico è l'SSTR5. Per quanto riguarda gli insulinomi maligni può essere usata anche la chemioterapia, che si avvale dell'utilizzo di 5-FU e doxorubicina e streptozocina anche se ha un'efficacia limitata. Dal punto di vista prognostico gli insulinomi nella maggior parte dei casi presentano comportamento benigno. Nel caso degli insulinomi maligni la sopravvivenza disease-free dopo resezione curativa è di 5 anni, ma si manifestano recidive in più del 60% dei pazienti mediamente dopo 2,5-3 anni soprattutto se sono associati a MEN1<sup>(67,68)</sup>.

Nello scenario terapeutico del trattamento di queste neoplasie è emerso il SOM320, un analogo della somatostatina che ha un'affinità recettoriale più elevata per i

recettori SSTR 1-3 e 5 rispetto all'octreotide e al lanreotide ed ha effetto anche sul SSTR 4. Un terzo dei pazienti refrattari al lanreotide mostrano una riduzione della sintomatologia e una risposta antiproliferativa dopo trattamento con SOM320 in assenza di effetti collaterali ad eccezione di alterazioni della glicemia.

In fase di studio vi sono altri farmaci che hanno come bersagli biologici l'angiogenesi (bevacizumab, anticorpo monoclonale contro VEGF-A), la proliferazione (Imatinib, inibisce il PDGFR) e altri meccanismi come la stabilizzazione microtubulare (epothilone), l'inibizione della topoisomerasi I (irinotecan) o del complesso proteasomico (bortezomib). Sono state studiati altri meccanismi come il blocco di vie kinasi-dipendenti, i mediante l'inibitore della tirosin-chinasi gefitinib e la soppressione di mTOR (mammalian target of rapamycin). Inoltre, sono in fase di studio gli effetti sul ciclo cellulare e la regolazione dell'espressione genica dell'antimetabolita pirimidinico, gemcitabine e degli inibitori delle deacetilasi istoniche (MS-275 e SAHA). Per il trattamento della fibrosi, risultati promettenti sono stati ottenuti dagli inibitori della via del CTGF, per esempio l'analogo sintetico della prostaciclina Iloprost e anticorpi monoclonali contro CTGF e TGF- $\beta$ .

## **2. CARCINOMA MIDOLLARE DELLA TIROIDE**

Il Carcinoma midollare della tiroide (MTC) rappresenta attualmente il 5% - 10% di tutti i tumori della tiroide. Il decorso clinico dell' MTC varia da un tumore estremamente indolente che può rimanere invariato per anni ad una variante aggressiva associata ad un alto tasso di mortalità. La maggioranza dei MTCs sono sporadici, ma circa il 20% di MTC sono il risultato di una mutazione genetica germinale del proto-oncogene *ret*. Le forme ereditarie di MTC possono essere considerati come casi isolati (carcinoma midollare della tiroide familiare [FMTC]) o come parte di neoplasie endocrine multiple (MEN) sindrome di tipo 2 (2A o 2B).

L' MTC è un tumore maligno che ha origine dalle cellule C parafollicolari della tiroide. Le cellule C si trovano in tutta la ghiandola tiroidea, ma la maggior parte di esse si trovano a livello della giunzione del terzo superiore e inferiore dei due terzi della ghiandola tiroidea, di conseguenza, questa è la posizione più comune di MTC. Le cellule C secernono una varietà di peptidi e ormoni, di cui la calcitonina è il più comune. Elevati livelli sierici di calcitonina in pazienti con MTC possono essere utilizzati per confermare la diagnosi e per seguire i pazienti in caso di recidiva.

### **2.1 DIAGNOSI**

La maggior parte dei pazienti con diagnosi di MTC sporadico presentano una massa palpabile al collo. L' MTC tende a presentarsi tra la quinta e la sesta decade di vita con una leggera preponderanza femminile. Questi tumori tendono ad essere situati nella parte posteriore della tiroide, e quindi possono comprimere o invadere strutture locali, causando voce rauca, disfagia o difficoltà respiratorie. Alti livelli di calcitonina circolante possono anche causare sintomi quali vampate di calore, diarrea e perdita di peso. Il coinvolgimento linfonodale è visto nel 35% -50% dei pazienti al momento della diagnosi iniziale. Metastasi a distanza sono presenti nel 10% -15% dei pazienti al momento della diagnosi. L'MTC inoltre metastatizza soprattutto a livello di mediastino, fegato, polmoni e ossa.

La maggior parte dei pazienti con malattia ereditaria vengono identificati attraverso test genetici per membri della famiglia a rischio. I familiari di pazienti con una mutazione germinale del gene *RET* hanno una probabilità del 50% di ereditare la

mutazione. Se i pazienti sono considerati portatori genetici, il loro rischio si avvicina al 100%. La forma ereditaria tende a presentarsi in età precoce rispetto alla forma sporadica e si presenta comunemente con il coinvolgimento multifocale e bilaterale.

La diagnosi di MTC è più frequentemente ottenuta mediante un agoaspirato (FNA) di un nodulo tiroideo nuovo. Nell' FNA, l' MTC è caratterizzato dalla presenza di amiloide stromale e assenza di follicoli tiroidei. Nell'FNA non sempre è possibile distinguere l'MTC base dall'aspetto delle cellule, quindi la diagnosi è tipicamente confermata con immunocistochemica. Un'altra tecnica utile che è stata recentemente descritta è quella di misurare il livello di calcitonina nel fluido di lavaggio di un FNA. Questa tecnica sembra essere ancora più sensibile della citologia con immunocistochemica <sup>(69,70)</sup>. L' iperplasia delle cellule C, definita come più di sei cellule C nel follicolo o > 50 cellule C per campo a bassa potenza, è riscontrata in molti pazienti con malattia ereditaria ed è considerata come un precursore della trasformazione maligna. Mentre iperplasia delle cellule C è associata a tumori maligni nella malattia ereditaria, la sua importanza nei casi sporadici è ancora incerta.

Se un paziente ha una storia clinica o un FNA che è sospetto per MTC, il livello di calcitonina nel siero può essere utile per confermare la diagnosi. I livelli di calcitonina possono essere leggermente elevati in una piccola percentuale di pazienti normali, ma la maggior parte dei pazienti con un aumento > 100 pg / ml hanno una diagnosi di MTC. Il grado di aumento di calcitonina è ben correlato con il volume del tumore. Le metastasi linfonodali cominciano ad emergere a livelli di calcitonina basale di 10-40 pg / ml (range normale <10 pg / ml). Le metastasi a distanza sono in genere associate con un livello di calcitonina > 150 pg / ml e spesso > 1000 pg / ml.

L' Antigene carcinoembrionario (CEA) è stato dimostrato essere un utile marker tumorale in pazienti con MTC. Livelli di CEA sono elevati in più del 50% dei pazienti con MTC. Livelli sierici pre-operatori di CEA > 30 ng / ml sono altamente predittivi dell' incapacità di curare un paziente con l'intervento chirurgico [3]. Livelli di CEA > 100 ng / ml sono fortemente associati ad un ampio coinvolgimento dei linfonodi e metastasi a distanza. Un crescente livello di CEA in presenza di un livello stabile di calcitonina può essere un segno di dedifferenziazione del tumore ed è associato ad una prognosi peggiore.

Un' ecografia del collo deve essere eseguita come parte della valutazione iniziale di tutti i pazienti con una nuova diagnosi di MTC. L'ecografia può essere

utilizzata per cercare tumori tiroidei aggiuntivi nonché la presenza di linfadenopatia collo sospetto. Un contrasto-enhanced tomografia computerizzata (TC) del torace, mediastino, e l'addome è consigliato anche come parte della valutazione metastatico di un paziente con una diagnosi iniziale di MTC.

## **2.2 FORME FAMILIARI**

Mentre la maggior parte degli MTC è sporadico, circa il 20% dei casi sono il risultato di una forma ereditaria della malattia. Le forme ereditarie di MTC insorgono nell'ambito delle MEN-2A, MEN-2B, e FMTC. Tutti questi disturbi sono ereditate con modalità autosomica dominante, e hanno penetranza variabile. MEN-2A è il disturbo più comune e rappresenta il 75% degli MTC ereditari.

L' MTC è presente in >95% dei casi di MEN-2A ed è tipicamente multifocale e bilaterale. L'età di insorgenza varia a seconda della specifica mutazione genetica, ma di solito si presenta in età adulta. I feocromocitomi possono insorgere nel 50% dei casi e sono spesso multifocali e associati ad iperplasia midollare surrenale. Se identificati i feocromocitomi devono essere trattati e resecati prima di procedere con una operazione al collo. L'iperparatiroidismo si verifica nel 20% -35% dei pazienti con MEN-2A. Lo screening per l'iperparatiroidismo può essere eseguito con calcemia e livelli di ormone paratiroideo. I pazienti devono essere trattati come qualsiasi altro paziente con iperparatiroidismo primario, con la rimozione dei soli paratiroidi gravemente anormali. Alcune varianti di MEN-2A sono anche associati sia con amiloidosi cutanea o malattia di Hirschsprung. La maggior parte della mortalità associata a MEN-2A è da MTC, pertanto, il riconoscimento precoce e il trattamento sono essenziali.

Nell'ambito delle MEN-2B, quasi il 100% dei pazienti sviluppa MTC. L' MTC si sviluppa in età molto giovane e ha un decorso molto aggressivo. A causa della giovane età di esordio e il frequente ritardo nella diagnosi, i pazienti con MEN-2B sono raramente curabili. I feocromocitomi si osservano nel 50% dei pazienti, ma i pazienti non sviluppano iperparatiroidismo. Una caratteristica distintiva di MEN-2B è lo sviluppo di ganglioneuromi diffuse nelle labbra, lingua, palpebre e del tratto gastrointestinale. Questi pazienti hanno un aspetto caratteristico, tra cui un habitus marfanoide, eversione delle palpebre e le labbra spesse. Questi pazienti hanno anche

problemi con megacolon, anomalie scheletriche e nervi periferici notevolmente allargati. A causa della natura aggressiva dell' MTC in questi pazienti muoiono in giovane età. Di conseguenza, la maggior parte delle diagnosi di MEN-2B osservate ad oggi sono mutazioni germinali de novo.

FMTC si verifica quando le famiglie sviluppano solo MTC. Al fine di prendere in considerazione una famiglia con FMTC, e non con MEN-2A, ci deve essere alcuna prova di una feocromocitoma o iperparatiroidismo in più di 10 portatori e membri multipli devono essere colpiti dopo i 50 anni di età.

### **2.3 TEST GENETICI**

La mutazione genetica negli MTC famigliari è a carico del proto-oncogene RET mappato sul cromosoma 10q11.2. Il gene RET codifica per un recettore tirosin chinasi trans-membrana e dato che si tratta di un proto-oncogene è necessaria una singola mutazione puntiforme per la trasformazione maligna. La prima mutazione germinale del gene RET fu identificata in pazienti nel 1993. Le mutazioni attualmente note codificano nel 95% dei casi per MTC ereditari. La mutazione più comune nelle MEN-2A è a carico del codone 634, che si verificano nell' 80% dei pazienti. Il codone 918 è quello più frequentemente associato con MEN-2B.

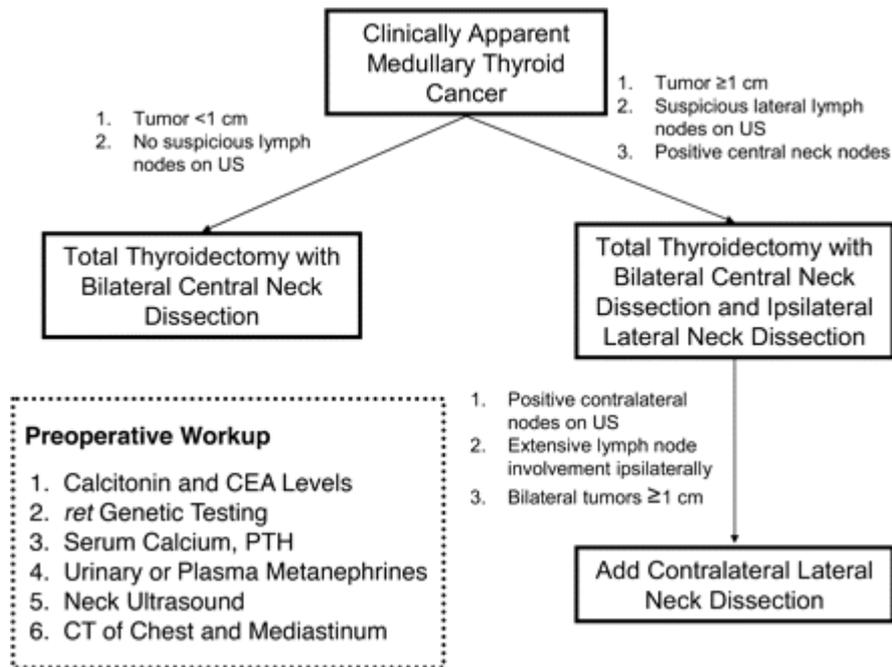
Circa il 20% dei pazienti con MTC hanno una mutazione germinale del proto-oncogene RET. Anche i pazienti con malattia apparentemente sporadica hanno una probabilità del 6% -10% di sviluppare una mutazione germinale di RET. Pertanto tutti i pazienti con una diagnosi di MTC dovrebbero essere sottoposti a test genetici.

L'importanza di una mutazione genetica in un paziente e nella sua famiglia non possono essere sottovalutati. È importante che, prima di effettuare uno screening per le mutazioni genetiche, i pazienti ricevono un' appropriata consulenza genetica. I rischi ed i benefici dei test genetici devono essere discussi con il paziente e la loro famiglia. Una volta che un paziente è risultato essere positivo per una mutazione di RET, deve essere informato del rischio per i suoi familiari. I membri della famiglia a rischio devono essere sottoposti a test genetici, perché i pazienti che vengono identificati come portatori della mutazione devono essere sottoposti a tiroidectomia profilattica.

Tra le mutazioni a carico di RET, vi sono variazioni significative nell' aggressività dell' MTC che si sviluppa. Attualmente, le mutazioni di RET sono classificate in tre gruppi in base al livello di aggressività dell' MTC (<sup>71, 72, 73, 74</sup>). Le mutazioni di Livello 3 (codone 883, 918, e 922) hanno un decorso più aggressivo, con malattia metastatica già dai primi anni di vita. A causa del rischio di malignità in tenera età, la tiroidectomia è raccomandata entro i primi 6 mesi di vita e, preferibilmente entro il primo mese di vita(<sup>71</sup>). Le mutazioni di Livello 2 di RET (codone 611, 618, 620, e 634) sono considerate ad alto rischio per MTC e si raccomanda in questi pazienti la tiroidectomia entro i 5 anni di età(<sup>71</sup>). Le mutazioni di Livello 1 (codone 609, 768, 790, 791, 804, e 891) sono ancora considerate ad alto rischio per MTC, ma sono a più basso rischio di mutazioni di RET. L' MTC in questi pazienti tende a svilupparsi più tardi nella vita e assume un decorso più indolente. Poiché la malattia clinicamente evidente raramente si manifesta prima dei 10 anni di età, molti raccomandano di aspettare fino ad allora per eseguire una tiroidectomia. Tuttavia, la variabilità e l'imprevedibilità rimane in alcune famiglie e di conseguenza molti chirurghi consigliamo di trattare tutti i pazienti con MEN-2A ed eseguire la tiroidectomia profilattica entro i 5 anni di età dove è possibile.

## **2.4 TRATTAMENTO CHIRURGICO**

I pazienti che hanno una malattia clinicamente evidente vengono sottoposti a tiroidectomia totale e bilaterale con dissezione centrale del collo. La dissezione laterale del collo deve essere effettuata se il tumore primario è di dimensioni superiori a 1 cm o se c'è evidenza di linfonodi positivi nel collo centrale. Una dissezione controlaterale del collo deve essere effettuata in pazienti con tumori bilaterali o con vasta adenopatia laterale sul lato del tumore primario (Figura 1). Sfortunatamente, nonostante la resezione chirurgica di tutti i linfonodi del collo, solo il 32% dei pazienti con malattia linfonodale al momento del loro funzionamento hanno livelli non rilevabili di calcitonina post-operatoria (<sup>75</sup>).



**FIGURA 1:** Algoritmo di trattamento per MTC clinicamente evidente <sup>(76)</sup>.

La malattia a livello centrale del collo linfonodale è presente in oltre l' 81% dei pazienti con tumori palpabili<sup>77</sup>. La dissezione centrale del collo ha un tasso di guarigione superiore a quello che si osserva con la sola tiroidectomia in pazienti con MTC clinicamente evidente<sup>78</sup>. Molti chirurghi sostengono che è impossibile fare una dissezione centrale del collo completa senza rimuovere le paratiroidi e / o il loro apporto di sangue. Alcuni chirurghi routinariamente rimuovono le ghiandole paratiroidi e ripuliscono con cura dal tessuto nodale per poi autotrapiantarle.

Se i pazienti hanno un MTC sporadico, FMTC, o MEN-2B allora l'autotrapianto può essere eseguito nel sternocleidomastoideo. Nei pazienti con MEN-2A, a causa del rischio di iperparatiroidismo il tessuto paratiroideo dovrebbe essere autotrapiantato nell' avambraccio. Il posizionamento dell' autotrapianto nell'avambraccio facilita la gestione di qualsiasi iperparatiroidismo che si può sviluppare. Le paratiroidi autotrapiantate solitamente non funzionano per 4-8 settimane, così il calcio e la vitamina D sono necessarie come terapia sostitutiva durante questo periodo.

## **Chirurgia profilattica**

La Chirurgia profilattica riduce il tasso di rischio di insorgenza della malattia. Nel determinare la temporizzazione della chirurgia profilattica, è importante bilanciare il rischio di malattia clinicamente significativa con i rischi dell' intervento chirurgico. Nell' MTC ereditario, vi è un rischio maggiore legato all'età di progressione da iperplasia delle cellule C a MTC ed infine alla diffusione linfonodale.

## **Controlli post-operatori**

I pazienti con malattia confinata alla sola ghiandola tiroidea, senza alcuna metastasi linfonodale, hanno un rischio molto basso di recidiva e raramente muoiono a causa della malattia <sup>(79)</sup>. Tuttavia, molti pazienti con MTC hanno metastasi linfonodali al momento della diagnosi, pertanto presentano un rischio molto elevato di sviluppare una malattia ricorrente o persistente. Pertanto, devono essere seguiti attentamente dopo l'intervento.

Il follow-up dovrebbe iniziare 2-3 mesi dopo l'intervento mediante l'ottenimento di una nuova baseline di calcitonina e dei livelli di CEA. I pazienti che hanno livelli di calcitonina non rilevabili dopo l'intervento possono essere seguiti dosaggi annuali sierici di calcitonina e CEA. Di routine sarà l'ecografia del collo ed eventualmente dell'utero, ma quest'ultimo non è di beneficio provato. La terapia ormonale sostitutiva della tiroide è necessaria dopo una tiroidectomia totale. I pazienti con malattia ereditaria devono essere sottoposti a screening annuale per lo sviluppo di feocromocitoma e iperparatiroidismo.

## **Prognosi**

Nel complesso la prognosi dei i pazienti con MTC è buona. Il tasso di sopravvivenza a 10 anni per i pazienti con MTC è del 75% -85%. Circa la metà dei pazienti con malattia localizzata alla ghiandola tiroidea presente, hanno un tasso di sopravvivenza a 10 anni del 95,6% (Errore. Il segnalibro non è definito.). Un terzo dei pazienti presentano tumori localmente invasivi o di diffusione clinicamente evidente ai linfonodi regionali. I pazienti con malattia regionale hanno un tasso di sopravvivenza a 5 anni del 75,5%. Metastasi a distanza sono presenti nel 13% dei pazienti al momento della diagnosi iniziale e predicono una prognosi infausta, con un tasso di sopravvivenza di 10 anni di solo il 40%.

## **Malattia ricorrente/persistente**

La malattia ricorrente si sviluppa in circa il 50% dei pazienti con MTC. La Calcitonina e livelli di calcitonina stimolati sono metodi molto sensibili per la rilevazione sia di malattia residua che ricorrente. Quando il livello di calcitonina postoperatorio è elevata, un'attenta valutazione delle metastasi deve essere eseguita prima di procedere con l'esplorazione operativa. Re-interventi al collo sono associati a rischi significativi. Pertanto, un nuovo intervento dovrebbe essere eseguito solo se esiste un beneficio superiore al rischio per il paziente. I pazienti con invasione tracheale o mediastiniche possono rischiare di morire per compressione locale / invasione se la malattia non viene asportata. Pertanto, se i pazienti sviluppano recidiva loco-regionale, anche nel contesto della malattia metastatica, dovrebbero essere mandati alla resezione chirurgica quando possibile e radioterapia esterna quando la chirurgia non è possibile <sup>(80)</sup>.

Diversi studi hanno confermato che, con una buona selezione dei pazienti, il reintervento al collo può normalizzare i livelli di calcitonina in circa un terzo dei pazienti <sup>(81)</sup>. Le chiavi per il successo di un nuovo intervento al collo sono un'accurata selezione dei pazienti e il riconoscimento della malattia metastatica. La valutazione della malattia metastatica può includere analisi di imaging anatomico con ecografia del collo, TC del torace e dell'addome e la risonanza magnetica del collo e mediastino. L'imaging funzionale, come ad esempio la tomografia ad emissione di positroni e metaiodobenzilguanidina (MIBG) scansioni, sono state utilizzate per localizzare la malattia metastatica in pazienti con MTC <sup>(82)</sup>.

## **Radioterapia**

La radioterapia esterna attualmente non gioca un ruolo significativo nel trattamento di pazienti con MTC. Tuttavia, la radioterapia è stata applicata per in casi di malattia locale quando la chirurgia non è un'opzione praticabile. La radioterapia è stata anche utilizzata per attenuare le metastasi ossee. Dato l'alto rischio di recidiva cervicale in questi pazienti, soprattutto quelli con malattia microscopica residua, coinvolgimento linfonodale, o la diffusione extra-gliandolare, alcuni hanno sostenuto il trattamento post-operatorio con radioterapia esterna. Ci sono stati diversi studi che esaminano il ruolo della radioterapia adiuvante esterna negli MTC. Uno studio ha dimostrato che pazienti ad alto rischio trattati con chirurgia più radioterapia esterna ha

avuto un tasso di recidiva del 14%, contro il 48% nel gruppo chirurgico (<sup>83</sup>). Anche se questo studio suggerisce che un sottogruppo di pazienti possono trarre beneficio dalla radioterapia esterna adiuvante, la questione deve essere ulteriormente valutata. La radioterapia esterna provoca cicatrici e fibrosi estesa all'interno del collo, rendendo i futuri interventi chirurgici difficile e potenzialmente pericolosi. Poiché i benefici della radioterapia non sono del tutto chiari e il suo uso limita il futuro intervento chirurgico, dovrebbe essere riservati ai casi di malattia nota residua in cui la resezione chirurgica completa non è possibile. Lo iodio radioattivo è parte del trattamento standard per il cancro papillare della tiroide, ma dal momento che le cellule C non sono di origine follicolare, lo iodio radioattivo non viene captato dalle cellule C ed il trattamento con iodio radioattivo non svolge alcun ruolo nella gestione dei pazienti con MTC.

### **Terapia sistemica**

I pazienti con malattia metastatica possono avere sintomi da eccesso di calcitonina e possono beneficiare di un trattamento medico con analoghi della somatostatina. Questi pazienti possono anche beneficiare della chirurgia citoreducente di malattia non resecabile. Procedure per ridurre la massa tumorale, tra cui la resezione e l'ablazione, possono fornire ai pazienti un significativo sollievo sintomatico (<sup>84</sup>).

La chemioterapia convenzionale ha mostrato un'efficacia limitata in pazienti con MTC. Risposte complete sono molto rare e risposte parziali sono state osservate in meno di un terzo dei pazienti. Il profilo degli effetti collaterali della chemioterapia è spesso notevole, rendendo questa un'opzione poco percorribile per molti pazienti. Chemioterapici utilizzati singolarmente come la doxorubicina, dacarbazina, capecitabina e 5-fluorouracile sono stati riportati avere un tasso di risposta parziale fino al 24% -29% (<sup>85</sup>). I nuovi agenti chemioterapici, come irinotecan (un inibitore della topoisomerasi I) e 17-AAG (un inibitore della heat shock 90 protein), sono attualmente in corso di valutazione in studi clinici di fase II.

Con la scoperta della proto-oncogene RET ed il suo ruolo fondamentale nella patogenesi degli MTC, una nuova classe di farmaci è stata sviluppata ed è rivolta alle vie molecolari coinvolte nello sviluppo e progressione degli MTC. RET è parte della famiglia dei recettori tirosin chinasi e ha diverse vie di segnale a valle, comprese le extracellular signal-related kinase (ERK), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt,

p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), e c-Jun N-terminal kinase pathways (<sup>86</sup>). Gli studi e le terapie attuali mirano a bloccare l'attività tirosin chinasi a livello recettoriale, ma vi è un crescente interesse nello sviluppo di terapie più mirate per lo sviluppo di terapie maggiormente focalizzate ai target a valle di questo recettore.

Recentemente è stata scoperta una nuova classe di farmaci che agiscono come inibitori delle tirosin chinasi. Il primo di questi farmaci disponibile in commercio, inibitore del recettore tirosin-chinasi è imatinib mesilato (Gleevec ®, Novartis Pharmaceuticals Corporation, East Hanover, NJ), che è stato usato con successo nel trattamento della leucemia mieloide cronica e tumori stromali gastrointestinali. Un primo studio di fase II con imatinib in MTC ha mostrato un'efficacia limitata in pazienti con MTC (<sup>87</sup>).

Molti degli inibitori delle tirosin chinasi che vengono studiati inibiscono molteplici recettori, compresi RET, il recettore del fattore di crescita e il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF). Vandetanib (Zactima ®; AstraZeneca Pharmaceuticals, Wilmington, DE), un inibitore di RET, è attualmente in corso di valutazione in uno studio multicentrico di fase II in pazienti con MTC ereditario. I risultati preliminari rivelano un tasso del 20% di risposta parziale e un tasso di risposta del 30% stabile alla TC, con una drastica riduzione dei markers tumorali<sup>88</sup>. Motesanib diphosphate (AMG 706; Amgen, Thousand Oaks, CA) è un multikinase inhibitor che ha come bersaglio il VEGF, platelet-derived growth factor, RET, e i recettori Kit. È attualmente in fase di sperimentazione clinica sia nel carcinoma differenziato della tiroide avanzato che nell' MTC avanzato. È interessante notare che molte di queste nuove terapie portano a drastiche riduzioni dei livelli di calcitonina quasi da subito, suggerendo che i marcatori tumorali non possono essere un metodo affidabile per monitorare la risposta del tumore alla terapia.

## **2.5 TERAPIE FUTURE**

Diverse vie di trasduzione del segnale sono coinvolte e contribuiscono alla crescita e alla produzione di diversi ormoni negli MTC. Questi pathway includono quella di PI3K-Akt, MAPK, Notch-1-hairy enhancer of split (HES)-1-achaete-scute complex like (ASCL)-1, e la glicogeno sintasi chinasi-3 (GSK-3) (<sup>89, 90, 91, 92</sup>). Questi

pathway del segnale possono pertanto rappresentare dei possibili traget terapeutico per gli MTC.

### **Pathway del segnale di PI3K–Akt**

L' attivazione della PI3K-Akt sembra giocare un ruolo importante nello sviluppo e nella progressione dei tumori tiroidei, e questa attivazione può essere un risultato della perdita di espressione della fosfatasi PTEN, un oncosoppressore in vari tipi di cancro (<sup>93</sup>). Nonostante il ruolo centrale di PI3K-Akt nella tumorigenesi tiroidea, poco si sa sulle molecole che mediano questa via nel regolare la crescita degli MTC. Recentemente, è stato dimostrato che l'inibizione della PI3K-Akt con un noto inibitore, LY294002, ha comportato una riduzione della crescita cellulare degli MTC e dei marker tumorali neuroendocrini. La riduzione della crescita è mediata da apoptosi. Inoltre, un inibitore di AKT, KP372-1, ha mostrato di inibire la proliferazione cellulare e di indurre l'apoptosi nelle cellule tumorali tiroidee (<sup>93</sup>).

### **Pathway del segnale di Notch-1–HES-1–ASCL-1**

Il pathway del segnale di Notch-1 è altamente conservata in tutto il regno animale e regola la differenziazione cellulare, lo sviluppo, la proliferazione e la sopravvivenza in una varietà di contesti. Notch-1 quando si attiva si lega alla DNA-binding protein complex CSL, con conseguente attivazione di diversi geni bersaglio (<sup>94</sup>). Notch-1 è poco espresso o del tutto assente nei tumori neuroendocrini come il cancro del polmone a piccole cellule, carcinoidi e negli MTC, ed inoltre la sua attivazione risulta in una riduzione della crescita in cellule tumorali (<sup>95</sup>). L' attivazione di Notch-1 indotta dalla doxiciclina in cellule di MTC riduce significativamente la crescita delle cellule, e questa riduzione era dipendente dal livello di Notch-1 (<sup>96</sup>). Notch-1 regola anche i livelli di calcitonina in maniera dose-dipendente. Inoltre, i livelli di riduzione della crescita e produzione di ormoni dipendono dalla quantità di Notch-1 presente nella cellula (<sup>96</sup>). Queste osservazioni dimostrano che il pathway del segnale di Notch-1 è altamente conservato nelle cellule di MTC e sono a sostegno dell'ipotesi che l'attivazione di Notch-1 può essere un potenziale bersaglio per il trattamento di pazienti con MTC.

## **Pathway del segnale di Raf-1–Mitogen-Activated Extracellular Protein Kinase–ERK Pathway**

Nonostante le numerose ricerche e intuizioni di questo nuovo pathway del segnale, il ruolo della Raf-1–Mitogen-Activated Extracellular Protein Kinase–ERK nelle cellule tumorali rimane controverso ma interessante. L'attivazione del pathway di Raf-1 in cellule di MTC mediata dall'espressione dell'estradiolo indotta dal recettore dell'estrogeno fuso con il dominio catalitico di Raf-1 porta ad una riduzione di calcitonina e cromogranina A (<sup>97</sup>), ed a una significativa riduzione della crescita cellulare<sup>98</sup>. Inoltre, è stato anche dimostrato che l'inibizione della crescita mediata dall'attivazione di Raf-1 in una linea cellulare di MTC le cellule TT, induce l'espressione di una proteina autocrino-paracrino, leukemia inhibitory factor, e questo da solo potrebbe mediare la differenziazione e l'inibizione della crescita cellulare. L'attivazione del pathway di Raf-1 nelle cellule TT ha anche portato all'inattivazione di GSK-3 $\beta$  fosforilato in Ser-9 (<sup>99</sup>). Questi risultati indicano che l'attivazione di Raf-1 non solo attiva Raf-1-MEK-ERK crosstalks ma anche altre vie del segnale, che a sua volta regolano la crescita.

## **GSK-3 come potenziale target nella regolazione della crescita degli MTC**

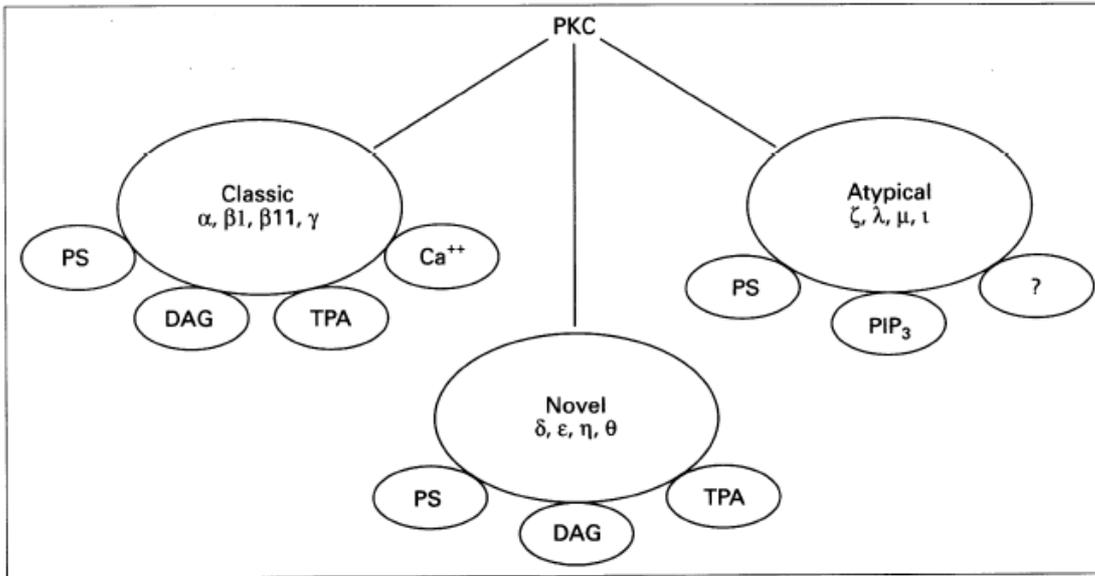
GSK-3 è una serin/treonin chinasi nota per il suo ruolo nella regolazione della sintesi del glicogeno (<sup>100</sup>). GSK-3 $\beta$  un' isoforma della GSK-3, ed è coinvolta in molti processi cellulari, quali metabolismo, sviluppo embrionale e differenziazione cellulare, proliferazione e sopravvivenza (<sup>101</sup>).

A differenza di altre chinasi, la GSK-3 $\beta$  è altamente attiva in forma non fosforilata in cellule non stimolate, e diventa inattiva in seguito a fosforilazione in risposta a diverse cascate del segnale (<sup>102</sup>).

GSK-3 $\beta$  regola diverse molecole quali  $\beta$ -catenina, MAPK chinasi 1, ERK-1/2, c-Myc, c-Jun, murino minuti matrimoniale 2, Mcl-1, e quindi modula diverse vie di segnalazione intracellulare che sono noti per svolgere un ruolo chiave nella tumorigenesi. Recentemente, è stato dimostrato che l'inattivazione di GSK-3 $\beta$  con cloruro di litio provoca differenziazione e inibizione della crescita cellulare negli MTC (<sup>103</sup>). Sulla base di questi studi, è stato intrapreso un trial clinico su pazienti con MTC metastatico, usando liotio, un inibitore non competitivo di GSK-3 con un buon profilo di sicurezza.

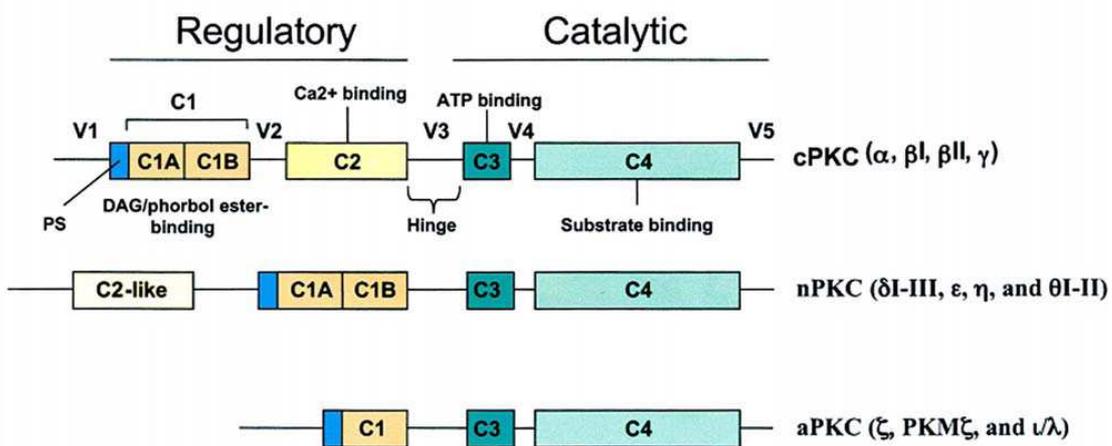
### 3. LE PROTEIN CHINASI C

Le proteine chinasi C (PKC) costituiscono una famiglia di proteine ad attività fosfo-trasferasica su residui serinici e treoninici ed hanno un ruolo regolatorio fondamentale in molti processi cellulari che includono proliferazione e progressione del ciclo cellulare, differenziamento, tumorigenesi, apoptosi, rimodellamento citoscheletrico, modulazione dei canali ionici e secrezione cellulare. Questi enzimi furono identificati per la prima volta nel 1995 da Nishizuka e collaboratori come proteine chinasiche istoniche nel tessuto cerebrale di ratto. Ad oggi sono state identificate 12 isoforme di PKC nei mammiferi e vengono comunemente suddivise in tre famiglie, perché sebbene tutte necessitino di fosfolipidi per la loro funzione, differiscono in struttura e per i cofattori che richiedono per la loro attivazione: le **PKC classiche** o convenzionali (cPKC) comprendono le isoforme  $-\alpha$ ,  $-\beta_1$ ,  $-\beta_2$  e  $-\gamma$ , richiedono  $\text{Ca}^{2+}$ , fosfatidilserina e DAG o esteri del forbolo; le **PKC “nuove”** (nPKC), ovvero le isoforme  $-\delta$ ,  $-\epsilon$ ,  $-\eta$  (anche conosciuta come PKC-L),  $-\theta$  e  $-\mu$  (isoforma del topo omologa all'isoforma umana conosciuta anche come PKD), sono  $\text{Ca}^{2+}$  indipendenti e richiedono solo DAG e fosfatidilserina per la loro attivazione; infine le **PKC atipiche** (aPKC) comprendono la  $-\zeta$ ,  $-\iota$  e la  $-\lambda$  (isoforma del topo omologa all'isoforma umana  $\iota$ ) e non richiedono né  $\text{Ca}^{2+}$  né DAG per essere attivate, ma solo fosfatidilserina o fosfolipidi o acido fosfatidico (Figura 2). Recentemente è stata identificata una nuova isoforma, la PKC $\nu$ , molto simile all'isoforma PKC $\mu$ /PKD. Strutturalmente, le PKC presentano domini conservati (C1-C4) interrotti da regioni variabili (V1-V5). Le regioni C1 e C2 servono per la localizzazione e rappresentano due moduli di indirizzamento alla membrana. Tutte le isoforme presentano un dominio regolatorio N-terminale che contiene una regione pseudosubstrato e un dominio catalitico C-terminale altamente conservato che comprende le porzioni C3 (dominio legante l'ATP) e C4 (dominio chinamico).



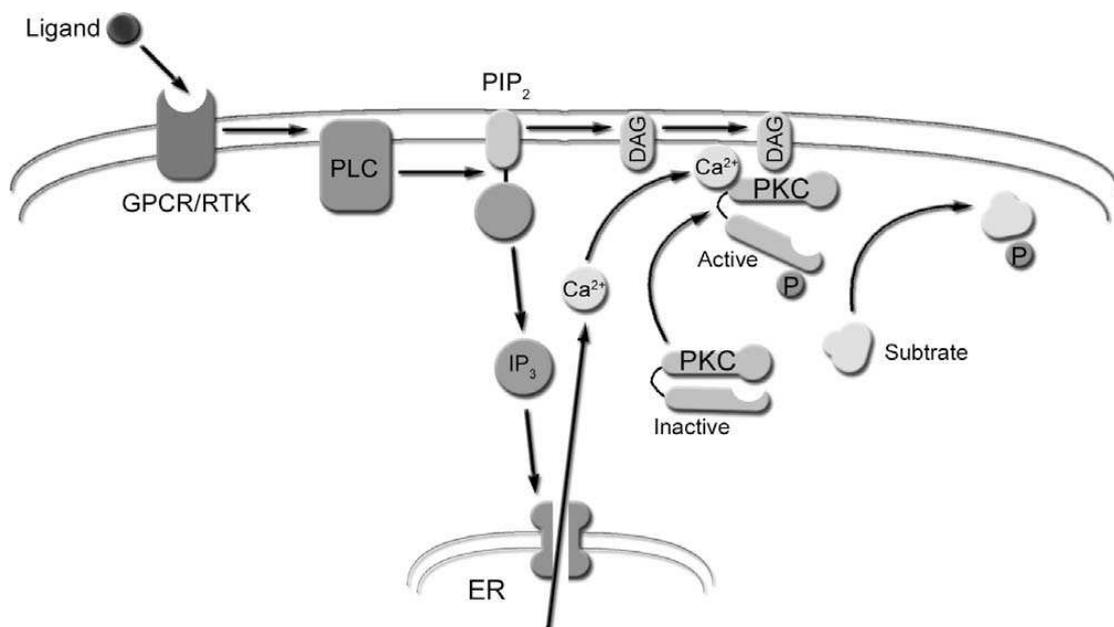
**FIGURA 2:** i tre gruppi differiscono per la loro esigenza di  $\text{Ca}^{2+}$  e la loro capacità di essere attivati da lipidi di varia specie, incluso il DAG. Tutti gli isoenzimi richiedono fosfatidilserina per una totale attività enzimatica (<sup>104</sup>).

La dipendenza dal  $\text{Ca}^{2+}$  per l'attivazione della funzione chinasi è conferita dal dominio C2; il sito di legame agli esteri del forbolo si trova nella regione C1 ed è costituito da due sottodomini simili a *zinc finger* ricchi in cisteine: in particolare, due residui cisteinici sono fondamentali, infatti le aPKC, che mancano di uno dei due residui, non possono essere attivate dagli esteri del forbolo. Non sono ancora stati identificati, invece, i siti di legame per gli attivatori lipidici (Figura 3).



**FIGURA 3:** Rappresentazione schematica dei domini delle PKC (<sup>105</sup>).

L'attivazione delle PKC sembra indurre la traslocazione dall'ambiente citosolico a quello di membrana; queste traslocazioni possono avvenire in differenti modi e scatenare diversi eventi di trasduzione del segnale. L'attività delle PKC viene quindi regolata a seconda della compartimentalizzazione cellulare, che sembra essere prevalentemente a livello della membrana plasmatica e nel citoplasma dato che molte PKC, nello stato inattivo, sono associate al citoscheletro mentre a seguito di fosforilazione vengono reclutate a livello della membrana plasmatica dove sono definitivamente attivate in presenza dei cofattori specifici (Figura 4). E' stato però dimostrato che quasi tutte le PKC possono essere presenti anche a livello nucleare sia come presenza fissa che in seguito a traslocazione indotta da particolari stimoli. Si è visto che nel nucleo, le PKC possono localizzare in distretti differenti a seconda delle isoforme: per esempio, la PKC $\alpha$  si trova sia a livello della membrana nucleare interna che dei domini intercromatinici, associata alla lamina e alla matrice nucleare; la PKC $\delta$  è stata trovata localizzata solo nei nucleoli mentre la PKC $\zeta$  solo a livello della matrice nucleare (<sup>106</sup>).



**FIGURA 4:** Rappresentazione schematica dell'attivazione di PKC. L'attivazione di un recettore accoppiato a proteine G (GPCR) o di un recettore tirosina chinasi (RTK), media la produzione di IP<sub>3</sub> e DAG. Il DAG attiva e media la traslocazione di PKC alla membrana cellulare, citoscheletro e nucleo. L'IP<sub>3</sub> promuove il rilascio delle riserve intracellulari di Ca<sup>2+</sup> potenziando così l'attivazione di cPKC. Le PKC così attivate possono fosforilare substrati specifici su residui di serina/treonina (<sup>107</sup>).

### **3.1 PROTEINE CHE LEGANO PKC**

Negli ultimi dieci anni sono state identificate molte proteine che interagiscono con PKC fra cui vinculina e talina, che costituiscono i contatti focali tra le cellule. In generale, le proteine che interagiscono con PKC sono classificate come STICKs, ovvero substrati che interagiscono con proteine chinasi C, RICKs, recettori per PKC inattive, o RACKs, recettori per PKC attivate. Tutte le STICKs sono proteine che legano fosfolipidi e sono generalmente localizzate tra la membrana e le strutture citoscheletriche, mentre le RACKs interagiscono direttamente con il dominio C2 delle PKC. Queste ultime sono fundamentalmente proteine di ancoraggio ed hanno il ruolo di indirizzare le PKC nei vari compartimenti cellulari, come i contatti focali, l'apparato di Golgi, le caveole e le strutture citoscheletriche. Sono state invece identificate come STICKs, quindi substrati di PKC, proteine quali la lamina A/C e la C23/nucleolina. In particolare, è stata caratterizzata l'interazione molecolare fra PKC $\alpha$  e lamina A e B, per la quale risulta essere fondamentale il dominio C2; la specificità di interazione sembra essere però conferita dalla regione V5 per la lamina A e dalla regione V1 per la lamina B. sono stati identificati anche altri STICKs nucleari per PKC $\alpha$ , fra cui PSF, fattore di splicing associato a PTB, la RNA elicasi p68 e le ribonucleoproteine A3 e L. Rosenberger e collaboratori hanno identificato numerose proteine di ancoraggio di PKC $\alpha$  e hanno osservato che tutte interagiscono con l'RNA e sono coinvolte nei meccanismi di splicing (<sup>106</sup>).

### **3.2 SUBSTRATI NUCLEARI DI PKC**

L'identificazione delle proteine che vengono riconosciute e sono substrato di PKC riveste un ruolo chiave per la comprensione del ruolo di questi enzimi e dei cambiamenti indotti a seguito della loro fosforilazione. Nel corso degli anni, sono state riconosciuti numerosi substrati nucleari, elencati in Tabella 5.

All'interno del nucleo la funzione delle PKC è collegata ai processi di regolazione della replicazione del DNA, alla sintesi e processazione dell'RNA, all'espressione genica, al trasporto nucleo-citoplasma e alla struttura della cromatina. Tuttavia non è ancora stato completamente chiarito il meccanismo con cui queste interazioni avvengono, per esempio se la fosforilazione di questi substrati avvenga realmente nel

nucleo o in altri compartimenti, oppure quali sono le conseguenze funzionali di queste fosforilazioni. Ci sono alcune eccezioni, per esempio si è visto che la fosforilazione della lamina B è un evento fondamentale per il disassemblamento nucleare durante la transizione G2/M e nella fase di esecuzione dell'apoptosi; inoltre, la fosforilazione della PI-PLC  $\beta 1$  su serina 887 da parte di PKC $\alpha$ , in risposta a stimolo mitogenico, ha la funzione di down-regolare l'attività della fosfolipasi<sup>(106)</sup>. La fosforilazione mediata da PKC è un meccanismo importante per il controllo dei processi intracellulari ed ha un ruolo chiave nelle cascate di trasduzione del segnale che regolano la crescita cellulare in risposta a stimoli extracellulari. Come già detto, sono state identificate numerose PKC e l'identificazione dei substrati su cui questi enzimi agiscono interessa numerosi gruppi di ricerca. Diversi studi hanno dimostrato che la sequenza primaria delle proteine substrato è di fondamentale importanza nella determinazione della specificità della chinasi che le riconosce, sebbene questa informazione sia disponibile solo per un numero limitato di enzimi.

Table 1  
Nuclear PKC substrates

Phosphorylated protein	In vitro/in vivo	PKC isoform	Effect of phosphorylation
Histone H1	In vitro	All classes	n.d.
Histone H2B	In vitro/in vivo	$\delta$	Apoptotic DNA fragmentation ( ?)
Histone H3	In vitro/in vivo	$\alpha$	Enhanced gene transcription
Lamin A	In vitro/in vivo	n.d.	Lamin disassembly/nuclear targeting
Lamin C	In vitro/in vivo	n.d.	n.d.
Lamin B	In vitro/in vivo	$\alpha, \beta, \delta$	Mitotic/apoptotic lamin disassembly
DNA topoisomerase I	In vitro	n.d.	Enzyme activation
DNA topoisomerase II $\alpha$	In vitro	n.d.	Enzyme activation
DNA polymerase $\beta$	In vitro	n.d.	Enzyme inactivation
DNA methyltransferase	In vitro	n.d.	n.d.
PARP	In vitro	$\beta$	Enzyme inactivation
B23/nucleophosmin	In vitro	n.d.	n.d.
Fos	In vitro	n.d.	n.d.
MRF4	In vitro/in vivo	n.d.	Inhibition of DNA binding activity
Vitamin D3 receptor	In vitro/in vivo	$\beta$	Transcriptional activation
BZLF1	In vitro/in vivo	$\alpha$	Enhanced DNA binding
RNA polymerase II	In vitro	n.d.	Increased RNA synthesis rate
hnRNP A1	In vitro	n.d.	Inhibition of strand annealing activity
hnRNP K	In vitro	$\delta$	n.d.
PSF	In vitro	$\alpha$	Inhibition of RNA binding
C23/nucleolin	In vitro/in vivo	$\zeta$	n.d.
Centaurin- $\alpha_1$	In vitro	All classes	n.d.
CREB	In vitro	n.d.	n.d.
PI-PLC $\beta 1$	In vitro/in vivo	$\alpha$	Enzyme inactivation
HMG proteins	In vitro	$\alpha, \beta, \gamma, \delta$	DNA binding affinity reduction
p53	In vitro	n.d.	Increased DNA binding affinity
TR2	In vivo	n.d.	Enhancement of activating ability
NSPc1	In vivo	n.d.	Transcriptional repression
DNA-PK	In vitro	$\delta$	Enzyme inhibition
Rad9	In vitro/in vivo	$\delta$	Rad9 complex formation
c-Abl	In vitro	$\delta$	Enzyme activation
p73 $\beta$	In vitro	$\delta$	Induction of transactivating activity

n.d. not determined.

**TABELLA 5:** Substrati nucleari di PKC <sup>(106)</sup>.

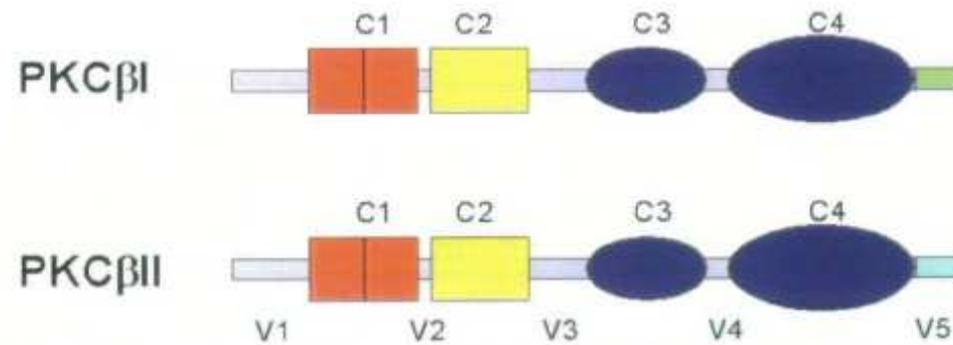
Cantley, Songyang e collaboratori hanno sviluppato un metodo per determinare la sequenza ottimale riconosciuta dalle proteine chinasi, fra cui PKC. La chinasi d'interesse viene aggiunta ad una soluzione che contiene una libreria degenerata di circa 2.5 bilioni di peptidi, della medesima lunghezza e con un solo aminoacido fosforilabile in una posizione nota. Al termine dell'incubazione, la piccola frazione di peptidi fosforilati viene separata dalla miscela abbondante di quelli non fosforilati e sequenziata. Gli aminoacidi che vengono preferenzialmente fosforilati e le relative posizioni, vengono determinate confrontando gli aminoacidi presenti nelle posizioni N-terminali e C-terminali adiacenti al residuo fosforilato, con la miscela di partenza non fosforilata. Questa tecnica può così predire l'ottimale sequenza consenso senza avere informazioni sul reale sito fosforilato in vivo e consente di ottenere informazioni sull'importanza relativa della posizione e sulla tolleranza dei residui adiacenti all'aminoacido fosforilato.

Utilizzando questa libreria, gli autori hanno identificato i peptidi substrato ottimali per nove isoforme umane di PKC. Sebbene ciascuna PKC abbia un proprio unico motivo specifico, ci sono elementi comuni a tutte le PKC ed altri comuni per ciascuna famiglia. Il motivo generale comune a tutte che è stato determinato è RXXS/TXRX dove X indica un aminoacido qualsiasi: tutte le PKC quindi, preferiscono un substrato con un residuo basico in posizione -3 e un residuo idrofobico, solitamente una fenilalanina, in posizione +1. Tuttavia, il gruppo delle cPKC si distingue dagli altri perché riconoscono preferenzialmente substrati con residui basici in posizione -6, -4, -2, +2 e +3. Anche il gruppo delle nPKC e l'aPKC $\zeta$  selezionano i substrati che presentano residui basici in posizione -6, -4 e -2, ma non in posizione +2 e +3, nelle quali preferiscono residui idrofobici (<sup>108</sup>, <sup>109</sup>).

### 3.3 PKC $\beta$

Sono state identificate due isoforme di PKC  $\beta$ , PKC  $\beta$ I e PKC  $\beta$ II, generate da splicing alternativo a livello degli esoni C-terminali (Figura 5). La differenza tra questi due enzimi risiede a livello del dominio C-terminale V5. Si è visto che entrambe hanno un ruolo in differenti percorsi di trasduzione del segnale che regolano proliferazione, differenziamento e metabolismo cellulare. Il ruolo della PKC  $\beta$  è ben

caratterizzato, in particolare, in due percorsi di trasduzione, quello indotto dall'insulina e quello che regola la risposta immunitaria.



**FIGURA 5:** Domini strutturali di PKC  $\beta$ I e PKC  $\beta$ II. Le due isoforme differiscono solamente a livello della regione V5, ma i siti di autofosforilazione (Thr641 e Ser660 in PKC  $\beta$ II) sono conservati (<sup>110</sup>).

Come già detto, a seguito di stimolazione del recettore dell'insulina, si ha attivazione di PIPLC, produzione di DAG che può attivare, a turno, parecchie isoforme di PKC. A loro volta le PKC possono attivare Ras e il percorso Raf-MEK-ERK. Sulla base di evidenze sperimentali condotte con oligonucleotidi antisenso e utilizzando inibitori farmacologici di PKC  $\beta$ , è stato proposto un meccanismo di regolazione da parte di PKC  $\beta$  in seguito a stimolo mitogenico. In diversi modelli cellulari però, l'attivazione di PKC è associata ad una inibizione del recettore insulinico ad attività tirosino-chinasica (PTK), il che contribuisce all'insorgenza del diabete mellito. È stato inoltre dimostrato il coinvolgimento di PKC  $\beta$ II nello sviluppo di retinopatie e neuropatie associate alla patologia diabetica: in questi processi il meccanismo di neovascolarizzazione gioca un ruolo molto importante e una delle molecole chiave è il fattore di crescita angiogenetico VEGF. È stato suggerito che, data l'interazione fisica che si instaura tra PKC  $\beta$ II e la proteina Rb, la fosforilazione di quest'ultima da parte di PKC  $\beta$ II potrebbe portare ad un aumento dell'attività trascrizionale di EF2 e della proliferazione delle cellule endoteliali indotta da VEGF; l'attivazione di PKC  $\beta$  è inoltre coinvolta nella deposizione della fibrina in processi di vascolarizzazione conseguenti a danno ipossico. PKC  $\beta$  esercita un ruolo molto importante anche nello sviluppo e nell'attivazione delle cellule B. Di particolare

interesse è che il segnale che deriva dall'interazione Btk/ PKC  $\beta$ I è coinvolto nella produzione di IL-2 e TNF- $\alpha$ , inoltre si è visto che PKC  $\beta$ I è necessaria per la secrezione di IL-2 in cellule T stimulate con PMA<sup>111</sup>. In un lavoro recente è stato dimostrato che la cascata di trasduzione evocata da PKC  $\beta$ I e che coinvolge NF- $\kappa$ B ha un ruolo importante anche in cellule enterocitiche prevenendo il fenomeno di iperpermeabilità della barriera enterocitica indotto da fattori ossidativi: l'attivazione di PKC  $\beta$ I comporterebbe la soppressione di NF- $\kappa$ B, la conseguente diminuzione di fosforilazione di I $\kappa$ B $\alpha$ , stabilizzazione dei livelli di I $\kappa$ B $\alpha$ , inibizione della traslocazione nucleare e dell'attivazione delle subunità di NF- $\kappa$ B. Sempre a questo livello, l'attivazione di PKC  $\beta$ I aumenterebbe la stabilità della polimerizzazione dei filamenti di actina, riducendo l'actina G instabile proteggendo così l'integrità del monostrato cellulare (<sup>112</sup>).

### **3.4 ISOFORME DI PKC E PROLIFERAZIONE CELLULARE**

Numerosi studi hanno osservato che l'espressione dei diversi isoenzimi di PKC in vari tessuti è estremamente variabile. PKC $\alpha$  e PKC $\zeta$  sono espressi ubiquitariamente. Il cervello contiene tutti gli isoenzimi, mentre altri tessuti, come la cute ed il tessuto muscolare, ne contengono solo alcuni (<sup>113</sup>). Questi differenti pattern di espressione suggeriscono che gli isoenzimi di PKC giocano differenti ruoli nei vari tessuti, ma sono a sfavore dell'ipotesi che tutti gli isoenzimi di PKC giochino un ruolo generale nella proliferazione cellulare.

È stato dimostrato che cellule NIH3T3 (fibroblasti di topo) che over-esprimono una forma alterata di PKC $\alpha$  hanno un incremento della crescita e sono capaci di crescere in soft-agar dopo trattamento con TPA. Questi effetti sono stati bloccati da un inibitore specifico di PKC, la staurosporina<sup>114</sup>. In parallelo, è stato osservato che i primi eventi nella trasformazione dei cheratinociti riguardano mutazioni ed attivazione di Ras, attivazione del recettore per il fattore di crescita epidermico, nonché up-regolazione di PKC $\alpha$  (<sup>115</sup>), e down regolazione dell'espressione di PKC $\delta$  (<sup>116</sup>). Inoltre, alcuni studi dimostrano che in mioblasti in coltura PKC $\alpha$  ricopre un ruolo importante nel mantenimento della proliferazione cellulare<sup>117</sup>. È stato anche dimostrato che PKC $\alpha$  è coinvolto nell'attivazione della telomerasi in cellule di carcinoma mammario, requisito essenziale per il

mantenimento della proliferazione<sup>(118)</sup>. D'altro canto, però, l'incremento dell'espressione di PKC $\alpha$  in cellule B16 di melanoma porta alla cessazione della crescita, induzione della differenziazione ed inoltre inibisce la proliferazione di cellule K562 di leucemia mieloide cronica <sup>(119)</sup>. È stato inoltre dimostrato che proteine chimeriche ricombinanti con il dominio regolatore di PKC $\alpha$  ed il dominio catalitico di un altro isoenzima di PKC, inibiscono la crescita cellulare <sup>(120)</sup>. L'overespressione di PKC $\alpha$  in cellule endoteliali di aorta bovina, porta ad una riduzione della proliferazione ed incremento dell'accumulo di cellule in fase G2/M del ciclo cellulare <sup>(121)</sup>.

Cellule che overesprimono PKC $\beta$  risultano più suscettibili a trasformazione con l'oncogene H-ras <sup>(122)</sup>. L'overespressione di PKC $\beta$ I in fibroblasti di ratto porta ad un disordine nella crescita <sup>(123)</sup>. La linea cellulare umana K562, che esprime PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ II, e PKC $\zeta$ , subisce differenziazione megacariocitaria e cessazione della proliferazione se trattata con TPA. Qualora venga indotta l'overespressione di PKC $\alpha$ , tali cellule crescono più lentamente e sono più sensibili all'effetto citostatico del TPA rispetto alle cellule di controllo. Se invece viene overespressa PKC $\beta$ II, le cellule risultano meno sensibili al TPA. Esperimenti con oligonucleotidi antisenso dimostrano che PKC $\beta$ II è richiesta per la proliferazione delle cellule K562, mentre PKC $\alpha$  è coinvolta nella differenziazione megacariocitaria <sup>(124)</sup>. In cellule di carcinoma embrionale murino F9, PKC $\alpha$  sembra giocare un ruolo attivo nella differenziazione indotta dall'acido retinoico, invece l'attività di PKC $\beta$  risulta incompatibile con la differenziazione <sup>(125)</sup>. L'overespressione di PKC $\beta$ I in cellule endoteliali di aorta bovina promuove la crescita diminuendo il tempo di duplicazione cellulare, invece PKC $\alpha$  riduce la proliferazione <sup>(126)</sup>. Tuttavia, in promielociti umani HL-60 l'attivazione di PKC $\beta$  rappresenta un requisito necessario e sufficiente per la differenziazione indotta da TPA <sup>(127)</sup>. L'overespressione di PKC $\beta$ I in cheratinociti murini inibisce la crescita e la differenziazione Ca<sup>+2</sup>-indotta<sup>128</sup>. Alcuni studi osservarono che l'espressione di PKC $\beta$ I è più alta in linee cellulari ben differenziate SKUT-1-B (mixed mesodermal uterine) comparata ad una linea cellulare HEC-1-B (adenocarcinoma endometriale) con moderata differenziazione <sup>(129)</sup>.

È stato dimostrato che quando PKC $\gamma$  è overespressa in cellule NIH3T3, c'è riduzione della richiesta dei fattori di crescita, crescita ad alta densità e formazione di tumori in topi nudi <sup>(130)</sup>. Cellule umane U251 di glioma in coltura, che overesprimono PKC $\gamma$ ,

acquisiscono un aumento della velocità di crescita in monostrato, con incremento dell'efficienza della formazione di colonie su soft-agar e della sintesi di DNA in risposta al fattore di crescita epidermico e al fattore di crescita per i fibroblasti (<sup>131</sup>).

PKC $\delta$  sembra essere coinvolta nell'inibizione della crescita, differenziazione, apoptosi e nella soppressione dei tumori<sup>132</sup>. La stimolazione con TPA in cellule CHO (cellule ovariche di criceto cinese) che overesprimono PKC $\delta$  porta ad un arresto della divisione cellulare (<sup>133</sup>). L'overespressione di PKC $\delta$  in cellule di glioma determina un decremento della crescita e dell'efficienza di formazione di colonie (<sup>134</sup>). È stato osservato che l'overespressione di PKC $\delta$  in linee cellulari HT (adenocarcinoma mammario di ratto) incrementa significativamente la crescita ancoraggio-indipendente, nonostante non abbia alcun effetto sulla crescita delle cellule in adesione. PKC $\delta$  sembra infatti coinvolta nella regolazione della crescita ancoraggio-indipendente, considerato un meccanismo che incrementa il potenziale metastatico in questi sistemi (<sup>135</sup>). Proteine chimeriche ricombinanti con il dominio regolatore di PKC $\delta$  ed il dominio catalitico di altri isoenzimi di PKC inibiscono la crescita cellulare<sup>136</sup>. È stato inoltre osservato che agenti antitumorali quali taxolo, vinblastina e vincristina attivano specificatamente PKC $\delta$  (<sup>137</sup>). Uno studio ha poi osservato che topi transgenici che overesprimono PKC $\delta$  nell'epidermide acquisiscono resistenza al TPA, che promuove tumore alla pelle (<sup>138</sup>). In cellule NIH3T3, che normalmente esprimono solo l'isoforma PKC $\alpha$ , l'overespressione di PKC $\delta$  dopo transfezione, induce un significativo cambio morfologico, causando crescita lenta e decremento della densità cellulare in colture confluenti. Questi cambiamenti vengono accentuati dopo trattamento con TPA.

L'overespressione di PKC $\epsilon$  non comporta cambiamenti morfologici, ma causa un incremento della crescita, e maggiore densità cellulare in colture monostrato. È stato dimostrato che nessuna linea cellulare che overesprime PKC $\delta$  è capace di crescere in soft-agar con o senza TPA, ma tutte le linee cellulari che overesprimono PKC $\epsilon$  crescono in soft-agar in assenza di TPA, ma non in sua presenza. L'overespressione di PKC $\epsilon$  in cellule NIH3T3 induce la formazione di tumori in topi nudi con un'incidenza del 100%, indicando che un'elevata espressione di PKC $\epsilon$  contribuisce alla trasformazione neoplastica (<sup>139</sup>). In colonie di cellule epiteliali di ratto non tumorali, l'overespressione di PKC $\epsilon$  causa un marcato cambiamento morfologico, accompagnato da formazione di colonie ancoraggio-indipendente in

agar semisolido. Questi effetti sulla crescita sono attenuati o bloccati mediante incubazione cronica con TPA. Un altro studio ha osservato che linee cellulari a rapida crescita di carcinoma polmonare non a piccole cellule overesprimono il frammento catalitico di PKC $\epsilon$  costitutivamente attivo (<sup>140</sup>). Al contrario, la trasfezione con geni dominanti negativi di PKC $\epsilon$  inibiscono la proliferazione in cellule NIH3T3 (<sup>141</sup>). Proteine chimeriche ricombinanti con domini regolatori di PKC $\alpha$ , PKC $\delta$  e PKC $\epsilon$  ed il dominio catalitico di un'altro isoenzima sono state transfettate in cellule NIH3T3. Tutte le chimere contenenti il dominio regolatore o catalitico di PKC $\epsilon$  esibivano una promozione della crescita (<sup>142</sup>). È anche noto che l'inibizione della proliferazione cellulare attraverso tamoxifene è associata all'attivazione di PKC $\epsilon$  (<sup>143</sup>). Questi dati indicano che PKC $\epsilon$  sembra avere proprietà oncogenetiche. D'altra parte, in cellule neuronali PKC $\epsilon$  sembra essere importante per la differenziazione (<sup>144</sup>).

L'overespressione di PKC $\zeta$  in cellule U937 di leucemia monocitaria, porta ad un decremento della proliferazione e della densità cellulare, con induzione alla differenziazione (<sup>145</sup>). Alcuni studi hanno inoltre osservato che l'overespressione di PKC $\zeta$  in fibroblasti normali NIH3T3 (<sup>146</sup>) e in cellule K562 (<sup>147</sup>) non ha nessun effetto sulla proliferazione cellulare o sulla trasformazione oncogenetica. L'overespressione di PKC $\zeta$  in cellule NIH3T3, trasformate con v-raf ritarda drasticamente la proliferazione, abolisce la crescita ancoraggio-indipendente e blocca la trasformazione morfologica (<sup>148</sup>). L'attivazione di PKC $\zeta$  attraverso ceramide in cellule MOLT-4 di leucemia linfoblastica acuta induce apoptosi. Tuttavia, è stato anche dimostrato che il trattamento con ceramide oltre ad attivare PKC $\zeta$  inattiva PKC $\alpha$  (<sup>149</sup>). L'esposizione di cellule a stimoli genotossici che inducono l'apoptosi conduce all'inibizione di PKC $\zeta$  (<sup>150</sup>). È stato dimostrato che l'espressione di Par-4 è correlata con un'inibizione della crescita e l'apoptosi (<sup>151</sup>). Il prodotto del gene Par-4 interagisce con PKC $\zeta$ , inibendone l'attività enzimatica. In cellule COS-7 (linea cellulare renale di scimmia) le cPKCs e le nPKCs attivano la cascata ERK/MAPK via Raf-1, mentre PKC $\zeta$  stimola queste vie di trasduzione del segnale senza l'attivazione di Raf-1 (<sup>152</sup>). L'overespressione di N-myc, che incrementa la malignità in cellule di neuroblastoma, causa la soppressione di PKC $\delta$  ed induce PKC $\zeta$  (<sup>153</sup>). Infine PKC $\mu$  sembra essere coinvolta nella proliferazione di cheratinociti murini. Una correlazione tra l'espressione di PKC $\mu$  e l'aumento della proliferazione cellulare è stata osservata in cellule NIH3T3 murine (<sup>154</sup>).

### 3.5 ESPRESSIONE DI PKC IN LINEE CELLULARI E NEI TUMORI

L'overespressione di PKC sembra essere coinvolta nel cancro mammario. Uno studio ha dimostrato che è presente un'elevata attività di PKC nel tumore al seno rispetto al tessuto normale <sup>(155)</sup>. TPA inibisce la crescita cellulare in linee di carcinoma mammario MCF-7, BT-20, MDA-MB-231, ZR-75-1 e HBL-100, ma non in cellule T-47-D. T-47-D sono cellule non responsive al TPA, con bassa attività di PKC. Una rapida traslocazione di PKC, dal citoplasma (dove si trova normalmente a riposo) alla membrana, è stata evidenziata in 5 linee cellulari TPA-sensibili senza apportare modifiche della crescita. È stato inoltre osservato che il trattamento con TPA per più di 10 ore inibisce reversibilmente la crescita in cellule TPA-responsive. Questi effetti coincidono con la perdita completa dell'attività cellulare di PKC in seguito a proteolisi. La ripresa della crescita cellulare dopo rimozione di TPA, dovuta alla riattivazione dell'attività di PKC in linee cellulari di tumore umano mammario TPA-responsive, suggerisce il coinvolgimento di PKC nella regolazione della crescita <sup>(156)</sup>. È stato dimostrato che, durante un periodo di coltura di 4 giorni, vari derivati degli esteri del forbolo inibiscono la proliferazione di cellule MCF-7 in modo dose-dipendente. È stato anche riportato che l'attivazione di PKC attraverso TPA e DAG inibisce la proliferazione cellulare di cellule MCF-7 <sup>(157)</sup>. L'attivazione di PKC è maggiore in linee cellulari di carcinoma mammario negative per il recettore per gli estrogeni (ER) rispetto a quelle ER-positive <sup>(158)</sup>. È stato osservato che cellule MCF-7 transfettate con PKC $\alpha$  esibiscono un aumento della proliferazione, crescita ancoraggio-indipendente, alterata morfologia e incremento di tumorigenicità in topi nudi. Inoltre, cellule MCF-7 che overesprimono PKC $\alpha$  mostrano una significativa riduzione dell'espressione di ER ed un decremento dell'espressione dei geni estrogeno-dipendenti. È stato dimostrato anche che gli esteri del forbolo down-regolano l'espressione di ER in linee cellulari di cancro mammario. Inoltre, PKC $\alpha$  risulta essere attivata in situ in un numero significativo di carcinomi mammari umani. In accordo con questi dati, cellule MCF-7 transfettate con PKC $\alpha$  hanno un fenotipo molto più aggressivo in confronto a cellule non transfettate <sup>(159)</sup>. Altri studi hanno dimostrato che l'overespressione di PKC $\alpha$  in cellule MCF-7 causa up-regolazione di PKC $\beta$  e ciò porta ad un fenotipo meno aggressivo, caratterizzato da riduzione dell'invasività in vitro e da una marcata diminuzione della formazione di tumore e

della crescita cellulare in topi nudi. In linea con l'attività oncogenica di PKC, alcuni studi osservarono che TPA e briostatina 1 inibiscono la crescita di cellule MCF-7. TPA induce rapida traslocazione di PKC $\alpha$  dal citoplasma alla membrana plasmatica. In contrasto al TPA, il trattamento con briostatina 1 porta ad una bassa attività di PKC $\alpha$  in entrambi i compartimenti, citoplasma e membrana, durante 10 minuti di trattamento. Questi risultati suggeriscono che PKC $\alpha$  gioca un ruolo importante nell'inibizione della crescita in cellule di tumore mammario umano dopo trattamento con briostatina 1 (<sup>160</sup>).

Alcuni studi hanno indicato che l'espressione di PKC $\alpha$  in astrocitoma umano è maggiore in tumori ben differenziati (grado 1), intermedio in astrocitoma anaplastico (grado 2), basso o non determinabile in glioblastomi indifferenziati (astrocitomi di grado 3) e normale nei controlli<sup>161</sup>. In uno studio di confronto tra cellule di glioma di ratto C6 ed astrociti di ratto non maligni, fu osservato che entrambe le linee esprimevano PKC $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  e  $\zeta$  ma non  $\gamma$ . Dalla misura dell'attività enzimatica è emerso che l'attività di PKC in cellule di glioma era dovuta all'overespressione di PKC $\alpha$ <sup>162</sup>. In altri studi tutte le linee di glioma esaminate, ed in glioma di ratto si osserva un'elevata attività di PKC $\alpha$  relativa a cellule gliali non maligne, correlata con la percentuale di proliferazione nelle rispettive fasi di crescita. Campioni chirurgici congelati di glioma umano maligno espongono anche un'elevata attività di PKC (<sup>163</sup>). Linee cellulari derivanti da glioma di alto grado esprimono alti livelli di PKC $\alpha$  rispetto a linee cellulari derivanti da glioma a basso grado. In linee cellulari derivanti da glioblastoma, PKC $\alpha$  è risultata principalmente espressa nella frazione citosolica, indicando uno stato enzimatico inattivo. A sostegno del ruolo di PKC nel glioblastoma, è stato dimostrato che briostatina 1 down-regola specificatamente PKC $\alpha$  in linee cellulari derivanti da glioblastoma. Tuttavia, questo fenomeno non era associato con un'inibizione significativa della crescita, indicando che PKC $\alpha$  non è essenziale per la proliferazione cellulare (<sup>164</sup>).

Elevati livelli di PKC furono anche osservati nel tumore della tiroide rispetto al tessuto normale (<sup>165</sup>). È stato dimostrato che TPA, tamoxifene e staurosporina inibiscono l'invasione e la crescita cellulare in cancro follicolare tiroideo (<sup>166</sup>). Mutazioni di PKC $\alpha$  sono state poi indagate in cancro tiroideo umani (<sup>167</sup>) ed in adenomi ipofisari (<sup>168</sup>). Tutti gli adenomi ipofisari analizzati avevano la sequenza di DNA wild-type di PKC $\alpha$  normale. Anche se il tumore era invasivo con infiltrazione

della dura madre, non c'erano mutazioni. Inoltre, ulteriori analisi con Western blot hanno confermato che non c'è nessuna differenza nell'espressione proteica di PKC $\alpha$  tra gli adenomi ipofisari invasivi e quelli non invasivi. Questi dati non confermano l'ipotesi secondo la quale mutazioni di PKC $\alpha$  sono una caratteristica dei tumori ipofisari invasivi (<sup>169</sup>). L'attività e l'espressione di PKC era maggiore in adenomi ipofisari rispetto all'ipofisi normale o a quella del ratto. È stato poi osservato che l'espressione di PKC è significativamente maggiore in tumori secernenti ormoni della crescita e in adenomi non secernenti rispetto ai tumori prolattino-secernenti. L'attività di PKC era inoltre significativamente elevata nei tumori invasivi che in quelli non invasivi. In adenomi ottenuti da pazienti trattati con bromocriptina (agonista dopaminergico) o octreotide (farmaco analogo alla somatostatina), l'attività di PKC risulta significativamente più bassa rispetto agli adenomi non trattati (<sup>170</sup>). In tutti gli adenomi ipofisari umani prevale la PKC $\alpha$ , e solo in alcuni fu osservata un'espressione variabile di PKC $\beta$  e PKC $\gamma$ . Inoltre, sia l'ipofisi normale che quella neoplastica esprimono abbondante mRNA per PKC $\epsilon$ , mentre solo alcuni tumori e un'ipofisi normale avevano alcune cellule positive per PKC $\zeta$  (<sup>171</sup>).

La famiglia delle PKC è importante in cheratinociti normali e nelle malattie della pelle, soprattutto nelle forme neoplastiche<sup>172</sup>. L'apoptosi dei cheratinociti indotta da radiazioni UV è uno dei meccanismi maggiormente protettivo dalla fotocarcinogenesi. Il dominio catalitico costitutivamente attivo di PKC $\delta$  è un effettore apoptotico generato dal clivaggio della caspasi 3, in risposta ad una varietà di stimoli apoptotici incluse le radiazioni UV (<sup>173</sup>). L'attivazione del dominio catalitico di PKC $\delta$  induce infatti la redistribuzione e attivazione di Bax (gene pro-apoptotico) che può direttamente indurre il rilascio del citocromo c. Il clivaggio e l'attivazione di PKC $\delta$  sono fasi critiche nell'apoptosi indotta da UV nei cheratinociti umani. È infatti noto che l'inattivazione di PKC $\delta$  può promuovere la sopravvivenza dei cheratinociti esposti a radiazioni UV (<sup>174</sup>). Recenti studi (<sup>175</sup>) hanno dimostrato che topi transgenici che overesprimono PKC $\delta$  non riescono a sopprimere lo sviluppo di un carcinoma a cellule squamose indotto da ripetute esposizioni a radiazioni UV. Topi transgenici che overesprimono invece PKC $\epsilon$  in cellule epidermiche basali e in cellule dei follicoli piliferi sviluppano carcinoma squamocellulare. Esposizione cronica a radiazioni UV in topi transgenici per PKC $\epsilon$  indica che PKC $\epsilon$  induce il rilascio di TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor-  $\alpha$ ), legato alla fotosensibilità in questi topi (<sup>176</sup>). L'overespressione di

PKC $\epsilon$  nell'epidermide di topi può anche portare alla produzione di specifiche citochine che perturbano la normale ematopoiesi nel midollo osseo, e provocano un disequilibrio tra granulociti, neutrofili ed eosinofili (<sup>177, 178</sup>). Un'elevata espressione di PKC $\epsilon$  nell'epidermide di topi può condurre ad un microambiente appropriato per lo sviluppo del carcinoma a cellule squamose mediante meccanismo paracrino.

È stato osservato che l'attività di PKC è più alta in cellule epiteliali del colon in attiva proliferazione rispetto a quelle che si trovano in uno stato di quiescenza, suggerendo un ruolo di PKC nella proliferazione. Le cellule epiteliali del colon esprimono multipli isoenzimi di PKC che sono diversamente modulati durante la carcinogenesi del colon, e ciò suggerisce un legame diretto tra PKC e la carcinogenesi in questo tessuto (<sup>179,180</sup>). Cellule umane di tumore al tratto gastroenterico CaCo-2 transfettate con PKC $\delta$  mostrano come l'incremento dell'espressione della PKC $\delta$  induce alla differenziazione cellulare e limita la sopravvivenza. Elevati livelli di espressione di PKC $\beta$ II rappresentano uno dei primi eventi alla base della carcinogenesi al colon. L'espressione transgenica di PKC $\beta$ II nel colon di topi induce un'iperproliferazione ed aumenta la suscettibilità alla carcinogenesi nel colon, correlata ad un decremento dell'espressione del recettore per TGF $\beta$ II (transforming growth factor- $\beta$  type II receptor). È stato dimostrato che in topi transgenici per PKC $\beta$ II ed in cellule epiteliali intestinali di ratto in coltura transfettate con PKC $\beta$ II, aumenta l'espressione della ciclossigenasi 2 (COX-2) (<sup>181</sup>). L'espressione di PKC $\beta$ II in cellule epiteliali intestinali di ratto in coltura ed in vivo, è regolata attraverso la via MAPK/ERK. Nell'epitelio del colon, l'elevata espressione di PKC $\beta$ II sembra essere procarcinogena, agendo attraverso la COX-2 e la via di trasduzione del segnale di TGF $\beta$ II. Per quanto riguarda PKC $\lambda$ , sembra che essa sia un effettore critico a valle dell'oncogene Ras nell'epitelio del colon (<sup>182</sup>). È stato osservato che linee cellulari tumorali umane con mutazioni di p21 Ras sono più sensibili all'inibitore di PKC, etere lipidico sintetico (competitore del sito di legame per il DAG) (<sup>183</sup>), rispetto alle linee cellulari tumorali con gli alleli K-ras normali. Entrambe le isoforme di PKC possono cooperare nel promuovere lo sviluppo di neoplasie del colon, perché l'espressione transgenica di PKC $\beta$ II nel topo induce iperproliferazione ed incrementa la suscettibilità a sviluppare tumore al colon attraverso vie che includono l'attivazione di Ras, PKC $\lambda$ /Rac1 e Mek, portando a invasione nelle cellule epiteliali intestinali (<sup>184</sup>). La fosforilazione di PKC promuove una rapida dissociazione di K-ras dalla

membrana plasmatica e la sua associazione alla membrana intracellulare, incluse le membrane esterne mitocondriali dove K-ras fosforilato interagisce con Bcl-XL<sup>(185)</sup>.

È stato dimostrato che PKC $\alpha$  e PKC $\delta$  promuovono l'apoptosi in cellule del tumore alla prostata androgeno-dipendente<sup>(186)</sup>. Inibitori selettivi della PKC quali GF109203X e Go6983, bloccano la transattivazione del recettore di EGF (epidermal growth factor) indotto dagli esteri del forbolo, indicando un requisito per PKC, e supportando l'inibizione di PKC $\alpha$  come approccio terapeutico per il tumore alla prostata. Infatti, il frequente fallimento della terapia ormonale si associa ad un aumento di cellule PKC $\epsilon$ -positive in tumori prostatici ricorrenti. Inoltre, è stato osservata un'interazione funzionale fra il recettore per le integrine, PKC $\epsilon$  e protein chinasi B/Akt in tumori alla prostata ricorrenti CWR-R1, sostenendo l'ipotesi che l'attivazione di queste integrine  $\beta$ 1 inducesse in queste cellule un comportamento androgeno-indipendente<sup>(187)</sup>.

È stato osservato che nel carcinoma al polmone non a piccole cellule (NSCLC), fra le aPKCs è particolarmente espressa l'isoforma PKC $\lambda$ , mentre PKC $\zeta$  non è determinabile<sup>(188)</sup>. PKC $\lambda$  sembra essere un gene critico nel tumore al polmone, attivando la via del segnale richiesta per la progressione della trasformazione. PKC $\lambda$  è considerato un oncogene in NSCLC perché:

1. risulta overespresso in molti NSCLCs,
2. è poco espresso in pazienti con NSCLC che sopravvivono,
3. il gene che codifica per la PKC $\lambda$  è frequentemente amplificato in linee cellulari NSCLC e in colture primarie di NSCLC,
4. l'amplificazione del gene induce l'espressione di PKC $\lambda$  in linee NSCLC e nei tumori,
5. la disgregazione del segnale con un allele dominante negativo di PKC $\lambda$  blocca la progressione della trasformazione in cellule NSCLC umane<sup>(189)</sup>.

PKC $\lambda$  è inoltre implicata nella sopravvivenza delle cellule maligne<sup>(190)</sup>. Da ulteriori studi è emerso che PKC $\delta$  svolge un'attività antiapoptotica in cellule NSCLC<sup>(191)</sup> e che PKC $\epsilon$  svolge un ruolo critico nei meccanismi di resistenza ai farmaci nel tumore al polmone perché previene l'apoptosi delle cellule<sup>(192)</sup>.

In cellule H19-7 di ippocampo di ratto e in cellule PC12 di feocromocitoma di ratto, l'attivazione chinasica, in risposta ad agenti neurogeni, fattore di crescita dei fibroblasti e fattore di crescita per i nervi è PKC $\delta$ -dipendente. Invece, l'attivazione

chinasica in risposta al fattore di crescita epidermico è PKC $\delta$ -indipendente. L'inibizione di PKC $\delta$  attraverso oligonucleotidi antisenso blocca la crescita di neuriti in cellule H19-7 indotte da Raf, e in cellule PC12 indotte da fattori di crescita per i fibroblasti e fattori di crescita dei nervi. Questi dati indicano un coinvolgimento di PKC $\delta$  negli effetti neurogenetici mediati dai fattori di crescita per i fibroblasti, per i nervi e da Raf. Il fattore di crescita epidermico attiva invece le protein chinasi attraverso vie PKC $\zeta$ -dipendenti, coinvolgendo la fosfatidilinositolo-3-chinasi e PDK1 in cellule H19-7 (<sup>193</sup>).

PKC sembra essere inoltre direttamente coinvolta nella modulazione dell'apoptosi in neoplasie ematopoietiche. L'espressione di PKC $\delta$ , PKC $\lambda$ , PKC $\mu$  e PKC $\zeta$  è stata infatti rilevata in linee cellulari di mieloma multiplo (U266, RPMI-8226 e K620) (<sup>194</sup>). Attraverso tecniche di immunostochimica, l'espressione di PKC $\delta$  è stata confermata in cellule provenienti dal plasma di 11 pazienti. Uno studio ha poi indagato l'espressione delle diverse isoforme di PKC in cellule di leucemia linfatica cronica su 7 pazienti mediante Western blot, osservando che le isoforme PKC $\beta$ , PKC $\gamma$ , PKC $\delta$  e PKC $\zeta$  erano espresse in tutti i campioni (<sup>195</sup>).

### **3.6 INIBITORI DI PKC**

#### **3.6.1 *Enzastaurin hydrochloride (LY317615)***

Enzastaurin è un potente e selettivo inibitore di PKC $\beta$ II, sviluppato per il trattamento antitumorale (<sup>196</sup>). Enzastaurin inibisce PKC $\beta$  (IC<sub>50</sub>~16 nM), ma anche altre isoforme di PKC (per esempio,  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ , IC<sub>50</sub>s 40-100 nM). Diversi studi hanno dimostrato che l'angiogenesi tumore-indotta richiede l'attivazione delle PKCs, in particolare di PKC $\beta$  (<sup>197</sup>). Inoltre la PKC $\beta$ , così come le altre PKCs, possono attivare AKT (<sup>198</sup>). È noto che l'attivazione della via di AKT promuove la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule tumorali. Inoltre è stato osservato che la via di AKT è frequentemente attivata in un ampio numero di tumori umani, specialmente in glioblastomi, tumore alla prostata, e carcinoma all'endometrio (<sup>199</sup>). Concentrazioni di Enzastaurin simili a quelle utilizzate in studi clinici sopprimono la via del segnale di AKT. Attraverso il blocco di queste "chiavi" nelle vie di segnale, Enzastaurin

sopprime la proliferazione cellulare, induce morte cellulare (apoptosi), e inibisce l'angiogenesi tumore-indotta.

L'attività di PKC, in particolare dell'isoforma PKC $\beta$ , è frequentemente implicata in tumori umani e in modelli sperimentali. Elevati livelli di PKC $\beta$  attivo promuovono carcinogenesi al colon. Inoltre l'overespressione di PKC $\beta$  in cellule di epitelio intestinale inducono un fenotipo invasivo che può essere bloccato dal trattamento di queste cellule con Enzastaurin (<sup>200</sup>). Questi dati indicano un ruolo centrale di PKC $\beta$  nella formazione e nella malignità del tumore al colon, e supportano l'importanza di un inibitore selettivo per PKC $\beta$  come l'Enzastaurin per il trattamento del carcinoma al colon.

Uno studio ha dimostrato che, oltre al segnale di PKC, l'attivazione della cascata del segnale del fosfatidil-inositolo 3'(PI3) chinasi/AKT stimola la progressione del ciclo cellulare e sopprime l'apoptosi. Questa via è frequentemente attivata in una varietà di tumori umani, dopo la conseguente perdita di espressione del gene oncosoppressore PTEN sul cromosoma 10. L'inibizione di questa via in modelli sperimentali induce apoptosi delle cellule tumorali, soprattutto in cellule tumorali senza PTEN. Entrambe le vie di segnale, PKC e PI-3chinasi/AKT, regolano la fosforilazione del glicogeno sintasi chinasi 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ).

È stato osservato che un ampio numero di cellule tumorali umane, incluse quelle del tumore al colon, vanno in apoptosi dopo trattamento con Enzastaurin a concentrazioni simili a quelli utilizzati in studi clinici. Questa risposta è preceduta da una significativa riduzione dose/tempo-dipendente, della fosforilazione di GSK3 $\beta$  (serina 9). La crescita di HCT116, tumore al colon trapiantato, è significativamente soppressa ( $p < 0.01$ ) con dosi orali di Enzastaurin, a concentrazioni plasmatiche simili a quelle cliniche (~2  $\mu$ M). La stessa cosa è stata osservata in glioblastoma umano U87MG. È stato inoltre dimostrato che la fosforilazione di GSK3 $\beta$ , in tessuti tumorali trapiantati ed in colture cellulari, viene inibita (oltre il 90%) in maniera tempo/dose-dipendente, dopo trattamento con Enzastaurin per più di 8 ore. Questi dati supportano l'importanza del trattamento con Enzastaurin nel tumore umano al colon, e indicano che la fosforilazione di GSK3 $\beta$  può servire da marker farmacodinamico affidabile per l'attività di Enzastaurin (<sup>201</sup>).

Il Vascular endothelial growth factor (VEGF) è secreto in numerosi tumori maligni, compreso il tumore al colon, ed è un potente stimolo angiogenetico. VEGF

lega i suoi recettori tirosin chinasi (VEGF receptor 1/Flt, VEGF receptor 2/KDR/FLK1 e VEGF receptor 3/Flt-4) e stimola la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali. Questo segnale dipende dall'attività di PKC $\beta$ . Di conseguenza, il trattamento con inibitori selettivi di PKC $\beta$ , può sopprimere l'angiogenesi indotta da VEGF secreto nei tumori. Le proprietà antiangiogenetiche di Enzastaurin sono state infatti dimostrate sia in vitro che in vivo. Questi studi hanno dimostrato che, Enzastaurin può sopprimere la crescita dei tumori attraverso meccanismi multipli:

- *effetto diretto*: induce morte cellulare e sopprime la proliferazione delle cellule tumorali;
- *effetto indiretto*: sopprime l'angiogenesi tumore-indotta.

### **3.6.2 Briostatine**

PKC è un recettore intracellulare per gli esteri del forbolo (<sup>202</sup>). Gli esteri del forbolo come TPA, modulano l'attività di PKC e pertanto vengono utilizzati per indagare gli effetti della PKC nell'apoptosi e nella resistenza ai farmaci antitumorali. Tuttavia l'uso di TPA può dare risultati apparentemente contraddittori, perché può attivare diverse isoforme di PKC. A differenza dell'attivatore fisiologico DAG, TPA è stabile e induce una persistente attivazione che porta alla down-regolazione di PKC (<sup>203</sup>). L'esposizione di cellule per un breve periodo di tempo agli esteri del forbolo attiva la PKC, invece un'esposizione prolungata esaurisce l'enzima intracellulare, molto probabilmente a causa della degradazione proteolitica (<sup>204</sup>). In molti casi è difficile distinguere se gli effetti degli esteri del forbolo siano dovuti ad attivazione o ad inattivazione di PKC. Oltre ad interagire con PKC, TPA interagisce anche con altre proteine. Gnidimacrin è un altro attivatore di PKC che porta a down-regolazione dell'enzima, dopo un'esposizione a lungo termine. Il composto esibisce un'attività antitumorale in vivo (<sup>205</sup>).

Le Briostatine sono un gruppo di metaboliti attivi (macrocyclic lactones) isolati dal briozoo *Bugula neritina*, in avanzata fase di studio presso il National Cancer Institute per l'uso nel trattamento di melanomi, linfomi non- Hodgkin's e cancro renale. Questi composti mostrano una notevole affinità per PKC, e competono per lo stesso sito di legame degli esteri del forbolo (<sup>206</sup>). La maggior parte delle indagini

sono state condotte con briostatina 1. In cellule sane, briostatina, così come gli esteri del forbolo, attiva PKC e ne causa la traslocazione dal citoplasma alla membrana (<sup>207</sup>). A seguito di un'esposizione prolungata, PKC subisce degradazione proteolitica. Alcuni studi hanno osservato molte differenze tra le briostatine e TPA. Anche le briostatine, come gli esteri del forbolo, stimolano la crescita in alcuni sistemi e la inibiscono in altri (<sup>208</sup>). Tuttavia, a differenza degli esteri del forbolo, le briostatine non promuovono lo sviluppo tumorale. In fibroblasti NIH3T3, briostatina 1 ha mostrato una potenzialità simile a quella del TPA nel traslocare PKC $\alpha$  alla membrana cellulare, e si è anche rivelata più potente nel down-regolare l'attività di PKC $\alpha$ , PKC $\delta$  e PKC $\epsilon$  rispetto al TPA. È stato dimostrato che briostatina 1 inibisce la proliferazione del carcinoma umano polmonare A549, carcinoma mammario MCF7, adenocarcinoma renale murino, melanoma B16, di cellule M5076 di sarcoma reticolare, cellule L10A di linfoma ed ha un'attività antitumorale in sistemi P388 di leucemia murina (<sup>209</sup>). Briostatina 1 inibisce inoltre la crescita di cellule MCF-7 solo ad alte dosi, e antagonizza completamente l'inibizione della crescita ed il cambio morfologico indotto dal TPA. L'effetto opposto di questi due composti è stato associato alle diverse isoforme di PKC espresse in cellule MCF-7. TPA induce una rapida traslocazione alla membrana di PKC $\alpha$ . In contrasto, il trattamento con briostatina provoca la perdita di PKC $\alpha$  da entrambe i compartimenti, citoplasma e membrana, dopo 10 minuti di trattamento.

### 3.6.3 Analoghi dei fosfolipidi

Gli analoghi dei fosfolipidi sono una nuova classe di farmaci con attività antineoplastica. I composti principali che rappresentano questo gruppo sono:

- *edelfoside* (ET-18-OCH<sub>3</sub>: 1-*O*-octadecyl-2-*O*-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine);
- *ilmofoside* (BM 41440);
- *miltefoside* (hexadecylphosphocholine).

Questi composti hanno una notevole attività antineoplastica sia in vitro che in vivo (<sup>210</sup>). Miltefoside è il primo di questi composti usato in clinica. In fase II della

sperimentazione clinica, è stato osservato che 8 pazienti su 23, con tumore al seno metastatico, hanno avuto una remissione parziale in seguito a trattamento con miltefoside (<sup>211</sup>). Questo farmaco è stato approvato in diversi paesi per il trattamento topico delle metastasi cutanee derivanti dal carcinoma mammario (<sup>212</sup>). Il meccanismo molecolare responsabile degli effetti citotossici di questi composti non è del tutto chiaro, ma sembra che questi composti interferiscano con segnali mitogeni sulla membrana cellulare (<sup>213</sup>). È stato osservato che gli analoghi dei fosfolipidi inibiscono le PKC in estratti cellulari attraverso competizione con fosfatidilserina (<sup>214</sup>). Questi composti sono potenti farmaci diretti contro PKC non solo in lisati cellulari ma anche in cellule sane (<sup>215</sup>). L'ipotesi che l'inibizione di PKC sia responsabile della diminuzione della crescita cellulare è ulteriormente supportata dalla constatazione che l'effetto antiproliferativo di miltefoside può essere antagonizzato da TPA. È stato dimostrato inoltre che miltefoside ed edelfoside non interferiscono con la traslocazione di PKC, ma mediano un decremento generale dell'attività enzimatica nelle membrane e nel citoplasma delle cellule. Diversi tipi di cellule depauperate di PKC mostrano sensibilità a edelfoside simile a quella di cellule esprimenti PKC. Questi risultati suggeriscono un'improbabile ruolo di PKC nell'azione citotossica di Edelfoside (<sup>216</sup>). Tali dati possono essere spiegati dal fatto che gli analoghi dei fosfolipidi interferiscono con altre vie della traduzione del segnale, quali la formazione di inositolo fosfato (<sup>217</sup>) e la sintesi di fosfatidilcolina (<sup>218</sup>).

#### ***3.6.4 Derivati della staurosporina***

La staurosporina, isolata dal batterio *streptomyces staurosporeus* (<sup>219</sup>), è un potente inibitore di PKC (<sup>220</sup>). Il composto è un inibitore chinasi non specifico, ed inibisce protein tirosin chinasi e chinasi cAMP-dipendenti. Sono stati sintetizzati diversi derivati della staurosporina con alta specificità per PKC, come:

- benzoyl-staurosporina (CGP 41251);
- bisindolylmaleimide IX (RO 31-8220) e RO 31-7549;
- GÖ 6976 e GÖ 6850;GF 109203X;
- 7-idrossi-staurosporina (UCN-01);
- CGP 53506 e CGP 54345;

- Rottlerin (<sup>221</sup>);
- LY333531.

Ad eccezione di Rottlerin, tutti gli altri composti della categoria hanno un basso valore di IC50 per PKCs (<sup>222</sup>). Le briostatine e gli analoghi dei fosfolipidi modulano l'attività di PKC attraverso interazione con il dominio regolatore. Staurosporina e i suoi derivati sono invece in grado di inibire PKC attraverso competizione con il sito di legame per l'ATP. Staurosporina infatti previene il legame con l'ATP perché ha un'affinità maggiore per le protein chinasi.

### ***3.6.5 Oligonucleotidi antisenso***

Per oligonucleotide antisenso si intende un breve frammento di DNA, di circa 15 nucleotidi, che contiene la sequenza nucleotidica complementare del filamento di DNA codificante (senso) o di RNA messaggero (mRNA). Perciò l'antisenso, grazie a questa sua "specularità" rispetto al DNA senso, si appaia ad esso, o all' mRNA, annullandone l'attività biologica. Gli oligonucleotidi di impiego in terapia sono sintetici, ma nelle cellule sono stati individuati anche oligonucleotidi endogeni, di cui è ignota la funzione. L'oligonucleotide antisenso si lega all'RNA messaggero, o a sequenze di controllo dell'espressione genica presenti sul filamento complementare di DNA, impedendo così la decodificazione ed il successivo processo di sintesi proteica. Esistono due diverse possibilità per un eventuale uso clinico degli oligo antisenso. La prima richiede la formazione di un breve tratto di tripla elica, mediante legami, detti di Hogsten, con le regioni di controllo della trascrizione in RNA presenti nel DNA (approccio a tripla elica).

Alternativamente, si potrebbe pensare di veicolare un oligo antisenso all'interno della cellula per formare una doppia elica ibrida RNA/DNA con il trascritto in RNA. La formazione della molecola ibrida può abolire la capacità di un segmento di DNA ad essere riconosciuto e dunque tradotto dall'apparato cellulare deputato alla biosintesi delle proteine.

#### 4. SCOPO DELLO STUDIO

Per quanto riguarda i NETs, ad oggi l'asportazione completa della massa è l'unica modalità terapeutica che consente di ottenere la guarigione. L'efficacia del trattamento chirurgico diminuisce significativamente in caso di malattia metastatica. Purtroppo, a causa dell'aspecifica o addirittura assente sintomatologia, la diagnosi dei NETs è spesso tardiva e diventa quindi necessario ricorrere alla terapia medica. I farmaci attualmente a disposizione risultano troppo spesso poco efficaci e provocano molteplici effetti collaterali che possono rendere necessaria la sospensione della terapia. Per questi motivi è necessario valutare l'utilizzo di nuovi farmaci efficaci nel trattamento di tali neoplasie.

Scopo del nostro studio è stato quello di valutare gli effetti antiproliferativi di un inibitore selettivo per PKC $\beta$ II, Enzastaurin su:

- colture primarie derivate da campioni umani di PET prelevati in corso di intervento chirurgico;
- una linea cellulare di carcinoma neuroendocrino del pancreas umano (BON1);
- colture primarie derivate da pezzi operatori di MTC;
- una linea cellulare di carcinoma midollare della tiroide (TT);

per verificare se PKC potesse rappresentare un buon target terapeutico nel controllo della proliferazione cellulare dei tumori neuroendocrini.

## 5. MATERIALI E METODI

### TESSUTI UMANI

Per questo studio sono stati raccolti 6 campioni (Tabella 6) provenienti da pazienti operati per diagnosi di tumore neuroendocrino del pancreas all'Università di Ferrara (Sezione di Endocrinologia e di Clinica Chirurgica) e all'Università di Padova (Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche).

Paziente	Età	Sesso	Diagnosi	Secrezione Ormonale	Sindrome genetica	TNM	Stadio	Grado
1	49	M	NN	Insulinoma	Sporadico	T1N0M0	I	1
2	56	F	NN	Non funzionante	Sporadico	T2N0M0	IIa	1
3	25	F	NC	Insulinoma	MEN1	T2N1M1	IV	2
4	69	M	NC	Non funzionante	Sporadico	T4N1M1	IV	2
5	54	M	NC	Non funzionante	Sporadico	T1N1M1	IV	2
6	62	M	NC	Non funzionante	Sporadico	T2N1M0	IIIb	2

**TABELLA 6:** Caratteristiche dei pazienti.

I campioni di MTC raccolti provenivano da 8 pazienti, le cui caratteristiche sono riportate in Tabella 7, operati presso l'Università di Ferrara (Sezione di Endocrinologia e Sezione di Clinica Chirurgica), e presso l'Università di Padova (Sezione di Chirurgia Generale Patologia Speciale, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche). Di questi pazienti, 6 avevano un carattere sporadico, 1 aveva un MTC correlato a MEN2A e 1 aveva un MTC correlato a MEN2B.

Paziente	Età	Sesso	Sindrome genetica	Stadio
1	25	M	MEN2A	2
2	56	F	Sporadic	2
3	49	F	Sporadic	2
4	69	M	Sporadic	3
5	54	M	Sporadic	3
6	22	F	MEN2B	2
7	57	F	Sporadic	2
8	62	M	Sporadic	3

**TABELLA 7:** Caratteristiche pazienti.

### **RACCOLTA DEI TESSUTI E COLTURE PRIMARIE**

La raccolta e l'uso dei campioni di tessuto è avvenuta in accordo con le linee guida del Comitato Etico locale per la ricerca scientifica. I campioni sono stati prelevati in condizioni sterili al momento dell'intervento ed un frammento è stato congelato immediatamente in azoto liquido e conservato a -80° C fino al momento dell'estrazione dell'RNA ed all'esecuzione della reazione di retrotrascrizione (RT).

Una porzione di tessuto fresco è stato subito processato per l'allestimento della coltura primaria. Il tessuto è stato dissociato enzimaticamente usando collagenasi e tripsina. In seguito è stata eseguita una disgregazione meccanica attraverso passaggi in siringa utilizzando aghi da 20 – 22 G. Le cellule sono state mantenute in coltura in RPMI con siero bovino fetale al 10% e antibiotico al 1% (EuroClone Ltd), seminate in piastre da 96 pozzetti (~2 x 10<sup>4</sup> cellule/pozzetto) e incubate a 37°C in atmosfera umidificata con 5% CO<sub>2</sub> e 95% aria. Dopo 24 ore, le cellule sono state incubate durante la notte in mezzo di coltura senza siero. Il giorno dopo, le cellule sono state trattate con ciascuna sostanza. Per i dosaggi ormonali il surnatante è stato raccolto dopo 6 ore e conservato a -20°C, rinnovando i trattamenti per altre 48 ore per gli esperimenti di vitalità cellulare ed apoptosi.

## **REAGENTI**

Enzastaurin è stata fornita dalla Eli Lilly (Indianapolis, IN). È stata risospesa in dimetil sulfoxyde (DMSO in stock solution da 10 mM) e conservata a -20°C. La staurosporina è stata acquistata da Santa Cruz (Delaware, USA). IGF-I invece da PeproTek Inc (Rocky Hill, NJ, USA). Tutti gli altri reagenti, se non diversamente specificato, sono stati acquistati da Sigma (Milano, Italia).

## **LINEA CELLULARE BON1**

La linea cellulare BON1 deriva da una neoplasia neuroendocrina del pancreas. È stata stabilizzata da R. Göke (Marburg, Germany) e mantenuta in coltura in DMEM/F12 (1:1) medium con aggiunta di siero fetale bovino al 10% (FBS, Invitrogen, Milano), 100 U/mL penicillina, 0.1 mg/mL streptomina e 100 µg/mL amfotericina (EuroClone Ltd, Torquay, UK) a 37° C in atmosfera umidificata con 5% CO<sub>2</sub> e 95% aria. Studi immunocitochimici e citochimici hanno dimostrato che le cellule BON-1 esprimono markers neuroendocrini, quali serotonina, neurotensina, sinaptofisina e cromogranina A (CgA), così come il marker epiteliale citocheratina. Tale linea cellulare, inoltre, presenta alti livelli di espressione di canali per il calcio di tipo L e R, mentre i canali N e P/Q sono meno espressi. I canali di tipo R sono espressi ad alti livelli anche nei neuroni ed hanno un ruolo essenziale nel rilascio Ca<sup>2+</sup> - dipendente di ormoni.

## **LINEA CELLULARE TT**

La linea cellulare TT è stata ottenuta da un campione di un agoaspirato tiroideo di una paziente di 77 anni affetta da MTC (<sup>223</sup>). Consiste di cellule C parafolicolari aneuploidi trasformate, caratterizzate dalla presenza di una mutazione nell'esone 11 al codone 634 del proto-oncogene RET (TGC in TTG: Cys in Trp) (<sup>224</sup>). Inoltre, le cellule TT hanno un'espressione aberrante del gene oncosoppressore p53. Studi immunocitochimici hanno dimostrato che le cellule TT esprimono la CT ed il suo recettore (<sup>225</sup>), l'antigene carcino-embriionario, somatostatina, neurotensina, GRP, encefaline, cromogranina A (CgA), PTHrp, sinaptofisina, enolasi neurono-specifica (NSE), recettore della vitamina D<sub>3</sub>, tirosin-idrossilasi, α-tubulina, citocheratina e molti altri peptidi. Le cellule TT secernono quantità significative di CT e rispondono a variazioni dei livelli di calcio ionizzato (<sup>226</sup>). La linea cellulare TT è stata acquistata

dall'American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) e mantenuta in coltura in Ham's Nutrient Mixture F12 con Glutamina (EuroClone Ltd, Torquay, UK) con aggiunta di siero fetale bovino al 10% (FBS, Invitrogen, Milano), 100 U/mL penicillina, 0.1 mg/mL streptomina e 100 µg/mL amfotericina (EuroClone Ltd, Torquay, UK) a 37° C in atmosfera umidificata con 5% CO<sub>2</sub> e 95% aria.

### **VALUTAZIONE DELLA VITALITA' CELLULARE**

Le variazioni del numero di cellule è stata valutata mediante kit ATPLite (Perkin Elmer Life Sciences, Waltham, MA, USA). Brevemente, le cellule sono state seminate a concentrazione di  $2 \times 10^4$  cellule/well in piastre da 96 pozzetti, fatte attaccare una notte e poi esposte alle sostanze in esame per 48 e 72 ore, in presenza del 10% FBS. Le cellule di controllo hanno ricevuto solo il veicolo (DMSO ad una concentrazione finale di 0,1%). Staurosporina 100 nM è stata usata come controllo positivo per l'inibizione della vitalità cellulare. Dopo l'incubazione, la soluzione rivelatrice è stata aggiunta e la quantità di luce emessa è stata registrata mediante Wallac Victor TM 1420 Multilabel contatore (Perkin Elmer Life Sciences). I risultati sono stati ottenuti mediante la determinazione del valore medio di 6 replicati in tre diversi esperimenti.

### **SINTESI DEL DNA**

La sintesi di DNA in corso dei vari trattamenti è stata valutata misurando l'incorporazione di [<sup>3</sup>H]timidina ([<sup>3</sup>H]thy). Le cellule sono state seminate ad una concentrazione di  $5 \times 10^4$  cellule / well in piastre da 24 pozzetti, fatte attaccare una notte e successivamente trattate con Enzastaurin in presenza di [<sup>3</sup>H]thy (1.5 µCi/ml; 87 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech Italia, Cologno Monzese, Italia). Staurosporina 100 nM è stato usato come controllo positivo per l'inibizione della sintesi del DNA. Dopo l'incubazione, ciascun campione è stato raccolto e successivamente dispensato in piastre da 96 pozzetti in triplicato. La radioattività in eccesso è stata eliminata mediante filtrazione (Harvester C9619 Unifilter, Camberra Packard) su apposita piastra (Unifilter-96 GF/C, Perkin Elmer). La radioattività associata alle cellule è stata valutata tramite uno spettrometro a scintillazione (Top Count, Camberra Packard) in triplicato

## **VALUTAZIONE DELL'APOPTOSI**

L'Attività caspasi è stata misurata mediante kit Caspasi-Glo 3/7 Assay (Promega, Milano, Italia). Brevemente, le cellule sono state seminate ad una concentrazione di  $10^4$  cellule/well in piastre da 96 pozzetti, fatte attaccare per una notte e successivamente trattate con Enzastaurin per 48 e 72 h. Staurosporina 100 nM è stato usato come controllo positivo per l'induzione dell'apoptosi. Le cellule di controllo hanno ricevuto solo il veicolo (0,1% DMSO). Dopo le 48 e 72 h, è stato aggiunto un uguale volume di reagente caspasi-Glo 3/7. Le piastre sono state agitate a 500 rpm per 30 sec, incubate per 3 ore, ed infine valutato il segnale luminescente emesso (unità luminose relative) con Wallac Victor 1420 multilabel (Perkin Elmer Life Sciences).

## **ELISA PER CALCITONINA IN CELLULE TT**

Le cellule sono state seminate in piastre da 6 well ad una concentrazione di  $10^6$  cell/well e fatte attaccare per una notte. Successivamente sono state trattate per 6 h. I livelli di Calcitonina (CT) sono stati determinati in terreno condizionato impiegando Human calcitonina ELISA Kit (Diagnostic Systems Laboratories, Inc., TX, USA), seguendo le istruzioni del produttore. I campioni sono stati analizzati in triplicato utilizzando il contatore Wallac Victor 1420 multilabel (Perkin Elmer Life Sciences). I risultati sono espressi come media  $\pm$  SE valore in percentuale dei livelli CT vs le cellule di controllo.

## **ELISA PER CROMOGRANINA A ED INSULINA IN CELLULE BON1**

Le cellule sono state seminate in piastre da 6 well ad una concentrazione di  $10^6$  cell/well e fatte attaccare per una notte. Successivamente sono state trattate per 6 h. I livelli di Cromogranina A (CgA) e/o insulina sono stati determinati in terreno condizionato impiegando Human CgA ELISA Kit (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) e in alcuni casi selezionati l'Insulin ELISA kit (Calbiotech, Sring Vally, CA; USA) seguendo le istruzioni del produttore. I campioni sono stati analizzati in triplicato utilizzando il contatore Wallac Victor 1420 multilabel (Perkin Elmer Life Sciences).

## **ESPRESSIONE DI Akt(Ser473) e GSK3 $\beta$ (Ser9)**

I livelli di Akt e GSK3 $\beta$  totali e fosforilati sono stati misurati mediante AlphaScreen<sup>®</sup> SureFire<sup>®</sup> kit (Perkin Elmer Life Sciences). I dati sono stati normalizzati con l'appropriato AlphaScreen<sup>®</sup> SureFire<sup>®</sup> Kit per la GAPDH. Brevemente, le cellule sono state seminate ad una concentrazione di  $2 \times 10^4$  cellule / well in 96 pozzetti, e il giorno dopo incubate con o senza le sostanze in esame e valutate secondo il protocollo del produttore. Le piastre sono state misurate su lettore di piastre AlphaScreen<sup>®</sup> (Perkin Elmer Life Sciences), utilizzando le normali impostazioni AlphaScreen<sup>®</sup>. I valori ottenuti con il kit di analisi per pAkt, totAkt, pGSK3 $\beta$  e totGSK3 $\beta$  sono stati normalizzati contro la GAPDH. I risultati sono espressi come rapporto tra proteina fosforilata e livelli di proteina totali.

## **WESTERN BLOT**

Le cellule in coltura sono state raccolte lavate in PBS e centrifugate a 200g per 10 min. I pellet sono stati risospesi in un tampone di lisi cellulare (50mM Tris-HCl, pH7.4; 1% NP-40; 0.25% sodium deoxycholate; 150mM NaCl; 1mM EDTA; 1mM PMSF; 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 1mM NaF) contenente gli inibitori delle proteasi ed in seguito è stata valutata la concentrazione proteica utilizzando il BCA<sup>™</sup> protein assay kit (Pierce, Rockford, IL). Su di un gel di SDS-acrylamide al 12% sono state migrate 30  $\mu$ g di proteine per ogni campione e poi trasferite su un filtro di nitrocellulosa (Schleicher & Schuell Italia SRL, Milano, Italia).

Le membrane di nitrocellulosa contenenti le proteine sono state bloccate ed incubate con un anticorpo primario specifico, seguendo le indicazioni del produttore. In particolare, anticorpi policlonali (prodotti in coniglio) anti- PKC $\beta$ II ed anti-PKC $\beta$ II(Thr500) sono stati utilizzati ad una concentrazione di 1:1000 (Abcam, Cambridge, UK). Anti-PKC $\delta$  (prodotto in coniglio) , anti-actina (prodotto in topo) (Signalling Cell Technology, Euroclone, Milano, Italia), sono stati diluiti rispettivamente 1:1000 e 1:5000. Le membrane, in seguito all'incubazione con l'anticorpo primario, sono state lavate ed incubate nuovamente con un anticorpo secondario diretto contro le IgG di topo (1:2000) o di coniglio (1:5000) (Pierce) coniugato con la perossidasi per 1 ora a temperatura ambiente. La specifica reazione è stata evidenziata mediante il sistema di rivelazione ECLSupersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce).

## **IMMUNOFLUORESCENZA**

La localizzazione di PKC $\beta$ II e PKC $\delta$  in colture primarie di MTC e PETs e nelle rispettive linee cellulari è stata determinata mediante immunofluorescenza. Brevemente, le cellule sono state seminate ad una concentrazione di  $10^4$  cellule, in vetrini sterili da 2 pozzetti (Lab-Tek Chamber Slide System, Nalgene Nunc International, Naperville, IL, USA), e fissate in metanolo e acetone (1:1) per 10 minuti a  $-20^\circ\text{C}$ . I vetrini sono stati poi incubati con tampone bloccante e poi con un anticorpo monoclonale murino anti-PKC $\delta$  (1:100) (Sigma, Milano, Italia) o un anticorpo policlonale di coniglio anti-PKC $\beta$ II (1:100) (Santa Cruz Biotechnology). Le cellule sono state poi incubate per 45 minuti con il rispettivo Ab secondario, anti-topo coniugato a FITC e anti-coniglio coniugato a TRITC (1:200, Santa Cruz Biotechnology). I vetrini sono stati poi montati con ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen Molecular Probes) contenente il colorante nucleare 4',6'-diamidino-2-fenilindole (DAPI) sotto il vetrino oprioggetto, mantenuti al buio per 24 ore a temperatura ambiente ed osservati con microscopio a fluorescenza Nikon Eclipse TE2000-U con obiettivo 60X ad immersione.

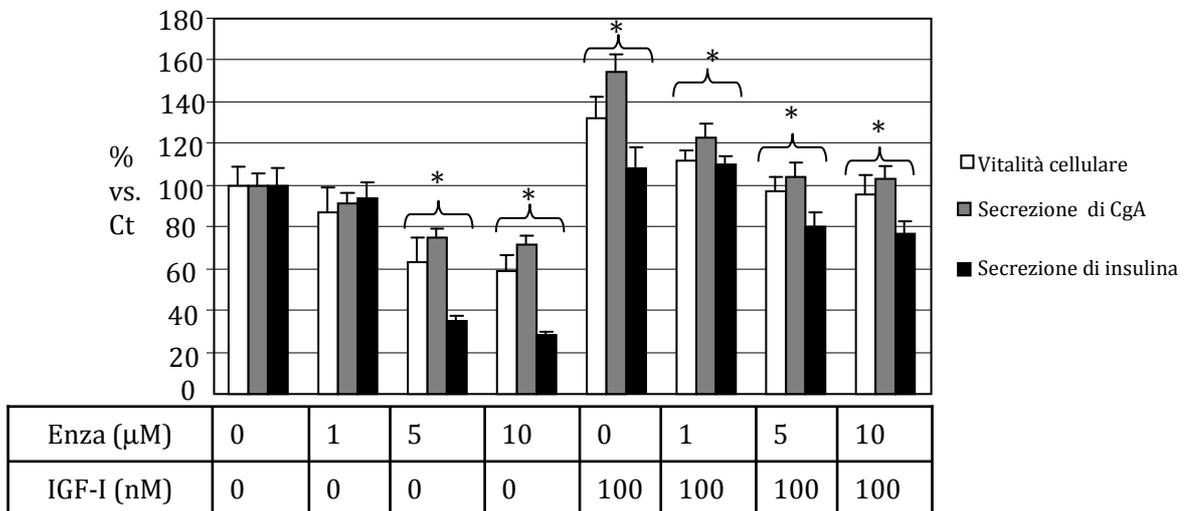
## **ANALISI STATISTICA**

I dati sono stati espressi come media  $\pm$  errore standard (SE). È stato utilizzato il test t di Student per dati appaiati o non appaiati per valutare le differenze individuali fra le medie. Una  $P < 0.05$  è stata considerata significativa in tutti i test.

## 6. RISULTATI

### EFFETTI DI ENZASTAURIN SULLE COLTURE PRIMARIE DI PETs

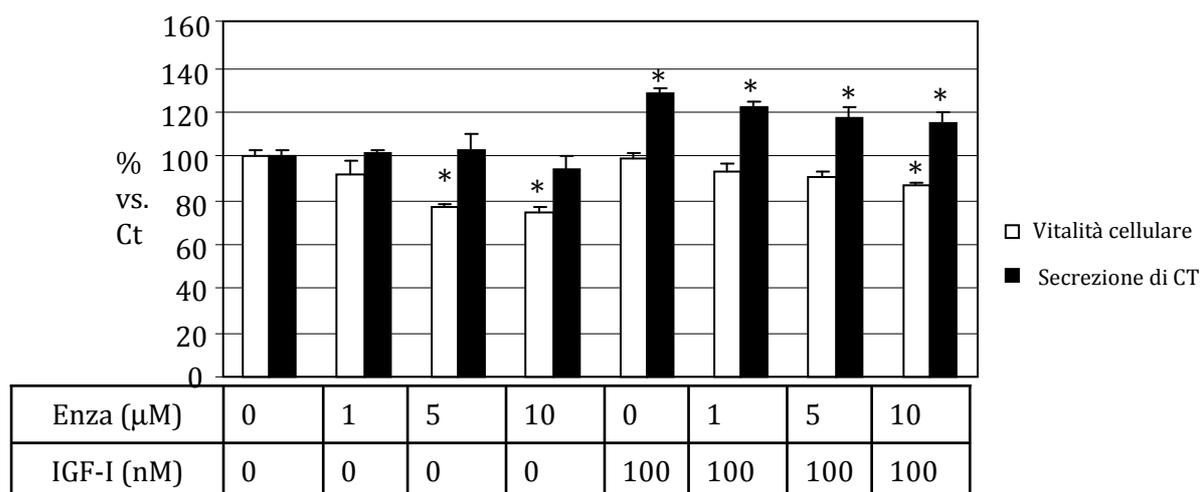
Per verificare gli effetti di Enzastaurin sulla proliferazione cellulare, sei colture primarie di PETs sono state trattate con questa sostanza a concentrazioni crescenti (1-10  $\mu\text{M}$ ) sia in presenza che in assenza di siero, da sola o in combinazione con IGF-I 100 nM come stimolo proliferativo (Figura 6). Abbiamo verificato che Enzastaurin riduce significativamente la vitalità cellulare delle colture primarie di PETs a 5 e 10  $\mu\text{M}$  (-37 e -41%, rispettivamente,  $p < 0.05$  vs controllo;  $\text{IC}_{50} = 11\mu\text{M}$ ), mentre IGF-I ne incrementa la vitalità cellulare (+32%,  $p < 0,05$ ), effetto quest'ultimo completamente bloccato da Enzastaurin 5 e 10  $\mu\text{M}$ . Alle stesse concentrazioni Enzastaurin riduce anche la secrezione di CgA sia basale (-25 e -30%, rispettivamente,  $p < 0.05$  vs controllo;  $\text{IC}_{50} = 15,2 \mu\text{M}$ ) che IGF-I stimolata (dal 54% al 4%) dopo 6 h. Inoltre, una forte riduzione dei livelli di insulina sono stati osservati nei medium provenienti da colture primarie di insulinoma dopo trattamento con Enzastaurin 5 e 10  $\mu\text{M}$  (-65 e -72%, rispettivamente,  $p < 0.05$  vs controllo;  $\text{IC}_{50} = 5,9 \mu\text{M}$ ) dopo 6 h, anche in presenza di IGF-I.



**FIGURA 6:** Effetto di Enzastaurin su colture primarie di PETs. \* $P < 0.05$  vs Ct

## EFFETTI DI ENZASTAURIN SULLE COLTURE PRIMARIE DI MTC

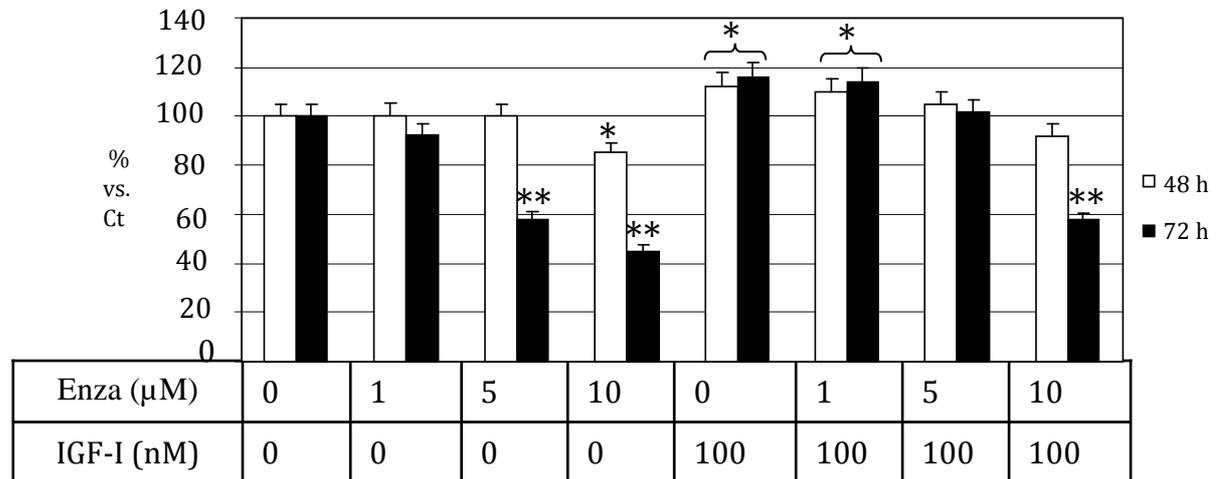
Abbiamo valutato la capacità di Enzastaurin di influenzare la vitalità cellulare in 8 colture primarie di MTC. Come illustrato in Figura 7, dopo 72 ore Enzastaurin riduce significativamente la vitalità cellulare nelle colture primarie di MTC a 5 e 10  $\mu\text{M}$  (-23 e -25%, rispettivamente,  $p < 0.05$  vs controllo;  $\text{IC}_{50} = 17,9 \mu\text{M}$ ). D'altra parte, IGF-I non modifica la vitalità cellulare di queste colture, e non protegge dagli effetti inibitori di Enzastaurin. Inoltre, Enzastaurin non influenza la secrezione basale di CT. Il trattamento con IGF-I induce un significativo ( $p < 0,05$ ) aumento della concentrazione di CT nel mezzo di coltura, che viene significativamente attenuato dalla co-incubazione con 5 e 10  $\mu\text{M}$  Enzastaurin (del 20%,  $p < 0,05$  e del 30%,  $p < 0.02$  vs cellule trattate con IGF-I).



**FIGURA 7:** Effetti di Enzastaurin su colture primarie di MTC. \* $P < 0.05$  vs Ct

## EFFETTI DI ENZASTAURIN SULLA PROLIFERAZIONE DELLE CELLULE BON1

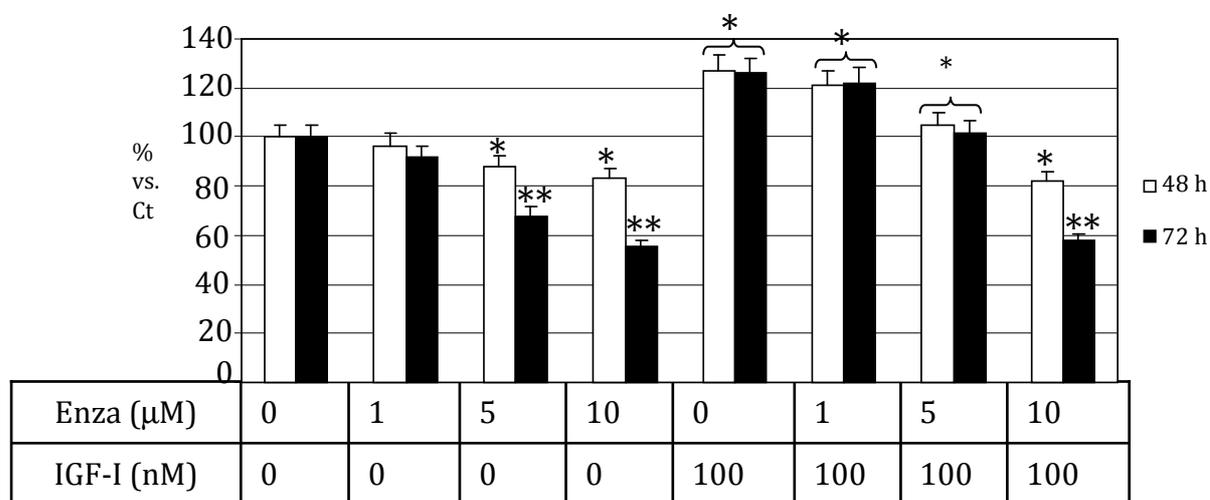
Per meglio comprendere i meccanismi attraverso cui Enzastaurin influenza la proliferazione cellulare nei PETs, è stato utilizzato come modello la linea cellulare BON1. Dopo 48 ore in presenza di siero, la vitalità cellulare delle cellule BON1 si riduce significativamente con concentrazioni di Enzastaurin pari a 10  $\mu\text{M}$  (-15%;  $P < 0.05$  vs controllo;  $\text{IC}_{50} = 19.4 \mu\text{M}$ ), e dopo 72 ore l'effetto antiproliferativo è ancora più marcato a concentrazioni di 5 e 10  $\mu\text{M}$  (-40% e -56% rispettivamente;  $P < 0.01$  vs il controllo;  $\text{IC}_{50} = 8.1 \mu\text{M}$ ). L'IGF-I stimola significativamente la vitalità cellulare sia dopo 48 che 72 ore (+12 e 16% rispettivamente;  $P < 0.05$  vs il controllo), effetto quest'ultimo completamente bloccato dalla co-incubazione con Enzastaurin 5 e 10  $\mu\text{M}$  (figura 8).



**FIGURA 8:** Effetti di Enzastaurin sulla vitalità cellulare delle cellule BON1 in presenza di FBS. \* $P < 0.05$  vs Ct, \*\* $P < 0.01$  vs Ct

Gli stessi esperimenti sono stati inoltre eseguiti in assenza di siero, al fine di evitare l'influenza dei fattori di crescita. La vitalità basale era di 30 volte più bassa rispetto ai campioni trattati in presenza di siero. Come mostrato in figura 9, dopo 48 ore la vitalità cellulare era significativamente ridotta da Enzastaurin 5 e 10  $\mu\text{M}$  (-12 e -18% rispettivamente;  $P < 0.05$  vs il controllo;  $\text{IC}_{50} = 26.8 \mu\text{M}$ ), e dopo 72 ore l'effetto antiproliferativo è ancora più marcato (-33 e 44% rispettivamente;  $P < 0.01$  vs il controllo;  $\text{IC}_{50} = 10.1 \mu\text{M}$ ). L'IGF-I stimola la vitalità cellulare sia a 48 che a 72 ore (+26%;  $P < 0.05$  vs il controllo), effetto quest'ultimo bloccato dalla coincubazione con

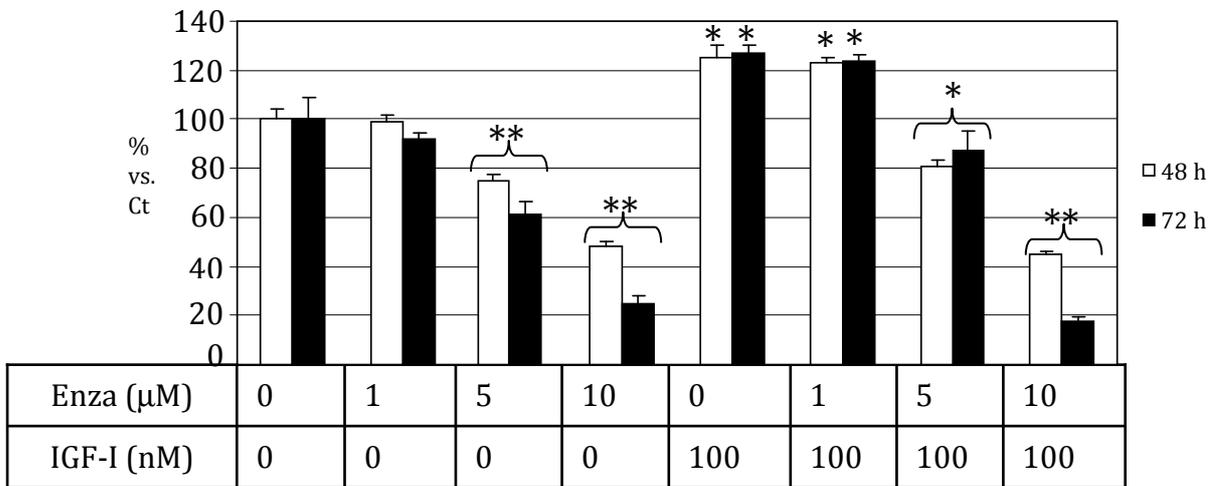
Enzastaurin 5 e 10  $\mu\text{M}$ . La staurosporina riduce significativamente la vitalità cellulare sia a 48 che a 72 ore, sia in presenza che in assenza di siero (da 70 a 80%;  $P < 0.01$  vs il controllo).



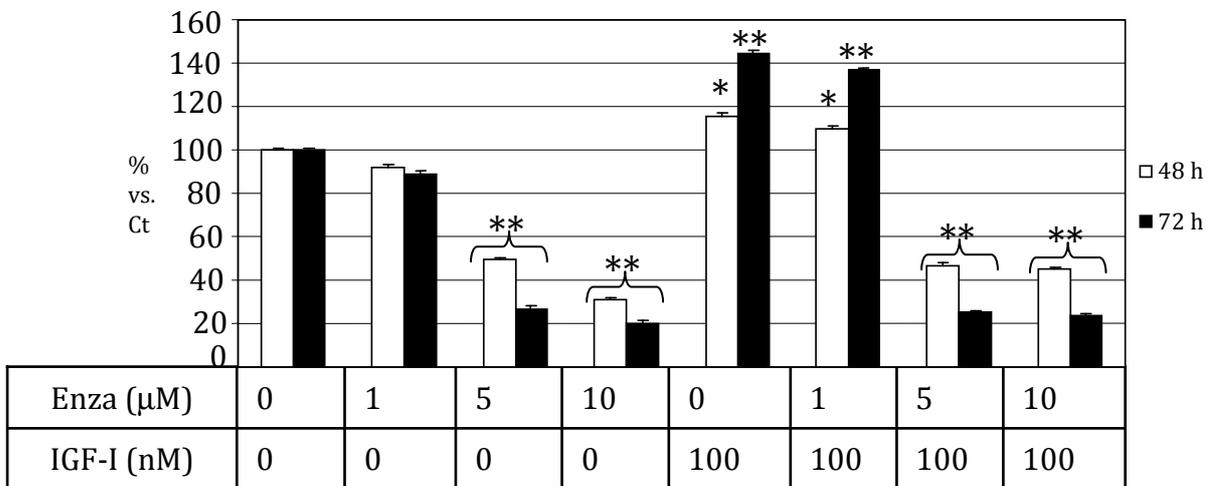
**FIGURA 9:** Effetti di Enzastaurin sulla vitalità cellulare delle cellule BON1 in assenza di FBS. \* $P < 0.05$  vs Ct, \*\* $P < 0.01$  vs Ct

Per confermare i risultati ottenuti con il metodo colorimetrico, è stata valutata la sintesi del DNA tramite la misura dell'incorporazione di timidina triziata (figura 10) ed è stato osservato che in presenza di siero Enzastaurin 5 e 10  $\mu\text{M}$  dopo 48 ore riduce significativamente la sintesi del DNA (-30 e 50% rispettivamente;  $P < 0.01$  vs il controllo;  $\text{IC}_{50} = 9.6 \mu\text{M}$ ), ed una maggiore riduzione si osserva dopo 72 ore (-40 e -75% rispettivamente;  $P < 0.01$  vs il controllo;  $\text{IC}_{50} = 6.9 \mu\text{M}$ ). IGF-I stimola significativamente la sintesi del DNA sia a 48 che a 72 ore (+25%;  $P < 0.01$  vs il controllo), effetto completamente bloccato quest'ultimo dalla co-incubazione con Enzastaurin 5 e 10  $\mu\text{M}$ . Come mostrato in figura 11 dopo 48 ore in assenza di siero la sintesi del DNA era significativamente ridotta da Enzastaurin 5 e 10  $\mu\text{M}$  (-50 e -65% rispettivamente;  $P < 0.01$  vs il controllo;  $\text{IC}_{50} = 6.9 \mu\text{M}$ ), e dopo 72 ore si osservava un effetto più marcato (-70 e -80% rispettivamente;  $P < 0.01$  vs il controllo;  $\text{IC}_{50} = 5.4 \mu\text{M}$ ). IGF-I significativamente stimola la sintesi del DNA sia a 48 che a 72 ore (+15 e +45% rispettivamente;  $P < 0.05$  e  $P < 0.01$  vs il controllo), effetto quest'ultimo bloccato dalla coincubazione con Enzastaurin 5 e 10  $\mu\text{M}$ . Staurosporina riduce significativamente la

sintesi del DNA sia a 48 che 72 ore, in presenza ed in assenza di siero (-80 e -93%;  $P < 0.01$  vs il controllo).



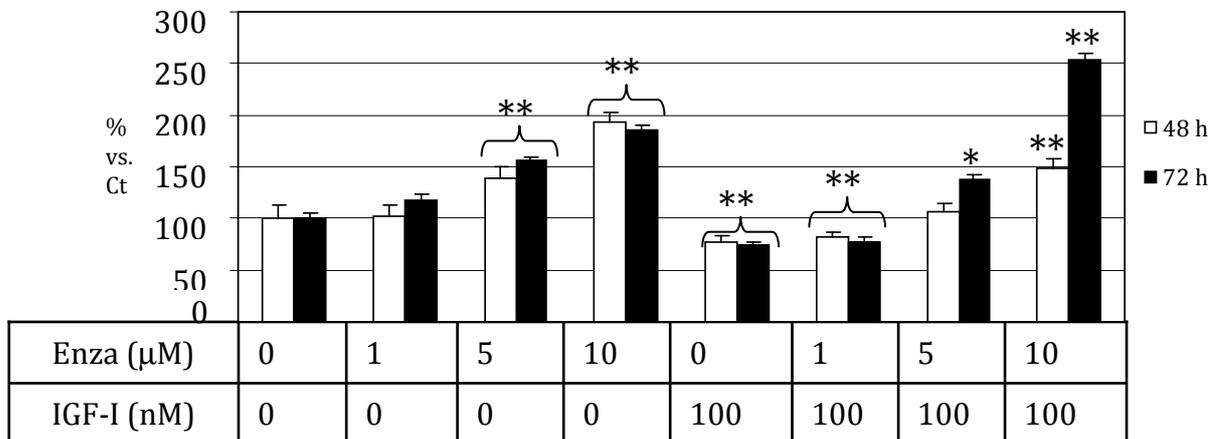
**FIGURA 10:** Effetti di Enzastaurin sulla sintesi del DNA delle cellule BON1 in presenza di FBS. \* $P < 0.05$  vs Ct, \*\* $P < 0.01$  vs Ct



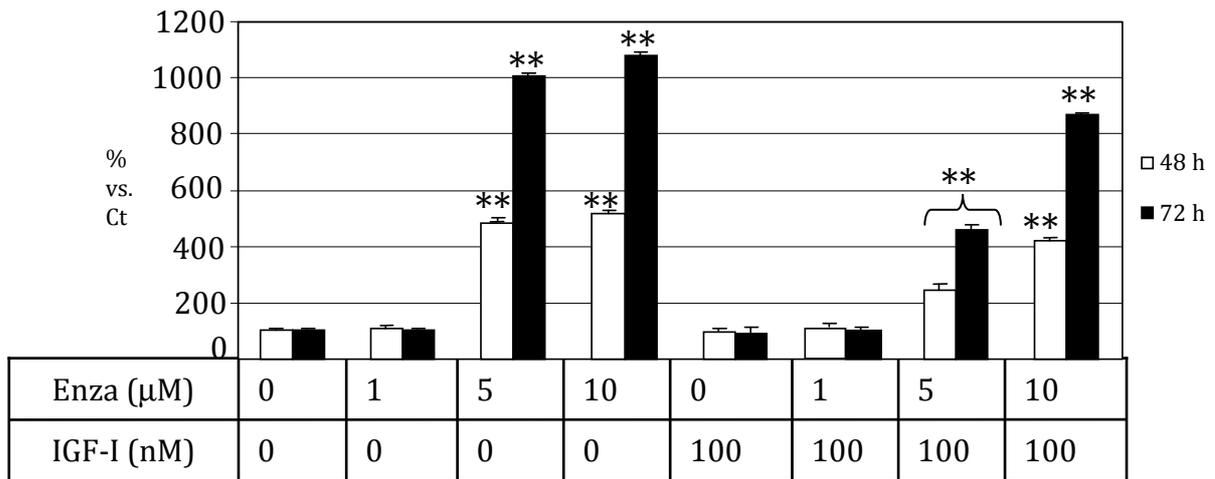
**FIGURA 11:** Effetti di Enzastaurin sulla sintesi del DNA delle cellule BON1 in assenza di FBS. \*\* $P < 0.01$  vs Ct

## EFFETTI DI ENZASTAURIN SULL'APOPTOSI DELLE CELLULE BON1

Per verificare se gli effetti antiproliferativi di Enzastaurin sulle cellule BON1 fossero causati da morte per apoptosi, è stata misurata l'attività delle caspasi 3/7. È stato osservato che dopo 48 ore in presenza di siero Enzastaurin 5 e 10  $\mu\text{M}$  induce significativamente morte per apoptosi (+40 e +100% rispettivamente;  $P < 0.01$  vs il controllo;  $\text{IC}_{50} = 5.4 \mu\text{M}$ ), con un simile effetto dopo 72 ore (+55 e +85% rispettivamente;  $P < 0.01$  vs il controllo;  $\text{IC}_{50} = 4.7 \mu\text{M}$ ). IGF-I riduce significativamente l'attività delle caspasi 3/7 a 48 e 72 ore (-25%;  $P < 0.01$  vs il controllo), un effetto fortemente contrastato dalla coincubazione con Enzastaurin 5 e 10  $\mu\text{M}$  (figura 12). In assenza di siero dopo 48 ore Enzastaurin 5 e 10  $\mu\text{M}$  induce significativamente apoptosi (approssimativamente di 5 volte;  $P < 0.01$  vs il controllo;  $\text{IC}_{50} = 4.2 \mu\text{M}$ ), con un effetto ancora più forte dopo 72 ore (10 volte superiore;  $P < 0.01$  vs il controllo;  $\text{IC}_{50} = 4.1 \mu\text{M}$ ). IGF-I non modifica significativamente l'attività caspasi sia a 48 che 72 ore, ma contrasta gli effetti di Enzastaurin (figura 13). Staurosporina stimola significativamente l'apoptosi sia a 48 che 72 ore, in presenza ed in assenza di siero (da 2 a 3 volte;  $P < 0.01$  vs il controllo).



**FIGURA 12:** Effetti di Enzastaurin sull'apoptosi delle cellule BON1 in presenza di FBS. \*\* $P < 0.01$  vs Ct

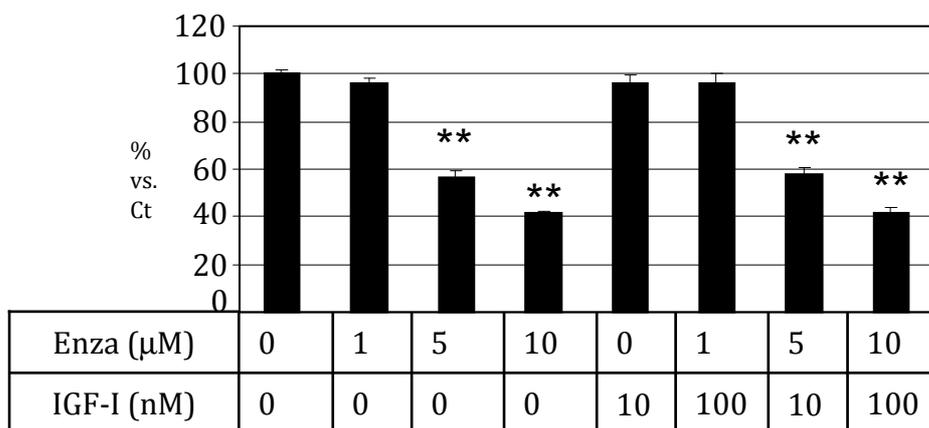


**FIGURA 13:** Effetti di Enzastaurin sull'apoptosi delle cellule BON1 in assenza di FBS.

\*\*P<0.01 vs Ct

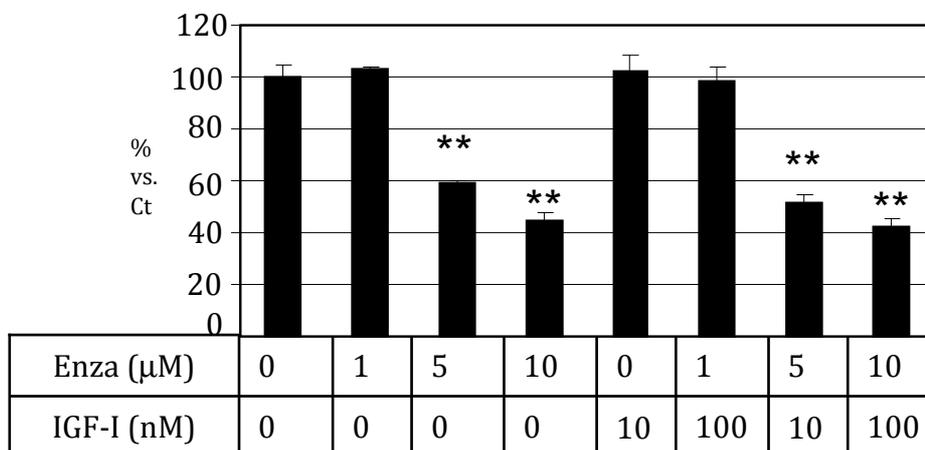
### **EFFETTI DI ENZASTAURIN SULLA PROLIFERAZIONE, APOPTOSI E SECREZIONE DI CT IN CELLULE TT**

Al fine di valutare i meccanismi antiproliferativi di Enzastaurin sugli MTC, sono state utilizzate le cellule TT come modello. La vitalità cellulare, la sintesi del DNA e l'apoptosi sono state osservate dopo 72 ore. Come mostrato in figura 14 la vitalità delle cellule TT era significativamente ridotta da Enzastaurin 5 e 10 μM (-43.3 e 58.5% rispettivamente; P< 0.01 vs il controllo; IC<sub>50</sub> = 9.2 μM). IGF-I non influenza la vitalità delle cellule TT e non protegge le cellule TT dagli effetti inibitori di Enzastaurin. La staurosporina riduce significativamente la vitalità cellulare (-70%; P<0.01 vs il controllo).



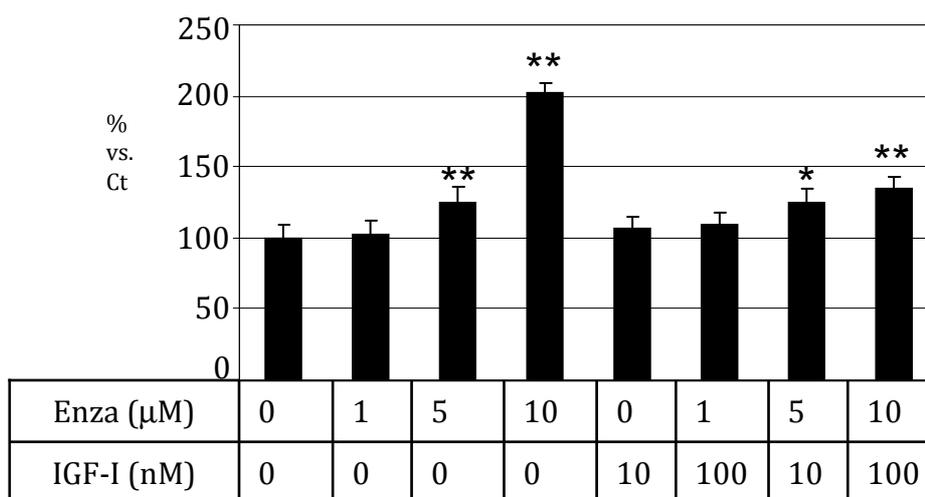
**FIGURA 14:** Effetti di Enzastaurin sulla vitalità delle cellule TT. \*\*P<0.01 vs Ct

Per confermare gli effetti antiproliferativi di Enzastaurin, è stata anche valutata la sintesi del DNA misurando l'incorporazione di timidina triziata. Come mostrato in figura 15, la sintesi del DNA era significativamente ridotta da Enzastaurin 5 e 10 µM (-41 e -55% rispettivamente; P<0.01 vs il controllo; IC<sub>50</sub> = 8.1 µM). L'IGF-I non modifica la sintesi del DNA e non protegge le cellule TT dagli effetti inibitori di Enzastaurin. La staurosporina riduce significativamente la sintesi del DNA (-80%; P<0.01 vs il controllo).



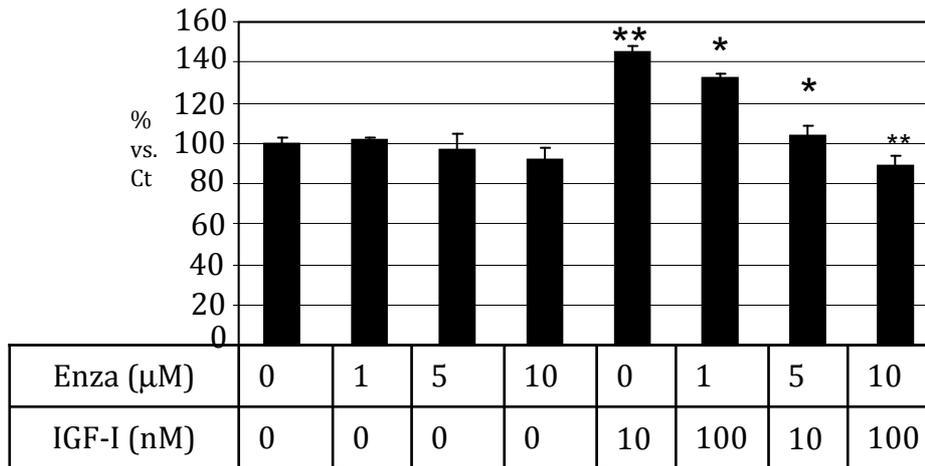
**FIGURA 15:** Effetti di Enzastaurin sulla sintesi del DNA delle cellule TT. \*P<0.05 vs Ct, \*\*P<0.01 vs Ct

Per verificare se gli effetti antiproliferativi di Enzastaurin sulle cellule TT fossero causati dall'induzione dell'apoptosi, è stata valutata l'attività delle caspasi 3/7 a 72 ore (figura 16). Enzastaurin 5 e 10  $\mu\text{M}$  induce significativamente l'apoptosi (+25 e +100% rispettivamente;  $P < 0.01$  vs il controllo;  $\text{IC}_{50} = 5.8 \mu\text{M}$ ). IGF-I non modifica in modo significativo l'attività basale delle caspasi 3/7, ma riduce l'effetto stimolatorio di Enzastaurin 5 e 10  $\mu\text{M}$ . Staurosporina stimola significativamente l'apoptosi (+120%;  $P < 0.01$  vs il controllo).



**FIGURA 16:** Effetti di Enzastaurin sull'attività delle caspasi 3/7 in cellule TT. \* $P < 0.05$  vs Ct, \*\* $P < 0.01$  vs Ct

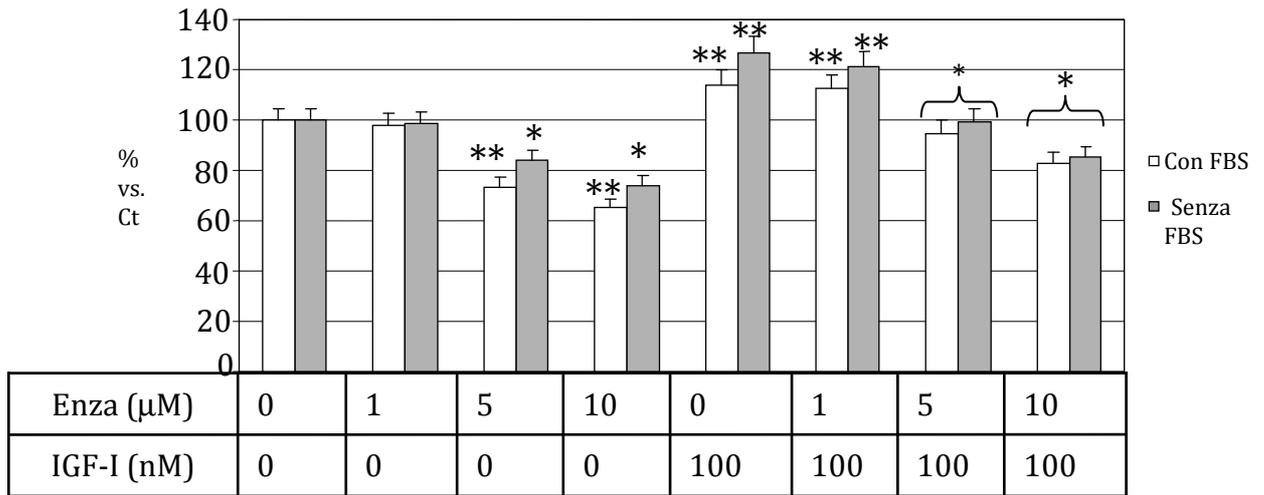
Per verificare gli effetti di Enzastaurin sulla secrezione di calcitonina nelle cellule TT, la concentrazione di CT è stata valutata con metodica ELISA in medium di coltura di cellule TT trattate con Enzastaurin 1-10  $\mu\text{M}$ , da sola o in combinazione con IGF-I 100nM (figura 17). Enzastaurin non ha effetti sulla secrezione basale di CT, invece l'IGF-I induce significativamente la concentrazione di CT in medium condizionato di colture primarie ( $P < 0.02$ ). Gli effetti di IGF-I sul rilascio di CT erano significativamente ridotti dalla co-incubazione con Enzastaurin 5 e 10  $\mu\text{M}$  (-29 e -40% rispettivamente;  $P < 0.02$ ).



**FIGURA 17:** Effetti di Enzastaurin sulla secrezione di Calcitonina in cellule TT.  
\* $P < 0.05$  vs Ct, \*\* $P < 0.01$  vs Ct

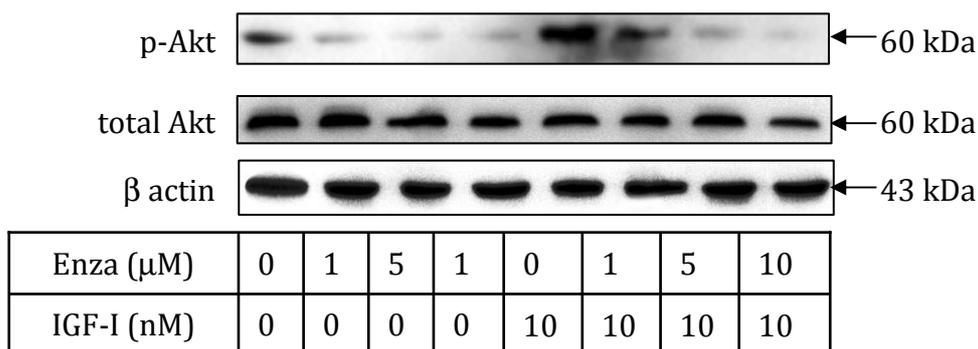
### **EFFETTI DI ENZASTAURIN SULLA FOSFORILAZIONE DI GSK3 $\beta$ E AKT IN CELLULE BON1**

GSK3 $\beta$ (Ser9) è un target a valle sia della PKC che di Akt, pertanto una sua down regulation riflette un'inibizione di questi due pathway del segnale, entrambe target di Enzastaurin. È stata valutata la fosforilazione di GSK3 $\beta$ (Ser9) in cellule BON1 in seguito a trattamento con Enzastaurin 1-10  $\mu\text{M}$  (figura 18) abbiamo verificato che in presenza di siero Enzastaurin riduce significativamente la fosforilazione di GSK3 $\beta$ (Ser9) sia a 5 che 10  $\mu\text{M}$  (-26 e -34% rispettivamente;  $P < 0.01$  vs il controllo;  $\text{IC}_{50} = 13.55 \mu\text{M}$ ), e un basso effetto in assenza di siero (-16 e -26%;  $P < 0.05$  vs il controllo;  $\text{IC}_{50} = 18.6 \mu\text{M}$ ). Nessun effetto è stato invece osservato con Enzastaurin 1  $\mu\text{M}$ , sia in presenza che in assenza di siero. Al contrario l'IGF-I stimola significativamente la fosforilazione di GSK3 $\beta$ (Ser9) sia in presenza che in assenza di siero (+14 e +27% rispettivamente;  $P < 0.01$  vs il controllo) effetto quest'ultimo contrastato in modo dose-dipendente dalla co-incubazione con Enzastaurin.



**FIGURA 18:** Effetti di Enzastaurin sulla fosforilazione di GSK3β(Ser9) in cellule BON1. \*P<0.05 vs Ct, \*\*P<0.01 vs Ct

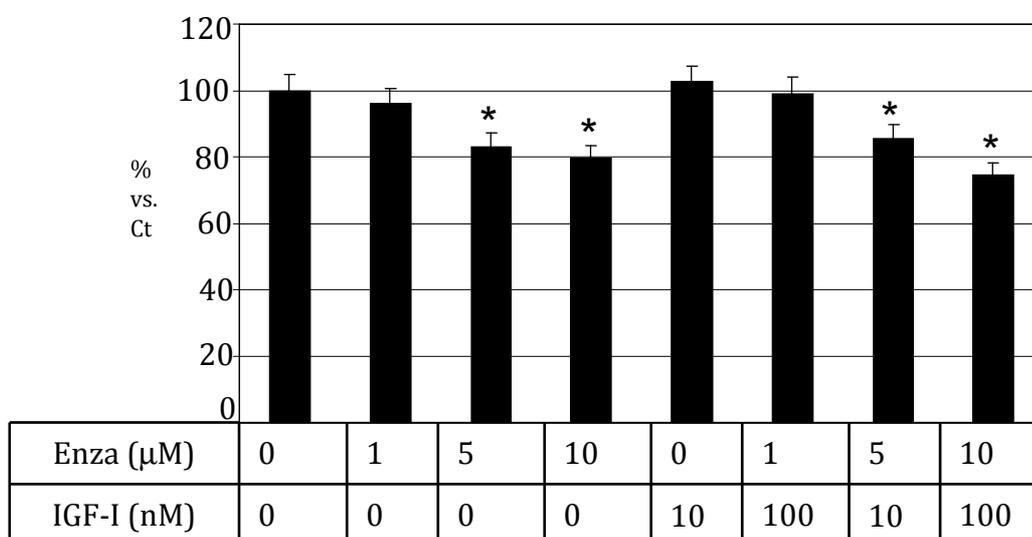
È stata anche valutata la fosforilazione di Akt dopo incubazione con Enzastaurin 1-10 μM. Come mostrato in figura 19 in presenza di siero Enzastaurin riduce significativamente ed in modo dose dipendente la fosforilazione di Akt(Ser473), con un basso effetto in assenza di siero. Al contrario, l'IGF-I stimola significativamente la fosforilazione di Akt(Ser473) sia in presenza che in assenza di siero, effetti questi contrastati da Enzastaurin.



**FIGURA 19:** Effetti di Enzastaurin sulla fosforilazione di Akt (Thr473) in cellule BON1.

## EFFETTI DI ENZASTAURIN SULLA FOSFORILAZIONE DI GSK3 $\beta$ E AKT IN CELLULE TT

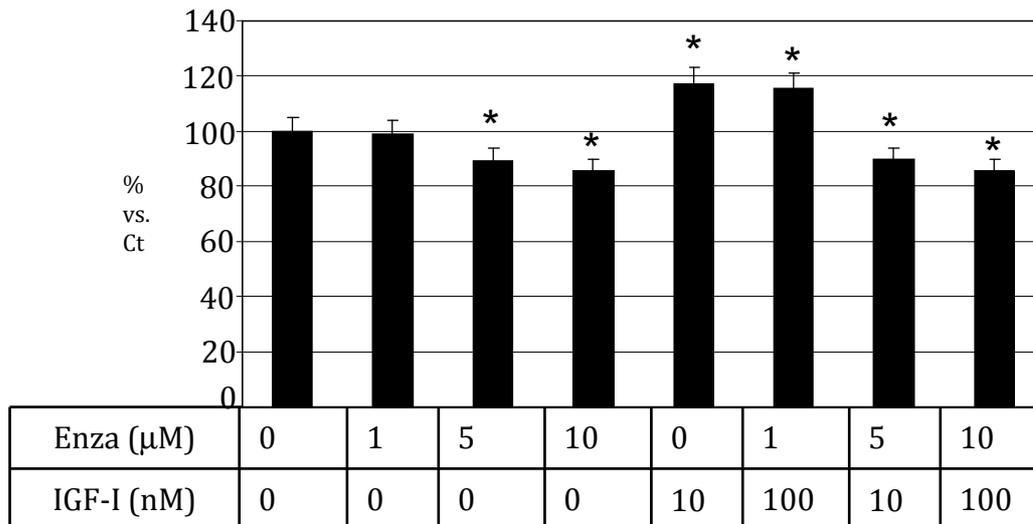
La fosforilazione di GSK3 $\beta$ (Ser9) e Akt(Ser473) è stata anche valutata nella linea cellulare TT in seguito a trattamento con Enzastaurin 1-10  $\mu$ M. Abbiamo verificato che la fosforilazione di Akt(Ser473) viene significativamente ridotta da Enzastaurin 5 e 10  $\mu$ M (-17 e -20% rispettivamente;  $P < 0.05$  vs il controllo;  $IC_{50} = 23.2 \mu$ M). IGF-I non modifica in modo significativo la fosforilazione di Akt(Ser473) e non reverte gli effetti inibitori di Enzastaurin (figura 20).



**FIGURA 20:** Effetti di Enzastaurin sulla fosforilazione di Akt(Thr473) in cellule TT.

\* $P < 0.05$  vs Ct

Per quanto riguarda la fosforilazione di GSK3 $\beta$ (Ser9), Enzastaurin 5 e 10  $\mu$ M riduce significativamente tale fosforilazione nelle cellule TT (-10.4 e 14.4% rispettivamente;  $P < 0.05$  vs il controllo;  $IC_{50} = 32.8 \mu$ M). IGF-I induce significativamente la fosforilazione di GSK3 $\beta$ (Ser9) (+16%;  $P < 0.05$  vs il controllo), ma non reverte gli effetti inibitori di Enzastaurin (figura 21).

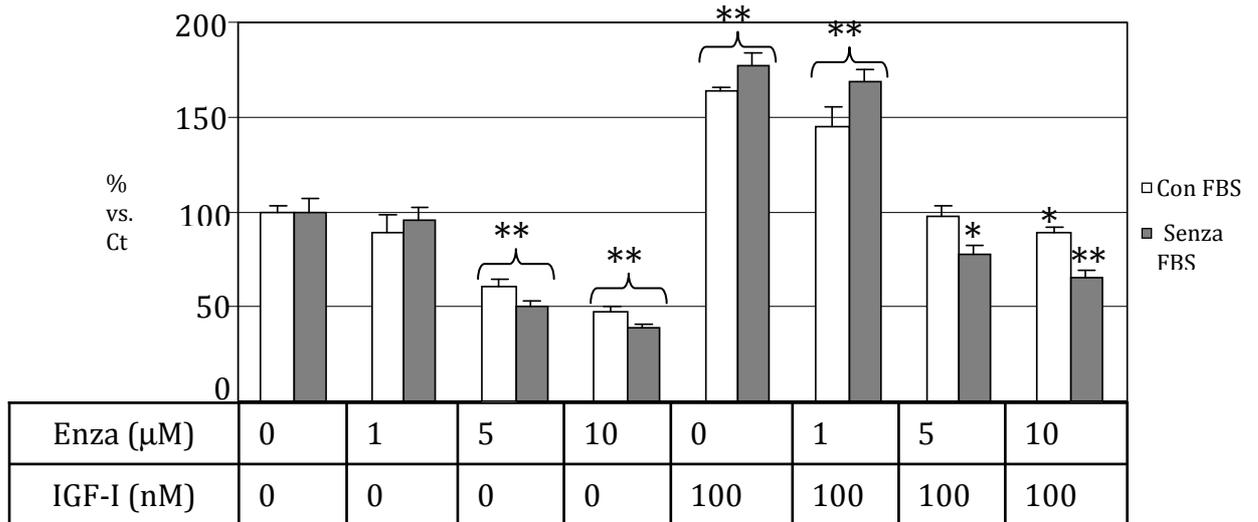


**FIGURA 21:** Effetti di Enzastaurin sulla fosforilazione di GSK3 $\beta$ (Ser9) in cellule TT.

\*P<0.05 vs Ct, \*\*P<0.01 vs Ct

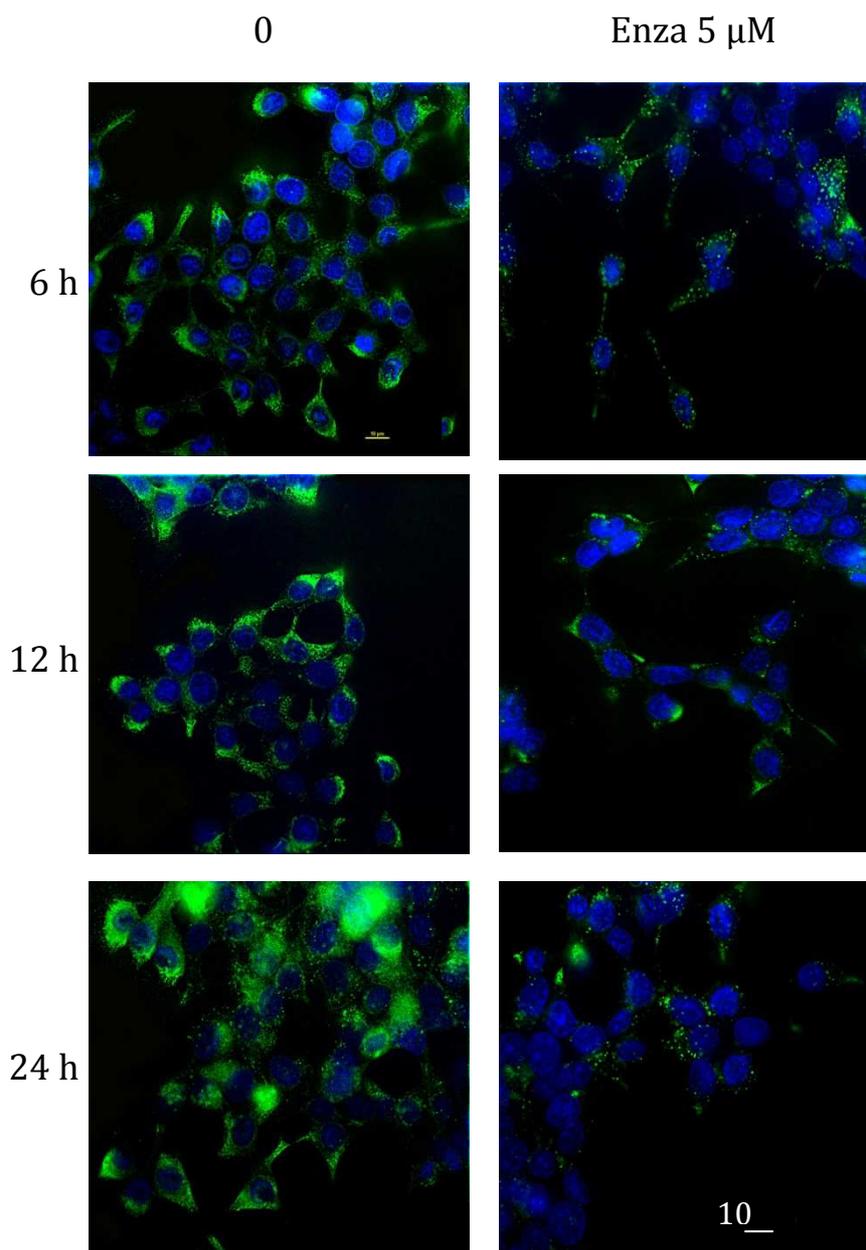
### **EFFETTI DI ENZASTAURIN SULLA SECREZIONE ED ESPRESSIONE DI CgA**

Per verificare se Enzastaurin potesse influenzare la secrezione di CgA nelle cellule BON1, la concentrazione di tale ormone è stata valutata in medium condizionato dopo 6 ore di incubazione. Come mostrato in figura 22 in presenza di siero Enzastaurin riduce significativamente la secrezione di CgA a 5 e 10  $\mu$ M (-40 e -50% rispettivamente; P<0.01 vs il controllo; IC<sub>50</sub> = 9  $\mu$ M). Un maggiore effetto inibitorio era osservato in assenza di siero ad entrambe le concentrazioni (-50 e -60% rispettivamente; P<0.01 vs il controllo). Al contrario, l'IGF-I stimola significativamente la secrezione di CgA sia in presenza che in assenza di siero (+64 e +77% rispettivamente; P<0.01 vs il controllo), effetto questo contrastato in modo dose-dipendente dalla co incubazione con Enzastaurin. Staurosporina, usata come controllo negativo, non influenza la secrezione di CgA.



**FIGURA 22:** Effetti di Enzastaurin sulla secrezione di CgA in cellule BON1. \*P<0.05 vs Ct, \*\*P<0.01 vs Ct

Per valutare se l'effetto inibitorio di Enzastaurin sulla secrezione di CgA fosse causata da una riduzione della sua produzione, sono stati eseguiti anche esperimenti di immunofluorescenza con un Ab diretto contro la CgA. È stato osservato che Enzastaurin riduce marcatamente la fluorescenza per la CgA dopo 6 e 24 (figura 23).

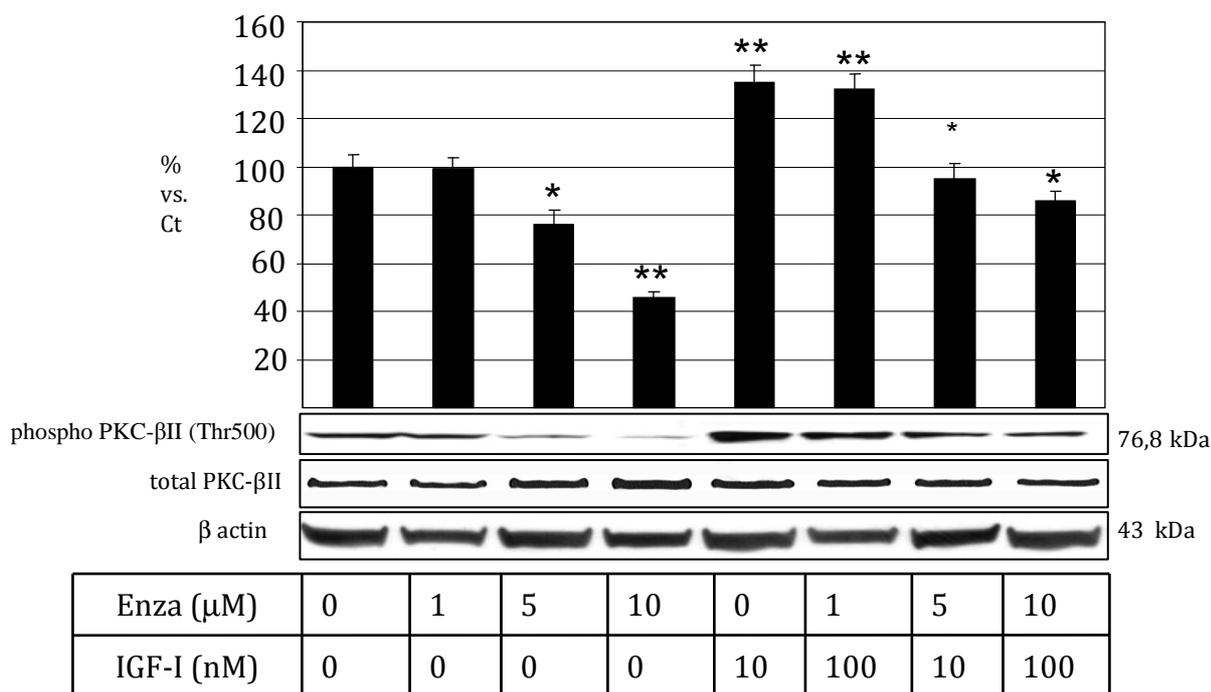


**FIGURA 23:** Effetti di Enzastaurin sulla localizzazione ed espressione di CgA in cellule BON1

### **EFFETTI DI ENZASTAURIN SULLA FOSFORILAZIONE DI PKC $\beta$ II(Thr500) IN CELLULE TT**

Studi hanno dimostrato che Enzastaurin inibisce p70S6K oltre che diverse isoforme di PKC<sup>227</sup>. I nostri risultati dimostrano che Enzastaurin non influenza

l'espressione e l'attività di p70S6K in colture primarie di MTC e nemmeno in cellule TT, supportando che il pathway del segnale di PKC è quello maggiormente coinvolto nel nostro modello. Noi pertanto abbiamo voluto valutare, in seguito a trattamento con Enzastaurin lo stato di fosforilazione di PKC $\beta$ II in Thr 500, sede del loop per l'auto-fosforilazione e attivazione di tale isoforma (acquisizione competenza catalitica). Come mostrato in figura 24 Enzastaurin non ha alcun effetto sui livelli di PKC $\beta$ II totale, ma riduce significativamente la fosforilazione di PKC $\beta$ II(Thr500) a 5 e 10  $\mu$ M (-24 e -54.3% rispettivamente; P<0.05 e P<0.01 vs il controllo; IC<sub>50</sub> = 9.4  $\mu$ M). IGF-I induce significativamente la fosforilazione di PKC $\beta$ II(Thr500) (+35%; P<0.01) e contrasta gli effetti inibitori di Enzastaurin. Nessuna variazione dei livelli di espressione sono stati osservati per l'isoforma totale e fosforilata (Thr505) di PKC $\delta$  in seguito a trattamento con Enzastaurin. Questi dati rafforzano ulteriormente l'ipotesi del diretto coinvolgimento dell'isoforma PKC $\beta$ II nel meccanismo d'azione di Enzastaurin, escludendo il possibile coinvolgimento di altre isoforme.

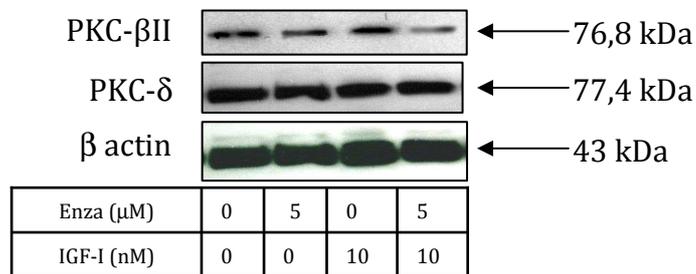


**FIGURA 24:** Effetti di Enzastaurin sulla fosforilazione di PKC $\beta$ II(Thr500) in cellule TT.

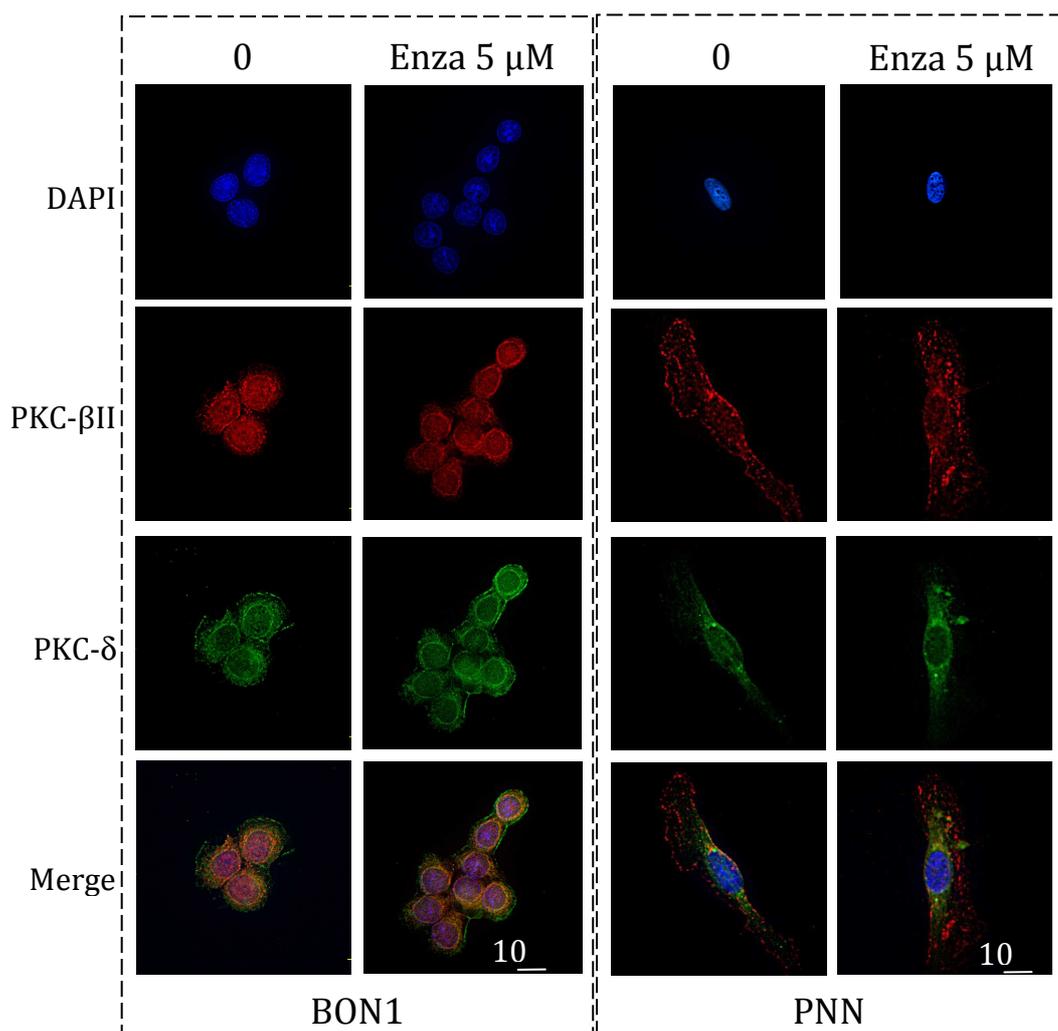
\*P<0.05 vs Ct, \*\*P<0.01 vs Ct

## ESPRESSIONE E LOCALIZZAZIONE DI PKC IN CELLULE BON1 E IN COLTURE PRIMARIE DI PETs

Il livello di espressione e la localizzazione di PKC $\beta$ II e di PKC $\delta$  nelle cellule BON1 è stato valutato mediante western blot ed immunofluorescenza. Come mostrato in figura 25 entrambe le isoforme sono espresse nelle cellule BON1, con differente localizzazione intracellulare. PKC $\beta$ II ha un pattern punteggiato con localizzazione prevalentemente citoplasmatica e nucleare, mentre PKC $\delta$  è localizzata soprattutto a livello della membrana citoplasmatica, nella regione perinucleare e presenta anch'essa un pattern punteggiato a livello citoplasmatico. Dopo trattamento con Enzastaurin 5  $\mu$ M, PKC $\beta$ II si localizzava completamente a livello della regione perinucleare mentre la localizzazione di PKC $\delta$  non ha subito cambiamenti. In colture primarie di PET, PKC $\beta$ II era localizzata a livello della membrana plasmatica, mentre PKC $\delta$  era anche presente nella regione perinucleare. Dopo trattamento con Enzastaurin 5  $\mu$ M, PKC $\beta$ II era completamente de localizzata a livello citoplasmatico con un pattern punteggiato, mentre la localizzazione di PKC $\delta$  non subiva cambiamenti (figura 26).



**FIGURA 25:** Effetti di Enzastaurin sull'espressione di PKC $\beta$  e PKC $\delta$  in cellule BON1

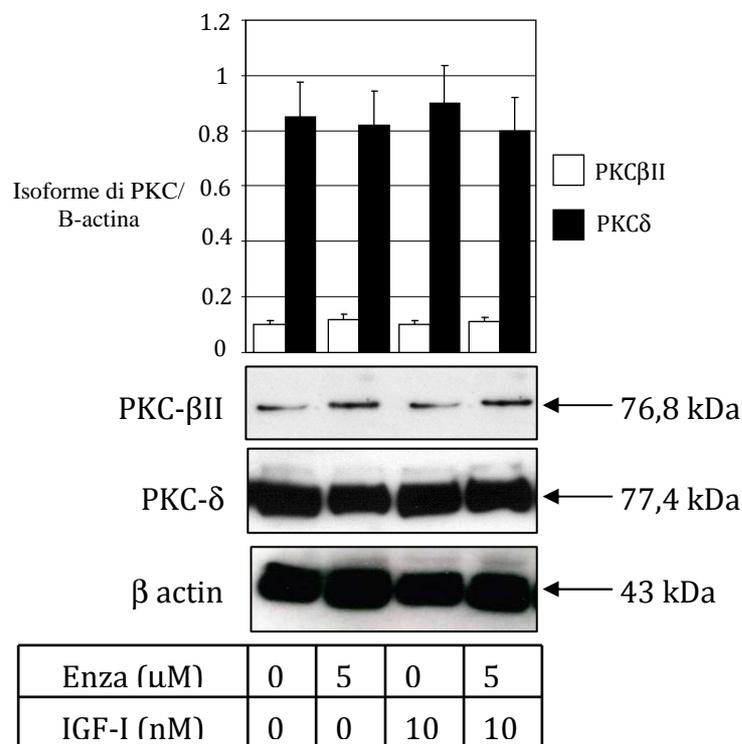


**FIGURA 26:** Effetti di Enzastaurin sulla localizzazione di PKC $\beta$ II e PKC $\delta$  in cellule BON1 ed in colture primarie di PETs.

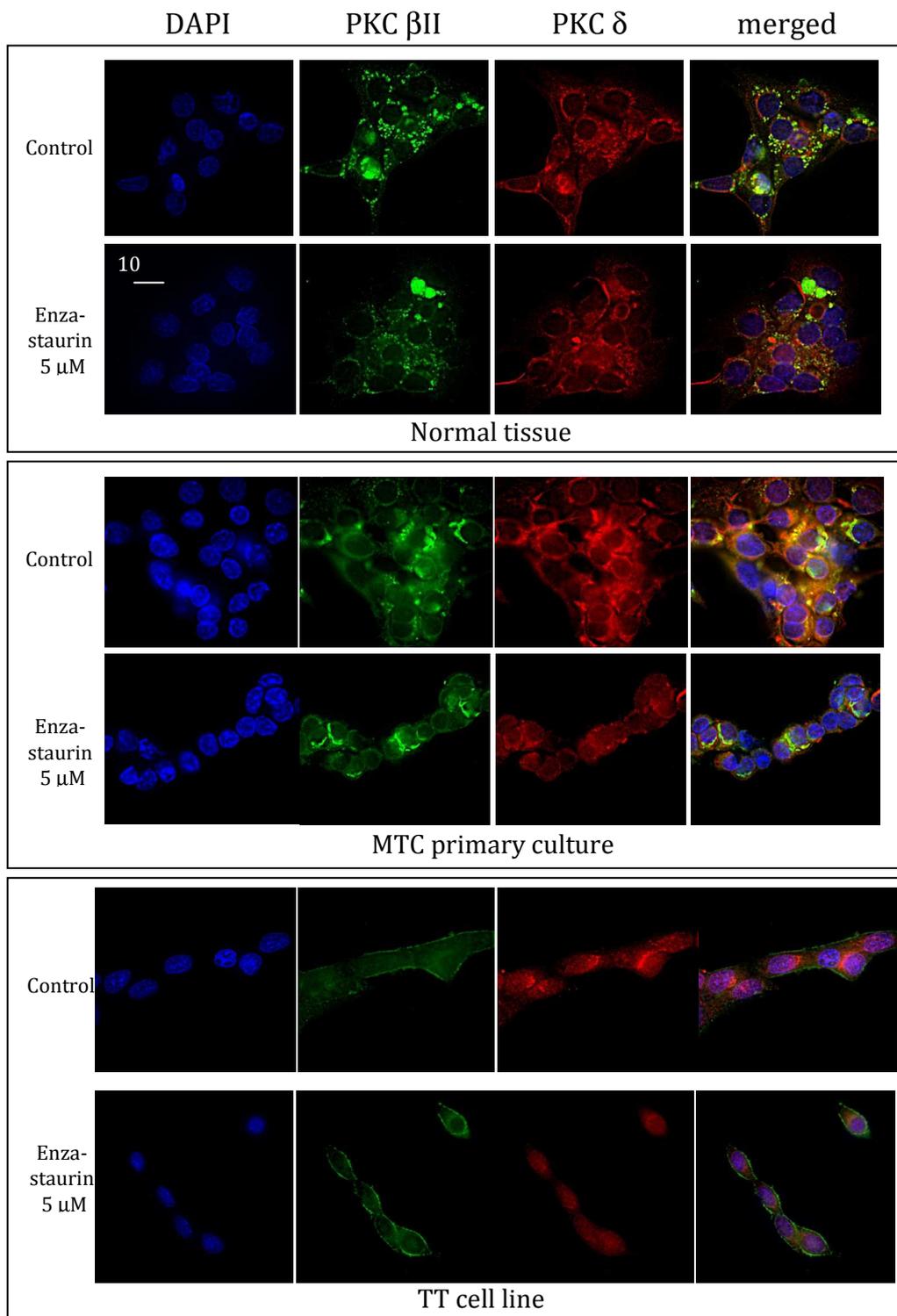
### ESPRESSIONE E LOCALIZZAZIONE DI PKC IN CELLULE TT E IN COLTURE PRIMARIE DI MTC

Il livello di espressione e la localizzazione di PKC $\beta$ II e di PKC $\delta$  è stata valutata anche nelle cellule TT e in colture primarie di MTC. Come mostrato in figura 27 entrambe le isoforme sono espresse nelle cellule TT. Il livello di espressione di entrambe non cambia nelle cellule TT in seguito a trattamento con Enzastaurin e/o IGF-I. Come mostrato in figura 28 , PKC $\beta$ II e PKC $\delta$  mostrano differenti localizzazioni intracellulari in campioni di tessuto tiroideo normale, in colture primarie di MTC ed in

cellule TT. In cellule provenienti da tessuto tiroideo normale, che include sia cellule follicolari che parafollicolari, PKC $\beta$ II mostra un pattern punteggiato soprattutto a livello citoplasmatico. Dopo trattamento con Enzastaurin, tale isoforma diffonde nel citoplasma ed è presente a bassi livelli anche nel nucleo. PKC $\delta$  si localizza soprattutto a livello della membrana citoplasmatica e nella regione perinucleare, e la sua localizzazione non cambia in seguito a trattamento con Enzastaurin. In colture primarie di MTC, PKC $\beta$ II era localizzata soprattutto a livello citoplasmatico con pattern punteggiato, e nucleare ed in seguito a trattamento con Enzastaurin si condensa in un ancora più evidente pattern punteggiato. PKC $\delta$  presenta una localizzazione citoplasmatica con pattern parzialmente punteggiato che non viene modificata in seguito a trattamento con Enzastaurin. In cellule TT, PKC $\beta$ II è localizzata soprattutto a livello della membrana citoplasmatica e diffonde nel citoplasma in seguito a trattamento con Enzastaurin. Al contrario, PKC $\delta$  ha una localizzazione prevalentemente citoplasmatica e perinucleare e trasloca leggermente a livello nucleare dopo trattamento con Enzastaurin.



**FIGURA 27:** Effetti di Enzastaurin sull'espressione di PKC $\beta$  e PKC $\delta$  in cellule TT.



**FIGURA 28:** Effetti di Enzastaurin sulla localizzazione di PKC $\beta$ II e PKC $\delta$  in tessuto normale tiroideo, in colture primarie di MTC ed in cellule TT.

## 7. DISCUSSIONE

I recenti progressi nella comprensione dei meccanismi molecolari della crescita e metastatizzazione dei tumori hanno consentito di identificare una serie di molecole che trasducono segnali chiave per il controllo della proliferazione cellulare, dell'angiogenesi e dell'apoptosi. Recenti evidenze sperimentali hanno dimostrato che le stesse molecole espresse in modo alterato durante i processi di crescita e metastatizzazione dei tumori vengono attivate dalle cellule tumorali per sfuggire alla morte indotta dalla chemioterapia e dalla radioterapia, determinando resistenza a tali trattamenti convenzionali. Un vasto numero di molecole di segnale è stato quindi considerato come un bersaglio potenzialmente rilevante per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche dei tumori e, conseguentemente, sono stati sviluppati numerosi inibitori farmacologici selettivi che interferiscono con la sintesi e la funzione di tali molecole. Tuttavia, proprio il progressivo arricchimento delle conoscenze sulle interazioni funzionali tra le molecole importanti nella trasduzione di segnali di crescita e metastatizzazione tumorale ha reso evidente il grado di complessità e di ridondanza del sistema, con la conseguente difficoltà di identificare bersagli realmente cruciali ed efficaci.

La protein chinasi C (PKC) è considerata una chiave nella regolazione della proliferazione cellulare, differenziazione, e apoptosi ed è inoltre uno dei maggiori target nella terapia antineoplastica. Le diverse isoforme della PKC sono coinvolte nella trasformazione neoplastica, carcinogenesi, invasione e resistenza ai farmaci antineoplastici<sup>228</sup>. Il chiarimento dei meccanismi più fini controllati dalle isoforme delle PKC in corso di proliferazione ed apoptosi delle cellule tumorali potrebbe consentire miglioramenti selettivi dell'efficacia della chemioterapia. Inoltre il ruolo di PKC nella tumorigenesi è complesso e dipende largamente dal tipo di cellule/tessuto e dal tipo di isoenzima di PKC coinvolta (<sup>229</sup>).

Enzastaurin è un inibitore della PKC $\beta$ , studiato per sopprimere la crescita tumorale tramite un esclusivo meccanismo di azione. I dati preclinici suggeriscono che essa attacchi il tumore in tre modi: riducendo la capacità delle cellule di dividersi (proliferazione cellulare), intensificando la morte naturale delle cellule tumorali

(apoptosi), ed inibendo l'irrorazione ematica indotta dal tumore (angiogenesi). I dati hanno suggerito che l'Enzastaurin inibisca i segnali nelle vie PKC- $\beta$  e PI3K/AKT. Alcuni studi hanno mostrato che queste vie vengono attivate in un'ampia gamma di tumori. Oltre al linfoma non Hodgkin, l'Enzastaurin è attualmente studiata come trattamento per altri tipi di tumori, compresi il glioblastoma, il cancro coloretale, il cancro al polmone non a piccole cellule, il cancro al pancreas, e il linfoma delle cellule mantellari.

In questo studio noi abbiamo dimostrato che Enzastaurin esercita un effetto antiproliferativo anche sulle colture primarie di PETs e sulla rispettiva linea cellulare. Per ottenere dei risultati omogenei e lineari, per questo studio sono state selezionate colture primarie derivanti da tumori neuroendocrini pancreatici. Nonostante i differenti TNM, lo stadio ed il grado dei diversi PETs, le colture primarie hanno mostrato una simile risposta al trattamento con Enzastaurin, con riduzione della vitalità cellulare ad una concentrazione di farmaco simile a quella osservata in circolo negli studi clinici<sup>230</sup>. Un recente studio ha riportato che Enzastaurin raggiunge basse concentrazioni plasmatiche (2.2  $\mu$ M) in pazienti trattati con concentrazioni giornaliere di 525 mg per os. Tuttavia, si deve anche tener conto che il 95% di Enzastaurin in circolo è legata alle proteine plasmatiche, quindi la concentrazione di farmaco nel sito del tumore potrebbe essere molto diversa da quella osservata a livello plasmatico. Inoltre, non è stata registrata alcuna risposta, con stabilizzazione della malattia nel 45% dei pazienti in fase I degli studi clinici che hanno ricevuto il trattamento con Enzastaurin 525 mg/day per os (<sup>231</sup>). Questi risultati, insieme ai nostri dati potrebbero suggerire che concentrazioni plasmatiche di Enzastaurin superiori a 2.2  $\mu$ M potrebbero essere necessari al fine di osservare effetti biologici maggiormente rilevanti. Poiché tali concentrazioni plasmatiche non sono state raggiunte con dosi di Enzastaurin ancora più alte (700 mg / die), potrebbe essere utile l'iniezione diretta del farmaco direttamente nel sito del tumore.

È stato inoltre osservato un effetto antisecretorio, poiché Enzastaurin è in grado di ridurre sia la secrezione basale di CgA ed insulina che quella indotta da IGF-I. Questi dati sono in linea con studi precedenti, che dimostrano che PKC gioca un ruolo cruciale nei processi secretori sia delle cellule pancreatiche insulina-secerenti normali

che neoplastiche (<sup>232</sup>), indicando che l'inibizione di PKC può rappresentare un utile terapia farmacologico anche per le PETs.

È stato precedentemente dimostrato che Enzastaurin, a concentrazioni richieste in studi clinici, inibisce in modo diretto la proliferazione ed induce l'apoptosi di cellule in coltura e tumori trapiantati sopprimendo la fosforilazione di Akt e dei suoi target a valle quali GSK3 $\beta$  e p70S6K (<sup>233</sup>). I nostri dati sono in linea con queste evidenze, in quanto Enzastaurin nelle nostre condizioni sperimentali down regola la fosforilazione di Akt, sia basale che IGF-I indotta. Precedenti studi, hanno inoltre sottolineato l'importanza del pathway del segnale di PI3K/Akt nel mediare gli effetti inibitori di PKC, mostrando che la fosforilazione di Akt e GSK3 $\beta$ , un target a valle di Akt, è ridotta dopo trattamento con Enzastaurin (<sup>234</sup>). I nostri risultati sono in linea con questi studi, poiché noi abbiamo osservato che Enzastaurin alle stesse concentrazioni (5-10  $\mu$ M) è capace di bloccare gli effetti proliferativi indotti dall'IGF-I, il quale attiva il pathway del segnale di PI3K/Akt. Questa evidenza è ulteriormente rafforzata dalla dimostrazione che sia la fosforilazione basale di Akt e GSK3 $\beta$  che quella IGF-I indotta sono ridotte dal trattamento con Enzastaurin, suggerendo che Enzastaurin può controllare la proliferazione cellulare dei PETs ostacolando il segnale a valle dell'IGF-I. Inoltre, questi dati suggeriscono che, PKC può essere un importante segnale proliferativo a valle del pathway del segnale dell'IGF-I.

L'importanza del ruolo dell'IGF-I nel controllo della proliferazione dei tumori neuroendocrini è rafforzata dal fatto che c'è un'alta o costitutiva espressione di IGF-I, IGF-II e IGF-Receptors nei tumori neuroendocrini gastroenteropancreatici (<sup>235</sup>). Inoltre, il segnale IGF-I dipendente promuove tumori genesi ed incrementa la secrezione ormonale nelle linee cellulari di GEP-NET (<sup>236</sup>). I nostri dati confermano che la proliferazione cellulare nei PETs è promossa dall'IGF-I, come già precedentemente dimostrato (<sup>237</sup>), e indicano che gli effetti proliferativi di IGF-I sono bloccati dall'inibizione della PKC, con riduzione sia della vitalità cellulare che della sintesi del DNA. Quest'ultimo ridotto in misura maggiore rispetto alla vitalità cellulare, suggerisce un importante effetto sulla replicazione del DNA. Queste evidenze sono in linea con precedenti risultati che indicano che Enzastaurin down regola l'espressione di geni coinvolti nel ciclo cellulare (<sup>238</sup>), inclusa la ciclina D, la quale controlla la transizione del ciclo cellulare in fase G1/S. questo effetto era ancora più marcato in assenza di siero, indicando che i fattori di crescita contenuti nel siero (incluso l'IGF-I e l'insulina)

possono esercitare un'azione protettiva nei confronti degli effetti antiproliferativi di Enzastaurin. Questa ipotesi è ulteriormente rafforzata dall'evidenza che gli effetti pro-apoptotici di Enzastaurin sono più evidenti in assenza di siero. Infatti, i nostri dati mostrano che Enzastaurin esercita il suo effetto antiproliferativo mediante induzione dell'apoptosi, in linea con precedenti studi su differenti modelli cellulari (<sup>239</sup>). Migliori effetti antiproliferativi possono essere ottenuti combinando Enzastaurin, anche se gli studi clinici in fase II hanno riportato risultati molto limitati in termini di risposta, con Pemetrexed, Carboplatino e Bevacizumab nel tumore polmonare non a piccole cellule (<sup>240</sup>), o con Gemcitabina nel tumore del pancreas esocrino ma non hanno mostrato un miglioramento di efficacia (<sup>241</sup>).

I nostri risultati supportano l'ipotesi che il pathway delle PKC può giocare un importante ruolo nella promozione della sopravvivenza cellulare nei PETs, per cui la sua inibizione mediante Enzastaurin attiva l'apoptosi, mentre la stimolazione mediata dall'IGF-I ha effetti anti-apoptotici. Tuttavia, in questo studio gli effetti anti-apoptotici di IGF-I non sono così evidenti in assenza di siero in cellule non trattate, mentre invece si osservano in cellule trattate con Enzastaurin. Questi risultati suggeriscono che l'IGF-I promuove la proliferazione cellulare nei PETs non solo proteggendo le cellule dall'apoptosi, ma anche mediante diretta stimolazione della replicazione del DNA e divisione cellulare. Inoltre, l'IGF-I non è in grado di revertire completamente gli effetti antiproliferativi dell'inibizione di PKC, suggerendo che l'azione di Enzastaurin può essere trasmessa anche da una via di segnalazione indipendente da quella dell'IGF-I.

È stato precedentemente dimostrato che l'IGF-I induce la secrezione di CgA, un marker di secrezione neuroendocrina in cellule BON1 attivata da PI3-kinase (<sup>242</sup>). I nostri risultati mostrano che Enzastaurin riduce in maniera significativa sia la secrezione che l'espressione di CgA, effetto questo in parte contrastato da IGF-I, che suggerisce la capacità del farmaco di controllare l'attività secretoria nei PETs. In cellule neuroendocrine di prostata la CgA induce l'overespressione di proteine anti-apoptotiche servivi, con un meccanismo che implica la fosforilazione di Akt (<sup>243</sup>), suggerendo che la CgA ha effetti anti-apoptotici. Nonostante i nostri dati non forniscano una diretta evidenza di un effetto anti-apoptotico della CgA nelle cellule BON1, noi possiamo ipotizzare che la sua riduzione può in parte mediare gli effetti anti-proliferativi di Enzastaurin osservati, poiché quest'ultimo inibisce la secrezione e la produzione di CgA.

Molte cellule co-esprimono multiple isoforme di PKC la cui specificità dei substrati è stata attribuita ad interazioni isoforma-specifica con varie proteine di ancoraggi che localizzano le isoforme di PKC in specifici domini di membrana (<sup>244</sup>). Precedenti studi hanno dimostrato che PKC $\beta$ II trasloca in differenti compartimenti subcellulari, sotto differenti stimoli<sup>245</sup>. I nostri dati dimostrano che PKC $\beta$ II è localizzata prevalentemente a livello nucleare e citoplasmatico nelle cellule BON1, e trasloca nella regione perinucleare dopo trattamento con Enzastaurin, suggerendo la completa inattivazione dell'enzima (<sup>246</sup>). Al contrario, PKC $\delta$  è localizzata a livello della membrana plasmatica, nei compartimenti citoplasmatici e nel nucleo, ma non subisce alcun cambiamento in seguito a trattamento con Enzastaurin. Questi dati possono suggerire che PKC $\delta$  è in uno stato attivo (a livello della membrana plasmatica) sia in assenza che in presenza di inibitore di PKC, indicando che tale isoforma è solo leggermente influenzata dal trattamento con Enzastaurin. Questa ipotesi è ulteriormente rafforzata dai risultati riportati sulle colture primarie di PETs. Tuttavia, la localizzazione delle isoforme di PKC non è costantemente legata allo stato di attivazione dell'enzima, ulteriori studi sono pertanto necessari per meglio chiarire questa questione nei PETs. I nostri dati dimostrano che almeno 2 isoforme di PKC sono espresse nelle cellule BON1, anche se a livelli diversi, e che i loro livelli di espressione non cambiano in seguito ad agenti stimolatori (IGF-I) o inibitori (Enzastaurin). Questa evidenza suggerisce che Enzastaurin riduce l'attività delle isoforme di PKC (in termini di riduzione di substrati effettori a valle) ma non ha alcun effetto sulla loro espressione.

In sommario, i nostri risultati dimostrano che Enzastaurin riduce la crescita cellulare, almeno in parte mediante induzione dell'apoptosi, così come la secrezione ed espressione di CgA nelle colture primarie di PETs e nella linea cellulare BON1, con un meccanismo che implica l'inibizione di PKC, suggerendo che PKC può rappresentare un nuovo target farmacologico nella terapia medica dei tumori neuroendocrini pancreatici.

Dato il potenziale delle isoforme di PKC nel regolare il pathway di trasduzione del segnale in modo da promuovere o inibire la trasformazione, alterazioni nella loro funzione possono verificarsi durante la progressione di diversi tumori umani inclusi quelli tiroidei in cui PKC $\beta$  e PKC $\delta$  risultano overespresse (<sup>247</sup>). Sia nelle colture primarie che nella linea cellulare di MTC è stato dimostrato che Enzastaurin riduce la

proliferazione cellulare. Solo le colture primarie derivanti da MTC sono state selezionate per questo studio al fine di mantenere l'omogeneità del tessuto più alta possibile. I tessuti derivano da pazienti con diverse caratteristiche (età, sesso, problemi genetici) e malattia a diversi stadi. Tuttavia le colture primarie mostrano una risposta simile al trattamento con Enzastaurin, mostranodo una riduzione significativa della vitalità cellulare ad alte concentrazioni. Gli effetti antiproliferativi di Enzastaurin sono stati osservati con una  $IC_{50}$  di approssimativamente 10  $\mu$ M, che risulta maggiore rispetto alla concentrazione plasmatica di 2,2  $\mu$ M riportata negli studi clinici in pazienti trattati con 525 mg/d per os (<sup>248</sup>). Questi ultimi studi indicano che un'alta concentrazione plasmatica non viene raggiunta, nemmeno con alte dosi (700mg/die) perché la quantità di farmaco che si lega alle proteine plasmatiche è alta. Questi dati, insieme ai nostri suggeriscono che un rilascio diretto del farmaco nel sito del tumore o una modifica stessa del farmaco è necessaria al fine di ottenere risultati clinici migliori. Infatti, i nostri risultati forniscono evidenze riguardo all'inibizione di PKC che può essere veramente utile nella regolazione degli MTC. È stato inoltre osservato che l'inibizione di PKC induce l'apoptosi, e questo dato è in linea con studi precedenti (<sup>249</sup>).

È stato anche osservato che l'inibizione di PKC determina una riduzione della secrezione di CT indotta dall'IGF-I, sia in colture primarie che nella linea cellulare di MTC, suggerendo che PKC può regolare la secrezione di CT in risposta a stimoli secretori. Questi risultati sono in linea con precedenti studi, che dimostrano che l'infusione di insulina in animali induce la secrezione di CT (<sup>250</sup>), suggerendo che i peptidi insulin-like possono avere effetti simili negli umani. Uno studio recente ha mostrato che livelli di pro-CT plasmatici correlano in modo significativo con i livelli di insulina in soggetti obesi a digiuno (<sup>251</sup>). Studi precedenti hanno anche dimostrato che l'IGF-I promuove la secrezione ormonale mediante modulazione dei canali del calcio (<sup>252</sup>), in linea con i nostri dati che mostrano un effetto stimolatorio di IGF-I sulla secrezione di CT in cellule di MTC.

È noto che Enzastaurin inibisce diverse isoforme di PKC così come p70S6K (<sup>253</sup>). Un coinvolgimento del pathway di PKC è maggiore nel nostro modello sperimentale poiché l'espressione e l'attività di p70S6K non vengono modificate nelle colture primarie di MTC e nemmeno nella linea cellulare TT. In addizione, noi abbiamo osservato un effetto inibitorio di Enzastaurin sulla fosforilazione di PKC $\beta$ II in Thr500, localizzata nel loop di attivazione. Questo step è un prerequisito per l'enzima per

autosfosforilare a sua volta altri siti, così come la Thr642, responsabile della competenza catalitica, e la Ser661 che permette in rilascio della kinasi nel citoplasma (<sup>254</sup>). PKC $\beta$ II sembra essere direttamente coinvolto negli effetti di Enzastaurin. D'altro canto, questi dati non mostrano un coinvolgimento di PKC $\delta$ . Infatti, la fosforilazione PKC $\delta$  in Thr505, step essenziale per l'attivazione enzimatica non è influenzata dal farmaco (<sup>255</sup>). Questi dati supportano l'ipotesi di un diretto coinvolgimento di PKC $\beta$ II e non di PKC $\delta$  nella trasduzione del segnale attivata dal trattamento con Enzastaurin, anche se non si esclude il coinvolgimento di altre isoforme.

Precedenti studi hanno sottolineato l'importanza del pathway del segnale di PI3K/Akt nel mediare l'inibizione di PKC (<sup>256</sup>), mostrando che la fosforilazione di Akt e GSK3 $\beta$ , un target a valle di Akt, si riducono in seguito a trattamento con Enzastaurin (<sup>257</sup>). I nostri risultati sono in linea con questi studi in quanto è stato dimostrato che il farmaco inibisce in modo significativo sia Akt che GSK3 $\beta$  fosforilati, indicando una riduzione del pathway del segnale a valle di PKC. Precedenti studi hanno inoltre dimostrato che PI3K/Akt media il pathway del segnale di RET in cellule C, regolandone la proliferazione cellulare (<sup>258</sup>). I nostri dati supportano l'ipotesi che PKC può controllare la proliferazione cellulare negli MTC mediante il pathway di Akt. I nostri risultati dimostrano anche che IGF-I, noto attivatore del pathway del segnale di PI3k/Akt in molti modelli cellulari (<sup>259</sup>), non influenza l'espressione di Akt fosforilato nelle cellule TT. Questi risultati insieme alle evidenze che IGF-I non influenza la proliferazione cellulare, possono indicare che nelle cellule di MTC il segnale dell'IGF-I non coinvolge Akt, il quale media probabilmente quello proliferativo. D'altro canto, noi abbiamo osservato che IGF-I riduce gli effetti proapoptotici di Enzastaurin, indicando che PKC può regolare la proliferazione cellulare negli MTC mediante il pathway del segnale di Akt, il quale a sua volta non è influenzato da IGF-I, suggerendo che quest'ultimo attiva vie del segnale diverse.

Abbiamo inoltre valutato la fosforilazione di GSK3 $\beta$  in Ser9, la quale è un marker farmacodinamico dell'inibizione di PKC, specialmente sull'attività delle isoforme PKC $\beta$  e PKC $\alpha$ . I nostri dati mostrano che GSK3 $\beta$ (Ser9) è significativamente ridotta da Enzastaurin ed indotta da IGF-I, suggerendo ancora una volta che nel nostro modello sperimentale l'inibizione della PKC $\beta$  è coinvolta negli effetti indotti da Enzastaurin.

Nel complesso questi risultati dimostrano che l'inibizione di PKC riduce la fosforilazione di Akt e GSK3 $\beta$ , suggerendo che Enzastaurin down-regola il sistema ostacolando gli stimoli Akt e GSK3 $\beta$  dipendenti, molto probabilmente agendo mediante la PKC $\beta$ II. Questi risultati non escludono la possibilità che anche altri pathway del segnale e/o altre isoforme di PKC possono essere coinvolte nella mediazione degli effetti osservati ed indicano inoltre che ulteriori studi sono necessari per meglio chiarire il ruolo del sistema PI3K/Akt e GSK3 $\beta$  nella regolazione della proliferazione cellulare e attività secretoria delle cellule C.

È noto che le isoforme di PKC traslocano in differenti compartimenti intracellulari in seguito a diversi stimoli (<sup>260</sup>). I nostri dati mostrano che in campioni di tiroide normale la PKC $\beta$ II è localizzata prevalentemente a livello citoplasmatico, suggerendo che l'enzima, almeno in parte, è nella sua conformazione inattiva. In presenza di Enzastaurin, PKC $\beta$ II diffonde ulteriormente nel citoplasma, suggerendo un incremento della sua inattività. Questi risultati indicano che PKC $\beta$ II è sostanzialmente inattiva nel tessuto normale. In colture primarie di MTC, PKC $\beta$ II è citoplasmatica e si condensa dopo trattamento con Enzastaurin, suggerendo che tale isoforma è per lo più nel suo stato inattivo ed è ulteriormente inattivata da Enzastaurin. A differenza delle colture primarie, in cellule TT la PKC $\beta$ II localizza a livello della membrana plasmatica, e diffonde parzialmente dopo trattamento con Enzastaurin, suggerendo che viene disattivata in seguito a trattamento con Enzastaurin. Per quanto riguarda la PKC $\delta$ , in cellule di tiroide normale è localizzata a livello della membrana plasmatica e quindi è nella sua conformazione attiva. Al contrario, negli MTC e nelle cellule TT la PKC $\delta$  è prevalentemente citoplasmatica, suggerendo che l'enzima è nella sua conformazione inattiva e ha un comportamento diverso tra tessuto normale e neoplastico. In seguito a trattamento con Enzastaurin non si ha un cambiamento di localizzazione di tale isoforma, suggerendo che non è coinvolta nella trasduzione degli effetti mediati dal farmaco. Tuttavia, le diverse localizzazioni delle isoforme di PKC non sempre correlano con il loro stato di attivazione<sup>261</sup>, pertanto ulteriori studi sono necessari per meglio chiarire tale questione negli MTC. Questi dati sottolineano che almeno 2 isoforme di PKC sono espresse nelle cellule di MTC e che la loro espressione non cambia in seguito a trattamento con IGF-I o Enzastaurin. Pertanto gli effetti osservati sono verosimilmente dovuti al decremento dell'attività di PKC piuttosto che ad un decremento della sua espressione.

In conclusione, i nostri risultati dimostrano che le PKC sono coinvolte nel controllo in vitro della proliferazione cellulare degli MTC mediante modulazione dell'apoptosi, con un meccanismo che implica l'inibizione di PKC $\beta$ II e la sua traslocazione in diversi compartimenti intracellulari. Inoltre, i nostri studi forniscono un razionale per ulteriori approfondimenti riguardo al potenziale terapeutico e all'efficacia degli inibitori selettivi di PKC nel controllo degli MTC. Sulla base dell'efficacia in vitro del composto in esame, ulteriori studi inclusi saggi di tumorigenicità in topi trapiantati, sono necessari per valutare l'efficacia di Enzastaurin nel controllo della proliferazione degli MTC in vivo.

## 8. BIBLIOGRAFIA

---

- <sup>1</sup>. William ED, Sandler M. The classification of carcinoid tumours. *Lancet* 1963;1:238-239.
- <sup>2</sup>. Capella C, Heitz PU, Höfler H, et al. Revised classification of neuroendocrine tumors of the lung, pancreas and gut. *Digestion* 1994;55 (Suppl 3):11-23
- <sup>3</sup>. Rindi G, Capella C, Solcia E. Cell biology, clinicopathological profile and classification of gastroenteropancreatic endocrine tumours. *J.Mol.Med.* 1998;76:413-420.
- <sup>4</sup>. Solcia E, Klöppel G, Sobin LH, in collaboration with 9 pathologists from 4 countries. *Histological Typing of Endocrine Tumours*, 2nd edition. WHO International histological classification of tumours. Berlin: Springer Verlag, 2000.
- <sup>5</sup>. Grimelius L, Hultquist GT, Stenkvist B (1975) Cytological differentiation of asymptomatic pancreatic islet cell tumours in autopsy material. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 365:275-288.
- <sup>6</sup>. Kimura W, Kuroda A, Morioka Y (1991). Clinical pathology of endocrine tumors of the pancreas. Analysis of autopsy cases. *Dig Dis Sci* 35:933-942.
- <sup>7</sup>. Kovacs K, Asa SL (1998). *Functional Endocrine Pathology* 2nd ed. Blackwell Science Inc: Oxford, Boston.
- <sup>8</sup>. Lubensky I (2002). Endocrine pancreas. In: *Endocrine Pathology*, LiVolsi VA, Asa SL, eds. Churchill Livingstone: Philadelphia, pp.205-235.
- <sup>9</sup>. Roth J, Komminoth P, Kloppel G, Heitz PU (1996). Diabetes and the endocrine pancreas. In: *Anderson's Pathology*, Damjanov I, Linder J, eds 10th ed. Mosby-Year Book Inc: St. Louis, pp 2042-2070.
- <sup>10</sup>. Solcia E, Kloppel G, Sobin LH (2000) *WHO Histological Classification of Tumours. Histological Typing of Endocrine Tumours*, 2nd ed. Springer Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, Geneva.
- <sup>11</sup>. Bonner-Weir S, Baxter LA, Schuppin GT, Smith FE. A second pathway for re generation of adult exocrine and endocrine pancreas. *Diabetes* 1993;42:1715-1720.

- 
- <sup>12</sup>. Smith FE, Rosen KM, Villa-Komaroff L, et al. Enhanced insulin-like growth factor I gene expression in regenerating rat pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;6152-6156.
- <sup>13</sup>. Heitz PU. Pancreatic endocrine tumors. In: Klöppel G, Heitz PU, eds. *Pancreatic Pathology*. Edinburgh: Churchill-Livingstone, 1984:206-232.
- <sup>14</sup>. Capella C, Heitz PU, Höfler H, et al. Revised classification of neuroendocrine tumours of the lung, pancreas and gut. *Virchows Arch* 1995;425:547-560.
- <sup>15</sup>. Kimura N, Miura W, Noshiro T, et al. Ki-67 is an indicator of progression of neuroendocrine tumors. *Endocr Pathol* 1994;5:223-228.
- <sup>16</sup>. Pelosi G, Zamboni G. Proliferation markers and their uses in the study of endocrine tumors. *Endocr Pathol* 1996;7:103-119.
- <sup>17</sup>. Pelosi G, Zamboni G, Doglioni C, et al. Immunodetection of proliferating cell nuclear antigen assesses the growth fraction and predicts malignancy in endocrine tumors of the pancreas. *Am J Surg Pathol* 1992;16:1215-1225.
- <sup>18</sup>. La Rosa S, Sessa F, Capella C, et al. Prognostic criteria in nonfunctioning pancreatic endocrine tumors. *Virchows Arch* 1996;429:323-333.
- <sup>19</sup>. Solcia E, Klöppel G, Capella C. Tumors of the endocrine pancreas. In: Rosai J, Sobin LH, eds. *Tumors of the Pancreas. Atlas of Tumor Pathology*, 3rd edit. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1997:145-209.
- <sup>20</sup>. Solcia E, Klöppel G, Sobin LH, et al. Histological typing of endocrine tumours. WHO International Histological Classification of Tumours, 2nd edit. Berlin: Springer, 2000.
- <sup>21</sup>. Hochwald SN, Zee S, Conlon KC, Colleoni R, Louie O, Brennan MF, Klimstra DS (2002). Prognostic Factors in pancreatic endocrine neoplasms: an analysis of 136 cases with a proposal for low-grade and intermediate-grade groups. *J Clin Oncol* 20:2633-2542.
- <sup>22</sup>. Burgess JR, Greenway TM, Shepherd JJ. Expression of the MEN-1 gene in a large kindred with multiple endocrine neoplasia type 1. *J Inter Med* 1998;243:465-470.

- 
- <sup>23</sup>. Jensen RT. Pancreatic endocrine Tumors: Recent avances. *Ann Oncol* 1999;10:S179-S176.
- <sup>24</sup>. Lubensky IA, Debelenko LV, Zhuang Z, et al. Allelic deletions on chromosome 11q13 in multiple tumors from individual MEN1 patients. *Cancer Res* 1996;56:5272-5278.
- <sup>25</sup>. Emmert-Buck MR, Lubensky IA, Dong Q, et al. Localization of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene based on tumor loss of heterozygosity analysis. *Cancer Res* 1997;57:1855-1858.
- <sup>26</sup>. Chandrasekharappa SC, Guru SC, Manickam, et al. Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia-type 1. *Science* 1997;276:404-407.
- <sup>27</sup>. Guru SC, Goldsmith PK, Burns AL, et al. Menin, the product of the MEN1 gene, is a nuclear protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:1630-1634.
- <sup>28</sup>. Kaji H, Canaff K, Goltzman D, et al. Cell cycle regulation of MENIN expression. *Cancer Res* 1999;59:5097-5101.
- <sup>29</sup>. Kaji H, Canaff K, Lebrun JJ, et al. Inactivation of menin, a SMAD3-interacting protein, blocks transforming growth factor type  $\beta$  signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:3837-3842.
- <sup>30</sup>. Richard S, Giraud S, Beround C, et al. Von Hippel-Lindau disease: recent genetic progress and patient management. *Ann Endocrinol* 1998;59:452-458.
- <sup>31</sup>. Neumann HPH, Dinkel E, Brambs H, et al. Pancreatic lesions in the von Hippel-Lindau syndrome. *Gastroenterology* 1991;101:465-471.
- <sup>32</sup>. Lubensky IA, Pack S, Ault D, et al. Multiple endocrine tumors of the pancreas in von Hippel-Lindau disease patients: histopatological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol* 1998;153:223-231.
- <sup>33</sup>. Hammel P, Vilgrain V, Terris B, et al. Pancreatic involvement in Von Hippel-Lindau disease. *Gastroenterology* 2000;119:1087-1095.
- <sup>34</sup>. Hoang MP, Hruban RH, Albores-Saaverda J. Clear cell endocrine pancreatic tumor mimicking renal cell carcinoma: a distinctive neoplasm of von Hippel-Lindau disease. *Am J SurgPathol* 200;125:602-609.

- 
- <sup>35</sup>. Hessman O, Lindberg D, Skogscid B, et al. Mutation of the multiple endocrine neoplasia type 1 gene in nonfamilial, malignant tumors of the endocrine pancreas. *Cancer Res* 1998;58:377-379.
- <sup>36</sup>. Shan L, Nakamura M, Yokoi T, et al. Somatic mutations of MEN1 gene in the sporadic endocrine tumors. *Lab Invest* 1998;78:471-475.
- <sup>37</sup>. Moore PS, Missiaglia E, Antonello D, et al. Role of disease-causing genes in sporadic pancreatic endocrine tumors: MEN1 and VHL. *Genes Chromosome Cancer* 2001;32:177-181.
- <sup>38</sup>. Zhuang Z, Vortmeyer AO, Pack S, et al. Somatic mutations of the MEN1 tumor suppressor gene in sporadic gastrinomas and insulinomas. *Cancer Res* 1997;57:4682-4686.
- <sup>39</sup>. Debelenko LV, Zhuang Z, Emmert-Buck MR, et al. Allelic deletions on chromosome 11q13 in MEN1-associated and sporadic gastrinomas and pancreatic endocrine tumors. *Cancer Res* 1997;57:2238-2243.
- <sup>40</sup>. Cupisti K, Hoppner W, Dotzenrath C, et al. Lack of Men1 gene mutations in 27 sporadic insulinomas. *Eur J Clin Invest* 2000;30:325-329.
- <sup>41</sup>. Gortz B, Roth J, Krahenmann A, et al. Mutations and allelic deletions of the MEN1 gene are associated with a subset of sporadic endocrine pancreatic and neuroendocrine tumors and not restricted to foregut neoplasms. *Am J Pathol* 1999;154:429-436.
- <sup>42</sup>. La Rosa S, Uccella S, Erba S, et al. Immunohistochemical detection of fibroblast growth factor receptors in normal endocrine cells and related tumors of the digestive system. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2001;9:319-328.
- <sup>43</sup>. Driman DK, Kobrin MS, Kudlow JE, et al. Transforming growth factor- $\alpha$  in normal and neoplastic human endocrine tissues. *Hum Pathol* 1992;23:1360-1365.
- <sup>44</sup>. Srivastava A, Alexander J, Lomakin I, et al. Immunohistochemical expression of transforming growth factor  $\alpha$  and epidermal growth factor receptor in pancreatic endocrine tumors. *Hum Pathol* 2001;32:1184-1189.

- 
- <sup>45</sup>. La Rosa S, Uccella S, Capella C, et al. Localization of hepatocyte growth factor and its receptor met in endocrine cells and related tumors of the gut and pancreas: an immunohistochemical study. *Endocr Pathol* 2000;11:315-329.
- <sup>46</sup>. Wulbrand U, Wied M, Zöfel P, et al. Growth factor receptor expression in human gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Eur J Clin Invest* 1998;28:1038-1049.
- <sup>47</sup>. Galbut DL, Markowitz AM (1980). Insulinoma: diagnosis, surgical management and long-term follow-up. Review of 41 cases. *Am J Surg* 139:682-690.
- <sup>48</sup>. Giercksky KE, Halse J, Mathisen W, Gjone E, Flatmark A (1980). Endocrine tumors of the pancreas. *Scand J Gastroenterol* 15:129-135.
- <sup>49</sup>. Glickman MH, Hart MJ, White TT (1980). Insulinoma in Seattle: 39 cases in 30 years. *Am J Surg* 140:119-125.
- <sup>50</sup>. Le Quesne LP, Nabarro JD, Kurtz A, Zweig S (1979). The management of insulin tumors of the pancreas. *Br J Surg* 66:373-378.
- <sup>51</sup>. Service FJ, Dale AJ, Elveback LR, Jiang NS (1976). Insulinoma: clinical and diagnostic features of 60 consecutive cases. *Mayo Clin Proc* 51:417-429.
- <sup>52</sup>. Service Fj, McMahon MM, O'Brien PC, Ballard DJ (1991). Functioning insulinoma-incidence, recurrence, and long-term survival of patients: a 60-year study. *Mayo Clin Proc* 66:711-719.
- <sup>53</sup>. Van Heerden JA, Edis AJ, Service FJ (1979). The surgical aspect of insulinomas. *Ann Surg* 189:677-682.
- <sup>54</sup>. Le Douarin NM (1988). On the origin of pancreatic endocrine cells. *Cell* 53: 169-171.
- <sup>55</sup>. Perren A, Roth J, Muletta-Feurer S, Saremaslani P, Speel EJ, Heitz PU, Komminoth P (1988). Clonal analysis of sporadic pancreatic endocrine tumors. *J Pathol* 186:363-371.
- <sup>56</sup>. Adamson AR, Grahame-Smith DG, Bogomoletz V, Maw DS, Rothnie NG (1971). Malignant argentaffinoma with carcinoid syndrome and hypoglycaemia. *Br Med J* 3:93-94.

- 
- <sup>57</sup>. Kiang DT, Bauer GE, Kennedy BJ (1973) Immunoassayable insulin in carcinoma of the cervix associated with hypoglycaemia. *Cancer* 31:801-805.
- <sup>58</sup>. Koga A, Tabata M, Kido H, Todo S, Nagamitsu S, Nakamura Y, Aono K (1979). Successful treatment of ectopic insulinoma. Report of a case. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 78:279-284.
- <sup>59</sup>. Pelletier G, Cortot A, Launay JM, Debons-Guillemain MC, Nemeth J, LeCharpentier Y, Celerier M, Modigliani R (1984). Serotonin-secreting and insulin-secreting ileal carcinoid tumor and the use of in vitro culture of tumoral cells. *Cancer* 54:319-322.
- <sup>60</sup>. Shames JM, Dhurandhar NR, Blackard WG (1968). Insulin-secreting bronchial carcinoid tumor with widespread metastases. *Am J Med* 44:632-637.
- <sup>61</sup>. Shetty MR, Boghossian HM, Duffell D, Freel R, Gonzales JC (1982). Tumor-induced hypoglycaemia: a result of ectopic insulin production. *Cancer* 49:1920-1923.
- <sup>62</sup>. Yoshikawa K, Wakasa H (1980). Hypoglycemia associated with aberrant insulinoma: a case report of 16 years follow-up. *Tohoku J Exp Med* 132:17-29.
- <sup>63</sup>. Norton JA, Shawker TH, Doppman JL, Miller DL, Fraker DL, Cromack DT, Gorden P, Jensen RT (1990). Localization and surgical treatment of occult insulinomas. *Ann Surg* 212:615-620.
- <sup>64</sup>. Service FJ (1995) Hypoglycemic disorders. *N Eng J Med* 332:1144-1152.
- <sup>65</sup>. Stefanini P, Carboni M, Patrassi N, Basoli A (1974). Beta-islet tumors of the pancreas: results of a study on 1067 cases. *Surgery* 75:597-609.
- <sup>66</sup>. Zimmer T, Stolzel U, Bader M, Koppenhagen K, Hamm B, Buhr H, Riecken EO, Wiedermann B (1996). Endoscopic ultrasonography and somatostatin receptor scintigraphy in the preoperative localisation of insulinomas and gastrinomas. *Gut* 39:562-568.
- <sup>67</sup>. Faglia G, Beck-Peccoz P. *Malattie del Sistema Endocrino e del Metabolismo* 4ed. p443-445. McGraw-Hill.
- <sup>68</sup>. WHO Pathology&Genetics Tumours of Endocrine Organs 2004 p183-186.

- 
- <sup>69</sup>. Boi F, Maurelli I, Pinna G, et al . Calcitonin measurement in wash-out fluid from fine needle aspiration of neck masses in patients with primary and metastatic medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*2007;92:2115-2118.
- <sup>70</sup>. Kudo T, Miyauchi A, Ito Y, et al. Diagnosis of medullary thyroid carcinoma by calcitonin measurement in fine-needle aspiration biopsy specimens. *Thyroid* 2007;17:635-638.
- <sup>71</sup>. Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, et al. Guidelines for diagnosis and herapy of MEN type 1 and type 2. *J Clin Endocrinol Metab*2001;86:5658-5671
- <sup>72</sup>. Skinner MA, Moley JA, Dilley WG, et al. Prophylactic thyroidectomy in multiple endocrine neoplasia type 2A. *N Engl J Med*2005;353:1105-1113.
- <sup>73</sup>. Machens A, Dralle H. DNA-based window of opportunity for curative pre-emptive therapy of hereditary medullary thyroid cancer. *Surgery*2006;139:279-282.
- <sup>74</sup>. Machens A, Niccoli-Sire P, Hoegel J, et al. Early malignant progression of hereditary medullary thyroid cancer. *N Engl J Med*2003;349:1517-1525
- <sup>75</sup>. Scollo C, Baudin E, Travagli JP, et al. Rationale for central and bilateral lymph node dissection in sporadic and hereditary medullary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2070-2075.
- <sup>76</sup>. Current Management of Medullary Thyroid Cancer Rebecca S. Sippel, Muthusamy Kunnimalaiyaan and Herbert Chen *The Oncologist* May 2008vol. 13 no. 5 539-547
- <sup>77</sup>. Moley JF, DeBenedetti MK. Patterns of nodal metastases in palpable medullary thyroid carcinoma: Recommendations for extent of node dissection. *Ann Surg* 1999;229:880-887. discussion 887–888.
- <sup>78</sup>. Greenblatt DY, Elson D, Mack E, et al. Initial lymph node dissection increases cure rates in patients with medullary thyroid cancer. *Asian J Surg* 2007;30:108-112.
- <sup>79</sup>. Machens A, Hofmann C, Hauptmann S, et al. Locoregional recurrence and death from medullary thyroid carcinoma in a contemporaneous series: 5-year results. *Eur J Endocrinol* 2007;157:85-93.

- 
- <sup>80</sup>. Chen H, Roberts JR, Ball DW, et al. Effective long-term palliation of symptomatic, incurable metastatic medullary thyroid cancer by operative resection. *Ann Surg* 1998;227:887-895.
- <sup>81</sup>. Tisell LE, Hansson G, Jansson S, et al. Reoperation in the treatment of asymptomatic metastasizing medullary thyroid carcinoma. *Surgery* 1986;99:60-66.
- <sup>82</sup>. Tung WS, Vesely TM, Moley JF. Laparoscopic detection of hepatic metastases in patients with residual or recurrent medullary thyroid cancer. *Surgery* 1995;118:1024-1029. discussion 1029–1030.
- <sup>83</sup>. Brierley J, Tsang R, Simpson WJ, et al. Medullary thyroid cancer: Analyses of survival and prognostic factors and the role of radiation therapy in local control. *Thyroid* 1996;6:305-310.
- <sup>84</sup>. Chen H, Roberts JR, Ball DW, et al. Effective long-term palliation of symptomatic, incurable metastatic medullary thyroid cancer by operative resection. *Ann Surg* 1998;227:887-895.
- <sup>85</sup>. You YN, Lakhani V, Wells SA Jr., et al. Medullary thyroid cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2006;15:639-660.
- <sup>86</sup>. Ball DW. Medullary thyroid cancer: Therapeutic targets and molecular markers. *Curr Opin Oncol* 2007;19:18-23.
- <sup>87</sup>. de Groot JW, Zonnenberg BA, van Ufford-Mannesse PQ, et al. A phase II trial of imatinib therapy for metastatic medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:3466-3469.
- <sup>88</sup>. Wells SA Jr., Gosnell JE, Gagel RF, et al. Vandetanib in metastatic hereditary medullary thyroid cancer: Follow-up results of an open-label phase II trial. *J Clin Oncol* 2007;25(18) suppl:6018.
- <sup>89</sup>. Kunnimalaiyaan M, Ndiaye M, Chen H. Apoptosis-mediated medullary thyroid cancer growth suppression by the PI3K inhibitor LY294002. *Surgery* 2006;140:1009-1014. discussion 1014–1015.

- 
- <sup>90</sup>. Kunnimalaiyaan M, Vaccaro AM, Ndiaye MA, et al. Overexpression of the NOTCH1 intracellular domain inhibits cell proliferation and alters the neuroendocrine phenotype of medullary thyroid cancer cells. *J Biol Chem*2006;281:39819-39830.
- <sup>91</sup>. Kunnimalaiyaan M, Chen H. The Raf-1 pathway: A molecular target for treatment of select neuroendocrine tumors? *Anticancer Drugs*2006;17:139-142.
- <sup>92</sup>. Kunnimalaiyaan M, Chen H. Tumor suppressor role of Notch-1 signaling in neuroendocrine tumors. *The Oncologist* 2007;12:535-542.
- <sup>93</sup>. Mandal M, Kim S, Younes MN, et al. The Akt inhibitor KP372-1 suppresses Akt activity and cell proliferation and induces apoptosis in thyroid cancer cells. *Br J Cancer* 2005;92:1899-1905
- <sup>94</sup>. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: Cell fate control and signal integration in development. *Science*1999;284:770-776.
- <sup>95</sup>. Kunnimalaiyaan M, Chen H. Tumor suppressor role of Notch-1 signaling in neuroendocrine tumors. *The Oncologist* 2007;12:535-542.
- <sup>96</sup>. Kunnimalaiyaan M, Vaccaro AM, Ndiaye MA, et al. Overexpression of the NOTCH1 intracellular domain inhibits cell proliferation and alters the neuroendocrine phenotype of medullary thyroid cancer cells. *J Biol Chem*2006;281:39819-39830.
- <sup>97</sup>. Sippel RS, Carpenter JE, Kunnimalaiyaan M, et al. The role of human achaete-scute homolog-1 in medullary thyroid cancer cells. *Surgery*2003;134:866-871. discussion 871-873.
- <sup>98</sup>. Park JI, Strock CJ, Ball DW, et al. The Ras/Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway induces autocrine-paracrine growth inhibition via the leukemia inhibitory factor/JAK/STAT pathway. *Mol Cell Biol* 2003;23:543-554.
- <sup>99</sup>. Kunnimalaiyaan M, Vaccaro AM, Ndiaye MA, et al. Inactivation of glycogen synthase kinase-3beta, a downstream target of the Raf-1 pathway, is associated with growth suppression in medullary thyroid cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2007;6:1151-1158.
- <sup>100</sup>. Cohen P, Frame S. The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol*2001;2:769-776.

- 
- <sup>101</sup>. Wang Q, Wang X, Hernandez A, et al. Regulation of TRAIL expression by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/GSK-3 pathway in human colon cancer cells. *J Biol Chem* 2002;277:36602-36610.
- <sup>102</sup>. Cohen P, Frame S. The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol*2001;2:769-776.
- <sup>103</sup>. Kunnimalaiyaan M, Vaccaro AM, Ndiaye MA, et al. Inactivation of glycogen synthase kinase-3beta, a downstream target of the Raf-1 pathway, is associated with growth suppression in medullary thyroid cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2007;6:1151-1158.
- <sup>104</sup>. Lord J M, Pongracz J.(1995) Protein kinase C: a family of isoenzymes with distinct roles in pathogenesis. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 48:M57-M64
- <sup>105</sup>. Tan S.L. and Parker P.J. Emerging and diverse roles of protein kinase C in immune cell signalling. *Biochem J* 376(3),545-52 (2003).
- <sup>106</sup>. Martelli AM, Evangelisti C, Nyakern M, Manzoli FA. Nuclear protein kinase C. *Biochim Biophys Acta*. 2006 May-Jun;1761(5-6):542-51.
- <sup>107</sup>. Koivunen J et al. Protein kinase C (PKC) family in cancer progression. *Cancer Letters* 235, 1-10 (2006).
- <sup>108</sup>. Nishikawa K, Toker A, Johannes FJ, Songyang Z, Cantley LC. Determination of the specific substrate sequence motifs of protein kinase C isozymes. *J Biol Chem*. 1997 Jan 10;272(2):952-60.
- <sup>109</sup>. Songyang Z, Blechner S, Hoagland N, Hoekstra MF, Piwnica-Worms H, Cantley LC. Use of an oriented peptide library to determine the optimal substrates of protein kinases. *Curr Biol*. 1994 Nov 1;4(11):973-82.
- <sup>110</sup>. Kawakami T et al. Protein Kinase Cp (PKCp): Normal Functions and Diseases. *J Biochem* 132, 677-682 (2002).
- <sup>111</sup>. Kawakami T, Kawakami Y, Kitaura J. Protein kinase C beta (PKC beta): normal functions and diseases. *J Biochem*. 2002 Nov;132(5):677-82.
- <sup>112</sup>. Banan A, Zhang LJ, Farhadi A, Fields JZ, Shaikh M, Keshavarzian A. PKC-beta1

---

isoform activation is required for EGF-induced NF-kappaB inactivation and kappaBalpha stabilization and protection of F-actin assembly and barrier function in enterocyte monolayers. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004 Mar;286(3):C723-38.

<sup>113</sup>. Blobe GC, Obeid LM, Hannun YA, (1994) Regulation of protein kinase C and role in cancer biology. *Cancer Metastasis Rev* 13:411-431

<sup>114</sup>. Finkenzeller G, Marme D, Hug H (1992) Inducible overexpression of human protein kinase C in NIH 3T3 fibroblast results in growth abnormalities. *Cell Signal* 4:163-177

<sup>115</sup>. Denning, M. F., A. A. Dlugosz, M. K. Howett, and S. H. Yuspa (1993) Expression of an oncogenic rasHa gene in murine keratinocytes induces tyrosine phosphorylation and reduced activity of protein kinase C d. *J. Biol. Chem.* 268:26079–26081

<sup>116</sup>. Geiges D, Marks F, Gschwendt M (1995) Loss of protein kinase Cδ from human HaCaT keratinocytes upon ras transfection is mediated by TNFα. *Exp Cell Res* 219:299-303

<sup>117</sup>. Capiati DA, Limbozzi F, Tellez-Inon MT, Boland RL, (1999) Evidence on the participation of protein kinase C alpha in the proliferation of cultured fibroblasts. *J Cell Biochem* 74:292-300

<sup>118</sup>. Li H, Zhao L, Yang Z, Funder JW, Liu JP (1998) Telomerase is controlled by protein kinase Calpha in human breast cancer cells. *J Biol Chem.*11;273(50):33436-42

<sup>119</sup>. Gruber JR, Ohno S, and Niles RM (1992) Increased expression of protein kinase C alpha plays a key role in retinoic acid-induced melanoma differentiation. *J Biol Chem* 267:13356-13360

<sup>120</sup>. Acs P, Wang QJ, Bogi K, Marquez AM, Lorenzo PS, Biro T, Szallasi Z, Mushinski JF, Blumberg PM (1997) Both the catalytic and regulatory domains of protein kinase C chimeras modulate the proliferative properties of NIH 3T3 cells. *J Biol Chem* 272 :28793-28799

<sup>121</sup>. Oscar R. Rosales, Carlos M. Isales and Jaya Bhargava (1998). Overexpression of Protein Kinase C α and β1 Has Distinct Effects on Bovine Aortic Endothelial Cell Growth. *Cellular Signalling*, Volume 10, Issue 8, Pages 589-597

- 
- <sup>122</sup>. Hsiao, W.L.W. ; Housey, G.M. ; Johnson, M.D. ; Weinstein, I.B (1989) Cells that overproduce protein kinase C are more susceptible to transformation by an activated h-ras oncogene. *Molecular and Cellular Biology* ; Vol/Issue: 9:6
- <sup>123</sup>. Jaken S, Leach K, Klauck T.(1989). Association of type 3 protein kinase C with focal contacts in rat embryo fibroblasts. *J Cell Biol.* 109(2):697–704
- <sup>124</sup>. Murray NR, Baumgardner GP, Burns DJ and Fields AP (1993) Protein kinase C isotypes in human erythroleukemia (K562) cell proliferation and differentiation. Evidence that beta II protein kinase C is required for proliferation. *J. Biol. Chem.*, Vol. 268, Issue 21, 15847-15853, 07
- <sup>125</sup>. Cho Y, Klein MG, Talmage DA (1998) Distinct functions of protein kinase C Calpha and protein kinase Cbeta during retinoic acid-induced differentiation of F9 cells. *Cell Growth Differ* 9:147-154
- <sup>126</sup>. Oscar R. Rosales, Carlos M. Isales and Jaya Bhargava (1998). Overexpression of Protein Kinase C  $\alpha$  and  $\beta$ 1 Has Distinct Effects on Bovine Aortic Endothelial Cell Growth. *Cellular Signalling*, Volume 10, Issue 8, Pages 589-597
- <sup>127</sup>. Macfarlane DE and Manzel L (1994) Activation of beta-isozyme of protein kinase C (PKC beta) is necessary and sufficient for phorbol ester-induced differentiation of HL-60 promyelocytes. Studies with PKC beta-defective PET mutant. *J. Biol. Chem.*, Vol. 269, Issue 6, 4327-4331, 02
- <sup>128</sup>. O'Driscoll KR, Madden PV, Christiansen KM, Viage A, Slaga TJ, Fabbro D, Powell CT, Weinstein IB (1994). Overexpression of protein kinase C beta I in a murine keratinocyte cell line produces effects on cellular growth, morphology and differentiation. *Cancer Lett.* 15;83(1-2):249-59
- <sup>129</sup>. Bamberger AM, Bamberger CM, Wald M, Kratzmeier M, Schulte HM, (1996) Protein kinase C (PKC) isoenzyme expression pattern as an indicator of proliferative activity in uterine tumor cells. *Mol Cell Endocrinol* 123:81-88
- <sup>130</sup>. Persons DA, Wilkison WO, Bell RM, Finn OJ (1988). Altered growth regulation and enhanced tumorigenicity of NIH 3T3 fibroblasts transfected with protein kinase C-I cDNA. *Cell.* 12;52(3):447–458

- 
- <sup>131</sup>. Mishima K, Ohno S, Shitara N, Yamaoka K, Suzuki K (1994). Opposite effects of the overexpression of protein kinase C gamma and delta on the growth properties of human glioma cell line U251 MG. *Biochem Biophys Res Commun.* 30;201(1):363-72
- <sup>132</sup>. Michael Gschwendt (1999) Protein kinase C $\delta$ . *European Journal of Biochemistry* 259 (3), 555–564
- <sup>133</sup>. Watanabe T, Ono Y, Taniyama Y, Hazama K, Igarashi K, Ogita K, Kikkawa U, and Nishizuka Y.(1992). Cell division arrest induced by phorbol ester in CHO cells overexpressing protein kinase C-delta subspecies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1; 89(21): 10159–10163
- <sup>134</sup>. Mishima K, Ohno S, Shitara N, Yamaoka K, Suzuki K.(1994). Opposite effects of the overexpression of protein kinase C gamma and delta on the growth properties of human glioma cell line U251 MG. *Biochem Biophys Res Commun.* 30;201(1):363-72
- <sup>135</sup>. Susan C. Kiley, Kimberly J. Clark, Michelle Goodnough, Danny R. Welch and Susan Jaken (1999). Protein Kinase C  $\delta$  Involvement in Mammary Tumor Cell Metastasis. *Cancer Research* 59, 3230-3238
- <sup>136</sup>. Acs P, Wang QJ, Bogi K, Marquez AM, Lorenzo PS, Biro T, Szallasi Z, Mushinski JF, Blumberg PM (1997) Both the catalytic and regulatory domains of protein kinase C chimeras modulate the proliferative properties of NIH 3T3 cells. *J Biol Chem* 272 :28793-28799
- <sup>137</sup>. Das KC, Guo X, White CW. (1998). Protein kinase C $\delta$ -dependent induction of Manganese superoxide dismutase gene expression by microtubule-active anticancer drugs. *J Biol Chem* 273 :34639-34645
- <sup>138</sup>. Peter J. Reddig, Nancy E. Dreckschmidt, Helga Ahrens, Robita Simsiman, Ching-Ping Tseng, Jun Zou, Terry D. Oberley and Ajit K. Verma (1999). Transgenic Mice Overexpressing Protein Kinase C $\delta$  in the Epidermis Are Resistant to Skin Tumor Promotion by 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Research* 59, 5710-5718
- <sup>139</sup>. Mischak H, Goodnight JA, Kolch W, Martiny-Baron G, Schaehtle C, Kazanietz MG, Blumberg PM, Pierce JH and Mushinski JF (1993). Overexpression of protein kinase C-delta and -epsilon in NIH 3T3 cells induces opposite effects on growth,

---

morphology, anchorage dependence, and tumorigenicity. *J. Biol. Chem.*, Vol. 268, Issue 9, 6090-6096, 03

<sup>140</sup>. Baxter G, Oto E, Daniel-Issakani S, Strulovici B (1992) Constitutive presence of a catalytic fragment of protein kinase C in a small cell lung carcinoma cell line. *J Biol Chem* 267:1910-1917

<sup>141</sup>. Cai H, Smola U, Wixler V, Eisenmann-Tappe I, Diaz-Meco MT, Moscat J, Rapp U, Cooper GM (1997) Role of diacylglycerol-regulated protein kinase C isotypes in growth factor activation of the Raf-1 protein kinase. *Mol Cell Biol* 17:732-741

<sup>142</sup>. Acs P, Wang QJ, Bogi K, Marquez AM, Lorenzo PS, Biro T, Szallasi Z, Mushinski JF, Blumberg PM (1997) Both the catalytic and regulatory domains of protein kinase C chimeras modulate the proliferative properties of NIH 3T3 cells. *J Biol Chem* 272 :28793-28799

<sup>143</sup>. Lavie Y, Zhang ZC, Cao HT, Han TY, Jones RC, Liu YY, Jarman M, Hardcastle IR, Giuliano AE, Cabot MC.(1998) Tamoxifen induces selective membrane association of protein kinase C epsilon in MCF-7 human breast cancer cells. *Int J Cancer*. 11;77(6):928-32

<sup>144</sup>. Fagerstrom S, Pahlman S, Gestblom C, Nanberg E (1996) protein kinase C-epsilon is implicated in neurite outgrowth in differentiating human neuroblastoma cells. *Cell Growth Differ* 7:775-785

<sup>145</sup>. Ways DK, Posekany K, deVente J, Garris T, Chen J, Hooker J, Qin W, Cook P, Fletcher D, Parker P.(1994) Overexpression of protein kinase C-zeta stimulates leukemic cell differentiation. *Cell Growth Differ*. 5(11):1195-203

<sup>146</sup>. Crespo P, Mischak H, Gutkind JS (1995) Overexpression of mammalian protein kinase C-zeta does not affect the growth characteristics of NIH 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 213:266-272

<sup>147</sup>. Murray NR, Fields AP.(1997) Atypical protein kinase C iota protects human leukemia cells against drug-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 31;272(44):27521-4

- 
- <sup>148</sup>. Kieser A, Seitz T, Adler HS, Coffey P, Kremmer E, Crespo P, Gutkind JS, Henderson DW, Mushinski JF, Kolch W, Mischak H.(1996) Protein kinase C-zeta reverts v-raf transformation of NIH-3T3 cells. *Genes Dev.* 15;10(12):1455-66
- <sup>149</sup>. Lee JY, Hannun YA, Obeid LM.(1996) Ceramide inactivates cellular protein kinase Calpha. *J Biol Chem.* 31;271(22):13169-74
- <sup>150</sup>. Berra E, Municio MM, Sanz L, Frutos S, Diaz-Meco MT, Moscat J (1997) Positioning atypical protein kinase C isoforms in the UV induced apoptotic signaling cascade, *Mol Cell Biol* 17 :4346-4354
- <sup>151</sup>. Diaz-Meco MT, Municio MM, Frutos S, Sanchez P, Lozano J, Sanz L, Moscat J (1996) The product of par 4, a gene induced during apoptosis, interacts selectively with the atypical isoforms of protein kinase C. *Cell* 86 :777-786
- <sup>152</sup>. Schönwasser DC, Marais RM, Marshall CJ, Parker PJ.(1998) Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Mol Cell Biol.* 18(2):790-8
- <sup>153</sup>. Bernard R (1991) N-myc disrupts protein kinase C-mediated signal transduction in neuroblastoma. *EMBO J* 10 :1119-1125
- <sup>154</sup>. Rennecke J, Rehberger PA, Fürstenberger G, Johannes FJ, Stöhr M, Marks F, Richter KH.(1999) Protein-kinase-Cmu expression correlates with enhanced keratinocyte proliferation in normal and neoplastic mouse epidermis and in cell culture. *Int J Cancer.* 5;80(1):98-103
- <sup>155</sup>. O'Brian C, Vogel VG, Singletary SE, Ward NE.(1989) Elevated protein kinase C expression in human breast tumor biopsies relative to normal breast tissue. *Cancer Res.* 15;49(12):3215-7
- <sup>156</sup>. Fabbro D, Ragazzi R, Costa SD, Borner C, Eppenberger U (1986) Protein kinase C desensitization by phorbol esters and its impact on growth of human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1986 135:65-73
- <sup>157</sup>. Darbon JM, Valette A, Bayard F (1986) Phorbol esters inhibit the proliferation of MCF-7 cells. Possible implication of protein kinase C. *Biochem Pharmacol* 35 :2683-2686

- 
- <sup>158</sup>. Borner C, Wyss R, Ragazzi R, Eppenberger U, Fabbro D (1987) Immunological quantitation of phospholipids/ $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protein kinase of human mammary carcinoma cells : inverse relationship to estrogen receptors. *Int J Cancer* 40 :344-348
- <sup>159</sup>. Ways DK, Kukoly CA, deVente J, Hooker JL, Bryant WO, Posekany KJ, Fletcher DJ, Cook PP, Parker PJ.(1995) MCF-7 breast cancer cells transfected with protein kinase C-alpha exhibit altered expression of other protein kinase C isoforms and display a more aggressive neoplastic phenotype. *J Clin Invest.* 95(4):1906-15
- <sup>160</sup>. Kennedy MJ, Prestigiacomo LJ, Tyler G, May WS, Davidson NE.(1992) Differential effects of bryostatins 1 and phorbol ester on human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 52(5):1278-83
- <sup>161</sup>. Benzil DL, Finkelstein SD, Epstein MH, Finch PW (1992) Expression pattern of alpha-protein kinase C in human astrocytomas indicates a role in malignant progression. *Cancer Res* 52:2951-2956
- <sup>162</sup>. Baltuch GH, Dooley NP, Rostworowski KM, Villemure JG, Yong VW, (1995) Protein kinase C isoform alpha overexpression in C6 glioma cells and its role in cell proliferation. *J Neurooncol* 24:241-250
- <sup>163</sup>. Couldwell WT, Antel JP, Yong VW, (1992) Protein kinase C activity correlates with the growth rate of malignant gliomas: Part II. Effects of glioma mitogens and modulators of protein kinase C. *neurosurgery* 31:717-724
- <sup>164</sup>. Zellner A, Fetell MR, Bruce JN, De Vivo DC, O'Driscoll KR.(1998) Disparity in expression of protein kinase C alpha in human glioma versus glioma-derived primary cell lines: therapeutic implications. *Clin Cancer Res.* 4(7):1797-802
- <sup>165</sup>. Hatada T, Sakanoue Y, Kusunoki M, Kobayashi A, Utsunomiya J.(1992) Protein kinase C activity in human thyroid carcinoma and adenoma. *Cancer.* 15;70(12):2918-22
- <sup>166</sup>. Hoelting T, Duh QY, Clark OH, Herfarth C.(1996) Tamoxifen antagonizes proliferation and invasion of estrogen receptor-negative metastatic follicular thyroid cancer cells via protein kinase C. *Cancer Lett.* 27;100(1-2):89-93
- <sup>167</sup>. Prévostel C, Martin A, Alvaro V, Jaffiol C, Joubert D.(1997) Protein kinase C alpha and tumorigenesis of the endocrine gland. *Horm Res.* 47(4-6):140-4

- 
- <sup>168</sup>. Alvaro V, Levy L, Dubray C, Roche A, Peillon F, Querat B, Joubert D (1993) Invasive human pituitary tumors express a point-mutated alpha-protein kinase C. *J Clin Endocrinol Metab* 77:1125-1129
- <sup>169</sup>. Schiemann U, Assert R, Moskopp D, Gellner R, Hengst K, Gullotta F, Domschke W, Pfeiffer A.(1997) Analysis of a protein kinase C-alpha mutation in human pituitary tumours. *J Endocrinol.* 153(1):131-7
- <sup>170</sup>. Alvaro V, Touraine P, Raisman Vozari R, Bai-Grenier F, Birman P, Joubert D (1992) Protein kinase C activity and expression in normal and adenomatous human pituitaries. *Int J Cancer* 50:724-730
- <sup>171</sup>. Jin L, Maeda T, Chandler WF, Lloyd RV.(1993) Protein kinase C (PKC) activity and PKC messenger RNAs in human pituitary adenomas. *Am J Pathol.* 142(2):569-78
- <sup>172</sup>. Denning MF.(2004) Epidermal keratinocytes: regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1141-6
- <sup>173</sup>. Sitailo LA, Tibudan SS, Denning MF.(2004) Bax activation and induction of apoptosis in human keratinocytes by the protein kinase C $\delta$  catalytic domain. *J Invest Dermatol* 123:434-43
- <sup>174</sup>. D'Costa AM, Denning MF.(2005) A caspase-resistant mutant of PKC- $\delta$  protects keratinocytes from UV-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 12:224-32
- <sup>175</sup>. Aziz MH, Wheeler DL, Bhamb B, Verma AK.(2006) Protein kinase C $\delta$  overexpressing transgenic mice are resistant to chemically but not to UV radiation-induced development of squamous cell carcinomas: a possible link to specific cytokines and cyclooxygenase-2. *Cancer Res* 66:713-22
- <sup>176</sup>. Wheeler DL, Martin KE, Ness KJ, et al.(2004) Protein kinase C $\delta$  is an endogenous photosensitizer that enhances ultraviolet radiation-induced cutaneous damage and development of squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 64:7756-65
- <sup>177</sup>. Wheeler DL, Reddig PJ, Ness KJ, Leith CP, Oberley TD, Verma AK.(2005) Overexpression of protein kinase C $\delta$  in the mouse epidermis leads to a spontaneous myeloproliferative-like disease. *Am J Pathol* 166:117-26

- 
- <sup>178</sup>. Wheeler DL, Li Y, Verma AK.(2005) Protein kinase C $\alpha$  ultraviolet light-induced cutaneous damage and development of squamous cell carcinoma possibly through induction of specific cytokines in a paracrine mechanism. *Photochem Photobiol* 81:9–18
- <sup>179</sup>. Gustafson WC, Ray S, Jamieson L, Thompson EA, Brasier AR, Fields AP.(2004) Bcr-Abl regulates protein kinase C $\delta$  (PKC $\delta$ ) transcription via an Elk1 site in the PKC $\delta$  promoter. *J Biol Chem* 279:9400–8
- <sup>180</sup>. Murray NR, Jamieson L, Yu W, et al.(2004) Protein kinase C $\delta$  is required for Ras transformation and colon carcinogenesis in vivo. *J Cell Biol* 164:797–802
- <sup>181</sup>. Yu W, Murray NR, Weems C, et al.(2003) Role of cyclooxygenase 2 in protein kinase C $\beta$ II-mediated colon carcinogenesis. *J Biol Chem* 278:11167–74
- <sup>182</sup>. Murray NR, Jamieson L, Yu W, et al.(2004) Protein kinase C $\delta$  is required for Ras transformation and colon carcinogenesis in vivo. *J Cell Biol* 164:797–802
- <sup>183</sup>. Liou JS, Chen JS, Faller DV.(2004) Characterization of p21 Ras-mediated apoptosis induced by protein kinase C inhibition and application to human tumor cell lines. *J Cell Physiol* 198:277–94
- <sup>184</sup>. Zhang J, Anastasiadis PZ, Liu Y, Thompson EA, Fields AP.(2004) Protein Kinase C (PKC)  $\beta$ II induces cell invasion through a Ras/Mek-, PKC $\delta$ /Rac 1-dependent signaling pathway. *J Biol Chem* 279:22118–23
- <sup>185</sup>. Bivona TG, Quatela SE, Bodemann BO. et al. (2006) PKC regulates a farnesyl-electrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bcl-XL on mitochondria and induces apoptosis. *Mol Cell* 21:481–93
- <sup>186</sup>. Gavrielides MV, Frijhoff AF, Conti CJ, Kazanietz MG.(2004) Protein kinase C and prostate carcinogenesis: targeting the cell cycle and apoptotic mechanisms. *Curr Drug Targets* 5:431–43
- <sup>187</sup>. Wu D, Thakore CU, Wescott GG, McCubrey JA, Terrian DM.(2004) Integrin signaling links protein kinase C $\alpha$  to the protein kinase B/Akt survival pathway in recurrent prostate cancer cells. *Oncogene* 23:8659–72

- 
- <sup>188</sup>. Regala RP, Weems C, Jamieson L, Copland JA, Thompson EA, Fields AP.(2005) Atypical protein kinase C $\epsilon$  plays a critical role in human lung cancer cell growth and tumorigenicity. *J Biol Chem* 280:31109–15
- <sup>189</sup> Regala RP, Weems C, Jamieson L, et al.(2005) Atypical protein kinase C $\epsilon$  is an oncogene in human non-small lung cancer. *Cancer Res* 65:8905–11
- <sup>190</sup>. Jin Z, Xin M, Deng X.(2005) Survival function of protein kinase C $\{\iota\}$  as a novel nitrosamine 4-(methylnitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-activated bad kinase. *J Biol Chem* 280:16045–52
- <sup>191</sup>. Clark AS, West KA, Blumberg PM, Dennis PA.(2003) Altered protein kinase C (PKC) isoforms in non-small cell lung cancer cells: PKC $\delta$  promotes cellular survival and chemotherapeutic resistance. *Cancer Res* 63:780–6
- <sup>192</sup>. Ding L, Wang H, Lang W, Xiao L.(2002) Protein kinase C- $\epsilon$  promotes survival of lung cancer cells by suppressing apoptosis through dysregulation of the mitochondrial caspase pathway. *J Biol Chem* 277:35305–13
- <sup>193</sup>. Corbit KC, Soh JW, Yoshida K, Eves EM, Weinstein IB, Rosner MR.(200) Different protein kinase C isoforms determine growth factor specificity in neuronal cells. *Mol Cell Biol* 20:5392–403
- <sup>194</sup>. Ni H, Ergin M, Tibudan SS, Denning MF, Izban KF, Alkan S.(2003) Protein kinase C- $\delta$  is commonly expressed in multiple myeloma cells and its downregulation by rottlerin causes apoptosis. *Br J Haematol* 121:849–56
- <sup>195</sup>. Alkan S, Huang Q, Ergin M, et al.(2005) Survival role of protein kinase C (PKC) in chronic lymphocytic leukemia and determination of isoform expression pattern and genes altered by PKC inhibition. *Am J Hematol* 79:97–106
- <sup>196</sup>. Teicher BA, Alvarez E, Menon K, et al.(2002) Antiangiogenic effects of a protein kinase C $\beta$ -selective small molecule. *Cancer Chemother Pharmacol* 49:69–77
- <sup>197</sup>. Goekjian PG, Jirousek MR.(2001) Protein kinase C inhibitors as novel anticancer drugs. *Expert Opin Investig Drugs* 10(12):2117-2140

- 
- <sup>198</sup>. Aeder SE, Martin PM, Soh JW, Hussaini IM.(2004) PKC-beta mediates glioblastoma cell proliferation through the Akt and mTOR signaling pathways. *Oncogene* 23(56):9062-9069
- <sup>199</sup>. Sansal I, Sellers WR.(2004) The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol* 22(14):2954-2963
- <sup>200</sup>. Zhang J, Anastasiadis PZ, Liu Y, Thompson EA, Fields AP.(2004) Protein kinase C(PKC)  $\beta$ II induces cell invasion through a Ras/Mek-, PKC $\beta$ /Rac 1-dependent signaling pathway. *J Biol Chem* 279:22118-22123
- <sup>201</sup>. Graff JR, McNulty AM, Ross Hanna K, Knoicek BW, Lynch RL, Bailey SN, Banks C, Capen A, Goode R, Lewis JE, Sams L, Huss KL, Campbell RM, Iversen PW, Neubauer BL, Brown TJ, Musib L, Geeganage S, Thornton D.(2005) The protein kinase C $\beta$ -selective inhibitor, Enzastaurin (LY317615,HCl), suppresses signaling through the AKT pathway, induces apoptosis, and suppresses growth of human colon cancer and glioblastoma xenografts. *Cancer Res* 65:7462-7469
- <sup>202</sup>. Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y (1982) Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* 257:7847-7851
- <sup>203</sup>. Blumberg PM (1991) Complexities of the protein kinase C pathway *Mol Carcinog* 4:339-344
- <sup>204</sup>. Chida K, Kato N, Kuroki T (1986) Down regulation of phorbol diester receptors by proteolytic degradation of protein kinase C in a cultured cell line of fetal rat skin keratinocytes. *J Biol Chem* 261:13013-13018
- <sup>205</sup>. Chida K, Kato N, Kuroki T (1986) Down regulation of phorbol diester receptors by proteolytic degradation of protein kinase C in a cultured cell line of fetal rat skin keratinocytes. *J Biol Chem* 261:13013-13018
- <sup>206</sup>. Pettit GR, Day JF, Hartwell JL, Wood HB.(1970) Antineoplastic components of marine animals. *Nature*. 29;227(5261):962-3

- 
- <sup>207</sup>. Hocevar BA, Fields AP.(1991) Selective translocation of beta II-protein kinase C to the nucleus of human promyelocytic (HL60) leukemia cells. *J Biol Chem.* 5;266(1):28-33
- <sup>208</sup>. Kennedy MJ, Prestigiacomo LJ, Tyler G, May WS, Davidson NE.(1992) Differential effects of bryostatin 1 and phorbol ester on human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 52: 1278-1283
- <sup>209</sup>. Szallasi Z, Smith CB, Pettit GR, Blumberg PM.(1994) Differential regulation of protein kinase C isozymes by bryostatin 1 and phorbol 12-myristate 13-acetate in NIH 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem.* 21;269(3):2118-24
- <sup>210</sup>. Berdel WE (1991) Membrane-interactive lipids as experimental anticancer drugs. *Br J Cancer* 64:208-211
- <sup>211</sup>. Clavel M, Mauriac L, Vennin P, Namer M, maugard-Louboutin C, Goupil A, Veyret c, Sindermann H, David M (1992) Topically applied miltefosine (hexadecylphosphocholine) in cutaneous relapses and/or skin metastasizes breast cancer: a French multicentric study. *Ann Oncol* 3 (Suppl.1):65
- <sup>212</sup>. Hilgard P, Klenner T, Stekar J, Unger C.(1993) Alkylphosphocholines: a new class of membrane-active anticancer agents. *Cancer Chemother Pharmacol.* 32(2):90-5
- <sup>213</sup>. Brachwitz H, Vollgraf C (1995) Analogs of alkyllysophospholipids: chemistry, effects on the molecular level and their consequences for normal and malignant cells. *Pharmacol Ther* 66:39-82
- <sup>214</sup>. Kiss Z, Deli E, Kuo JF.(1987) Phorbol ester inhibits phosphatidylserine synthesis in human promyelocytic leukaemia HL60 cells. Possible involvement of free radicals and correlation with phosphorylation of nuclear protein 1b. *Biochem J.* 15;248(3):649-56
- <sup>215</sup>. Uberall F, Maly K, Egle A, Doppler W, Hofmann J, Grunicke HH.(1991) Inhibition of cell proliferation, protein kinase C, and phorbol ester-induced fos expression by the dihydropyridine derivative B859-35. *Cancer Res.* 1;51(21):5821-5
- <sup>216</sup>. Geilen CC, Haase R, Buchner K, Wieder T, Hucho F, Reutter W (1991) The phospholipid analogue, hexadecylphosphocholine, inhibits protein kinase C in vitro and antagonises phorbol ester-stimulated cell proliferation. *Eur J Cancer* 27:1650-1653

- 
- <sup>217</sup>. Thomas Wieder, Werner Reutter, Constantin E. Orfanos and Christoph C. Geilen.(1999) Mechanisms of action of phospholipid analogs as anticancer compounds. *Progress in Lipid Research*, Volume 38, Issue 3, Pages 249-259
- <sup>218</sup>. Watson SP, McNally J, Shipman LJ, and Godfrey PP.(1988) The action of the protein kinase C inhibitor, staurosporine, on human platelets. Evidence against a regulatory role for protein kinase C in the formation of inositol trisphosphate by thrombin. *Biochem J.* 15; 249(2): 345–350
- <sup>219</sup>. Furusaki A, Hashiba N, Matsumoto A, Hirano A, Iwai Y, and Omura S (1978) X-ray crystal structure of staurosporine: a new alkaloid from *Streptomyces* strain. *J Chem Soc Chem Commun* 1978, 800-801
- <sup>220</sup>. Tamaoki, T., Nomoto, H., Takahashi, I., Kato, Y., Morimoto, M. and Tomita, F.(1986) Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca<sup>2+</sup> dependent protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135: 397–402
- <sup>221</sup>. Meyer T, regenass U, Fabbro D.(1989) A derivative of staurosporine (CGP-41-251) shows selectivity for protein kinase C inhibition and in vitro anti-proliferative as well as in vivo anti-tumor activity. *Int J Cancer* 43:851-856
- <sup>222</sup>. Andreas Gescher (1998) Analogs of Staurosporine: Potential Anticancer Drugs? *General Pharmacology: The Vascular System*, Volume 31, Issue 5, Pages 721-728
- <sup>223</sup>. Leong SS, Horoszewicz JS, Shimaoka K, Firedman M, Kawinski E, Song MJ, Zeigel Z, Chu Tm, Baylin SB, Mirand EA.(1981) A new cell line for study of human medullary carcinoma. In: Andreoli M (ed) *Advances in thyroid neoplasia*. Rome:95
- <sup>224</sup>. Cooley LD, Elder FFB, Knuth A, Gagel RF.(1995) Cytogenetic characterization of three human and three rat medullary thyroid carcinoma lines. *Cancer Genet Cytogenet* 80:138-149
- <sup>225</sup>. Frendo JL, Pichaud F, Delange- Morroux R, Bouizar Z, Segond N, Moukhtar MS, Julienne A.(1994) An isoform of the human calcitonin receptor is expressed in TT cells and in medullary carcinoma of the thyroid. *FEBS Lett.* 342:214-216

- 
- <sup>226</sup>. Zabel M, Seidel J, Kaczmarek A, Surdyk-Zasada J, Grzeszkowiak J, Gorny A.(1995) Immunocytochemical characterization of two thyroid medullary carcinoma cell lines in vitro. *Histochemical J* 27:859-868
- <sup>227</sup> Molè et al MTC
- <sup>228</sup>. Fields AP, Gustafson WC.(2003) Protein kinase C in disease: cancer. *Methods Mol Biol* 233:519-37
- <sup>229</sup>. Dal Pra I, Whitfield JF, Chiarini A, Armato U.(2000) Increased activity of the protein kinase C-delta holoenzyme in the cytoplasmic particulate fraction precedes the activation of caspases in polyomavirus-transformed pyF111 rat fibroblasts exposed to calphostin C or topoisomerase-II inhibitors , *Experimental Cell Research* , 255 , 171-183
- <sup>230</sup>. Graff JR, McNulty AM, Hanna KR, Konicek BW, Lynch RL, Bailey SN, Banks C, Capen A, Goode R, Lewis JE, Sams L, Huss KL, Campbell RM, Iversen PW, Neubauer BL, Brown TJ, Musib L, Geeganage S & Thornton D 2005 The protein kinase C $\beta$ -selective inhibitor, Enzastaurin (LY317615.HCl), suppresses signaling through the AKT pathway, induces apoptosis, and suppresses growth of human colon cancer and glioblastoma xenografts. *Cancer Research* 65 7462–7469
- <sup>231</sup>. Carducci MA, Musib L, Kies MS, Pili R, Truong M, Brahmer JR, Cole P, Sullivan R, Riddle J, Schmidt J, Enas N, Sinha V, Thornton DE & Herbst RS 2006 Phase I dose escalation and pharmacokinetic study of Enzastaurin, an oral protein kinase C beta inhibitor, in patients with advanced cancer. *Journal of Clinical Oncology* 24 4092-4099.
- <sup>232</sup>. Mendez CF, Leibiger IB, Leibiger B, Høy M, Gromada J, Berggren PO & Bertorello AM 2003 Rapid association of protein kinase C-epsilon with insulin granules is essential for insulin exocytosis. *Journal of Biological Chemistry* 278 44753-44757
- <sup>233</sup>. Graff JR, McNulty AM, Hanna KR, Konicek BW, Lynch RL, Bailey SN, Banks C, Capen A, Goode R, Lewis JE, Sams L, Huss KL, Campbell RM, Iversen PW, Neubauer BL, Brown TJ, Musib L, Geeganage S & Thornton D 2005 The protein kinase C $\beta$ -selective inhibitor, Enzastaurin (LY317615.HCl), suppresses signaling through the

---

AKT pathway, induces apoptosis, and suppresses growth of human colon cancer and glioblastoma xenografts. *Cancer Research* 65 7462–7469

<sup>234</sup>. Querfeld C, Rizvi MA, Kuzel TM, Guitart J, Rademaker A, Sabharwal SS, Krett NL & Rosen ST 2006 The selective protein kinase C $\beta$  inhibitor Enzastaurin induces apoptosis in cutaneous T-cell lymphoma cell lines through the AKT pathway. *Journal of Investigational Dermatology* 126 1641–7

<sup>235</sup>. Wulbrand U, Remmert G, Zofel P, Wied M, Arnold R & Fehmann HC 2000 mRNA expression patterns of insulin-like growth factor system components in human neuroendocrine tumours. *European Journal of Clinical Investigation* 30 729–739

<sup>236</sup>. Grozinsky-Glasberg S, Franchi G, Teng M, Leontiou CA, Ribeiro de Oliveira Jr A, Dalino P, Salahuddin N, Korbonits M & Grossman AB 2008 Octreotide and the mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) block proliferation and interact with the Akt-mTOR-p70S6K pathway in a neuro-endocrine tumour cell Line. *Neuroendocrinology* 87 168–181

<sup>237</sup>. von Wichert G, Jehle PM, Hoeflich A, Koschnick S, Dralle H, Wolf E, Wiedenmann B, Boehm BO, Adler G & Seufferlein T 2000 Insulin-like growth factor-I is an autocrine regulator of chromogranin A secretion and growth in human neuroendocrine tumor cells. *Cancer Research* 60 4573-4581

<sup>238</sup>. Kuo WL, Liu J, Mauceri H, Vokes EE, Weichselbaum R, Rosner MR & Cohen EE 2010 Efficacy of the multi-kinase inhibitor Enzastaurin is dependent on cellular signaling context. *Molecular Cancer Therapeutics* 9 2814-2824

<sup>239</sup>. Teicher BA, Menon K, Alvarez E, Galbreath E, Shih C & Faul MM 2001b Antiangiogenic and antitumor effects of a protein kinase C $\beta$  inhibitor in murine lewis lung carcinoma and human Calu-6 non-small-cell lung carcinoma xenografts. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 48 473–480

<sup>240</sup>. Casey EM, Harb W, Bradford D, Bufill J, Nattam S, Patel J, Fisher W, Latz JE, Li X, Wu J & Hanna N 2010 Randomized, double-blinded, multicenter, phase II study of pemetrexed, carboplatin, and bevacizumab with Enzastaurin or placebo in chemo-naïve patients with stage IIIB/IV non-small cell lung cancer: Hoosier Oncology Group LUN06-116. *Journal of Thoracic Oncology* 5:1815-1820.

- 
- <sup>241</sup>. Richards DA, Kuefler PR, Becerra C, Wilfong LS, Gersh RH, Boehm KA, Zhan F, Asmar L, Myrand SP, Hozak RR, Zhao L, Gill JF, Mullaney BP, Obasaju CK & Nicol SJ 2011 Gemcitabine plus Enzastaurin or single-agent gemcitabine in locally advanced or metastatic pancreatic cancer: results of a phase II, randomized, noncomparative study. *Investigational New Drugs* 29 144-153.
- <sup>242</sup>. Zatelli MC, Torta M, Leon A, Ambrosio MR, Gion M, Tomassetti P, De Braud F, Delle Fave G, Dogliotti L & degli Uberti EC; Italian CromaNet Working Group 2007 Chromogranin A as a marker of neuroendocrine neoplasia: an Italian Multicenter Study. *Endocrine-Related Cancer* 14 473-482
- <sup>243</sup>. Gong J, Lee J, Akio H, Schlegel PN & Shen R 2007 Attenuation of apoptosis by Chromogranin A-induced Akt and Survivin pathways in prostate cancer cells. *Endocrinology* 148 4489-4499
- <sup>244</sup>. Jaken S & Parker PJ 2000 Protein kinase C binding partners. *BioEssays* 22 245-254
- <sup>245</sup>. Hocevar BA, Burns DJ & Fields AP 1993 Identification of protein kinase C (PKC) phosphorylation sites on human lamin B. Potential role of PKC in nuclear lamina structural dynamics. *Journal of Biological Chemistry* 268 7545- 7552
- <sup>246</sup>. Murray NR & Fields AP 1998 Phosphatidylglycerol is a physiologic activator of nuclear protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry* 273 11514-11520
- <sup>247</sup>. Knauf, J.A., Ward, L.S., et al., 2002. Isozyme-specific abnormalities of PKC in thyroid cancer: evidence for post-transcriptional changes in PKC epsilon. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 2150-2159.
- <sup>248</sup>. Carducci, M.A., Musib, L., et al., 2006. Phase I dose escalation and pharmacokinetic study of Enzastaurin, an oral protein kinase C beta inhibitor, in patients with advanced cancer. *J. Clin. Oncol.* 24, 4092-4099.
- <sup>249</sup>. Chiarini, A., Whitfiels, J.F., et al., 2002. Protein Kinase C- $\beta$ II is an apoptotic lamin kinase in polyomavirus-transformed, etoposide-treated pyF111 rat fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 277, 18827-18839.
- <sup>250</sup>. Care, A.D., Abbas, S.K., et al., 1998. Stimulatory effect of insulin on calcitonin secretion. *Horm. Metab. Res.* 30, 200-205.

- 
- <sup>251</sup>. Abbasi, A., Corpeleijn, E., et al., 2010. Plasma procalcitonin is associated with obesity, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, E26-31.
- <sup>252</sup>. Wong, C.K., Lai, T., et al., 2006. Insulin-like growth factors (IGF) I and II utilize different calcium signaling pathways in a primary human parathyroid cell culture model. *World J. Surg.* 30, 333-345.
- <sup>253</sup>. Graff, J.R., McNulty, A.M., et al., 2005. The protein kinase C $\beta$ -selective inhibitor, Enzastaurin (LY317615.HCl), suppresses signaling through the AKT pathway, induces apoptosis, and suppresses growth of human colon cancer and glioblastoma xenografts.
- <sup>254</sup>. Spalding, A.C., Watson, R., Davis, M.E., et al., 2007. Inhibition of protein kinase C $\beta$  by Enzastaurin enhances radiation cytotoxicity in pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* 13, 6827-6833.
- <sup>255</sup>. Spalding, A.C., Watson, R., Davis, M.E., et al., 2007. Inhibition of protein kinase C $\beta$  by Enzastaurin enhances radiation cytotoxicity in pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* 13, 6827-6833.
- <sup>256</sup>. Giovannetti, E., Honeywell, R., et al., 2010. Pharmacological aspects of the Enzastaurin-pemetrexed combination in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Curr. Drug Targets* 11, 12-28.
- <sup>257</sup>. Graff, J.R., McNulty, A.M., et al., 2005. The protein kinase C $\beta$ -selective inhibitor, Enzastaurin (LY317615.HCl), suppresses signaling through the AKT pathway, induces apoptosis, and suppresses growth of human colon cancer and glioblastoma xenografts.
- <sup>258</sup>. Cerrato, A., De Falco, V., et al., 2009. Molecular genetics of medullary thyroid carcinoma: the quest for novel therapeutic targets. *J. Mol. Endocrinol.* 43, 143-155.
- <sup>259</sup>. Scheid, M.P., Marignani, P.A., et al., 2002. Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B. *Mol. Cell. Biol.* 22, 6247-6260.
- <sup>260</sup>. Goekjian PG, Jirousek MR.(2001) Protein kinase C inhibitors as novel anticancer drugs. *Expert Opin Investig Drugs* 10(12):2117-2140
- <sup>261</sup>. Kawakami, T., Kawakami, Y., et al., 2002. Protein kinase C beta (PKC beta): normal functions and diseases. *J. Biochem.* 132, 677-682.

